



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Quantification de cytokines bovines par RT-PCR

Jossin, Yves

Award date:
1997

[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

Quantification de cytokines bovines par RT-PCR

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

Biologiques

Yves JOSSIN

1997

QUANTIFICATION DE CYTOKINES BOVINES PAR RT-PCR

JOSSIN Yves

Résumé

Le paradigme Th1/Th2 s'avère être un modèle très utile dans la compréhension des réponses immunitaires. L'identification des cytokines induites par différents pathogènes n'est pourtant pas suffisante car, dans le cas de l'analyse de profils Th1/Th2, il est nécessaire de calculer des rapports quantitatifs entre diverses cytokines. Bien que de nombreuses techniques existent dans les modèles humains et murins, peu de choses ont été réalisées à ce sujet chez le bovin.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons mis au point une technique de détection et de quantification des ARN messagers de l'IFN γ , de l'IL2 et de l'IL10 bovines. Cette technique consiste en une reverse transcription (RT) non spécifique d'ARN messagers à partir d'ARN totaux suivie d'une PCR spécifique des cDNA d'une cytokine donnée. Cette PCR se fait en compétition pour les mêmes amorces entre le cDNA et un standard interne en concentration connue. Ce standard est un plasmide contenant un insert dont la séquence est celle du cDNA cible mais comportant une délétion d'une cinquantaine de paires de bases. Cette délétion permet de séparer les deux amplicons suivant leurs tailles lors d'une migration en gel d'électrophorèse. La quantification est alors réalisée par densitométrie.

La technique a été optimisée et validée sur de l'ARN extrait de PBMC bovines stimulées non spécifiquement *in vitro* avec de la concanavaleine A qui induit la transcription, entre autres, des ARNm étudiés.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1997

Promoteur: J.-J. Letesson

Mes remerciements iront d'abord au Docteur J.J. Letesson pour m'avoir accepté en son laboratoire et pour sa disponibilité au cours de ces quatre mois de mémoire.

Merci à Isabelle Knott pour m'avoir épaulé et enseigné les rudiments du métier en si peu de temps.

Merci également à Pascal Mertens et à Xavier Debolle qui m'ont arrosé de leur savoir et de nombreux conseils judicieux.

N'oublions pas Vincent Weynants, Philippe Denoël, Anne Tibor, Fabrice, Dominique, Christian, J-P, Sandra, Ayman et tout ceux et celles que j'oublie à l'instant de l'écriture de ces quelques lignes mais dont le souvenir reste gravé en moi pour l'éternité. Merci donc à toutes ces personnes sans qui la chaleur du labo n'aurait pas été celle que j'ai connue.

Que serais-je devenu sans Max, Olivier, Thomas et Christophe ? Ne dit-on pas que la souffrance est plus supportable lorsqu'on la subit à plusieurs ! Vous voir dans le même état de stress que moi lors des dernières heures de rédaction de nos mémoires m'a procuré un soulagement intense.

Toute ma gratitude à Laurent d'Aries sans qui la qualité des photos ne serait pas ce qu'elle est.

Une place d'honneur en cette page revient à mes parents qui m'ont permis de parcourir mes études dans les meilleures conditions.

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	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
β 2m	β 2 microglobuline
BRSV	Bovine Respiratory Syncytial Virus
CD	Cluster of Differentiation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTL	Cytotoxic Lymphocyte
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DO	Densité Optique
DTH	Delayed Type Hypersensitivity (Hypersensibilité retardée)
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
INF γ	Interféron γ
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- κ B	Nuclear factor κ 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 Immunodéficitaire Acquis

TcR T	T Cell Receptor
Th	T helper lymphocyte
Tm	Melting Temperature
TNF- β	Tumor Necrosis Factor- β

A. Introduction

I. Immunité spécifique et immunité naturelle	1
I.1. L'immunité naturelle	1
I.2. L'immunité spécifique.....	3
I.2.1. Médiateurs cellulaires	3
I.2.1.1. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA).....	3
I.2.1.2. Les lymphocytes B.....	4
I.2.1.3. Les lymphocytes T.....	4
I.2.2. Médiateurs solubles.....	5
I.2.2.1. Les anticorps.....	5
I.2.2.2. Les cytokines.....	6
I.3. Réponse humorale et réponse cellulaire	7
I.3.1. Réponse humorale.....	7
I.3.2. Réponse cellulaire.....	8
II. L'importance des lymphocytes Th 1 et Th2	8
II.1. Caractérisation de Th1 et Th2	9
II.2. Réponses immunitaires où le biais Th1/Th2 est important	10
II.3. Caractéristiques des principales cytokines caractérisant TH1/TH2	11
II.3.1. IL2	11
II.3.2. IFNγ.....	11
II.3.3. IL4	12
II.3.4. IL10	13
II.4. La régulation croisée : Th1 contre Th2	13
II.5. Choix de l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 ou Th2.....	14
II.5.1. La différenciation des précurseurs de cellules T	15
II.5.2. Influence de l'environnement cytokinique	15
II.5.3. Influence des cellules présentatrices de l'antigène.....	17
II.6. La dichotomie chez les CD8 ⁺	18

III. Les cytokines bovines	19
III.1. Importance de ces cytokines dans différentes maladies bovines	19
IV. But du travail.....	20

B. Matériel & méthodes

I. Isolement de cellules mononucléées sanguines périphériques bovines	22
II. Stimulation de cellules mononucléées sanguines (PBMCs)	24
III. Extraction et précipitation de l'ARN total.....	24
IV. Quantification par spectrophotométrie de l'ADN et de l'ARN.....	26
V. Amplification et extraction des plasmides	27
V.1. amplification des plasmides	27
V.2. Extraction par Midiprep	29
V.3. Restriction des plasmides.....	30
VI. Séquençage des inserts.....	31
VII. Electrophorèse d'ADN et d'ARN en gel d'agarose.....	33
VIII. RT-PCR.....	35
IX. Quantification d'ARNm par RT-PCR en présence d'un standard interne	38
X. ELISA	39

C. Résultats & discussions

I. Extraction d'ARN total sur PBMC stimulés non spécifiquement.....	42
I.1. Vérification de la qualité de l'ARN.....	42
I.2. Détection des ARNm de l'IFN γ , IL2, IL4 et de l'IL10 bovins par RT-PCR.....	43

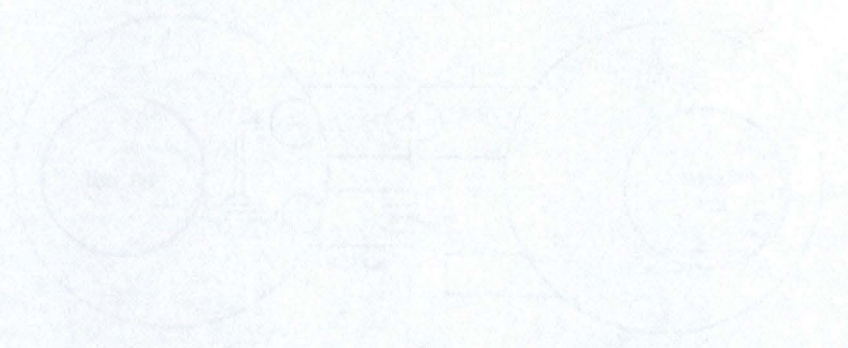
I.2.1. Détection de l'IFN γ par ELISA	44
I.3. Détection d'ARNm de PBMC stimulées ou non.....	45
II. PCR sur les plasmides compétiteurs	46
II.1. Séquençage des plasmides.....	47
III. Mise au point de la quantification avec les plasmides compétiteurs.....	47
IV. Mise au point de la PCR compétitive sur les plasmides.....	49
IV.1. Détermination du seuil de détection de la PCR.....	49
IV.2. Validation de la stratégie PCR compétitive.....	50
V. Problèmes inhérents à la PCR compétitive concernant l'IFNγ et l'IL1053	

D. Conclusions et perspectives

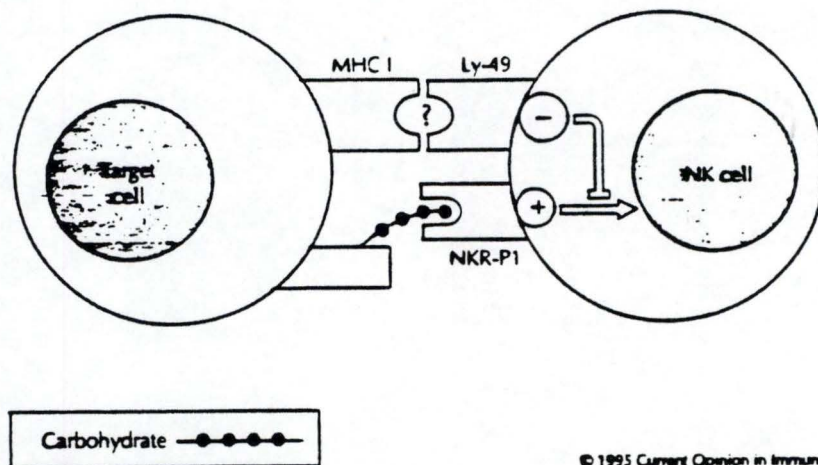
Conclusions et perspectives	56
--	-----------

E. Bibliographie

Bibliographie.....	61
---------------------------	-----------



Introduction



© 1995 Current Opinion in Immunology

Fig.A.1.1. : L'habileté du NK à tuer serait contrôlée par un équilibre entre des signaux d'activation et d'inhibition envoyés par deux types de récepteurs différents. L'activation est médiée par la liaison au récepteur d'activation, le NKR-P1, de ligands spécifiques largement distribués tels que des hydrates de carbone, ce qui induit une activation constante qui est contrôlée par des récepteurs inhibiteurs, Ly-49, qui se lient aux molécules du CMH I de la cellule cible (d'après Yokoyama, 1995)

I. Immunité spécifique et immunité naturelle

La réponse immunitaire est un mélange de deux types de réponses : la réponse naturelle, ou non adaptative, et la réponse adaptative, ou spécifique, qui ont entre elles de nombreuses interactions .

Le lieu de l'infection, la nature et la dose de l'agent infectieux déterminent quel type de réponse immunitaire sera efficace (O'Garra & Murphy, 1994). Ce système immunitaire développera une réaction destinée à éliminer le pathogène ou toute autre substance étrangère après l'avoir reconnue comme telle .

I.1. L'immunité naturelle

L'immunité naturelle constitue une première ligne de défense. Elle est immédiate, préexistante et ne possède pas de mémoire. On y distingue, tout comme pour l'immunité spécifique, une composante cellulaire et une composante soluble .

Les cellules impliquées sont les cellules phagocytaires et les Natural Killers (NK) .

De nombreux types cellulaires possèdent des propriétés phagocytaires: macrophages, monocytes, PMN neutrophiles, cellules de Kupffer, etc... Leur rôle est de phagocyter toutes sortes de particules. En plus de leur propriété phagocytaire, les macrophages sont importants par le fait qu'ils communiquent avec les acteurs spécifiques du système immunitaire en tant que cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles et par leurs sécrétions cytokiniques .

Le NK est une cellule cytotoxique. Sa fonction est de reconnaître et de détruire les cellules autologues qui ont perdu l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). L'habileté du NK à tuer serait contrôlée par un équilibre entre des signaux d'activation et d'inhibition envoyés par deux types de récepteurs différents. L'activation est médiée par la liaison, à un type de récepteur , de ligands spécifiques largement distribués tels que des hydrates de carbone, ce qui induit une activation constante qui est contrôlée par des récepteurs inhibiteurs qui se lient aux molécules du CMH I de la cellule cible (Colona, 1996)(fig. A.I.1.).Le NK peut également jouer un rôle dans l'immunité spécifique .

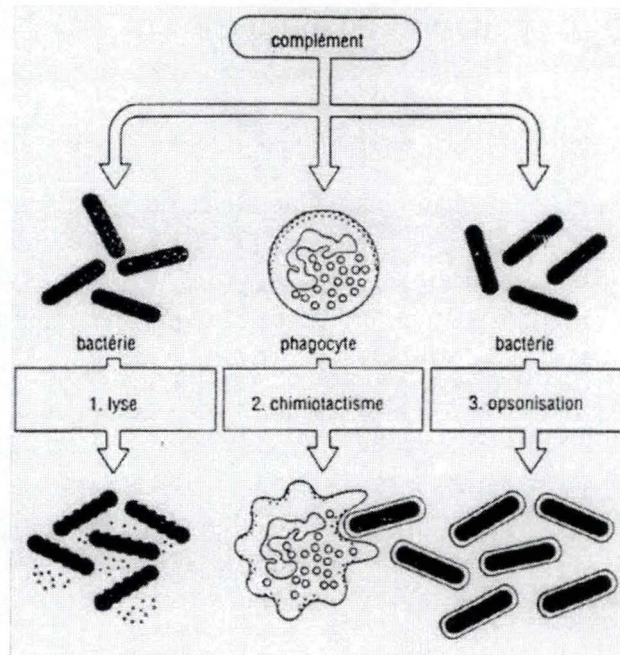


Fig.A.I.2. : Les différentes fonctions du complément (d'après Roitt, 1993).

LES TYPES D'INTERFÉRONS

La classification des interférons en deux groupes principaux est fondée sur leurs différences de structures et de propriétés. Les deux types de molécules perturbent la réplication virale et modulent l'activité du système immunitaire. Les interférons de type I interviennent surtout dans la résistance des cellules à l'infection virale, et les interférons de type II dans le fonctionnement du système immunitaire.

	TYPE I	TYPE II
PRINCIPAUX TYPES	Alpha et bêta	Gamma
AUTRES TYPES	Tau et oméga	Aucun
STRUCTURE	Une seule chaîne d'acides aminés	Deux chaînes associées d'acides aminés
PRODUITS PRINCIPALEMENT PAR :	Presque toutes cellules infectées par un virus, pour l'interféron alpha ; les fibroblastes, pour l'interféron bêta	Lymphocytes T et cellules tueuses
PRINCIPAUX EFFETS	Provoque la production de protéines qui inhibent la prolifération des virus	Stimule la partie du système immunitaire qui lutte contre les tumeurs et contre les infections

Fig. A.I.3. : Les différents types d'IFN γ (d'après Johnson et al., 1994).

Les médiateurs solubles impliqués dans l'immunité naturelle comprennent le système du complément, les protéines de la phase aiguë et le système des interférons (IFN).

- Le système du complément est l'un des systèmes enzymatiques du sérum. Il intervient dans l'inflammation (chimiotactisme des cellules phagocytaires), dans l'opsonisation des particules antigéniques (y compris les micro-organismes) et dans la destruction des pathogènes (fig.A.1.2.). Le système est constitué de molécules sériques qui peuvent être activées selon deux voies : la voie alterne et la voie classique. Les composants du complément interagissent les uns sur les autres de telle sorte que le produit d'une réaction est l'enzyme catalysant la suivante. C'est ce qu'on appelle la « cascade enzymatique ».

La voie alterne est activée en présence de surface ou de molécules activatrices, en particulier des produits d'origine microbienne. La voie classique, quant à elle, appartient aux réactions spécifiques car elle est activée par la liaison des molécules du complément avec des complexes immuns.

- Les protéines de la phase aiguë sont des molécules sériques dont la concentration augmente rapidement au moment de l'infection. La plus connue est la protéine C réactive (CRP) qui s'adsorbe sur les intrus et sert d'opsonine non-spécifique.

- Les interférons sont des molécules qui limitent l'extension des infections virales. Trois types coexistent : l'IFN α et l'IFN β produits par presque tous les types cellulaires et l'IFN γ produits par les lymphocytes T et les NK (fig.A.1.3). Les IFN produits par les cellules infectées par un virus ou autre parasite intracellulaire ou produits par les cellules activées se lient aux récepteurs des cellules voisines, les induisant ainsi à fabriquer des protéines antivirales dont le but est d'inhiber la transcription et la traduction. Une de ces protéines est l'eIF-2-alpha protéine kinase, qui, une fois activée, phosphoryle l'un des constituants nécessaires à l'élaboration de la plus petite des deux sous-unités du ribosome et ainsi bloque cette élaboration. Ce qui induit l'arrêt de la synthèse protéique. L'eIF-2-alpha protéine kinase nouvellement synthétisée ne devient active que lorsqu'elle se trouve en présence d'ARN double brin, lequel n'est présent dans la cellule que lorsqu'un virus s'y réplique. Ainsi, elle ne perturbe pas la traduction dans les cellules saines. Les IFN règlent également la synthèse d'enzymes nommées 2'-5'-oligo-A synthétases, qui perturbent également la production de protéines virales, en activant d'autres enzymes qui détruisent l'ARN avant qu'il ne soit traduit. D'autres protéines induites par les IFN agissent dans le ralentissement de la

croissance des tumeurs (Johnson , 1994). L'IFN γ présente en plus un certain nombre d'activités immunomodulatrices liées à l'immunité spécifique .

I.2.L'immunité spécifique

Cette réponse du système immunitaire est spécifique de l'agent qui l'a induite et se caractérise par une augmentation de la réponse à chaque rencontre avec cet agent. Ainsi, les caractéristiques majeures de la réponse immune adaptative sont : la mémoire et la spécificité. On y distingue également des médiateurs cellulaires et des médiateurs solubles .

I.2.1.Médiateurs cellulaires

I.2.1.1Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA)

Les CPA sont des cellules définies fonctionnellement par leur capacité à capter l'antigène et à le présenter aux lymphocytes sous une forme reconnaissable. Certains antigènes sont captés dans la périphérie et transportés jusque dans les tissus lymphoïdes secondaires, alors qu'il existe d'autres CPA qui sont normalement résidentes dans un organe et qui interceptent l'antigène lorsqu'il arrive.

Alors que les lymphocytes B reconnaissent l'antigène sous sa forme native, les lymphocytes T reconnaissent des peptides antigéniques qui ont été associés aux molécules du CMH. Les particules extracellulaires sont phagocytées par les CPAs tels que macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans ... Après l'ingestion, il y a digestion dans le phagolysosome puis présentation en membrane en association avec les molécules du CMH néosynthétisées de classe II. La reconnaissance spécifique de ces complexes par le récepteur spécifique TcR (T cell récepteur) du lymphocyte T CD4+ apporte le premier signal d'activation de celui-ci .

Toutes les cellules nucléées infectées par un virus ou un autre pathogène intracellulaire peuvent présenter des molécules antigéniques de cet envahisseur en association avec des molécules du CMH de classe I. Les protéines étrangères sont dégradées dans le cytosol puis transportées activement dans le réticulum endoplasmique puis montées en membrane en

association avec les molécules de classe I. Ce complexe est reconnu par le TcR des lymphocytes T CD8⁺.

1.2.1.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B reconnaissent des antigènes grâce à leurs récepteurs spécifiques qui sont des immunoglobulines M (Ig M) de surface. Sous l'influence de cytokines, ils se différencient en plasmocytes qui sécrètent des anticorps spécifiques qui sont de structure similaire aux Ig M de surface mais sous forme soluble et peuvent différer par leur chaîne lourde (cfr. point 1.2.2.1.).

Les cellules B peuvent également avoir un rôle important de cellules présentatrices de l'antigène.

1.2.1.3. Les lymphocytes T

Tout comme les lymphocytes B, les lymphocytes T reconnaissent spécifiquement les éléments étrangers et non étrangers mais ne sont activés, normalement, que par les antigènes « non-self ». Dans le cas contraire, ils entreraient en état d'anergie. Mais les cellules T, au contraire des lymphocytes B qui reconnaissent des antigènes natifs, reconnaissent des particules antigéniques qui ont été dégradées et présentées en association avec des molécules du CMH par les CPA. Cette reconnaissance se fait par un récepteur pour l'antigène en surface appelé TcR (T cell récepteur).

Pour reconnaître de façon spécifique l'énorme variété d'antigènes différents, les récepteurs pour l'antigène, considérés comme un ensemble, doivent présenter un niveau au moins équivalent de diversité. Chaque lymphocyte ne synthétisant qu'un seul type de récepteur pour l'antigène, ils sont donc monospécifiques. Dans la mesure où les récepteurs sont différents pour chaque clone de cellules, la population lymphocytaire, envisagée comme un tout, présente une très grande diversité de récepteurs spécifiques .

Les lymphocytes T peuvent être subdivisés en différents groupes suivant leur phénotype et leur fonction en : lymphocytes T helper (Th) et lymphocytes T cytotoxiques (Tc).

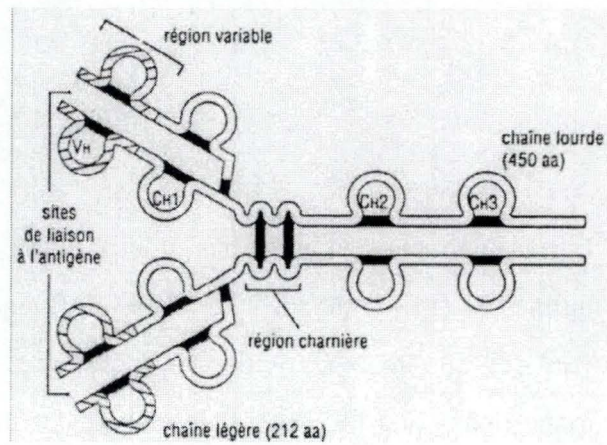


Fig. A.I.4. : Schéma général d'une immunoglobuline G1. *VH* et *VL* sont respectivement les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères. *CH1*, *CH2* et *CH3* sont les trois domaines globulaires de la partie constante de la chaîne lourde (d'après Roitt, 1993)

Les Tc sont responsables de la reconnaissance et destruction des cellules infectées par des étrangers intracellulaires et sont de phénotype CD8⁺ (Legros & Erard , 1994).

Les Th ou CD4⁺ sont responsables de l'assistance au lymphocytes B dans leur réponse anticorps, de l'activation des phagocytes afin qu'ils détruisent les pathogènes internalisés, de l'assistance aux Tc et, enfin, du contrôle du niveau et de la qualité de la réponse immunitaire.

Il existe encore une autre population de Ly T : les Ly T $\gamma\delta$. Ces lymphocytes possèdent un récepteur TcR $\gamma\delta$ dont la structure ressemble à celle de son homologue $\alpha\beta$ qui est celui des lymphocytes T cités plus haut (Roitt , 1993). In vitro, les Ly T $\gamma\delta$ ont une activité « NK-like » et sont IL 2-dependants. Ils peuvent sécréter de l'IFN γ et du TNF α . On peut considérer qu'ils font partie des premières lignes de défense non-spécifique car la diversité de leur récepteur TcR est faible et que la plupart des Ly T $\gamma\delta$ se trouvent en périphérie de la peau, des intestins, etc ... Chez la souris et l'homme, les Ly T $\gamma\delta$ constituent 1 à 10 % de la population totale des cellules T alors que chez les jeunes ruminants, ils atteignent 75 % (Brown et al , 1993).

I.2.2.Médiateurs solubles

I.2.2.1.Les anticorps

Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig), produites par les lymphocytes B activés, sont en fait les formes solubles des récepteurs membranaires pour l'antigène chez le lymphocyte B (fig. A.I.4.).

Les anticorps sont des molécules bi-fonctionnelles. Leur première fonction est de se lier à l'antigène, l'autre étant d'interagir avec les systèmes effecteurs. Ils peuvent agir en tant qu'Ac bloquant des fonctions nécessaires à la survie de l'envahisseur, comme par exemple empêcher un virus de se lier à sa cellule cible, mais la plupart des fonctions des Ac nécessitent la liaison des complexes Ag-Ac aux récepteurs Fc des cellules effectrices. Les Ac agissent alors comme des opsonines, permettant ainsi aux éléments du système immunitaire spécifique mais aussi du système non spécifique, par exemple l'activation du complément par la voie classique, de reconnaître spécifiquement des micro-organismes et leurs produits.

Les différentes classes et sous-classes se différencient par leur chaîne lourde et interagissent donc avec des cellules différentes.

	Sources	Cibles	Action	Mode d'action
Hormones	Sécrétées principalement par un seul type de cellule spécialisée et localisée	Spécificité vis à vis d'une cellule cible principale	L'activité est essentiellement unique	Endocrine
Cytokines	Produites par plusieurs types cellulaires (except. IL-2, TNF β)	Cellules hématopoïétiques et de nombreuses autres cellules	Large spectre d'activité et redondance	Autocrine Paracrine \pm Endocrine

Fig. A.I.5. : Comparaison entre cytokines et hormones (d'après Cavaillon, 1993)

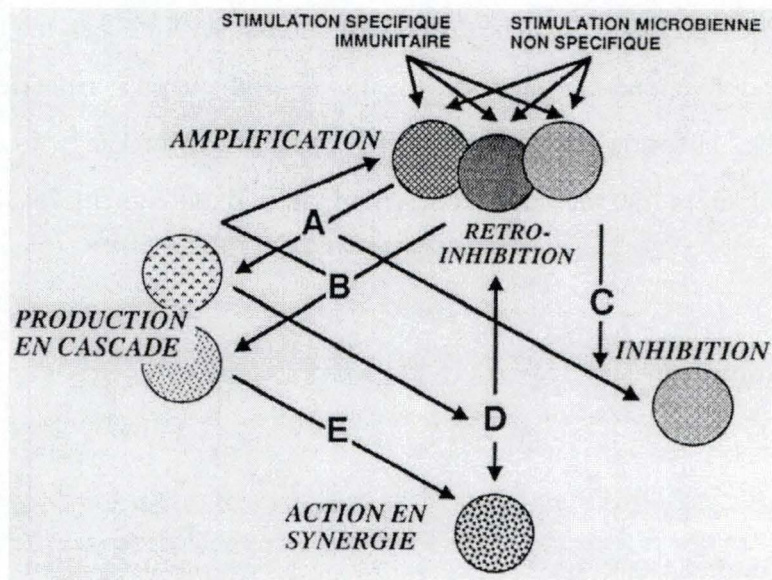


Fig. A.I.6. : Le réseau cytokinique (d'après Cavaillon, 1993)

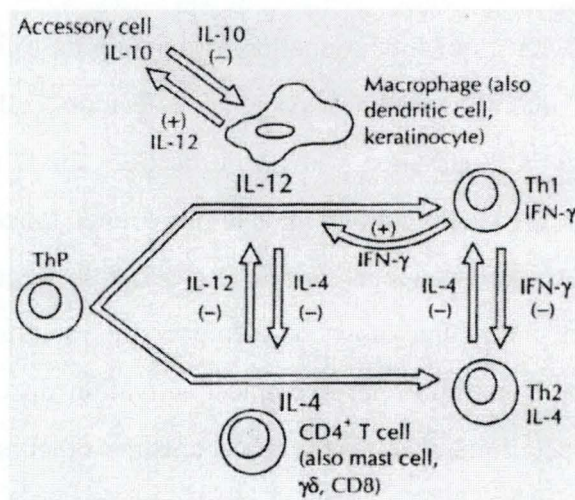


Fig. A.I.7. : Exemple d'interactions cytokiniques (d'après Reiner & Seder, 1995)

1.2.2.2. Les cytokines

Les cytokines sont des polypeptides (120 à 180 acides aminés) glycosylés ou non, de faible poids moléculaire (15 à 25 kDa) et produits principalement par les lymphocytes T mais aussi par les phagocytes mononucléés, les lymphocytes B et autres cellules.

Leur rôle est très important car elles permettent un « dialogue » entre les différentes cellules et donc une cohérence dans la réponse immunitaire. Ce dialogue ou « coopération cellulaire » peut aboutir à la prolifération cellulaire, la production d'anticorps, la différenciation de cellules cytotoxiques, l'augmentation de l'activité microbicide et/ou à l'augmentation de l'hématopoïèse (Cavaillon, 1993).

Les cytokines sont effectives à faible concentration. Néanmoins, l'effet engendré est étroitement dépendant de sa concentration et de l'état de différenciation de la cellule cible, c'est-à-dire de la présence ou non de récepteurs en quantité suffisante, spécifique pour chaque cytokine. Toute cellule capable de répondre à l'une ou l'autre de ces cytokines, doit obligatoirement posséder un récepteur pour celle-ci. La régulation du réseau cytokinique se donc également à ce niveau (Cavaillon, 1993).

Ce qui distingue les cytokines des hormones, c'est la diversité des cellules sources potentielles, le nombre de cellules cibles différentes, une activité aussi bien autocrine que paracrine et parfois même endocrine (IL 1, IL 6, TNF ...), un nombre de récepteur beaucoup plus petit. (fig. A.I.5.)

Souvent, une cytokine induit la sécrétion d'autres cytokines, d'elle-même, de son propre récepteur ou de celui d'autres cytokines et ceci sur la cellule qui la secrète ou sur une autre cellule, ce qui engendre une cascade de production cytokinique (fig. A.I.6.).

En conditions naturelles, les cellules sont sous l'influence d'un cocktail de cytokines. De plus, la séquence d'arrivée temporelle a aussi son importance (Cavaillon, 1993).

Un exemple illustrant ceci est celui où une APC professionnelle secrète de l'IL 12, ce qui induit la présence de son récepteur sur le Ly Th qui lui fait contact et induit la sécrétion d'IFN γ ; cet IFN γ augmente la sécrétion d'IL 12 par l'APC ; l'IL 12 induit également la sécrétion d'IL 10 par des cellules accessoires, ce qui inhibe la sécrétion d'IL 12 ; l'IFN γ inhibe également la sécrétion d'IL 4 par d'autres Ly Th, cet IL 4 pouvant inhiber les sécrétions d'IL 12 (Reiner & Seder, 1995) (fig. A.I.7.).

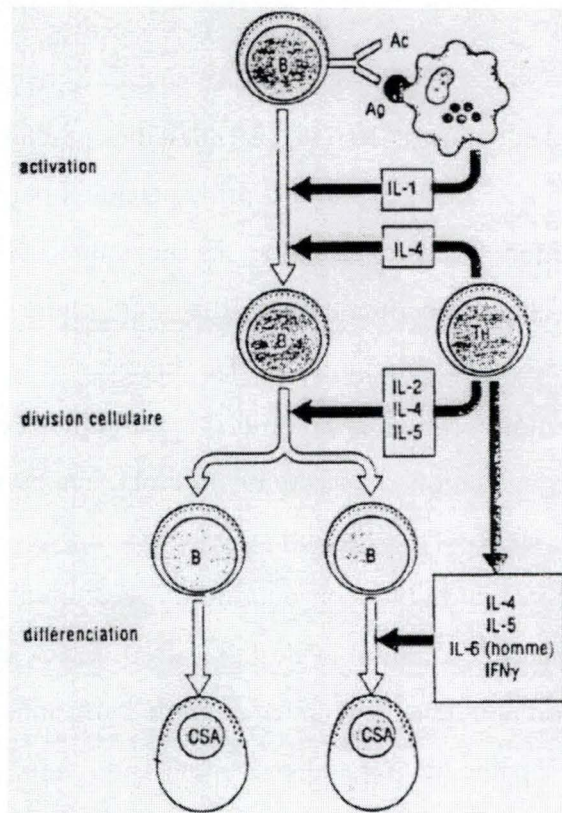


Fig. A.I.8. : Activation d'une cellule B pour une réponse humorale (d'après Roitt, 1993)

Mais les cytokines ne sont pas le seul moyen pour les cellules de communiquer. Il y a également un dialogue plus intime par contact cellulaire par l'intermédiaire des molécules d'adhésion membranaire. (voir II.1.1.)

I.3.Réponse humorale et réponse cellulaire

Dans chaque réponse immunitaire, il y a deux phases essentielles : la reconnaissance de l'antigène et la réaction destinée à l'éliminer. Dans la réponse immunitaire spécifique, ce sont les lymphocytes T et B qui assurent la reconnaissance. Celle-ci met en jeu un processus de sélection clonale, c'est-à-dire que lorsqu'un antigène se lie aux rares cellules capables de le reconnaître, il provoque leur prolifération et leur activation (expression de récepteurs, sécrétion de cytokines ...).

L'immunité à médiation cellulaire et l'immunité à médiation humorale sont les deux concepts traditionnellement utilisés pour définir les différents mécanismes employés par le système immunitaire. Les anticorps, le complément et les autres molécules solubles constituent les systèmes effecteurs humoraux alors que les lymphocytes T, les natural killers (NK) et les phagocytes sont les effecteurs cellulaires. Avec les progrès réalisés dans la connaissance des mécanismes de reconnaissance, il est plus juste de penser en termes de systèmes aptes à reconnaître soit les antigènes libres soit les antigènes associés aux cellules (Roitt , 1993). Les lymphocytes Tc peuvent reconnaître les antigènes provenant de l'intérieur des cellules et présentés à la surface cellulaire (par exemple un virus), alors que les anticorps sont particulièrement importants dans la reconnaissance des antigènes libres, extracellulaires (par exemple une toxine).

I.3.1.Réponse humorale

Lorsqu'un antigène est reconnu par un récepteur spécifique sur un lymphocyte B, celui-ci entre en phase de prolifération puis se différencie en plasmocyte sécréteur d'anticorps ou en cellule mémoire. Toutes ces étapes sont régulées par les cytokines sécrétées par le lymphocyte Th. (fig. A.1.8.)

I.3.2. Réponse cellulaire

Ce terme s'applique à la réponse immune spécifique dans laquelle les cellules T, aussi bien les CD8⁺ que les CD4⁺, spécifiques d'un antigène jouent le rôle principal.

Lorsqu'un lymphocyte T est activé par un antigène présenté par une APC, il entre en phase de différenciation et de prolifération et secrète ses différentes cytokines. C'est par le biais de ces cytokines qu'il va sélectionner les mécanismes effecteurs mis en jeu dans la réponse.

II L'importance des lymphocytes Th 1 et Th2

Une réponse immunitaire adaptative est toujours de type humorale et cellulaire mais l'intensité et la qualité de ces deux composants ainsi que leur rapport varient afin d'obtenir une réponse optimale. Le lymphocyte Th y tient un rôle central.

Pendant les années 70, il a été suggéré que ces différents types de réponse pourraient être attribuées à l'hétérogénéité des populations de Ly Th (O'Garra & Murphy, 1994). En 1989, Mosmann propose de subdiviser la population de Ly Th murins en deux sous-populations prédominantes caractérisées par leur profil de sécrétion cytokinique appelées Th1 et Th2. Ensuite, grâce aux études faites par Romagnani et al., ce paradigme a pu être étendu à l'homme (Bellardelli, 1995). Et en 1992, Brown et al. caractérisent pour la première fois chez le bovin une production de cytokines de type Th1.

Bien que de nombreuses réponses immunitaires puissent être caractérisées par une réponse de type Th1 ou Th2, ce ne sont pas les seuls profils de sécrétion possible:

- La sous-population Th0, divisée elle-même en Th0A sécrétant IL2 et IL4 et Th0B sécrétant IL2, IL4 et IFN γ (Mosmann & Sad, 1996).

Les Th0 pourraient, en fait, être des précurseurs de Th1 et Th2 (Oppenshaw et al., 1995).

Mais, sous certaines conditions, des Th0 peuvent aussi être une population différenciée au même titre que Th1 et Th2. Par exemple si, afin d'éliminer le pathogène avec le minimum de risque d'immunopathologie, une réponse équilibrée entre l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale sans biais prononcé vers Th1 ou Th2 est la plus appropriée (Oppenshaw et al., 1995).

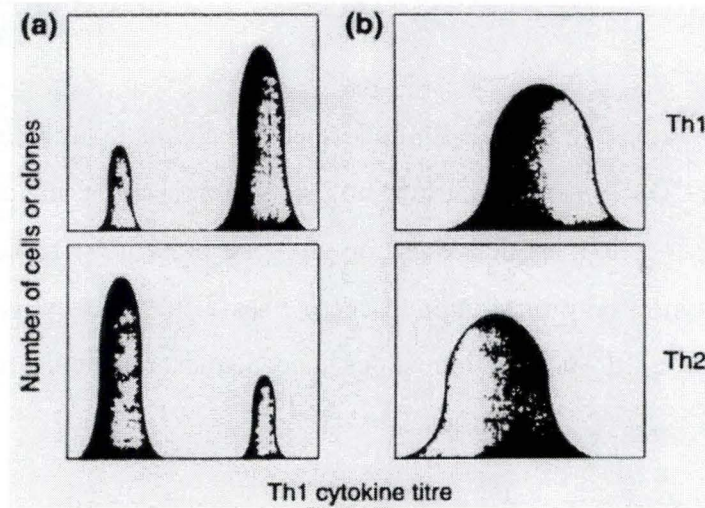


Fig. A.II.1. : Deux façon de voir comment une réponse immunitaire penche vers un profil Th1 ou Th2. En (a) : compétition entre deux populations distinctes, en (b) : switch de la population lymphocytaire T vers l'un ou l'autre profil (d'après Kelso, 1995)

Characteristic	Th1	Th2
IFN- γ	High	Variable, frequently low
IL-2	High	Variable, frequently low
IL-4 ^b	Low/negative	High
Major mode of action	DTH reactions (cellular immunity) Complement-binding antibodies	Eosinophil-associated cytotoxicity Non-complement-binding antibodies and IgE
Protective effects	Against intracellular microorganisms and tumors	Against extracellular parasites
Harmful effects	Contact hypersensitivity Tissue-specific autoimmunity Allergic encephalitis Juvenile diabetes Rheumatoid arthritis Thyroiditis Uveitis	Atopic diseases Ig-mediated autoimmunity Bullous autoimmune diseases Sclerosing diseases?

Abbreviations: DTH, delayed-type hypersensitivity; IFN- γ , interferon γ ; Ig, immunoglobulin; IL-2, interleukin 2; Th1, T helper 1.

^aTh1 and Th2 immunity characterizes T-cell populations, not single T cells.

^b*In vivo*, Th1 and Th2 responses are best characterized by the IL-4:IFN- γ ratio.

Tableau A.II.1.: Caractéristiques des réponses immunes associées à Th1 et Th2 *in vivo* (d'après Röken et al., 1996).

- La sous-population Th3 sont des cellules produisant de grandes quantités de TGF β (Mosmann & Sad, 1996).

En fait, les clones de lymphocytes T montrent une grande diversité dans leurs profils de sécrétion cytokinique formant un spectre continu dans lequel Th1 et Th2 sont deux extrêmes. C'est pourquoi les lymphocytes T ne peuvent être classés en profils discontinus de sécrétion (Kelso, 1995). Lorsqu'une réponse immunitaire penche vers un profil Th1 ou Th2, ce n'est pas une compétition entre deux populations distinctes mais un switch de la population totale de Ly T vers le profil Th1 ou Th2 (fig. A.II.1) (Kelso, 1995).

La détection des cytokines exprimées par chaque clone du spectre peut être biaisé par la sensibilité de la détection et donner l'impression de profils distincts (Kelso, 1995).

Cependant, il n'y a pas de doute que beaucoup de clones de cellules T et de réponses immunes in vivo montrent une dichotomie entre une forte sécrétion en IL2, IFN γ , TNF β ou en IL4, IL5 et IL10. Donc, cette dichotomie reste une division fonctionnelle importante dans le système immunitaire (Mosmann & Sad, 1996).

II.1. Caractérisation de Th1 et Th2

La différence se marque, chez la souris, par la sécrétion d'IL2, IFN γ et TNF β sans sécrétion détectable d'IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 et IL13 pour les Th1 et l'inverse pour les Th2. Chez l'homme, les Th1 sécrètent IFN γ et TNF β sans sécrétion détectable d'IL4, IL5 et IL9 tandis que Th2 fait l'inverse, les deux sous-populations pouvant sécréter IL2, IL10 et IL13 (Mosmann & Sad, 1996). Que ce soit chez l'homme ou la souris, les deux sous-populations sécrètent du GM-CSF et de l'IL3.

Les fonctions des cellules Th1 et Th2 corrélerent bien avec leurs types distincts de sécrétion (Tableau A.II.1.). Les cellules Th1 sont impliquées dans les réactions inflammatoires à médiation cellulaire : de nombreuses cytokines Th1 activent les fonctions cytotoxiques et inflammatoires ; les clones Th1 induisent les réactions d'hypersensibilité retardée (DTH) ; et l'IFN γ est souvent exprimé aux sites de réactions DTH. Les Th1 peuvent prodiguer de l'aide aux cellules B mais, à haute concentration en cellules Th1, ils deviennent supprimeurs. Deux mécanismes peuvent intervenir : premièrement, les fortes concentrations en IFN γ sont généralement immuno-suppressives ; ensuite, l'activité « helper » pour cellules B prédomine à faible concentration en antigènes ou à un ratio cellules T/cellules B inférieur à

0,2 alors que l'activité cytotoxique domine à un ratio supérieur à 1 (Mosmann & Coffman, 1989). Les cytokines de type Th2 encouragent la production d'anticorps, particulièrement d'IgE, et induisent également la prolifération et les fonctions des éosinophiles. Ces cytokines sont couramment trouvées en association avec les réactions allergiques (Mosmann & Sad, 1996).

II.2. Réponses immunitaires où le biais Th1/Th2 est important

De manière générale, les parasites intracellulaires tels que virus, *Leishmania*, etc ... stimulent une réponse à médiation cellulaire tandis que les parasites extracellulaires comme les helminthes engendrent une réponse à médiation humorale. Si la réponse immunitaire n'est pas appropriée, au lieu de mener à la guérison, elle va accentuer la maladie et les lésions.

Des exemples malheureux illustrent cette dichotomie :

L'infection de souris par *Leishmania major* résulte en deux réponses différentes suivant la souche infectée.

Chez la souche susceptible, BALB/c, la réponse est de type Th2 c'est-à-dire un taux élevé en anticorps (Ac) avec des IgE, une concentration élevée en IL4 et faible en IFN γ et n'exprimant pas de réponse DTH. La souris BALB/c développe une maladie sévère progressant jusqu'à la mort.

Par contre, la souche résistante C57B1/6 développe une forte DTH avec un faible taux en Ac sans IgE, une concentration élevée en IFN γ et faible en IL4. L'infection est locale et la guérison rapide.

Ces résultats avec d'autres, montrent que la réponse Th1 est ici la plus efficace pour se débarrasser du parasite qui est intracellulaire dans le macrophage. Peut-être grâce à la capacité de l'IFN γ à activer les macrophages (Mosmann & Coffman, 1989). L'IFN γ a déjà prouvé son utilité en tant qu'adjuvant dans des thérapies médicamenteuses pour le traitement de leishmanioses viscérales humaines en dirigeant la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 (Powrie, 1993).

La plupart des infestations par des helminthes induisent une réponse IgE, souvent accompagnées d'une éosinophilie élevée ; beaucoup de mastocytes intestinaux étant également présents. Un exemple fortement étudié, *Nippostrongylus brasiliensi*, nous montre

que ces effets sont dus à une activation des Th2. La concentration élevée en IgE peut être diminuée par l'administration d'Ac anti-IL4 et l'éosinophilie par l'injection d'Ac anti-IL5. Le profil cytokinique étudié au niveau de la rate et des noeuds lymphoïdes de souris infectées par *N. brasiliensis* montre de faibles concentrations en IL2 et IFN γ et de fortes concentrations en IL4 et IL5, ce qui est probablement dû à une sélection positive des Th2 (Mosmann & Coffman, 1989).

II.3. Caractéristiques des principales cytokines caractérisant TH1/TH2

Nous ne décrivons ici que les principales caractéristiques.

II.3.1. IL2

L'IL2 humaine mature est une glycoprotéine de 15,4 kD qui compte 133 acides aminés. Celle de la souris a une masse moléculaire de 17 à 19 kD et compte 149 acides aminés. L'IL2 humaine et murine partagent un pourcentage d'identité de 70 à 76 % au niveau nucléotidique et de 63 % au niveau des acides aminés.

L'IL2 est sécrétée principalement par les cellules T CD4+, Th0 et Th1 activées et les cellules B activées 6 à 8 heures après leur activation avec un taux maximal après 24 heures pour diminuer jusqu'à un minimum après 3 jours. Les cellules T CD8+ en sécrètent également mais à un taux beaucoup plus faible.

Elle induit la prolifération des cellules Tc, NK et Th activées et augmente leur synthèse cytokinique. Elle stimule la croissance et la différenciation des cellules B en plasmocytes sécréteurs d'Ig. L'IL2 est également chimotactique pour les NK qui ont une activité antivirale non spécifique par leur capacité à tuer spontanément les cellules infectées et par leur sécrétion d'IFN γ et de TNF β (Ramsay, 1993).

II.3.2. IFN γ

L'ARNm de l'IFN γ humain code pour un précurseur de 166 acides aminés contenant un peptide signal hydrophobe N-terminal de 23 acides aminés. Le polypeptide final a une masse

que ces effets sont dus à une activation des Th2. La concentration élevée en IgE peut être diminuée par l'administration d'Ac anti-IL4 et l'éosinophilie par l'injection d'Ac anti-IL5. Le profil cytokinique étudié au niveau de la rate et des noeuds lymphoïdes de souris infectées par *N. brasiliensis* montre de faibles concentrations en IL2 et IFN γ et de fortes concentrations en IL4 et IL5, ce qui est probablement dû à une sélection positive des Th2 (Mosmann & Coffman, 1989).

II.3. Caractéristiques des principales cytokines caractérisant TH1/TH2

Nous ne décrivons ici que les principales caractéristiques.

II.3.1. IL2

L'IL2 humaine mature est une glycoprotéine de 15,4 kD qui compte 133 acides aminés. Celle de la souris a une masse moléculaire de 17 à 19 kD et compte 149 acides aminés. L'IL2 humaine et murine partagent un pourcentage d'identité de 70 à 76 % au niveau nucléotidique et de 63 % au niveau des acides aminés.

L'IL2 est sécrétée principalement par les cellules T CD4+, Th0 et Th1 activées et les cellules B activées 6 à 8 heures après leur activation avec un taux maximal après 24 heures pour diminuer jusqu'à un minimum après 3 jours. Les cellules T CD8+ en sécrètent également mais à un taux beaucoup plus faible.

Elle induit la prolifération des cellules Tc, NK et Th activées et augmente leur synthèse cytokinique. Elle stimule la croissance et la différenciation des cellules B en plasmocytes sécréteurs d'Ig. L'IL2 est également chimotactique pour les NK qui ont une activité antivirale non spécifique par leur capacité à tuer spontanément les cellules infectées et par leur sécrétion d'IFN γ et de TNF β (Ramsay, 1993).

II.3.2. IFN γ

L'ARNm de l'IFN γ humain code pour un précurseur de 166 acides aminés contenant un peptide signal hydrophobe N-terminal de 23 acides aminés. Le polypeptide final a une masse

moléculaire de 20 à 25 kD. L'IFN γ murin est un polypeptide de 136 acides aminés d'une masse moléculaire de 16 kD et montre 40 % d'homologie avec la forme humaine.

L'IFN γ est principalement sécrété par les cellules Th, Tc et NK mais Fultz et al. ont montré que les macrophages murins avaient une sécrétion basale d'IFN γ (Bellardelli, 1995).

Au delà de ses effets anti-viraux, l'IFN γ a un rôle dans l'attraction des macrophages et leur activation. Il peut également induire l'expression de molécules de CMH 1 et de CMH 2 afin d'augmenter la capacité à présenter l'antigène. Il est responsable de l'inhibition de la production d'IgE et du switch isotypique vers une sécrétion d'IgG2a par les cellules B murines (Mosmann & Coffman, 1989). L'IFN γ a un rôle majeur dans l'orientation de la réponse immunitaire (cfr.point II.5.2.).

II.3.3. IL4

La séquence nucléotidique du cDNA murin et humain montre une phase de lecture ouverte codant pour approximativement 140 acides aminés dont les 20 premiers sont le peptide signal hydrophobe pour la sécrétion de l'IL4. Le pourcentage d'identité entre l'IL4 murine et l'IL4 humaine est de 50 % au niveau des acides aminés. Le traitement d'IL4 humain ou murin par des enzymes de déglycosylation donne un polypeptide avec une masse moléculaire de 15 à 16 kD qui garde toute son activité biologique.

L'IL4 est principalement sécrétée par les cellules Th0 et Th2 activées mais également par les basophiles et les mastocytes activés (Banchereau, 1993). Des cellules T CD8+ peuvent aussi en produire (cfr.point II.6.). Il y a des récepteurs de haute affinité en faible concentration sur presque toutes les cellules immunitaires et son expression sur les lymphocytes activés peut être activé par l'IL4 elle-même. L'IL4 a été identifiée par sa propriété à induire l'activation et la prolifération des cellules B mais aussi des cellules T et mastocytes. Elle favorise les interactions entre cellules B et T en augmentant l'expression de certaines molécules de surface :

- IgM et CD23 sur la cellule B pour une meilleure capture de l'antigène.
- CMH2 sur la cellule B pour une meilleure présentation aux cellules T.
- B7/BB1 sur la cellule B qui s'associe au CD28 de la cellule T, ce qui induit une augmentation de ses sécrétions cytokiniques.

L'IL4 est responsable du switch isotypique vers une production d'IgG1 et d'IgE chez la souris et d'IgG4 et d'IgE chez l'homme (Banchereau, 1993). Son importance est primordiale dans l'orientation de la réponse immunitaire (cfr. point II.5.2.).

II.3.4. IL10

Le cDNA humain de l'IL10 encode une protéine de 178 résidus avec une séquence N-terminale hydrophobe de 18 acides aminés. L'IL10 humaine et l'IL10 murine montrent 73 % de similitude au niveau des acides aminés et 81 % au niveau des acide nucléiques.

L'IL10 était auparavant connue sous le nom de « facteur inhibant la synthèse des cytokines » (CSFI) pour sa capacité à inhiber la synthèse des cytokines de type Th1.

L'IL10 est sécrétée par les cellules Th2, B et les macrophages activés par le LPS (Leclerc, 1993). En présence d'IL12, cytokine qui dirige la sécrétion des cellules Th vers un profil de type Th1, des cellules accessoires peuvent sécréter de l'IL10, inhibant la sécrétion des cytokines de type Th1. Ceci servirait à empêcher une amplification trop importante de la réponse Th1 (Reiner, 1995). Chez l'homme, les cellules Th1 peuvent elles aussi sécréter de l'IL10 (Mosmann & Sad, 1996).

L'IL10 augmente la croissance et la différenciation des cellules B et augmente l'effet de l'IL4 et de l'IL3 sur la croissance des mastocytes (Leclerc, 1993).

II.4. La régulation croisée : Th1 contre Th2

Bien que la sécrétion d'IL2 soit une caractéristique des cellules Th1 et non des Th2, celle-ci a une activité proliférative sur les deux populations et ne joue pas de rôle dans la direction du type de réponse immunitaire (Seder & Paul, 1994). Toutefois, elle peut avoir un rôle indirect par son action chémoattractique pour le NK, qui, par sa sécrétion en IFN γ peut influencer la réponse immunitaire (Ramsey et al., 1993).

Fitch et al. ont observé que des T CD4⁺ cultivés en présence d'IFN γ donnaient des cellules T ne sécrétant peu ou pas d'IL4 et que l'IFN γ inhibait la prolifération de clones Th2 bien établies suite à une stimulation par l'antigène et l'IL2. L'IFN γ n'ayant aucun effet sur la prolifération des Th1 (Seder & Paul, 1994). Cette résistance des Th1 à l'effet anti-prolifératif de l'IFN γ est due à l'absence, sur leur membrane, de la seconde chaîne du récepteur de l'IFN γ (IFN- γ R β) et donc à leur incapacité à activer le facteur de transduction de signal inductible par

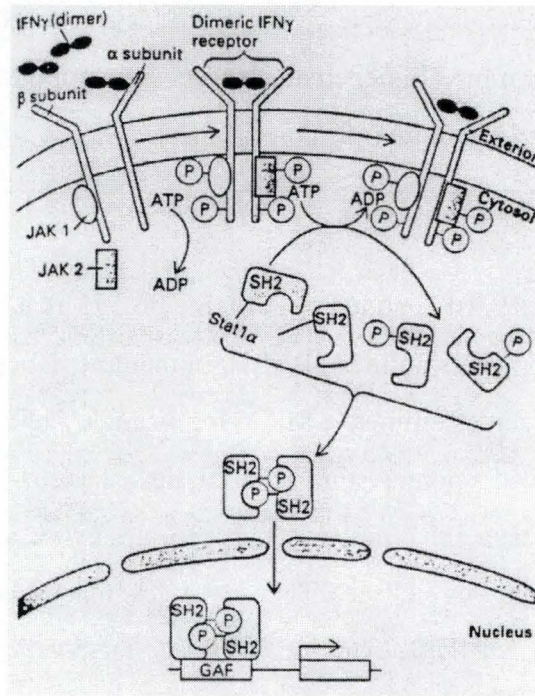


Fig. A.II.3.: Mécanismes moléculaires de l'activation de facteurs de transcription suite à la liaison de l'IFN γ à son récepteur. La liaison de l'IFN γ à son récepteur conduit à l'activation, par phosphorylation de tyrosines, de deux tyrosines kinases associées au récepteur : Janus kinase (jak 1) et janus kinase 2 (jak 2). Ces kinases phosphorylent STAT 1 α qui sont des facteurs cytoplasmiques appartenant à la famille STAT (signal transducers and activators of transcription). Les STAT 1 α phosphorylés forment des homodimères appelés ici STF-IFN γ qui vont jusque dans le noyau pour activer la transcription de gènes contrôlée par l'élément régulateur GAF. L'une des chaîne du récepteur est absente chez les cellules Th1, donc le facteur de transduction de signal STF-IFN γ ne peut être induit (d'après Pellegrini & Schindler, 1993).

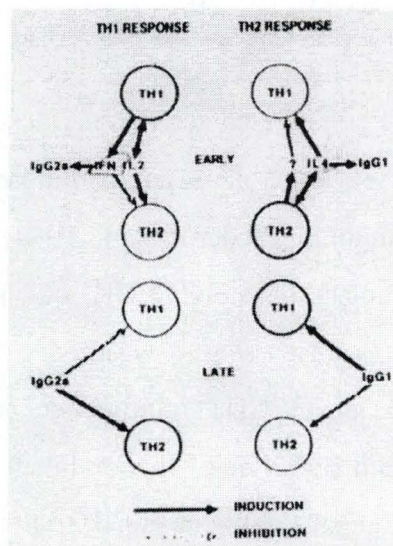


Fig. A.II.4.: Inhibition croisée Th1/Th2 par les anticorps qu'ils induisent (d'après Mosmann & Coffman, 1989).

l'IFN γ (STF-IFN γ). Les Th2 possèdent, quant à eux, le récepteur complet pour l'IFN γ . Cette différence entre Th1 et Th2 résultera en une régulation différente de l'expression de gènes après exposition à l'IFN γ (fig. A.II.3.). Les précurseurs des cellules Th sont capables d'activer STF-IFN γ . Durant leur différenciation en Th1, en présence d'IFN γ , ces cellules perdent leur capacité à activer STF-IFN γ (Pernis et al., 1995). L'IFN γ inhibe la prolifération des Th2 mais pas leur sécrétion cytokinique (Fitch et al., 1993). Il inhibe également l'expression du récepteur pour l'IL4 sur les cellules T activées et la production d'IgE induite par l'IL4 (Banchereau, 1993).

L'IL4 est un facteur de croissance autocrine pour les Th2 et n'a aucun effet sur la croissance des Th1 (Seder & Paul, 1994) mais elle inhibe la prolifération des cellules T, B et NK si celle-ci est induite par l'IL2. L'IL4 agirait en diminuant le nombre de récepteurs de haute affinité pour l'IL2 (Banchereau, 1993). Enfin, l'IL4 diminue la production d'IL2 et d'IFN γ par les cellules Th1 et d'IFN γ par les T CD8+ (Tanaka et al., 1993), ce qui lui donne un rôle primordial dans l'orientation de la réponse immunitaire.

L'IL10 inhibe la production d'IFN γ et, de façon plus variable, d'IL2, IL3, CSF et TNF par les cellules Th1 (Leclerc, 1993). Cette inhibition se ferait indirectement. En fait, l'IL10 réduit la capacité des CPA à stimuler la production de cytokines par les Th1 mais n'a aucun effet sur l'activation des cellules Th2 (Seder & Paul, 1994).

Certains types d'anticorps sont induits par une réponse Th1 ou Th2, la première induit la sécrétion d'IgG2a chez la souris par l'intermédiaire de l'IFN γ et la deuxième induit la sécrétion d'IgG1 par l'intermédiaire de l'IL4. Ces anticorps serviraient de signal de retour à l'équilibre après une réponse à une infection (Mosmann & Coffman, 1989). Les IgG2a inhiberaient les réactions d'hypersensibilité retardée et augmenteraient la réponse anticorps, les IgG1 auraient l'effet opposé. Cette inhibition croisée n'aurait d'effet que tard dans la réponse car une certaine concentration en anticorps est nécessaire pour que l'effet se fasse sentir (Mosmann & Coffman, 1989). (fig. A.II.4.)

II.5. Choix de l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 ou Th2

De nombreuses études ont montré que l'orientation de la réponse immunitaire dépendait de la nature de l'antigène, de sa concentration dans l'organisme, de sa voie d'entrée, de sa localisation, de l'état de santé de l'hôte et de son bagage génétique, etc... (O'Garra et al.,

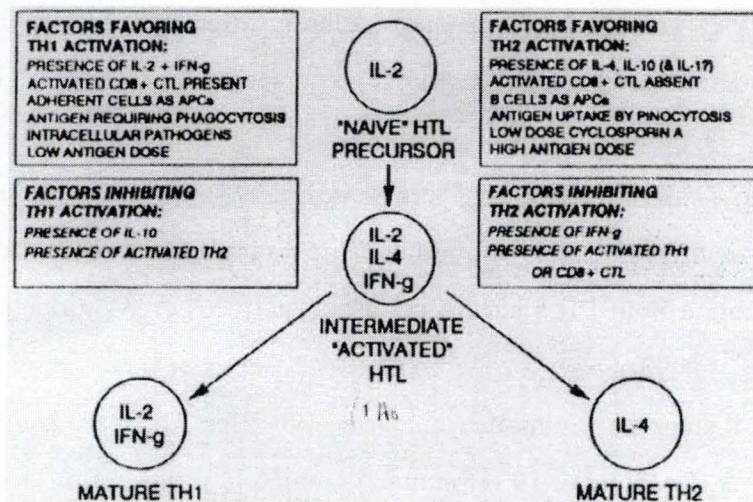


Fig. A.II.5.: Facteurs qui favorisent ou inhibent l'activation des cellules Th1 et Th2 (d'après Fitch et al., 1993).

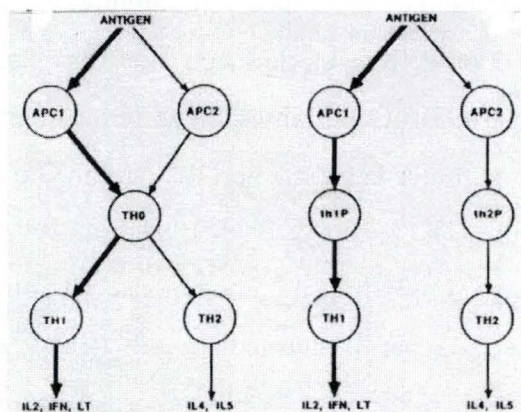


Fig. A.II.6.: Deux modes de différenciation possibles des cellules T helper (d'après Mosmann & Coffman, 1989).

1994). On découvrira qu'en fait, tout ces facteurs contribuent à induire un certain environnement cytokinique et que c'est celui-ci qui guidera la réponse immunitaire (fig. A.II.5.).

II.5.1. La différenciation des précurseurs de cellules T

En 1989, Mossman & Coffman proposaient deux voies de différenciation des cellules Th. Dans l'une, les deux sous-populations Th1 et Th2 dérivait d'un même précurseur et dans l'autre, chaque sous-population avait son propre précurseur. (fig. A.II.6.) A l'heure actuelle, on sait que la différenciation se fait à partir d'un seul précurseur ne sécrétant que de l'IL2 en quantité détectable (Mossman & Sad, 1996). Ce précurseur naïf, après une première stimulation par l'antigène porté par une APC, sécrète de l'IL2, se multiplie puis se différencierait en une cellule T intermédiaire (activée) appelée Th0 qui sécrète les deux types de cytokines avant de devenir, après restimulation, une cellule Th1 ou Th2, suivant l'environnement cytokinique ((Fitch et al., 1993), (Seder & Paul, 1994), (Mossman & Sad, 1996)). Mais on ne sait toujours pas si cette cellule Th0 est un passage obligé ou non dans la différenciation des cellules Th ((Mossman & Sad, 1996), (Seder & Paul, 1994)). Les Th effecteurs (eTh0, eTh1 et eTh2) peuvent se différencier en cellules mémoires (mTh0, mTh1 et mTh2) qui ne sécrètent plus que de l'IL2 lorsqu'elles sont à l'état de repos mais qui reprennent leur profil cytokinique lors d'une restimulation (Seder & Paul, 1994)(fig. A.II.7.).

II.5.2. Influence de l'environnement cytokinique

L'IL12 est une protéine hétérodimérique dont l'une des chaînes, celle de 35 kD de masse moléculaire, est exprimée constitutivement dans la plupart des cellules immunitaires et l'autre chaîne, celle de 40 kD, n'est exprimée que par quelques types cellulaires, surtout le macrophage et d'autres APC professionnelles, et n'est induite qu'après une infection intracellulaire ((Nicholoff & Turka, 1994);(Trinchieri, 1995)). L'IL12 peut induire directement la sécrétion d'IFN γ par la cellule Th, mais il a d'abord été connu sous le nom de Natural Killer Secreting Factor (NKSF) parce qu'il induit la sécrétion d'IFN γ par ce type de cellule (fig. A.II.8.). Le NK serait activé avant les cellules Th et influencerait la différenciation de celles-ci en Th1 en induisant une forte concentration locale en IFN γ .

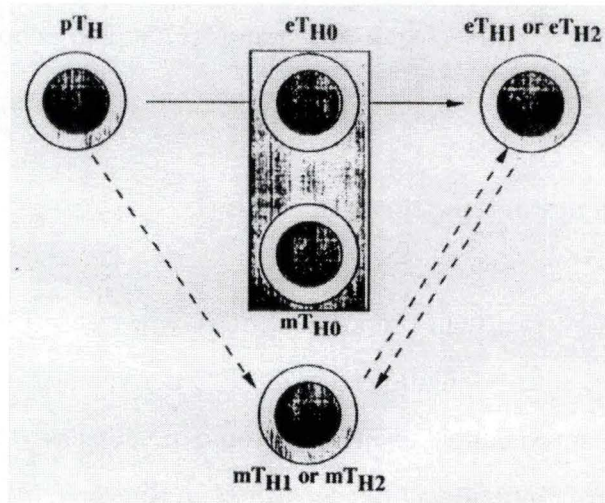


Fig. A.II.7.: Les cellules Th précurseurs (pTh) peuvent se différencier en cellules mémoires (mTh) ou en cellules effectrices (eTh) (d'après Seder & Paul, 1994).

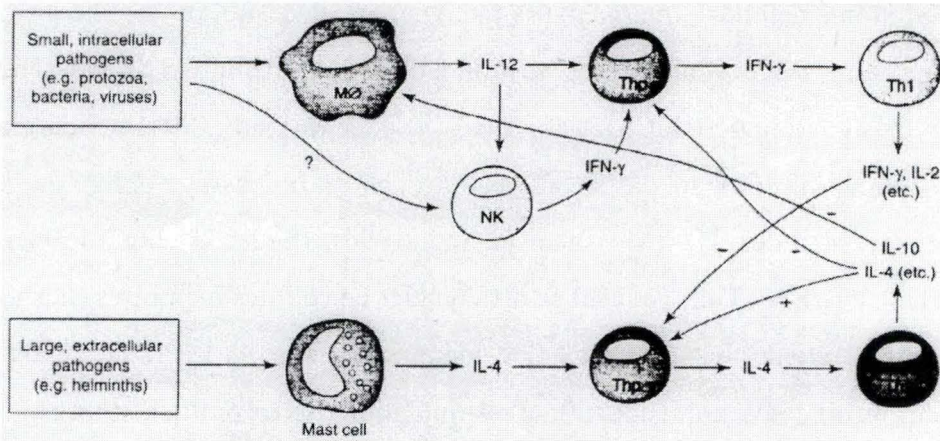


Fig. A.II.8.: La réponse non spécifique influencerait l'orientation de la réponse spécifique (d'après Garside & Mowat, 1995).

L'IFN γ augmentant la sécrétion d'IL12, on assiste à un feed-back positif ((Garside & Mowat, 1995), (Trinchieri, 1995), (Reiner & Seder, 1995)). L'IL12 n'inhibe pas par lui-même la prolifération des Th2 mais plutôt indirectement par la sécrétion d'IFN γ qu'il induit en augmentant la transcription et le temps de demi-vie de son mRNA (Trinchieri, 1995).

Un exemple représentatif de l'effet de l'IL12 est l'infection d'une souche susceptible BALB/c par *Leishmania major*. En traitant ces souris avec de l'IL12 dès le début de l'infection, on convertit la réponse inefficace Th2 en une réponse protectrice Th1. L'IL12, sécrété très tôt dans la réponse immunitaire, est probablement un facteur obligé dans l'orientation vers une réponse de type Th1 et fait le lien entre la réponse non spécifique et la réponse spécifique via l'activation des NK (Bellardelli, 1995).

De nombreuses études ont montré que la présence d'IL4 est critique pour l'expression d'une réponse Th2 *in vivo*. En particulier, il a été montré que le phénotype susceptible exprimé par la souche de souris BALB/c, qui répond à une infection par *Leishmania major* par une forte production d'IL4 ; peut être converti en une réponse protectrice de type Th1 si on lui administre des anticorps anti-IL4 (Garside & Mowat, 1995). L'IL4 est sans doute le facteur initiateur d'une réponse Th2. Les premiers producteurs d'IL4, lors d'une réponse immunitaire, sont les mastocytes (Garside & Mowat, 1995). L'IL4 diminue la production d'IFN γ aidée par l'IL10 qui réduit la sécrétion d'IL12. Une autre source potentielle d'IL4 est la population récemment identifiée NK1.1⁺CD4⁺ qui était la source prédominante d'IL4 dans un modèle d'activation de cellules T *in vivo* (Reiner & Seder, 1995). L'effet inducteur de l'IL4 prédomine sur les autres cytokines. De ce fait, si le taux d'IL4 atteint un certain niveau, la différenciation des lymphocytes Th précurseurs en Th2 se produit (Romagnani, 1997).

On peut donc voir l'initiation de la réponse spécifique Th comme un équilibre entre IL12 et IL4 pour déterminer une réponse de type Th1 ou Th2 (fig. A.II.9.). Mais il a été démontré récemment que l'IL6, dérivant de certaines APC, pouvait diriger la différenciation des Th précurseurs en Th2 effecteurs en induisant la sécrétion initiale d'IL4 par les cellules CD4⁺ (Romagnani, 1997).

Le premier contact qu'a une cellule T avec l'antigène se fait par l'intermédiaire d'une APC. Il est donc normal de se demander si elles ont une importance dans l'orientation de la différenciation des cellules Th autrement que par leur sécrétion cytokinique, comme nous venons de le voir avec l'IL12.

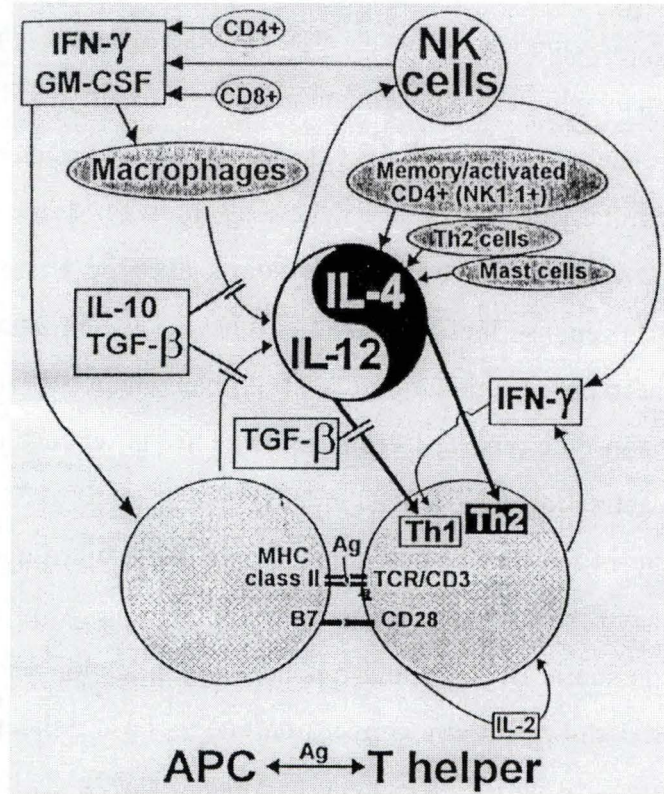


Fig. A.II.9.: Les effets antagonistes de l'IL12 et de l'IL4 dans l'orientation de la réponse Th (d'après Trinchieri, 1995).

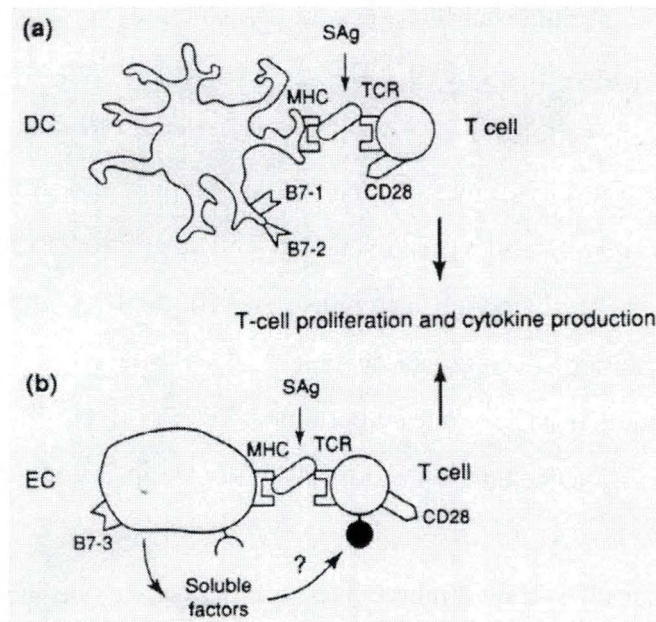


Fig. A.II.10.: Molécules membranaires de co-signal chez les APC professionnelles, ici des cellules dendritiques (a), et les APC non-professionnelles, ici des kératinocytes (b) (d'après Nikoloff & Turka; 1994).

II.5.3. Influence des cellules présentatrices de l'antigène

L'activation du lymphocyte Th demande deux signaux. L'un étant apporté par la liaison de son complexe T cell receptor (TcR/CD3) avec l'antigène associé aux molécules du CMH de l'APC. L'autre étant apporté par des molécules co-stimulatrices à la surface de l'APC. Si ce deuxième signal n'est pas présent, la cellule T entre en anergie ((Nicholoff, 1994), (Staedeker & Villanueva, 1994)). Parmi celles-ci, les molécules B7.1/B7.2 qui se lient aux protéines membranaires CD28 ou CTLA-4 de la cellule T, se sont montrées d'une importance cruciale dans l'activation de celui-ci puisque le blocage de cette interaction conduit à l'anergie du lymphocyte Th (Staedeker & Villanueva, 1994). Des expériences récentes utilisant le blocage sélectif de B7.1 ou B7.2 ont suggéré un rôle de ces ligands dans le développement des cellules Th. Le développement de celles-ci en présence d'anticorps anti-B7.1 les amène à produire fortement de l'IL4, tandis que des anti-B7.2 induisent une sécrétion d'IFN γ (Reiner & Seder, 1995). Mais la contribution de B7.1 et B7.2 dans la différenciation des cellules Th est beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait initialement : B7.1 et B7.2 peuvent tout deux induire la différenciation en Th1 ou Th2 et leur contribution relative peut être affectée par la concentration en antigène. B7.2 apparaît être la molécule co-stimulatrice dominante au début de la réponse immune primaire, alors que B7.1 joue un rôle critique dans le maintien de la réponse primaire et secondaire (Mosmann & Sad, 1996).

Ces molécules B7.1 et B7.2 se retrouvent chez les APC professionnelles tandis que des APC non professionnelles (dans ce cas, des kératinocytes) portent une molécule qui se lie également à CD28 appelée B7.3, mais on ne sait pas si l'interaction B7.3-CD28 apporte une costimulation (fig. A.II.10.) (Nicholoff & Turka, 1995).

La production d'IL2 est induite via la costimulation du CD28 en liaison avec une molécule B7, quelle que soit l'issue de la différenciation. Cette cytokine est en effet importante pour l'activation et la sécrétion cytokinique des deux types de lymphocytes T (Th1 et Th2).(Kuiper et al., 1994) Il a été montré que l'augmentation de la production en IL4 via la costimulation par le CD28 était en fait contrôlée par la présence d'IL2. Certains clones peuvent sécréter de l'IL4 de façon indépendante par rapport à l'IL2. Dans cette situation, la costimulation via le CD28 n'a aucun effet sur la production d'IL4 (Kuiper et al., 1994). En fait, l'IL2 augmenterait la stabilité des ARNm des cytokines des deux sous-populations de cellules Th (Kuiper et al., 1994).

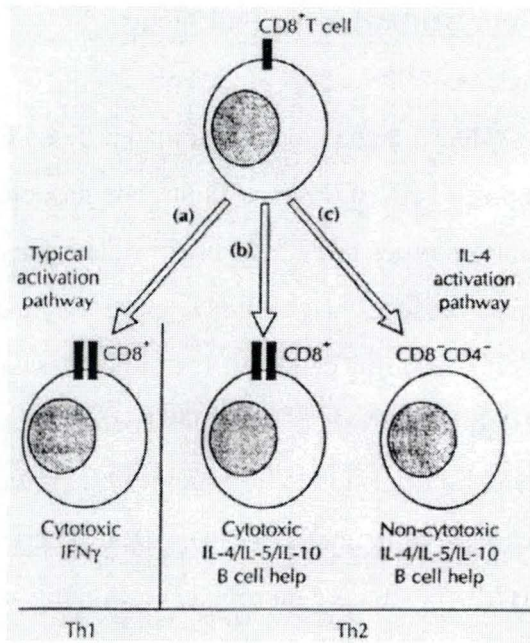


Fig. A.II.11.: Développement des fonctions des cellules T CD8⁺ (d'après Legros & Erard, 1994).

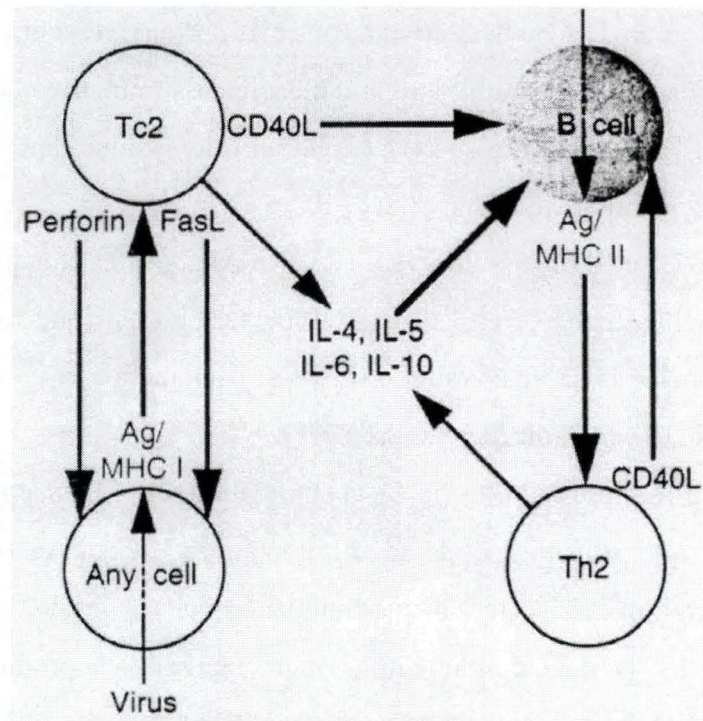


Fig. A.II.12.: Les cellules Tc de type 2 (Tc2) peuvent apporter de l'aide aux cellules B activées par un Th (d'après Mosmann & Sad, 1996).

II.6. La dichotomie chez les CD8⁺

Jusqu'il y a peu, les cellules T CD8⁺ ou T cytotoxiques (Tc) ont toujours été considérées comme une classe uniforme dont la fonction majeure était la lyse des cellules infectées. Cette lyse est liée à la restriction du CMH de classe I. Les productions cytokiniques majeures du CD8⁺ sont l'IFN γ et le TNF β et sont donc proches des productions de type Th1.

Il existe également des cellules Tc qui ont un profil cytokinique de type Th2 mais qui ont gardé leur cytotoxicité et le phénotype CD8⁺. Ces cellules utilisent les mêmes mécanismes de cytotoxicité que les Tc à sécrétion cytokinique de type 1 (perforines, etc...)(fig. A.II.11.). On peut donc également diviser la population CD8⁺ en Tc1 et Tc2 suivant leur profil de sécrétion.

Des études récentes ont montré que des CD8⁺ activés en présence d'IL4 pouvaient perdre leur cytotoxicité et leur capacité à produire de l'IFN γ et sécréter des cytokines de type Th2 (IL4,IL5,IL10). Ces cellules sont alors de phénotype CD8⁺ CD4⁻ (Legros & Erard, 1994).

Les Tc2 peuvent aider les lymphocytes B mais les mécanismes ne sont pas encore bien compris. Dans le cas des Th2, le contact cellulaire pour une aide à la cellule B, se fait via le ligand (CD40L) pour le CD40 du lymphocyte B. Bien que les Tc2 portent également ce ligand, elles n'aident pas les cellules B par contact cellulaire (fig. A.II.12.). En effet, les antigènes spécifiques capturés par les récepteurs des cellules B sont normalement processés et présentés par les molécules de classe II du CMH et ne peuvent être reconnues par les CD8⁺, restreints par les molécules de classe I. Des peptides étrangers présentés par des cellules B en association avec des molécules de classe I signifierait que celles-ci sont infectées et, dès lors, une réponse cytotoxique serait développée à la place d'une réponse d'aide. Il reste possible que l'aide prodiguée par le CD8⁺ aux cellules B déjà activées par une cellule CD4⁺, puisse avoir lieu sans doute par l'expression du CD40L ou la sécrétion de cytokines de type 2.

Les CD8⁺ ont donc un rôle important à jouer dans la régulation de la réponse immunitaire en influençant la production de cytokines des Th1 et Th2 (Kemeny et al., 1994).

L'importance des Tc2 peut être illustrée par certaines études du SIDA. Celles-ci ont attribué aux CD8⁺ un rôle protecteur contre les assauts du virus. Durant la première phase de la maladie, les CD8⁺ sont nombreux et montrent une forte activité cytotoxique contre les cellules infectées par le HIV. Chez les patients où l'infection a progressé vers le SIDA, les CD8⁺ se font de plus en plus rares et on assiste à une augmentation en CD4⁻ CD8⁻. Legros et

Cytokine	Auteur	N° d'accension Genbank
IL1 α	Leong et al., 1988	M36182
IL1 β	Maliszewski et al., 1988	M37211
IL2	Reeves et al., 1986	M13204 M17428
IL3	Mwangi et al., 1995	L31893
IL4	Heussler et al., 1992	M77120
IL5	Merens et al., 1996	Z67872
IL6	Droogmans, 1991	X57317 S49716
IL7	Cludts, 1992	X64540 S50667
IL8	Hash et al., 1994	U00799
IL10	Zarlenga, 1995	U42433
IL12	Zarlenga et al., 1995	U11815
IL15	Cerretti et al., 1986	M29867
IFN γ	Gaidulis, 1995	Z48808
TNF β	Morsey et al., 1996	S82598

Tableau A.III.1. : Les différentes cytokines bovines qui ont été séquencées à ce jour.

Erard proposent que le HIV induirait un cercle vicieux durant lequel les CD8⁺ seraient convertis en CD4⁺ CD8⁻ « Th1 like ». On voit alors s'installer un environnement cytokinique de type Th2. Cette conversion est également favorisée par des infections opportunistes ou des facteurs génétiques qui induisent la sécrétion d'IL4 par les cellules Th CD4⁺. L'influence de l'IL4 sur les CD8⁺ a été démontrée sur un modèle d'infection murine par le virus du SIDA où des souris déplétées en IL4 ne développent pas la maladie (Legros & Erard, 1994).

III. Les cytokines bovines

En comparaison avec ce qu'on sait sur les cytokines murines et humaines, les connaissances chez le bovin sont beaucoup plus limitées. Le tableau A.III.1. rassemble les différentes cytokines bovines qui ont été séquencées.

Le paradigme Th1/Th2 a pu être étendu au bovin grâce aux études de Brown et al. en 1993. Toutefois, l'IL10, caractérisée comme une cytokine de type Th2 chez la souris, peut être sécrétée par les deux types de cellule Th chez le bovin comme c'est également le cas chez l'homme (Brown et al., 1994). La sécrétion d'IL2 et d'IFN γ sans sécrétion d'IL4 ni d'IL5 sera caractéristique d'un profil Th1 bovin et l'inverse pour le profil Th2. Il existe également un profil Th0 bovin c'est-à-dire la sécrétion d'IL2, IFN γ , IL4 et IL5 (Brown et al., 1992).

III.1. Importance de ces cytokines dans différentes maladies bovines

Babesia bovis est un hémoparasite intra-cellulaire des régions semi-tropicales. Il cause chez le bétail de la fièvre, de l'anémie, de la cachexie et cause une mortalité élevée. La caractéristique de cette maladie est l'adhérence des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales des micro-capillaires du cerveau et des poumons. L'IFN γ et le TNF β , sécrétés par les cellules T activées par les antigènes du parasite et les macrophages, sont impliqués dans l'anémie, la cytoadhérence des érythrocytes infectés et l'accumulation d'érythrocytes infectés et de neutrophiles dans les vaisseaux pulmonaires ; ces mêmes cytokines jouant un rôle dans l'immunité protectrice. En fait, les deux types de cellules Th apparaissent dans l'immunité protectrice. Les Th1 étant activés au début, lors de l'étape intra-érythrocytaire, produisent de l'IFN γ et du TNF β alors que les Th2 sont activés plus tard dans l'infection sécrétant de l'IL4, IL5 et de l'IL6. L'IL4 facilite l'expansion du parasite mais les cytokines

de type Th2 ont probablement le rôle de maintenir un titre élevé en anticorps contre le parasite une fois que l'infection initiale a été contrôlée (Brown et al., 1993).

Le Bovin Respiratory Syncytial Virus (BRSV) de la famille des Paramixoviridae et du genre pneumovirus cause des bronchopneumopathies infectieuses aiguës, pouvant aboutir à la mort chez les jeunes veaux. Il montre de nombreuses similitudes tant structurales que pathologiques avec son homologue humain, le HRSV. Ainsi peut-on penser que les mécanismes immunologiques engagés sont plus ou moins similaires (Backer & Leland, 1991). La première preuve que l'immunité contre le HRSV pouvait être néfaste, fut apportée en 1960 lorsque des enfants immunisés avec du HRSV inactivé à la formaline montraient une forte aggravation de la maladie (Alwan et al., 1994). L'importance des cellules Th1 et Th2 dans l'immunopathologie liée au HRSV fut ensuite démontrée dans des modèles murins d'infection par le HRSV montrant que les Th2 sont responsables d'une forte éosinophilie pulmonaire et de l'activation des mastocytes et que les Th1 conduisent à une hémorragie pulmonaire et un taux élevé en neutrophiles pulmonaires ((Alwan et al., 1994), (Connors et al., 1994)). Chez le bovin, l'importance des cellules CD8⁺ dans l'élimination du BRSV a été démontrée mais également dans l'immunopathologie pulmonaire (Taylor et al., 1995). Des études de vaccination bovines par du BRSV inactivés à la formaline ont montré un même profil immunopathologique que ceux montrés en 1960 par les enfants vaccinés par du HRSV inactivé à la formaline (Gershwin, 1996). L'hypothèse du rôle des Th1 et Th2 dans le cas des immunopathologies liées au BRSV reste encore à démontrer.

IV. But du travail

Avec la découverte des deux sous-populations Th1 et Th2 chez la souris (Mosmann et al., 1986), l'homme (Romagnani, 1991) et le bovin (Brown et al., 1993), la possibilité de caractériser le type de réponse immunitaire par le profil cytokinique de ces sous-populations a vu le jour. L'identification des cytokines qui participent à une réponse immunitaire pouvant être très utile pour la compréhension de l'immunité et/ou des immunopathologies. En élucidant les mécanismes immunitaires induits par différents pathogènes, les profils cytokiniques apportent des informations utiles pour des applications telles que la thérapie par les cytokines (Powrie & Coffman, 1993), le développement de vaccins (Redhead et al., 1993) ou le diagnostic de maladies comme par exemple la brucellose bovine (Weynants et al., 1994).

La détection des cytokines bovines par (Brown et al., 1993) a été faite par bioassays et l'analyse de l'expression des ARNm de ces cytokines par Northern blot. Seul un kit ELISA pour l'IFN γ bovin est commercialisé. En fait, très peu d'outils sont développés pour la détection de ces cytokines chez le bovin. La technique que nous allons privilégier dans ce mémoire est la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). La RT-PCR de cytokines bovines a été décrite pour la première fois par Covert et Splitter en 1995. La mesure de l'expression des ARNm est une mesure appropriée de la production de cytokines puisque la plupart des gènes de cytokines sont régulés au niveau transcriptionnel, l'expression de l'ARNm étant alors en corrélation directe avec le niveau de sécrétion cytokinique (Cover & Splitter, 1995).

Cette technique a les avantages d'être très sensible, relativement rapide, de ne demander qu'une faible quantité de cellules et de pouvoir analyser simultanément plusieurs cytokines. La RT-PCR permet l'évaluation d'une réponse immunitaire aussi bien locale que systémique. Cette technique n'a pas le désavantage qu'a le test ELISA d'être inutilisable si la cytokine est rapidement dégradée ou utilisée par les cellules comme par exemple l'IL4. Enfin, la mise au point de la détection de ces cytokines peut s'appliquer à de nombreux pathogènes.

La RT-PCR seule ne donne qu'une information qualitative. Dans le cas de l'analyse de profils Th1/Th2, il est nécessaire de calculer des rapports entre diverses cytokines (par exemple le rapport IFN γ /IL4) et donc de quantifier ces cytokines. Dans ce cadre, nous avons choisi de mettre au point la technique de RT-PCR compétitive afin de quantifier des cytokines bovines.

Matériel et méthodes

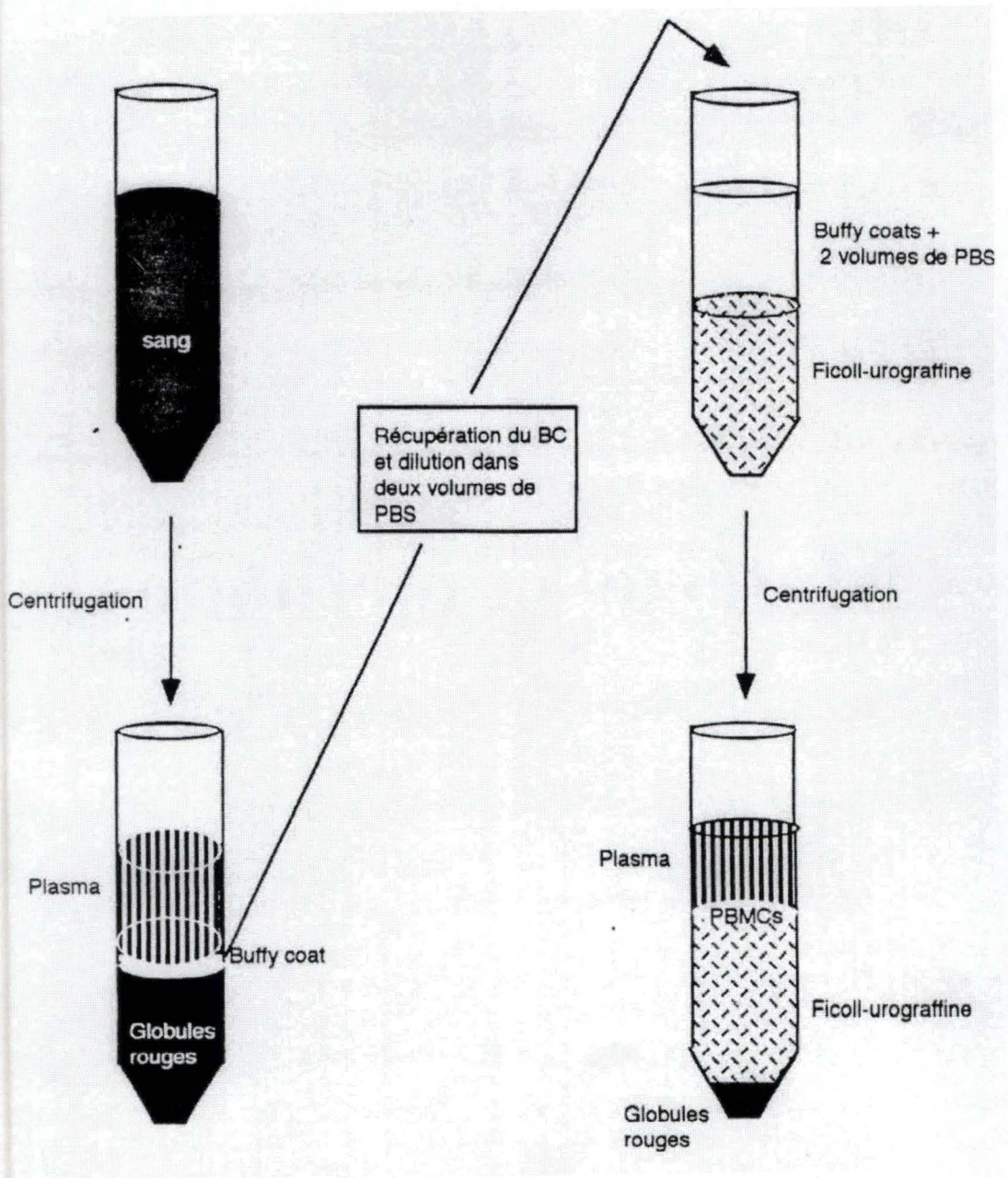


Fig. B.I.1. : Préparation de PBMC.

1. Isolement de cellules mononucléées sanguines périphériques bovines

Les cellules mononucléées sanguines périphériques (peripheral blood mononuclear cells ou PBMC) sont constituées en majorité de lymphocytes et de macrophages. Elles sont isolées sur une solution de Ficoll-urograffine. La séparation est basée sur des différences de densité entre le plasma, les globules rouges, les PBMCs et la solution Ficoll. Le Ficoll a une densité plus élevée que les PBMCs mais inférieure à celle des globules rouges et des granulocytes. Après centrifugation, les globules rouges et les PMNs passent à travers le Ficoll et forment un agrégat au fond du tube tandis que les PBMCs restent à l'interface entre le plasma et le Ficoll (Fig. B.I.1.).

Solutions

- HBSS :

KCl	0.4g/l
KH ₂ PO ₄	0.06g/l
NaCl	8g/l
NaHCO ₃	0.35g/l
Na ₂ HP0 ₄	0.048g/l
D-glucose	1 g/l
EDTA	10 mM
pH 7,4	

Autoclave (20 minutes à 120°C).

- PBS (Phosphate saline buffer) :

solution 10Xcc:

KH ₂ PO ₄	2g/l
Na ₂ HP0 ₄	11,4g/l
NaCl	80g/l
KCl	2g/l
pH 7,4	

Autoclave (20 minutes à 120°C).

- Héparine: 200 U/ml de sang (NOVO Nordisk).

- RPMI 1640 complet.

Le milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL) liquide stérile (86 ml) est additionné des composants suivants, sous hotte :

1 % de sérum de veau foetal (Foetal Bovin Serum) (FBS).

1 ml d'une solution de pénicilline 10000 U/ml streptomycine 10000 U/ml.

1ml d'une solution de pyruvate de sodium 100 mM.

1 ml de L-glutamine 200 mM.

- Ficoll : (Histopaque, Sigma, USA).

- Bromure d'éthidium-acridine orange (100Xcc) :

50 mg de bromure d'éthidium

15 mg d'acridine orange

dissoudre dans 1 ml d'éthanol 95% et 49 ml d'eau distillée. Répartir en aliquots de 1 ml et stocker à -20°C.

Méthode

- Prélever du sang dans un tube stérile hépariné.

- Transférer le sang dans des tubes en polypropylène de 50 ml stériles et centrifuger à 1200 rpm pendant 15 minutes.

- Récupérer l'anneau blanchâtre (Buffy Coat) situé à l'interface entre le culot de globules rouges et le plasma à l'aide d'une pipette pasteur et de manière stérile.

- Diluer le volume de cellules récupérées dans 2 volumes de PBS.

- Déposer doucement 20 ml de cette solution sur 15 ml de Ficoll contenu dans un tube de 50 ml stérile (éviter que les deux phases se mélangent).

- Centrifuger à 1000 rpm à 4°C pendant 25 minutes.

- Récupérer les cellules de l'interphase PBS/Ficoll.

- Resuspendre les cellules récupérées dans 10 ml de PBS et centrifuger à 1200 rpm pendant 10 minutes. Répéter l'opération deux fois.

- Resuspendre le culot de cellules dans 10 ml de RPMI complet et prélever 10 µl de cette suspension dans un Eppendorf stérile.

- Ajouter aux 10 μ l prélevés 10 μ l de la solution de bromure d'éthidium acridine orange et déposer cette solution sur une cellule de Thoma afin de déterminer le nombre de PBMCs vivantes (les cellules vivantes apparaissent vertes sous UV et les cellules mortes oranges).
- Après comptage, les cellules sont diluées à 10 millions de cellules/ml.

Décongélation des PBMCs :

La décongélation doit être rapide et les PBMCs subissent rapidement trois lavages:

- Resuspendre les cellules dans 10ml de PBS froid (4°C).
- Centrifuger à 1000g et à 4°C pendant 10 minutes.
- Répéter cette opération 2 fois.
- Resuspendre le culot dans du RPMI 1640 complet à la concentration voulue.
- Cultiver dans des plaques à fond plat de 24 puits (Nunc, Danemark).

II. Stimulation de cellules mononucléées sanguines (PBMCs)

La Concanavaline A est une lectine végétale qui se fixe spécifiquement aux α -D-glucopyranosides et α -D-mannopyranosides et aux polysaccharides ou glycoprotéines en contenant. Elle active les lymphocytes T, ce qui induit la sécrétion de cytokines et la prolifération cellulaire.

Méthode :

- Ajouter 10 μ g de Concanavaline A (Sigma, USA) à 10 millions PBMCs/ml et incubé pendant 18 à 24 heures dans une étuve à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.
- 10 millions de PBMC/ml sont incubés sans Con A (RPMI complet seul) et constituent le témoin négatif.

III. Extraction et précipitation de l'ARN total

Dés que l'on veut travailler avec de l'ARN, il est indispensable de travailler en conditions RNA-ase-Free (RF). Dans ce cas, il faudra veiller à passer toute la verrerie au four Pasteur

pendant trois heures à 180°C. Les manipulations se feront avec des gants frottés au dodécyle sulfate de sodium (SDS, Sigma, USA) 2% ainsi qu'avec des micropipettes et portoirs traités de la même manière. La paillasse sera également frottée au SDS 2%. Les solutions se feront à partir de solutés certifiés RF tout comme le sont les tips utilisés. L'eau sera traitée par 0,1 % de diéthyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma, USA) pendant une demi-heure à température ambiante puis autoclavée 20 minutes à 120°C.

Pour isoler l'ARN total à partir de cultures cellulaires, nous avons utilisé la solution Ultraspec RNA (Biotecx, USA). Cette purification est basée sur la propriété que possède l'ARN de rester soluble dans une solution à pH4 contenant une concentration élevée en sels de guanidine. La plupart des protéines et les petits fragments d'ADN (de 50 paires de bases à 10 kbp) restent dans la phase organique (phénol/chloroforme), alors que les plus grands fragments d'ADN et quelques protéines restent à l'interface. Cette technique permet de récupérer théoriquement 100-200 µg d'ARN total pour 10 millions de cellules eucaryotes.

Solutions

- Ultraspec RNA (Biotecx, USA) fourni par la firme.
- Chloroforme RF (UCB, Belgique).
- Isopropanol 100% RF (Sigma, USA).
- Ethanol 70% RF.
- Eau traitée au DEPC.

Méthode

L'extraction est réalisée sur des PBMCs immédiatement après l'arrêt de la stimulation.

- Centrifuger les PBMCs à 1100 rpm pendant 15 minutes.
- Prélever le milieu de culture pour un dosage d'IFN γ .
- Resuspendre le culot cellulaire dans de l'Ultraspec RNA (1 ml pour 10 millions de cellules).
- Homogénéiser en passant plusieurs fois au travers d'une pointe de 1 ml RF et laisser 5 minutes sur glace (4°C).
- Ajouter 0,2 volume de chloroforme RF et secouer vigoureusement pendant 15 secondes.

- Laisser reposer 5 minutes à 4°C (cette étape permet la stabilisation de l'ARN et l'inhibition des RNAses qui seraient présentes).
- Centrifuger à 13000 rpm et à 4°C pendant 15 minutes.
- Récupérer les 4/5 de la phase aqueuse et la transférer dans un autre Eppendorf.
- Ajouter un volume d'isopropanol 100% RF et bien mélanger jusqu'à homogénéisation.
- Centrifuger à 13000 rpm et à 4°C pendant 10 minutes.
- Eliminer délicatement le surnageant.
- Ajouter de l'éthanol 70% froid (-20°C).
- Centrifuger à 13000 rpm et à 4°C pendant 5 minutes.
- Répéter les trois opérations précédentes (2 X).
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous vide.
- Dissoudre le culot dans 50 µl d'eau exempte de RNAses.
- Quantification (point IV).
- Conservation à -20°C.

IV. Quantification par spectrophotométrie de l'ADN et de l'ARN

La mesure d'absorbance (DO) à 260 nm permet de calculer la concentration des acides nucléiques. Une absorbance à 260 nm égale à 1 correspond à une concentration de 50 µg d'ADN bicaténaire par ml ou à une concentration de 40 µg d'ARN monocaténaire selon la nature des acides nucléiques à quantifier.

Le rapport entre les absorbances à 260 nm et à 280 nm permet une estimation de la pureté de l'ADN ou de l'ARN. Des préparations pures ont un rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ compris entre 1,6 et 2. S'il y a contamination de la solution par du phénol ou des protéines, ce rapport sera inférieur ou supérieur et une quantification exacte de l'ARN ne sera pas possible par cette méthode. Un rapport inférieur peut également correspondre à une mauvaise dissolution des acides nucléiques; dans ce cas, il suffit de passer la solution d'acides nucléiques 30 sec à 60°C. Le spectromètre utilisé est l'Ultraspec II E de chez LKB (Suède).

V. Amplification et extraction des plasmides

Les plasmides que nous avons utilisés nous ont été fournis par Fauzia Nawaz (Laboratory of Applied and Molecular Biology, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK). Une partie du cDNA des cytokines bovines IL2, IL4, IFN γ ou IL10 a été insérée dans ces plasmides pCR-script Amp SK+ (Stratagene Ltd, UK). De plus, ces inserts présentent une délétion de 30 à 50 paires de bases, ce qui nous permet d'envisager une PCR compétitive (cfr. point IX.).

V.1. Amplification des plasmides

Solutions

- Souche bactérienne *Escherichia coli* XL1blue (Stratagene Ltd, UK).
- Milieu LB liquide :
 - Tryptone (Gibco-BRL) 10 g/l
 - NACI (Gibco-BRL) 5 g/l
 - Yeast Extract (Gibco-BRL) 5 g/l

 - Porter à volume avec de l'eau distillée.
 - Autoclave (20 minutes, 120°C).
 - Les cultures liquides se font à 37°C et avec agitation dans des bouteilles universelles ou dans des Erlenmeyers avec contre-pales. Dans le cas de l'utilisabon d'Erlenmeyers, le volume de la culture liquide ne dépasse pas en général 1/10ème du volume de l'Erlenmeyer.
- Milieu LB solide :
 - De même composition que le LB liquide, ce milieu content 1,6 % d'agar (Gibco-BRL).
 - Ce milieu autoclavé et refroidi à 55°C est coulé dans des boîtes de Pétri (conservées à 4°C après solidification).
- Milieu LB sélectif :

– Ce milieu contient de l'ampicilline à une concentration de 100µg/ml de milieu LB. Cet antibiotique étant thermolabile, il sera ajouté au milieu autoclavé et refroidi à 55°C à une concentration finale de 100µg/ml de LB.

Méthode

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans un micro-organisme. A cette fin, la paroi et la membrane bactérienne doivent devenir perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente. Les souches d'*E. coli* sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ou de chlorure de rubidium. Ces ions, déstabilisent la paroi et la membrane de la bactérie qui gonfle prenant ainsi l'aspect d'un sphéroplaste.

Un choc thermique permet l'entrée de l'ADN dans la bactérie. Suite à cela, un temps d'incubation d'au moins 30 minutes à 37°C en milieu riche est nécessaire à la bactérie pour régénérer sa paroi et commencer à exprimer le gène de résistance codé par le plasmide. Enfin, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif où seules les bactéries transformées, c'est-à-dire ayant reçu le plasmide porteur d'un gène de résistance à un antibiotique (l'agent sélectif), pourront croître. Ces clones cellulaires bactériens correspondent à des clones moléculaires du plasmide. Cette technique permet une efficacité de transformation de 10^6 à 10^7 transformants par µg d'ADN.

- A 100 à 200 ng de cellules compétentes (dégelées sur glace ou "fraîches"), ajouter 1 à 100 ng d'ADN suspendu dans de l'eau ou du TE
- Incuber 30 à 40 minutes sur glace puis 2 minutes à 42°C (choc thermique) puis 2 minutes sur glace.
- Ajouter 0,5 à 1 ml de LB et incuber 30 à 60 minutes à 37°C (régénération)
- Etaler sur boîte avec un milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.
 - Contrôle négatif: Des cellules compétentes sans ADN subissant les conditions de transformation sont étalées sur milieu sélectif comme contrôle de sensibilité, montrant ainsi la validité de ce milieu et la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

- Contrôle positif : Dans le cas d'une transformation avec un mélange de ligation, une transformation en parallèle avec une quantité connue d'un plasmide est réalisée dans les mêmes conditions ce qui permet de contrôler le taux de transformation.
- Contrôle de viabilité : Des cellules compétentes sans ADN ayant subi les mêmes conditions de transformation sont étalées sur un milieu non sélectif comme contrôle de leur viabilité.
- Prélever des bactéries transformées à l'aide d'une anse de platine et ensemercer 10 ml de milieu LB liquide + ampiciline (100µg/ml).
- Incuber une nuit à 37°C.
- Prélever 9 ml de la préculture et ensemercer 150 ml de LB liquide + ampiciline (100µg/ml).

V.2. Extraction 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.

Solutions

Les solutions sont fournies avec les colonnes dans le kit.

Méthode

- Récupérer les cellules transformées par un plasmide par centrifugation à 2500 rpm et à 4°C pendant 15 minutes dans des tubes de 50 ml.
- Resuspendre le culot bactérien dans 4 ml de tampon S1.
- Ajouter 4 ml de tampon S2. Mélanger gentiment et incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
- Ajouter 4 ml de tampon S3. Mélanger gentiment et incuber sur glace pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm (Rotor SS34, Sorval) et à 4°C pendant 40 minutes.
- Equilibrer la colonne AX 100 avec 2 ml de tampon N2.

- Récupérer le surnageant avec précaution sans toucher le précipité blanc et charger la colonne.
- Laver la colonne avec 2 x 4 ml de tampon N3.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5.
- Répartir le volume d'élution en Eppendorf.
- Précipiter l'ADN plasmidique avec 1,4 ml d'isopropanol, mélanger bien et centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes.
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70%, sécher le culot sous vide et resuspendre dans 100µl d'eau distillée ou TE.
- Estimer la concentration d'ADN en mesurant la DO à 280 nm.
- Restreindre le plasmide avec l'enzyme adéquate puis déposer sur gel pour contrôler la présence et la pureté de l'ADN extrait.

V.3. Restriction des plasmides

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent une séquence précise dans l'ADN double brin et qui coupent à un endroit déterminé dans cette séquence de reconnaissance ou, pour certaines enzymes, à proximité. La plupart des enzymes de restriction ont un site de reconnaissance recouvrant une séquence de 4 à 6 paires de bases qui est un palindrome (la séquence est identique sur les deux brins d'ADN).

Les enzymes qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail sont commercialisées par la firme Boehringer. Elles sont conservées à -20°C. Les tampons sont concentrés 10 x par rapport à leur concentration d'utilisation dans la réaction de restriction.

Les plasmides contenant les inserts IFN γ et IL2 sont restreints par *BamH I*, celui contenant l'insert IL10 par *EcoR I* et le plasmide contenant l'insert IL4 est restreint par *Pvu II*.

Méthode

Dans un Eppendorf, mélanger :

- 2 µl de plasmide à 2,5 µg/µl.
- 1/10^{ème} du volume final de tampon adéquat concentré 10 x.
- l'enzyme de restriction (1 unité par µg d'ADN ou selon les recommandations de la firme).

- de l'eau stérile jusqu'au volume final (20 μ l).
- La réaction de restriction se fait durant deux heures à 37°.

Séquençage des inserts

La méthode de séquençage que nous avons utilisée lors de ce travail a été mise au point par la firme Perkin-Elmer et est basée sur la méthode de Sanger. Il s'agit du séquençage automatique par PCR.

Une molécule d'ADN bicaténaire est dénaturée (séparation des deux brins). Un des deux brins (le brin matrice) est hybridé à un oligonucléotide de synthèse (l'amorce). Celui-ci est en fait complémentaire d'une courte portion du brin à séquencer (10 à 50 bp) et est utilisé comme amorce pour l'ADN polymérase.

La Taq DNA polymérase commence la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à la matrice à partir de l'amorce et ce, dans un mélange comprenant les quatre déoxynucléotides (A,C,G,T) et les quatre didéoxynucléotides chacun d'une fluorescence différente.

Lorsque la Taq DNA polymérase incorpore un didéoxynucléotide, elle s'arrête et ainsi bloque la synthèse; en effet, le didéoxynucléotide (ddNTP) ne possédant pas d'hydroxyle en 3' ne peut former de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant.

Les produits de la PCR sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide et sont séparés suivant leur taille par électrophorèse, en conditions dénaturantes (urée). Chaque bande possède une fluorescence en fonction du type de ddNTP qui est lue par l'ordinateur. De cette lecture, l'ordinateur déduit la séquence nucléotidique.

Solutions

Toutes les solutions reprises ci-dessous sont fournies dans le kit de séquençage ABI PRISM™ (avec l'AmpliTaq DNA polymerase FS) commercialisé par Perkin-Elmer Corporation.

Méthode

1. La PCR :

- Mélanger les réactifs suivants dans un Eppendorf PCR:
 - Mix terminator ready reaction 8 μ l
 - Matrice 250- 500 ng
 - Amorce 3,2 pmole
 - H₂O d volume final de 20 μ l
- La PCR est constituée par 25 cycles de :
 - 96°C pendant 30 secondes (dénaturation des brins d'ADN).
 - 50°C pendant 15 secondes (hybridation de l'amorce).
 - 60°C pendant 4 minutes (température optimale d'activité de la polymérase).
- Placer immédiatement les tubes à 4°C.

2. Purification des produits d'extension :

L'AmpliTaq DNA polymérase est une enzyme qui travaille très bien mais exige des concentrations en didéoxynucléotides fluorescents élevées car elle discrimine l'incorporation de didéoxynucléotides. Tous ne sont pas incorporés lors de la réaction PCR et doivent donc être éliminés avant le chargement de la réaction sur le gel afin qu'aucun didéoxynucléotide fluorescent non-incorporé ne puisse être chargé sur le gel.

- Mélanger dans un Eppendorf les produits suivants :
 - 2 μ l d'acétate de sodium 3M, pH 4.6.
 - 50 μ l d'éthanol 95%.
 - les 20 μ l de la réaction PCR.
- Bien agiter et placer à 4°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 30 minutes.
- Eliminer l'éthanol de la solution.
- Rincer le culot avec 250 μ l d'éthanol 70%.
- Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm.
- Eliminer l'éthanol et sécher le culot.

- Stocker à -20°C.

3. Lecture de la fluorescence :

Le séquenceur utilisé est l'ABI PRISM 377 (Perkin Elmer). La préparation du gel de séquençage et le traitement des échantillons à charger (à partir du culot sec d'ADN) ont été pris en charge par le laboratoire du Prof. Goffinet. Nous avons reçu la lecture de la séquence dans laquelle chaque nucléotide lu est caractérisé par un pic de fluorescence.

VII. Electrophorèse d'ADN et d'ARN en gel d'agarose

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la quantité des fragments. Les groupements phosphates confèrent à l'ADN (ou ARN) une charge globale négative. L'ADN (ou ARN) migre donc vers l'électrode positive dans un champ électrique. La vitesse de migration des acides nucléiques dans le gel dépend des quatre facteurs suivants :

- Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN (ou ARN) linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. En cas de voltage trop important, la résolution diminue.
- La concentration en agarose. Les gels à forte concentration (1,5 - 2%) permettent de séparer des molécules d'ADN de petite taille (100 à 1500 bp). Les gels à faible concentration (0,8 à 1%) permettent de séparer des molécules de taille supérieure (500 bp à plus de 10 kb). Nous avons utilisé un gel 2% pour séparer nos amplicons et un gel 1% pour la migration d'ARN.
- Le poids moléculaire des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN double brins linéaires migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.
- La conformation de l'ADN. Les formes plasmidiques super enroulées ou CCC (Completely Closed Circular), circulaires cassées sur un seul brin (nick) ou OC (Open Circular) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de migration sera CCC>OL>OC.

La visualisation des bandes se fera sous UV. Le bromure d'éthidium a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN ou de l'ARN (Il est par là même hautement mutagène et donc dangereux) et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce en rose-orange sous UV.

Solutions :

- Tampon TAE :

Tris	40 mM
EDTA	1 mM
Acide acétique glacial	40 mM

porter à pH8.

- Soluton d'alourdisseur :

pour 10 ml

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

porter à volume avec H₂O.

- Solution de bromure d'éthidium

10 mg/ml maintenue à l'abri de la lumière.

Méthode :

- Dans le cas de gel d'ARN, il faut nettoyer la cuve au SDS 2% et la rincer abondamment avec de l'eau RF.
- Ajouter l'agarose à du TAE et porter le tout à ébullition puis laisser refroidir à 50°C. Le gel encore liquide à cette température est coulé dans un moule en plexiglas.
- Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 mg/ml.
- Placer un peigne sur le moule en plexiglas permettant de former des puits dans le gel refroidi et solidifié. La taille des dents du peigne est choisie selon le volume des échantillons à déposer sur gel, le plus souvent 15 à 20 µl. Après solidification, retirer le peigne et placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TAE.

Fragment	Taille (kpbs)
1	1057
2	770
3	612
4	495
5	392
6A	345
6B	341
6C	335
7A	297
7B	291
8	210
9	162
10	79

Fig. B.VII.1. : Taille des fragments du Marker 5.

Fragment	Taille (kpbs)
1	578
2A	458
2B	434
3A	298
3B	267
3C	257
4	174
5	102
6	80
7	18
8	11

Fig. B.VII.2. : Taille des fragments de la restriction de l'ADN de pUC 19 par Hae III.

- Introduire l'échantillon d'ADN (ou d'ARN) alourdi par l'adjonction de 1/10 du volume final de solution d'alourdisseur à la micropipette dans un des puits. Le bleu de bromophénol qui migre à la même vitesse que les plus petits fragments visibles sur le gel permet de contrôler la migration.
- Appliquer une différence de potentiel de 40 à 100 volts aux extrémités de la cuve pendant 2 à 4 heures.
- Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur UV ($\lambda=302$ nm) pour visualiser les bandes d'ADN (ou d'ARN) et les photographier.
- Dans un des puits du gel, on place un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par un enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. Nous avons utilisé l'ADN du phageX174 restreint par *Hinc II* (Marker 5, Eurogentec) (Fig. B.VII.1.) mais également l'ADN de pUC 19 restreint par *Hae III* (Fig. B.VII.2.). Il n'y a pas de marqueur de taille pour l'ARN.

VIII. RT-PCR

Cette technique consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire du brin d'ARNm (transcription inverse ou reverse transcription (RT)). Ce type d'ADN est appelé ADN complémentaire (cDNA) et ne contient que les séquences exoniques du gène. Ensuite, ce brin d'ADN est amplifié par une réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Fig. B.VIII.1.).

La transcription inverse se fait ici à l'aide d'une enzyme, la reverse transcriptase (RTase) (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Gibco, USA)), qui synthétise un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin d'ARN à condition de fournir au système une amorce d'ADN nucléotidique (ou oligo) d'une dizaine de paires de bases, nous avons utilisé un oligo-dT-10 complémentaires à la région 3' terminale de l'ARNm qui est un poly-A. La RTase allonge l'extrémité 3'-OH de l'amorce en ajoutant des nucléotides complémentaires à la matrice d'ARN.

La réaction de PCR permet d'amplifier jusqu'à un million de fois un fragment de cDNA. Cette technique repose sur l'action d'une ADN polymérase capable de copier un brin d'ADN à haute température (72°C) et stable à très haute température (95°C) (*Thermus brockianus* ADN polymérase (Dynazyme™, Suède)). La stratégie consiste à faire fonctionner cette enzyme à

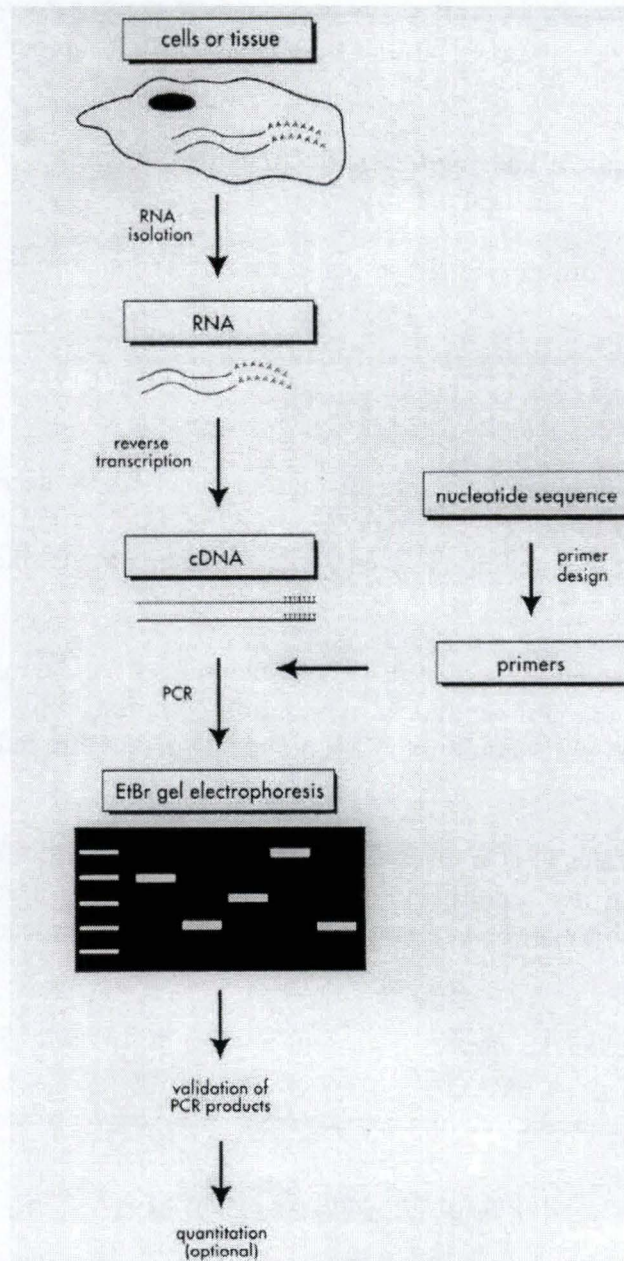


Fig. B.VIII.1. : Schéma général d'une RT-PCR.

- La distance entre les amorces ne doit pas dépasser 3000 bp car au-delà, l'efficacité diminue.
- La longueur optimale d'une amorce est de 20 à 30 pour assurer une bonne hybridation à la matrice et une spécificité suffisante.
- Eviter des primers qui pourraient se lier entre eux et qui formeraient des dimères de primers
- Les primers sont, de préférence, choisis à cheval sur deux exons. Ainsi l'amplification d'ADN génomique est évitée. .
- La spécificité doit être maximale et surtout dans les 8 dernières bases du côté 3', puisque la polymérisation se fait de 5' en 3'. Alors que des séquences non complémentaires peuvent être additionnées en 5' dans le but, par exemple, d'introduire un site de restriction.
- La séquence doit avoir un pourcentage de nucléotides G et C équilibré avec celui de A et T de manière à avoir une température d'hybridation comprise entre 50°C et 72°C car les résultats sont meilleurs dans ces conditions. Le pourcentage doit être le même pour le reverse et le forward.
- Eviter les nucléotides G et C en 3' du primer car il pourrait s'hybrider à une séquence riche en G et C et donner une amplification non spécifique, tandis qu'une séquence riche en GC du côté 5' ne pourra donner cette amplification non spécifique à cause de la cinétique de la polymérisation.
- Eviter les trop longues séquences d'un seul nucléotide (plus de 3 ou 4 nucléotides) et spécialement les G et C.

Tableau B.VIII.1. : Règles facilitant le bon choix de primers pour PCR

partir d'un petit fragment d'ADN complémentaire d'une des extrémités de la région à amplifier. Cette amorce va s'hybrider à l'ADN et pourra être allongée par son extrémité 3'-OH libre par addition de nucléotides complémentaires à la séquence d'ADN matrice. Mais ceci ne synthétise qu'un seul brin. Pour que l'amplification se fasse, il faut qu'un autre primer spécifique amorce la synthèse du brin complémentaire au brin susmentionné. Si on alterne sur un cycleur thermique des cycles de dénaturation des doubles brins, d'hybridation des amorces et de polymérisation, le nombre de doubles brins augmentera de manière exponentielle. Les produits majeurs de cette réaction sont donc des doubles brins d'ADN d'une séquence comprise entre les deux amorces.

La spécificité de l'amplification dépend de la température et du temps d'annealing, de la concentration en polymérase, de la concentration en sels et de la concentration en primers. Mais, si une diminution de ces trois derniers facteurs augmente la spécificité, elle diminue par contre le rendement de la PCR. La spécificité dépend également de la séquence des primers utilisés. Leur choix est donc une étape importante et doit suivre les différents conseils résumés dans le tableau B.VIII.1.

Méthode :

1. Transcription reverse (RT)

- Dans un Eppendorf de 200 µl, pour un volume final de 20 µl, mélanger :
- Oligo (dT)₁₀ (Boehringer, Allemagne) 250 ng
- ARN total 5µg
- Eau RF pour un total de 18,5 µl
- Chauffer 15 minutes à 65°C.
- Refroidir rapidement sur glace.
- Tampon M-MLV RT 5 fois concentré (Gibco, USA) 6 µl
- dNTPs (déoxyribonucléotides triphosphates) 10 mM (Boehringer, Allemagne) 2,5 µl
- Inhibiteur de RNAses (Solution de 10 unités/µl, Gibco, USA) 20 unités
- Eau traitée au DEPC porter à 30 µl
- M-MLV RTase (Gibco, USA) 200 unités

La RT se fait sur un cycleur thermique (TECHNE GENE E) par le cycle suivant:

- 37°C pendant 60 minutes (température optimale pour l'activité de la RTase M-MLV).
- 95°C pendant 5 minutes (arrêt de la réaction par dénaturation de la RTase). Le cDNA est immédiatement utilisé pour réaliser la PCR ou il peut être conservé à -20°C.

2. Polymérisation en chaîne (PCR)

- Tampon PCR/Dynazyme 10 fois concentré (Boehringer, Allemagne) 5 µl
- dNTP 10 mM 2 µl
- Oligo 3' 20 picomoles
- Oligo 5' 20 picomoles
- Eau bidistillée porter à 50 µl
- Polymérase (Dynazyme, Suède) 2,5 unités
- Recouvrir la réaction avec 40 µl d'huile minérale (Sigma).

La PCR se fait par les étapes suivantes :

- 94°C pendant 2 minutes (dénaturation de l'ADN).
- 35 fois le cycle: 94°C pendant 1 minute (dénaturation des deux brins d'ADN).
55°C pour l'IL2, 57°C pour l'IL4 et l'IFN γ , 59°C pour l'IL10 et la β actine pendant 1 minute (hybridation des oligos).
72°C pendant 2 minutes (température optimale d'activité de la polymérase).
- 72°C pendant 10 minutes (élongation finale).

Les différentes températures d'annealing sont choisies d'après la température de melting (T_m) des différentes amorces qui se calcule selon la formule suivante pour chaque amorce :

$$T_m(^{\circ}C) = (\text{nombre de A et T}) \times 2 + (\text{nombre de C et G}) \times 4$$

Généralement lors du choix des amorces, on s'arrange pour qu'elles aient plus ou moins la même température d'hybridation, supérieure à 50°C, pour éviter toute hybridation non spécifique.

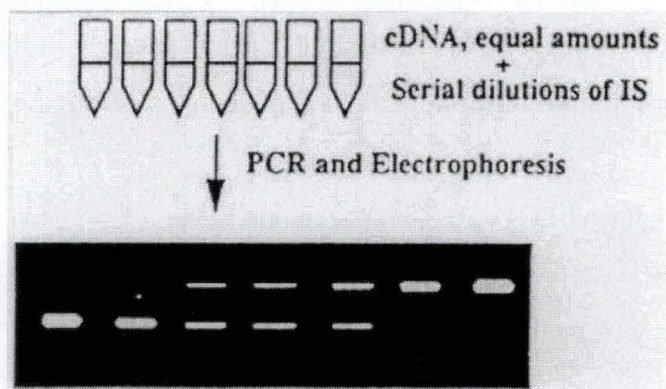


Fig. B.IX.1. : Plusieurs PCR sont effectuées avec différentes dilution de standard interne (compétiteur) pour une même concentration en cDNA cible (Jiang et al., 1996).

- Stocker à -20°C.
- Déposer 10 µl du produit de la RT-PCR sur gel agarose.

IX. Quantification d'ARNm par RT-PCR en présence d'un standard interne

La technique utilisée pour la quantification des ARNm de cytokines est basée sur les réactions consécutives de transcription inverse ou reverse transcription (RT) non spécifique c'est-à-dire que tous les ARNm seront retrotranscrits à partir d'ARN totaux en utilisant un oligo(dT) comme amorce. Cette RT est suivie d'une PCR en présence d'un ADN standard. Les ADN standards sont des plasmides contenant une séquence similaire à celle du cDNA à quantifier (cfr. point V). Les standards et les séquences cibles entrent en compétition pour les mêmes primers et donc pour l'amplification. Puisque le standard et l'ADN cible ont pratiquement la même séquence, utilisent les mêmes primers et sont amplifiés dans le même tube, leurs efficacités d'amplification resteront similaires et varieront parallèlement au cours des cycles PCR. Donc, pour n'importe quel nombre de cycles d'amplification, le rapport de quantité de produit d'amplification du standard et du cDNA cible restera égal au rapport des quantités de départ.

Méthode :

Différentes dilutions du standard (ou compétiteur) sont ajoutées à une série de réactions PCR contenant une quantité constante de cDNA (Fig. B.IX.1.).

Après la PCR, les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose. Ceci a été rendu possible par la délétion d'une cinquantaine de paires de bases dans la séquence du standard.

Les quantités d'amplicons du standard et du cDNA cible sont déterminées individuellement pour chaque réaction par un logiciel de densitométrie d'image (Vilber Lourmat Bio 1d V 6.32, France) qui calcule le volume de pixels situé dans la surface de

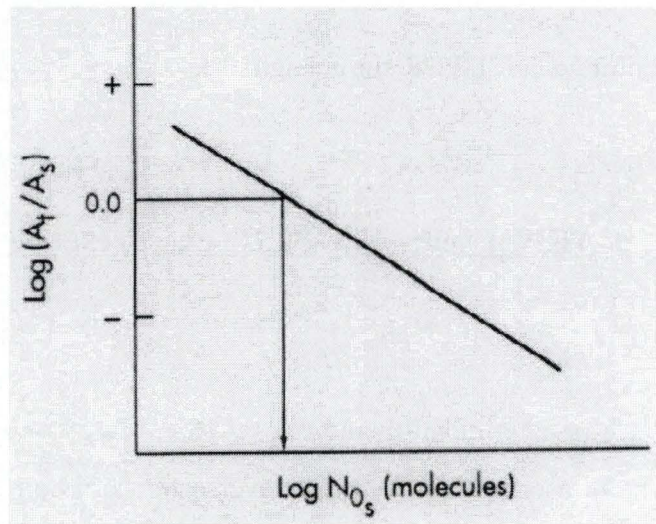


Fig. B.IX.2. : Le logarithme du rapport des produits d'amplification du cDNA cible et du compétiteur sont mis sur graphique en fonction du logarithme de la quantité de compétiteur ajoutée. Lorsque le rapport est égal à 1, le log du rapport est de zéro (Siebert & Larrick, 1993).

chaque spot lumineux à quantifier, ce volume étant proportionnel à la quantité de bromure fixée à l'ADN qui forme le spot.

Ensuite, un graphique montre en abscisse le logarithme de la quantité de standard engagée dans la réaction et en ordonnée le logarithme du rapport des densités calculées pour l'ADN compétiteur et l'ADN cible (Fig. B.IX.2.). La quantité de cDNA cible dans la réaction est extrapolée à partir du graphique puisqu'on admet que la quantité de départ de cDNA cible est égale à la quantité de DNA compétiteur ajoutée, lorsque le rapport de quantité des deux amplicons est un rapport équimolaire. Il faut noter que, puisque la taille du standard et du compétiteur sont différentes, la quantité de bromure incorporée n'est pas la même pour une même quantité de l'un ou de l'autre car les séquences plus longues incorporent plus de bromure que les petites. Un facteur de correction doit alors être pris en compte lors du calcul des rapport de densité.

Si l'on veut maintenant déterminer la quantité initiale d'ARNm, il ne faut pas oublier que l'efficacité de la RT n'est pas de 100%. L'efficacité d'une synthèse de cDNA en utilisant un oligo(dT) comme primer est estimée être de 40 à 50% (Bouaboula et al., 1992).

X. ELISA

Un test ELISA spécifique de l'IFN γ bovine a été effectué pour mettre en évidence que la détection d'ARNm correspond bien à une sécrétion de la cytokine en question.

Solutions :

– PBS 10 x :

KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄	11,48g
NaCl	80g
KCl	2g

– PBS-EDTA 50mM-Tween 0,1% (PET) :

PBS 10 x	100 ml
EDTA	18,61 g
Tween 20%	1 g
H ₂ O	porter à 1 litre

pH 7,4

– Solution de révélation :

TMB (4 mg TMB dans 1 ml de HCl 0,1 N) 0,5 ml

Tampon citrate 9,5 ml

H₂O₂ 2 µl

– Tampon citrate :

Acide citrique 0,96 g/100 ml

Tri sodium citrate 1,47 g/100 ml

Mélanger l'un dans l'autre en amenant à pH 4,2.

– Tampon carbonate :

Na₂CO₃ 10,6 g/l

NaHCO₃ 8,4 g/l

Ajouter l'un dans l'autre pour amener à pH 9,5

– Hydrolysate de caséine :

Caséine 25 g

NaOH 0,3 N 800 ml

Agiter une nuit à 37°C.

Porter à pH 7 avec de l'HCl concentré.

Porter à 1 l avec H₂O.

Filtrer.

Aliquoter.

Stocker à -20°C.

Méthode :

– Coater des plaques maxisorp (Nunk, Danemark) avec 150 µl/puit d'anticorps 5D10 5, µg/ml en tampon carbonate.

– Incuber une nuit à 37°C.

– Saturer 3 heures à 37°C avec 200 µl/puits de PBS-BSA 3%-Tween 0,1%.

– Laver 5 fois en NaCl-Tween 0,01%.

– Déposer 100 µl/puits les échantillons à tester non dilués.

– Incuber une heure à température ambiante.

- Laver 5 fois en NaCl-Tween 0,01%.
- Déposer 100 µl/puits d'anticorps 6H5-peroxidés dilués 500 fois en PET-HC (1/25).
- Incuber une heure à température ambiante.
- Laver 5 fois en NaCl-Tween 0,01%.
- Déposer 100 µl/puit de solution de révélation (TMB commercial ELISA-technology).
- Incuber 20 minutes à l'obscurité.
- Lire à 630 et 490 nm.
- Fixer éventuellement la réaction en déposant 25 µl/puits de H₂SO₄ 2 N.
- Lire à 450 et 630 nm.

Résultats et discussions

<i>Nombre de cellules</i>	<i>Quantité d'ARN total extrait (μg)</i>	<i>Moyenne(μg)</i>	<i>Pureté :DO260/DO280</i>
1 million	8,7	4,45	2,07
	2,6		1,08
	2,8		0,58
	3,7		0,7
5 millions	11,5	12,73	2,5
	16,1		1,08
	10,6		0,8
10 millions	9,6	13,6	1,57
	17,4		4,46
	18,3		1,36
	9,1		1,68

Tableau C.I.1. : Quantification de l'ARN total par spectrophotométrie et estimation de sa pureté : si nous avons un rapport des DO inférieure à 1,6, cela signifie que la présence de protéines contaminantes (DO 280nm élevée) induit une surestimation de la concentration en ARN. Par contre, un rapport de DO supérieur à 2 signifie également la présence de protéines contaminantes. La concentration en ARN est ici aussi surestimée.

Pour pouvoir mettre au point la technique RT-PCR compétitive pour une quantification des ARNm des cytokines bovines IFN γ , IL2, IL4 et IL10, nous avons besoin d'une source cellulaire via laquelle nous pouvons tirer ces ARNm pour tester la technique. Cette source cellulaire est constituée de PBMC de veaux stimulées *in vitro* non spécifiquement par de la concanavaline A, ce qui engendre la transcription de ces quatre ARNm parmi d'autres.

I. Extraction d'ARN total sur PBMC stimulés non spécifiquement

Des PBMC (cellules mononucléées de sang périphérique) de sang de veaux infectés par *Brucella abortus* dans le cadre du développement d'une nouvelle méthode de diagnostic de brucellose bovine (Weynants, Laboratoire de Microbiologie, FUNDP), ont été isolées sur gradient de Ficoll-urograffine, puis resuspendues dans du milieu RPMI 1640 complet aux concentrations de 10, 5 et 1 million de cellules/ml et stimulées non spécifiquement *in vitro* à la concanavaline A (cfr. Matériel & méthodes). Ceci afin de voir le seuil de concentration cellulaire auquel une extraction d'ARN peut se faire en quantité suffisante et avec une pureté acceptable. La quantification au spectrophotomètre donne les résultats montrés dans le tableau C.I.1. Le rendement obtenu tourne entre 10 et 15 μg d'ARN total pour 10 millions de cellules, ce qui est loin des 100 μg attendus. Ce rendement sera suffisant puisque la quantité d'ARN total qui sera engagée par RT-PCR est de 5 μg . Il faut remarquer également que l'on obtient plus ou moins la même quantité d'ARN total lors d'une extraction à partir de 5 millions de cellules mais la pureté estimée (cfr. Matériel & méthodes) est assez mauvaise et donc la concentration en ARN total est surestimée. Afin d'avoir de l'ARN en suffisance, nous travaillerons avec des cellules incubées à la concentration de 10 millions/ml de milieu RPMI complet.

I.1. Vérification de la qualité de l'ARN

La vérification de la pureté de l'ARN se fait par spectrophotométrie en calculant le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm (cfr. Matériel & méthodes). La pureté des ARN totaux extraits de PBMC bovines à la concentration de 10 millions de cellules par ml de milieu et stimulées à la concanavaline A est montrée dans le tableau C.I.1. Nous n'utiliserons

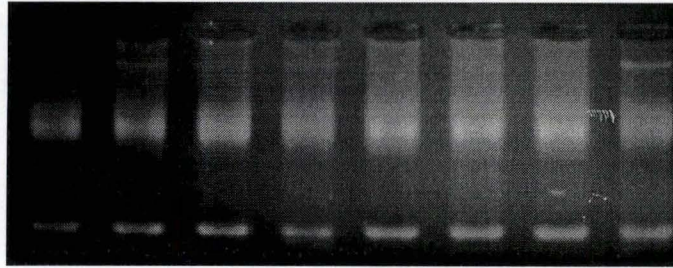


Photo C.I.1. :Analyse de la qualité des ARN totaux après extraction sur des PBMC bovines mises en culture à la concentration de 10^7 cellules par ml et stimulées non spécifiquement à la concanavaline A. 1 μ g d'ARN a été déposé par puits. Bandes du haut : ARN 28 S ; bandes du bas : ARN 18 S.

Cytokine	Amorces 5'	Amorces 3'	Taille du produit PCR sur cDNA	T° d'hybridation
IFN γ	gcaagtagcccagatgtagc	ggtgacaggtcaattcatcac	316 bp	57°C
IL2	tgctgctggatttacagttgc	gaggcacttagtgatcaagct	373 bp	55°C
IL4	gtctcacctaccagctgac	tcagcgtactgtgctcgtc	348 bp	57°C
IL10	acagctcagcactgctctgtt	cgttgatcatgtaggattctatg	518 bp	59°C
β -actine	ccagacagcactgtgttggc	gagaagctgtgctacgtcgc	270 bp	60°C

Tableau C.I.2. : Séquence des amorces , taille des produits PCR sur cDNA et t° d'hybridation utilisée.

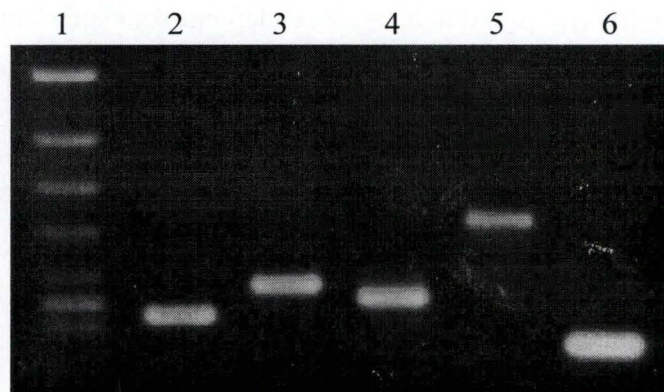


Photo C.I.2. :Les quatre cytokines et la β -actine ont pu être amplifiées par RT-PCR à partir d'ARN total extrait de PBMC bovines stimulées à la concanavaline A. Piste 1 :marker 5 ;piste 2 : IFN γ ;piste 3 :IL2 ;piste 4 :IL4 ;piste 5 :IL10 ;piste 6 : β actine.

que l'ARN dont la pureté est suffisamment bonne, c'est-à-dire à un rapport de densité optique entre 1,6 et 2, pour être sûrs que sa concentration ne soit pas surestimée.

Afin de vérifier si l'ARN total n'est pas dégradé, 1 µg de ces mêmes ARN est examiné après migration sur gel d'électrophorèse 1% d'agarose (fig. C.I.1.). L'ARN total contient seulement quelques % d'ARN messagers, le reste étant majoritairement des ARN de transfert et surtout de l'ARN ribosomique. Chez les eucaryotes, l'ARNr 18 S compte 1874 bases et l'ARNr 28 S, 4718 bases. La migration de l'ARN total sur gel d'électrophorèse va donner une traînée lumineuse avec une détection nette de deux bandes qui sont les ARNr 28 S et 18 S. Si l'ARN total n'a pas subi de dégradation, la bande de l'ARNr 28 S doit être environ deux fois plus intense que celle de l'ARNr 18 S. C'est ce que nous observons sur la photo C.I.1. Les ARN en question n'étant pas dégradés, nous pouvons les engager en RT-PCR.

I.2. Détection des ARNm de l'IFN γ , IL2, IL4 et de l'IL10 bovins par RT-PCR

Les ARN totaux extraits de PBMC bovines stimulées (voir point précédent) ont été engagés dans des réactions de RT-PCR en vue de détecter les ARN messagers (ARNm) des cytokines bovines suivantes : IFN γ , IL2, IL4 et IL10. Les séquences des amorces (tableau C.I.2.) que nous avons utilisées pour les différentes PCR nous ont été fournies par Fauzia Nawaz (Laboratory of Applied and Molecular Biology, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK), ces amorces devant également être spécifiques des plasmides compétiteurs pour une PCR compétitive (cfr. point II.). Une RT-PCR spécifique des ARNm de la β -actine nous sert de contrôle positif puisque ceux-ci sont transcrits à un taux constant quel que soit l'état d'activation des cellules. Un contrôle négatif, c'est-à-dire une RT-PCR sur de l'eau, sera également effectué à chaque RT-PCR afin de témoigner d'une éventuelle contamination d'origine externe aux échantillons. Un autre contrôle peut être effectué : celui-ci consiste en une PCR sur de l'ARN qui n'a pas subi de transcription inverse. Ce contrôle témoigne d'une éventuelle contamination interne à l'échantillon, en particulier par de l'ADN génomique car les amorces n'ont pas été définies à cheval sur deux exons, ce qui évite l'amplification d'ADN génomique (cfr. Matériel & méthodes). La photo C.I.2. nous montre que les RT-PCR pour toutes les cytokines étudiées nous donnent bien une amplification spécifique puisque seules les tailles attendues (tableau C.I.2.) sont bien retrouvées après la migration sur gel d'électrophorèse de 10 µl des produits des RT-PCR. Cette photo C.I.2. nous informe

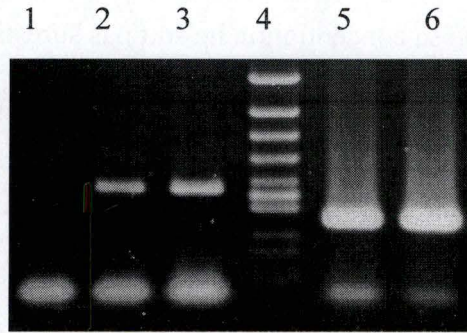


Photo C.I.3. : La piste 1 est une RT-PCR sur de l'eau et confirme l'absence d'une contamination extérieure. L'amplification PCR avec les primers β -actine d'ARN total (pistes 2 et 3) ; piste4 :marqueur 5 ;pistes 5 et 6 :PCR β -actine sur cDNA.

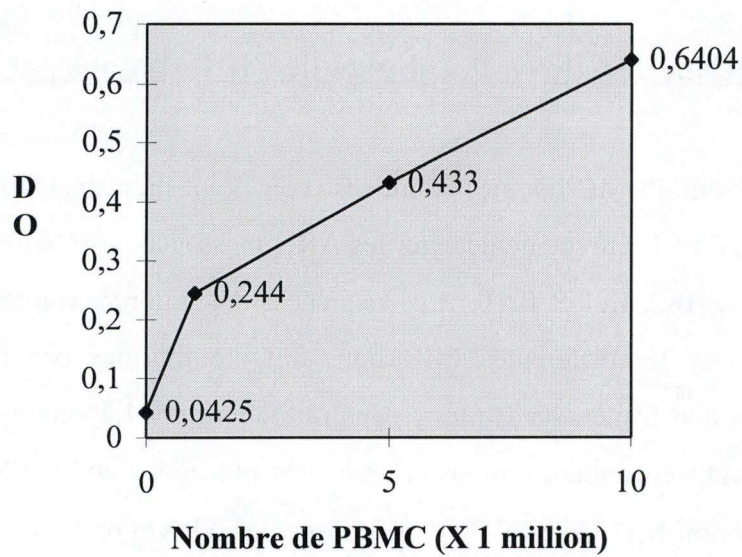


Tableau C.I.1. : Détection d'IFN γ par un test ELISA pour des PBMC stimulées à la concanavaline A.

également que la stimulation des PBMC bovines par la concanavaline A induit bien la transcription des quatre cytokines étudiées. Les contrôles négatifs (résultats non montrés pour les quatre cytokines) indiquent qu'aucune contamination n'est détectée sauf pour la β -actine (photo C.I.3.) où l'on peut voir une contamination interne à l'échantillon qui, en fait, est de l'ADN génomique. Cet ADN génomique n'entre pas en compétition pour les primers avec le cDNA des cytokines, parce que la taille des amplicons à partir d'ADN génomique de ces cytokines est trop élevée pour que sa polymérisation ait le temps de se terminer pendant la durée impartie dans les cycles PCR. Il ne posera donc pas de problème lors de la quantification par PCR compétitive.

Les mêmes réactions RT-PCR ont été effectuées sur de l'ARN extrait de PBMC de veaux n'ayant subi aucune infection (animal négatif). Nous y obtenons les mêmes résultats (non montrés). La restimulation *in vitro* par la concanavaline A active bien non spécifiquement les lymphocytes T.

I.2.1. Détection de l'IFN γ par ELISA

Un test ELISA spécifique de l'IFN γ bovine a été effectué afin de mettre en évidence que la détection d'ARNm correspond bien à une sécrétion de la cytokine en question. Ce test a été fait en double à partir du surnageant des PBMC mis en culture aux concentrations de 1 million, 5 millions et 10 millions de cellules par ml de milieu en présence de concanavaline A dont nous avons parlé dans le point précédent (Graphique C.I.1.). Les points sur le graphique correspondent à la moyenne des DO de doubles. La moyenne des DO des deux blancs constitués de PBS a la valeur de 0,022. Celle des deux témoins négatifs, surnageants de PBMC non stimulées, est de 0,0425 (valeur pour zéro cellule sur le graphique) et celle des deux témoins positifs, des surnageants de PBMC stimulées non spécifiquement et dont on a déjà vérifié la présence d'IFN γ sont utilisés comme témoins positifs, est de 0,4375. On peut constater qu'il y a bien sécrétion d'IFN γ au niveau protéique et que cette sécrétion est bien proportionnelle à la quantité de cellules. Ces résultats sont à mettre en corrélation avec la détection des ARNm par RT-PCR.

Dans le dosage d'IFN γ bovin mis au point par V. Weynants et dans le cas de détection sur des cellules stimulées antigénospécifiquement, la quantification se réalise en calculant un indice de sécrétion. Cet indice représente la DO obtenue pour les cellules sanguines stimulées

PBMC stimulés	Quantité d'ARN total(μg)	Pureté	PBMC non-stimulés	Quantité d'ARN total(μg)	Pureté
1 million	0	-	1 million	0,81	0,9
	1,5	10		1,08	1,24
2 millions	0,09	0,05	2 millions	0,48	0,5
	0,63	0,55		1,08	1
5 millions	1,83	0,76	5 millions	0,39	1
	1,38	1		1,2	1,5
10 millions	2,58	0,09	10 millions	0,96	0,5
	1,98	0,7		4,29	3,48

Tableau C.I.3. : quantification par spectrophotométrie de l'ARN total et calcul de la pureté.

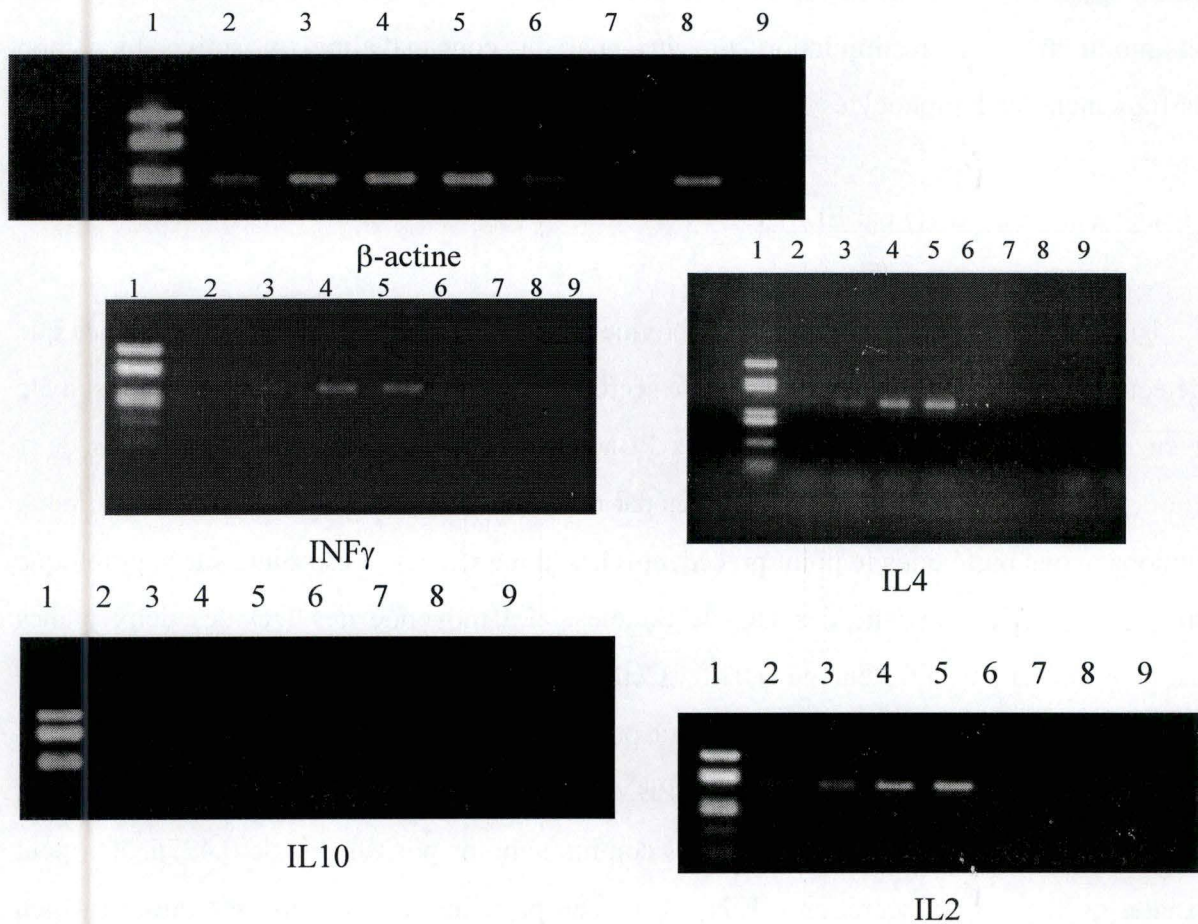


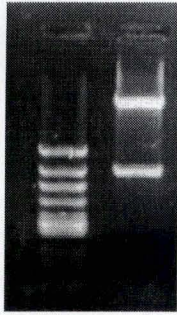
Photo C.I.4. :L'amplification par RT-PCR des ARNm de la β -actine nous sert de contrôle positif. Pour les quatre photos, nous avons en piste 1 :Marqueur de taille pUC 19, pistes 2 à 5 :PBMC stimulées à la concanavaline A et aux concentrations de gauche à droite, de 1.10^6 , 2.10^6 , 5.10^6 et 10.10^6 cellules par ml. Les pistes 6 à 9 correspondent aux PBMC non stimulées aux mêmes concentrations de gauche à droite.

sur la DO de cellules incubées à la même concentration mais non stimulées. Dans le cadre de notre expérience, nous n'avons pas incubé nos PBMC avec du RPMI seul. Nous ne pouvons donc pas calculer les indices de sécrétion. Une autre approche est de réaliser une courbe standard avec des dilutions en IFN γ recombinant.

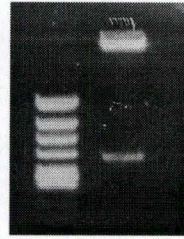
I.3.Détection d'ARNm de PBMC stimulées ou non

Les PBMC congelées ont l'avantage de pouvoir être conservées et facilement réutilisées par la suite. Des PBMC congelées provenant de sang de veaux ont été décongelées, resuspendues dans du milieu RPMI 1640 complet à une concentration de 10, 5, 2 et 1 million de cellules/ml et stimulées non spécifiquement *in vitro* à la concanavoline A (cfr. Matériel & méthodes) afin d'y voir le seuil de concentration cellulaire pour lequel le rendement de l'extraction d'ARN est suffisamment élevé. Chaque concentration cellulaire a été faite en double. Des PBMC décongelées et non stimulées ont également été cultivées dans les mêmes conditions afin de déterminer la présence ou non d'une sécrétion détectable basale d'ARNm des quatre cytokines sur lesquelles nous travaillons. Les résultats de la quantification en spectrophotométrie de ces extractions sont montrés dans le tableau C.I.3. Le rendement de l'extraction d'ARN étant encore plus faible que celui sur PBMC fraîches et restimulées, on peut penser que cette différence est due, en partie, à une mortalité des cellules entraînée par la décongélation. La mort cellulaire est suivie d'une libération de différentes enzymes telles que RNAases, protéases... qui résulte en la dégradation partielle ou totale de l'ARN. Malheureusement, il n'y avait pas assez d'ARN pour vérifier la dégradation de l'ARN sur gel d'électrophorèse.

Vu le très faible rendement de l'extraction, les doubles seront mis en commun et les RT-PCR seront effectuées sur la totalité des ARN des différentes concentrations de PBMC stimulées et non stimulées. On peut voir, à partir des résultats de la RT-PCR pour la β -actine (photo C.I.4.), que, effectivement, la trop faible quantité d'ARN nous limite dans nos observations puisque les signaux sur gel d'électrophorèse sont très différents pour les huit PCR effectuées. Les RT-PCR sur les PBMC stimulées montrent bien la présence d'ARNm d'IL2, IL4 et d'IFN γ . L'absence d'amplification des cDNA de l'IL10 pour les PBMC stimulées peut être expliquée par la trop faible quantité d'ARN de départ en plus du fait que, peut-être, l'IL10 soit transcrit plus faiblement que les autres cytokines étudiées. On peut



Restriction Pvu2 du plasmide IL4



Restriction Bam H1 du plasmide IL2

Photo C.II.1. : Sur les deux photos : piste de gauche :marqueur 5 ;piste de droite :plasmide restreint.

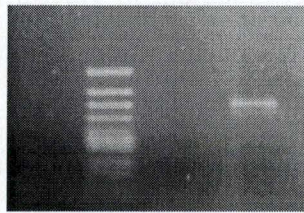


Photo C.II.2. : Amplification PCR avec les primers T3 et T7 du plasmide IL10. Piste de droite :marqueur 5 ;piste de gauche :plasmide IL10.

également conclure de ceci que les cellules cultivées dans du RPMI 1640 complet sans stimulation par la concanavoline A ne sécrètent pas d'IFN γ , d'IL4, d'IL10 ni d'IL2.

Pour la suite des expériences, nous n'utiliserons plus que des PBMC fraîchement récoltées et cultivées de suite dans du RPMI complet puisque l'extraction d'ARN sur des PBMC décongelées n'a pas un rendement suffisant. Il est cependant intéressant de noter que la mise en évidence d'ARNm de cytokines peut avoir lieu sur cellules décongelées, ce qui dans certains cas, facilite le travail expérimental.

II. PCR sur les plasmides compétiteurs

Les plasmides que nous avons utilisés nous ont été fournis par Fauzia Nawaz (Laboratory of Applied and Molecular Biology, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK). Une partie du cDNA des cytokines bovines IL2, IL4, IFN γ ou IL10 a été insérée dans ces plasmides pCR-script Amp SK+ (Stratagene Ltd, UK). Les sites d'insertion de ces séquences sont, pour l'IFN γ et l'IL2, le site unique *BamHI*, pour l'IL10, le site unique *EcoRI* et pour l'IL4, le site unique *Pvu II*. Ces sites se trouvent dans le site multiple de clonage du plasmide. Par rapport aux cDNA natifs, ces inserts présentent une délétion d'une cinquantaine de paires de bases. Seul l'amplification par PCR du plasmide contenant la séquence délétée de l'IFN γ (nous l'appellerons plasmide IFN γ) a pu être effectuée, les autres ne donnant rien (résultats non montrés). Afin de vérifier si ces plasmides contiennent bien l'insert adéquat, une restriction par une enzyme spécifique du site d'insertion de la séquence cible a été effectuée (cfr. Matériel & méthodes). Ces restrictions donnent bien les fragments à la taille attendue pour le plasmide contenant la séquence délétée de l'IL2 (plasmide IL2) et celui contenant la séquence délétée de l'IL4 (plasmide IL4) et donc les inserts sont bien présents sur ces plasmides (Photo C.II.1.). Mais la restriction du plasmide IL10 ne fait que l'ouvrir, ce qui signifie qu'un seul site est présent et donc que l'insertion ne se soit pas faite à ce site (résultats non montrés). Avant de conclure que ce plasmide ne contient pas d'insert, une amplification PCR avec les amorces T3 et T7 spécifiques de séquences sur le plasmide en amont et en aval du site multiple de clonage est effectuée (Photo C.II.2.). Celle-ci donne une amplification à la taille escomptée (683 bp) c'est-à-dire la taille de l'insert (517 bp) plus la taille des séquences qui séparent T3 et T7 du site d'insertion (166 bp), donc l'insert est bien présent. Ces résultats nous poussent alors à séquencer les inserts afin de vérifier si les séquences sont bien celles

que nous attendons et donc si les amorces spécifiques y ont leurs sites d'hybridation correspondants.

II.1. Séquençage des plasmides

Les séquences ont été obtenues pour les plasmides IFN γ , IL2 et IL10 (fig. C.II.3.) mais le plasmide IL4 n'a jamais pu être séquencé malgré tous nos efforts. Lorsqu'on compare ces séquences avec celle des cDNA des cytokines correspondantes, on peut facilement retrouver les délétions qui y ont été effectuées (fig. C.II.3.). Si on essaie par contre de retrouver les séquences d'annealing des primers correspondants, on se rend compte que celle du primer 5' du plasmide IL2 est à cheval sur le début de la délétion et donc qu'il ne reste qu'une moitié de cette séquence sur le plasmide. On découvre de même que le site d'annealing du primer 5' du plasmide IL10 se trouve en dehors de l'insert et est évidemment absent du plasmide.

La détermination de nouvelles séquences pour les amorces 5' IL2 et 5' IL10 a été guidé par les critères présentés dans le Matériel et Méthodes. Le tableau C.II.1. nous donne ces nouvelles séquences ainsi que les nouvelles tailles des amplicons générés par PCR à partir des cDNA et plasmides en utilisant les amorces pour l'IL2 et l'IL10.

Une PCR a ensuite été effectuée avec ces amorces sur du cDNA rétro-transcrit à partir d'ARN total extrait de PBMC stimulées *in vitro* à la concanavaleine A et sur les plasmides. La photo C.II.4. montre les produits PCR engendrés à partir des différentes amorces en notre possession. Maintenant, les plasmides IFN γ , IL2 et IL10 peuvent être amplifiés par PCR ainsi que les cDNA des cytokines bovines IFN γ , IL2, IL4 et IL10 et de la β actine.

Nous pouvons à présent commencer la mise au point de la RT-PCR quantitative.

III. Mise au point de la quantification avec les plasmides compétiteurs

La quantification se fera par densitométrie. Après migration dans un gel d'agarose 2 %, puis coloration dans un bain de bromure d'éthidium, l'ADN est photographié dans son gel sous UV ($\lambda=302\text{nm}$). Ensuite, la photo est traitée par un logiciel de densitométrie d'image (Vilber Lourmat Bio1D V 6.32, France) qui calcule le volume de pixels situé dans la surface du spot lumineux à quantifier, ce volume étant proportionnel à la quantité de bromure fixée à l'ADN dans ce spot.

Cytokines	Taille attendue pour le cDNA	Taille attendue pour le plasmide	Séquence des nouvelles amorces 5'
IFN γ	316 bp	262 bp	
IL2	420 bp	379 bp	cggggaacacaatgaaagaag
IL4	348 bp	/	
IL10	459 bp	379 bp	gcgagcaccctgtctgaca

Tableau C.II.1. :Séquences des nouvelles amorces 5' IL2 et 5'IL10 et tailles attendues pour ces cytokines (cDNA et plasmide).

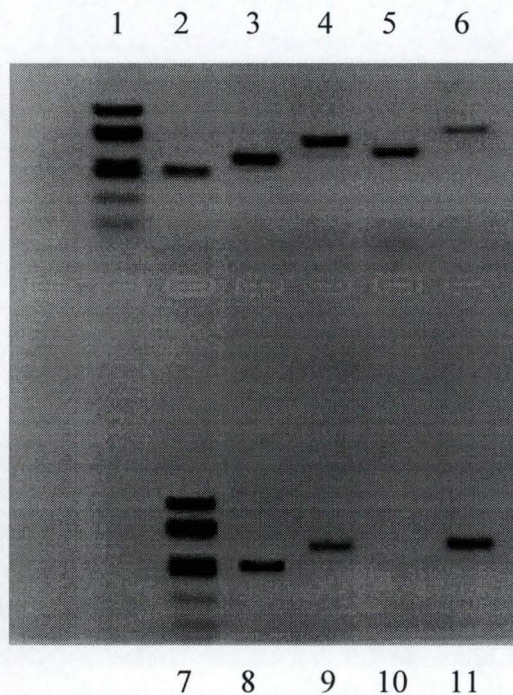


Photo C.II.4. :Les ARNm des quatre cytokines d'intérêt sont amplifiables par RT-PCR à partir d'ARN total de PBMC stimulées ;les PCR sur les plasmides compétiteurs donnent de bons résultats mis à part le plasmide IL4. Pistes 1 et 7 :marqueur de taille pUC 19 ;piste 2 :cDNA β actine ;piste 3 :cDNA IFN γ ;piste 4 :cDNA IL2 ;piste 5 :cDNA IL4 ;piste 6 :cDNA IL10 ;piste 8 :plasmide IFN γ ;piste 9 :plasmide IL2 ;piste 10 :plasmide IL4 ;piste 11 :plasmide IL10.

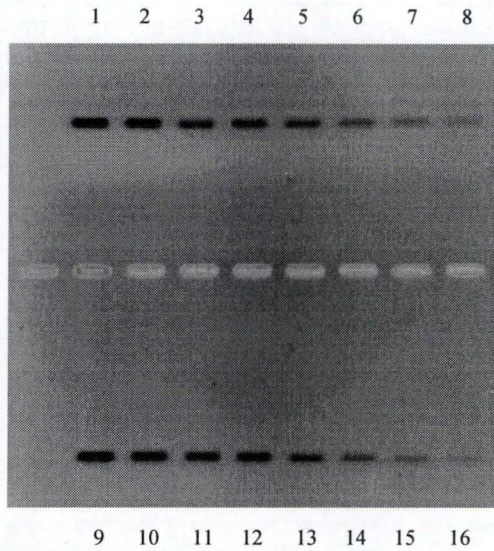


Photo C.III.1. : Des quantités décroissantes d'un même produit PCR (de 10 à 1 μ l) ont été engagées dans un gel d'électrophorèse et ceci à deux hauteurs différentes dans le gel. Pistes 1 et 9 : 10 μ l ; piste 2 et 10 : 8 μ l ; pistes 3 et 11 : 6 μ l ; pistes 4 et 12 : 5 μ l ; pistes 5 et 13 : 4 μ l ; pistes 6 et 14 : 3 μ l ; pistes 7 et 15 : 2 μ l ; pistes 8 et 16 : 1 μ l.

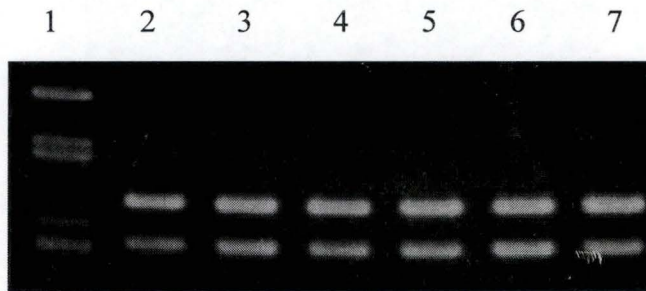
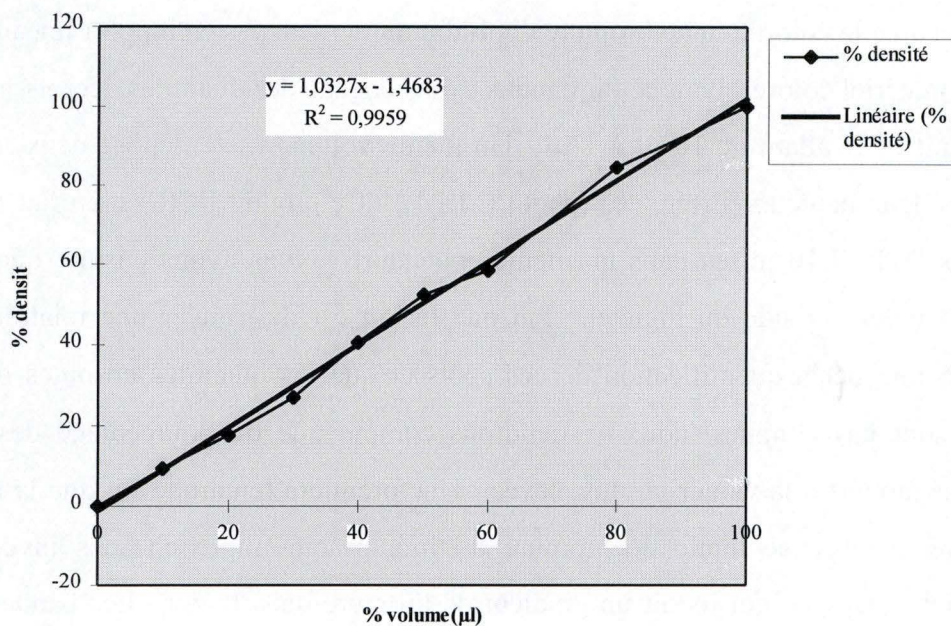


Photo C.III.2 : 2 X 10 μ l d'un même produit PCR ont migré en présence de bromure d'éthidium dans le même puits à un intervalle de quelques minutes et ce dans six puits différents. Piste 1 : marqueur de taille pUC 19.

Il a fallu mettre au point un protocole afin d'optimiser la quantification par densitométrie qui est rendue difficile par les biais inhérents au gel d'agarose, entre autres, la variabilité d'un gel à l'autre, la variabilité dans le gel et son important bruit de fond, mais aussi le biais dû à la coloration au bromure d'éthidium qui n'est pas en rapport linéaire avec la quantité de matériel coloré. Pour ce faire, nous avons engagé des quantités décroissantes d'un même produit PCR allant de 10 μ l à 1 μ l. Un même volume a été déposé deux fois sur le même gel, à deux hauteurs différentes (photo C.III.1.). Ce produit PCR est en fait le résultat de plusieurs PCR IL10 mises dans un même eppendorf. Nous avons ensuite quantifié les différentes bandes à l'aide du logiciel. Puisque le but est de trouver une relation linéaire décroissante lors de la quantification de ces spots et que les quantités absolues de l'ADN engagé ne sont pas connues, nous ne tiendrons compte que du pourcentage des densités obtenues par rapport à la valeur la plus élevée. Une première remarque fut que la migration doit se faire en absence totale de bromure d'éthidium qui migre en sens inverse de la migration de l'ADN, ce qui induit un gradient de bromure dans le gel. Les bandes du haut sont alors toujours plus intenses que celles du bas et ce même si on recolore le gel par après. On pourrait penser que, puisque les bandes du cDNA et du plasmide compétiteur qui n'ont qu'une cinquantaine de paires de bases de différence sont beaucoup moins éloignées entre elles que ne le sont celles de la photo C.III.1., la différence de coloration ne sera pas significative. Pour vérifier cela, nous avons fait migrer en présence de bromure d'éthidium dans le même puits deux mêmes quantités d'un même produit PCR à un intervalle de temps de quelques minutes, le test a été fait dans six puits (Photo C.III.2.). Ceci devrait donner deux bandes proches l'une de l'autre et de même intensité. Or la quantification de ces bandes nous montre que les bandes supérieures sont toujours plus intenses que les inférieures, la bande supérieure est en moyenne 1,3 fois plus intense que l'inférieure. Pour éviter cela, le gel ne sera coloré qu'après la migration dans un bain de bromure d'éthidium. Celui-ci a été fixé à une durée de deux heures et à une concentration de bromure de 3 μ g/ml pour qu'une relation linéaire entre la densité des spots et la quantité engagée puisse enfin être observée. Un lavage du gel dans un bain de $MgSO_4$ 1 mM peut également être effectué afin d'éliminer le bromure d'éthidium dans le gel et non fixé à de l'ADN, ceci permettant de diminuer le bruit de fond et de voir des bandes de plus faible intensité. Le lavage ne doit pas être trop long sinon le bromure d'éthidium fixé à l'ADN sera lui aussi éliminé.



Graphique C.III.1. : Le calcul de la densité d'une rangée de spots d'un gel similaire à celui de la photo C III.1. montre une linéarité en rapport avec les quantités croissantes de matériel mis sur gel. La densité est exprimée en % en considérant à chaque mesure la densité la plus élevée comme étant 100%. Les quantités sont aussi exprimées en %, les 10 µl étant les 100%.

Le gel d'agarose comporte le désavantage d'avoir un bruit de fond très élevé. Pour parer à cela, le logiciel comporte un programme d'élimination du bruit de fond, mais celui-ci n'est pas suffisant et l'on devra pour chaque photo calculer la densité d'une surface de gel « vide » plus ou moins égale à la surface des spots à quantifier et soustraire cette densité à la densité des spots à quantifier.

Le graphique C.III.1. montre les résultats de la quantification des densités d'une des rangée de spots d'un gel identique à celui de la photo C.III.1 mais seulement coloré après migration et dans les conditions citées plus haut. La quantification de l'autre rangée donne les mêmes résultats. Trois autres gels identiques à celui-ci et dans les mêmes conditions ont donné les mêmes droites, le coefficient angulaire variant entre 0,9999 et 1,0476 et le R^2 allant de 0,9833 à 0,9941. Ce qui signifie que lorsque l'on calculera le rapport de densité de deux spots, celui-ci reflétera bien le rapport de quantité de matériel dans ces deux spots. Mais ce test de linéarité n'a été fait que pour des densités entre 6187 pixels et 47318 pixels. Nous ne savons pas si, en dehors de ces limites, la linéarité est conservée. Pour le savoir, il suffirait de faire la même expérience avec des quantités plus faibles ou plus grandes. On peut à présent utiliser ce logiciel pour une quantification par densitométrie des produits de PCR compétitives.

IV. Mise au point de la PCR compétitive sur les plasmides

IV.1. Détermination du seuil de détection de la PCR

Par définition, la PCR est une réaction en chaîne. Le produit d'un cycle d'amplification sert de substrat pour le suivant. La quantité de produit augmente donc exponentiellement. Théoriquement, la quantité de produits doublerait après chaque cycle PCR suivant l'équation : $N = N_0 \cdot 2^n$. N_0 étant la quantité initial, N la quantité finale et n le nombre de cycles effectués. En pratique, l'efficacité de la PCR n'est pas de 100%. De nombreux facteurs peuvent affecter cette efficacité. La séquence des primers, la longueur de l'ADN à amplifier et sa séquence affectent les structures secondaires et le pourcentage en G/C, ce qui interfère avec l'accrochage des amorces et la température de melting de la matrice à amplifier. Des impuretés dans l'échantillon peuvent également diminuer l'efficacité en inhibant la polymérase, en causant des changements conformationnels de l'ADN cible ou en se mettant en compétition pour les primers. Cette efficacité n'est donc pas prédictible et varie d'un tube

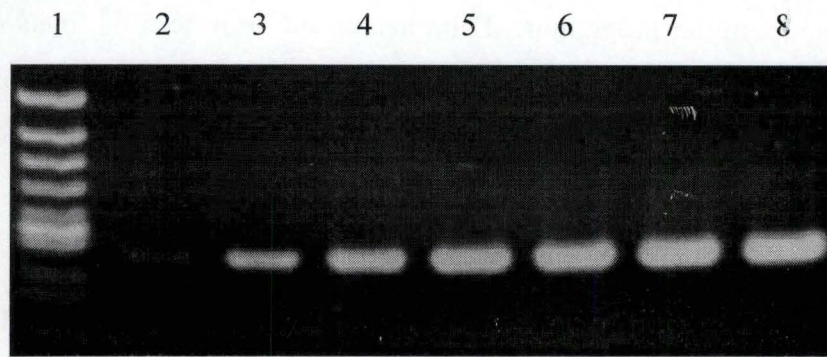


Photo C.IV.1. :Analyse du seuil de détection du plasmide IFN γ . 10 μ l de produit PCR sont engagés dans les puits. Piste 1 :marqueur 5 ;piste 2 : 0,5 fg ; piste 3 : 5 fg ; piste 4 : 50 fg ; piste5 : 500 fg ; piste6 : 5 pg ; piste7 : 50 pg ;piste8 :500 pg

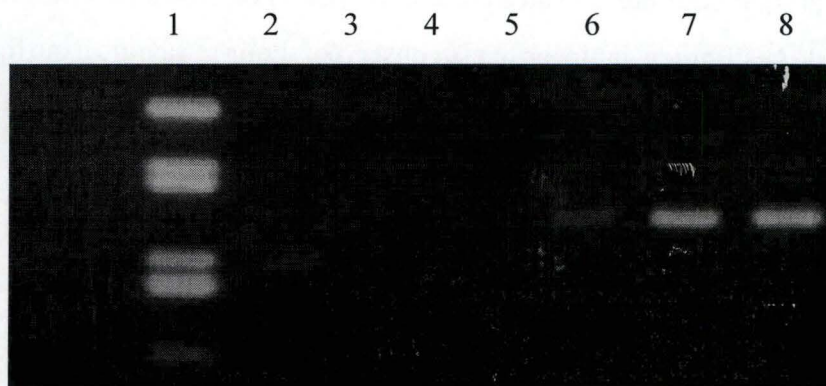


Photo C.IV.2. :Analyse du seuil de détection du plasmide IL10. Piste 1 :marqueur de taille pUC 19 ;piste 2 :5fg ;piste 3 :50fg ;piste 4 :500fg ;piste5 :5pg ;piste 6 :50pg ;piste 8 :500pg.

à l'autre mais aussi dans un tube au cours du temps. L'équation suivante décrit mieux la réalité : $N = N_0 \cdot (1 + \text{eff})^n$. L'efficacité (eff) prenant des valeurs comprises entre 0 et 1 ((Wang et al., 1989), (Gilliland et al., 1990)).

Le seuil de détection de la PCR varie alors d'un tube à l'autre mais surtout d'une cible à l'autre. Ce seuil a été déterminé pour l'IFN γ en engageant différentes quantités de plasmide IFN γ s'étendant de 0,5 fg à 500 pg (photo C.IV.1.). On peut constater qu'une PCR sur 0,5 fg de plasmide IFN γ donne encore un signal après 35 cycles d'amplification. Le nombre de molécules que représentent ces 0,5 fg de plasmide a été estimé grossièrement à 130 molécules. Il a été fait de même pour l'IL10 (photo C.IV.2.). Ici une faible bande est encore visible pour 5 pg. Ce seuil élevé pourrait peut-être être abaissé en diminuant la température d'annealing. Les tests pour déterminer le seuil de détection de l'IL2 n'ont pas été faits.

La quantité de produits PCR augmente comme nous l'avons vu de façon exponentielle mais, après un certain nombre de cycles, le taux de production diminue et fini par s'annuler. C'est ce qu'on appelle l'effet plateau. Celui-ci est dû à plusieurs facteurs : l'accumulation des produits PCR à une concentration telle que leur réassociation entre en compétition avec l'association des primers sur leur site d'annealing, le rapport de concentration entre la polymérase et les molécules d'ADN à amplifier qui diminue jusqu'à un niveau critique, l'accumulation d'inhibiteurs de la polymérase tels que des pyrophosphates et la disparition de composants nécessaires à la réaction tels que les dNTP. Mais un des avantages de la PCR compétitive est que le rapport entre la cible et le compétiteur reste toujours le même quel que soit le nombre de cycles effectués et donc indépendamment de l'effet plateau (Sieger & Larrick, 1993), du moins lorsque l'efficacité d'amplification est la même pour le cDNA et le plasmide compétiteur. Il n'est donc pas nécessaire de déterminer ce plateau mais il est par contre indispensable de déterminer si l'efficacité de la cible et du compétiteur restent identiques durant toute la durée de la PCR et ce quelles que soient leurs concentrations respectives.

IV.2. Validation de la stratégie PCR compétitive

La PCR compétitive repose sur le fait que l'ADN cible et l'ADN compétiteur sont amplifiés avec la même efficacité et donc que, pour n'importe quel nombre de cycles PCR effectués, le rapport des produits PCR de l'ADN cible et de l'ADN compétiteur reste toujours

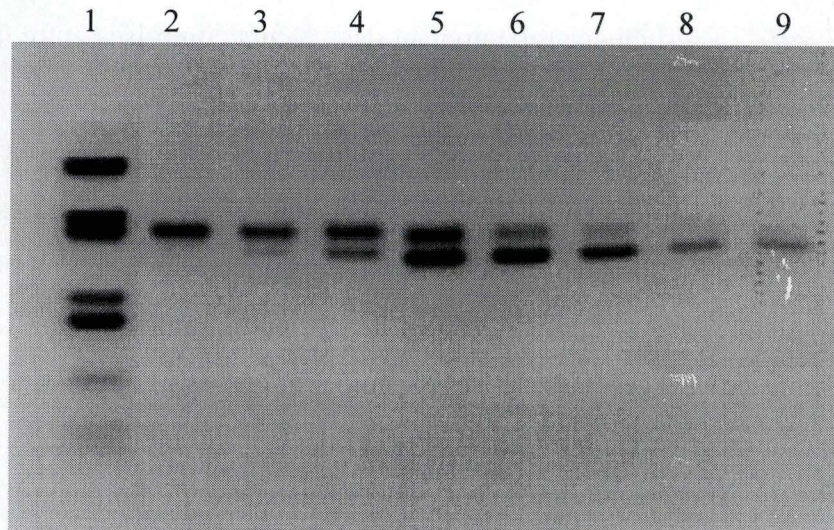
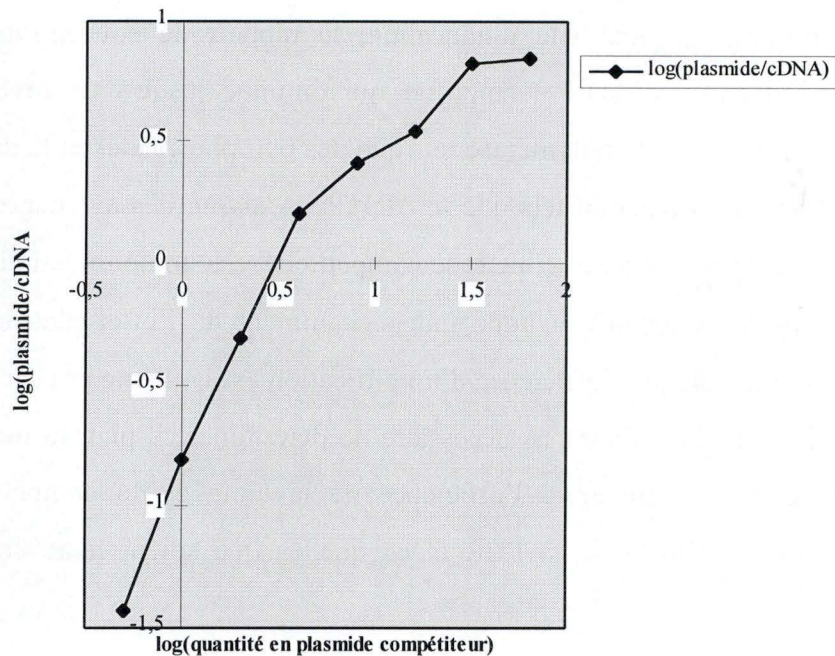


Photo C.IV.3. : Différentes PCR compétitives ont été effectuées avec des quantités croissantes en plasmide compétiteur (500fg ; 1pg ; 2pg ; 4pg ; 8pg ; 16pg ; 32pg ; 64pg de plasmide IL2) et une quantité constante en cDNA (2µl provenant d'une RT sur 5µg d'ARN total). Les bandes du haut correspondent aux amplicons de l'ADN cible et les bandes du bas aux amplicons de l'ADN compétiteur.



Graphique C.IV.1. Le log des rapport de densité des amplicons en compétition dans les différents PCR de la photo IV.3. varie linéairement avec le log de la quantité en plasmide engagée durant les quatre premières dilutions. Ceci nous permet de calculer la concentration de cDNA présente dans la PCR.

égal au rapport des quantités de départ. Cette similitude d'efficacité est due au fait que la cible et le compétiteur partagent les mêmes sites d'annealing pour les primers et que leurs séquences sont pratiquement identiques. Toutefois, parce qu'il y a une différence de taille entre la cible et le compétiteur, il est important de vérifier que les deux matrices de la PCR compétitive s'amplifient avec une efficacité similaire au cours des cycles de la réaction. Pour ce faire, nous avons comparé la cinétique d'amplification d'une quantité plus ou moins similaire de cDNA et d'ADN compétiteur, afin qu'ils soient détectables tout les deux, dans une même réaction et pour un nombre croissant de cycles. Ce test a été fait avec le plasmide IL2 en compétition avec le cDNA correspondant. Il a donc d'abord fallu estimer la quantité de cDNA IL2 présent dans un produit d'une transcription inverse (RT) d'ARN extraits de PBMC bovines stimulées *in vitro* à la concanavaline A. Pour cela, nous avons effectué différentes PCR de 35 cycles avec une même quantité de cDNA (2 µl d'une RT sur 5 µg d'ARN total) et des quantités croissantes de plasmide compétiteur, les quantités engagées sont : 500 fg, 1pg, 2pg, 4 pg, 8 pg, 16 pg, 32 pg et 64 pg. 10 µl de chaque produit PCR ont été engagés sur gel d'électrophorèse (Photo C.IV.3.). Ensuite, une droite fut tracée dans un graphique ayant pour abscisse le logarithme de la quantité de plasmide engagée et en ordonnée le logarithme du rapport de densité des spots du cDNA et du plasmide sur gel d'électrophorèse, en n'oubliant pas de multiplier la densité du cDNA par un facteur correctif éliminant l'effet d'une densité plus élevée due à la taille plus élevée (Graphique C.IV.1.). La quantité de cDNA IL2 est égale à la quantité de plasmide lorsque le logarithme du rapport de densité, correspondant au rapport de concentration, est égal à zéro. La concentration estimée est de 3 pg de cDNA IL2/µl de cDNA total.

Maintenant que la concentration est déterminée, nous pouvons effectuer une PCR compétitive avec une concentration identique en cDNA IL2 et en plasmide IL2. Cette PCR a été faite dans un volume de 100 µl afin d'avoir suffisamment de matériel. 10 µl ont été prélevés du tube aux cycles 27 à 35 puis ont subi une migration sur gel d'électrophorèse (photo C.IV.4.). Le graphique C.IV.2. montre la densité des produits PCR du compétiteur et la densité des produits PCR du cDNA IL2, toujours multiplié par un facteur correctif afin de pallier la différence de densité dû à la différence de taille des amplicons, pour les différents cycles de la réaction. Ce graphique nous indique que, du moins pendant les cycles 30 à 35, l'efficacité est la même pour les deux amplicons et donc le rapport entre les deux reste le même. La variation du rapport de densité pour les cycles 27, 28 et 29 ne peut être due à la

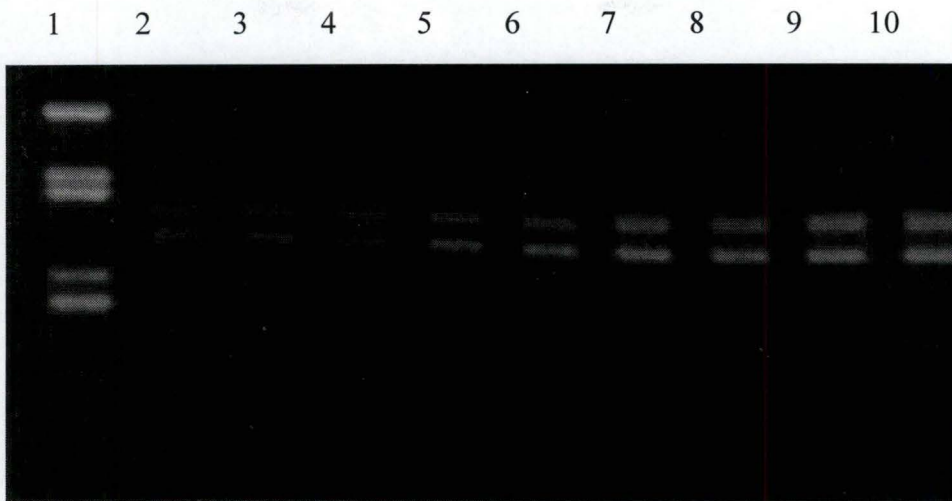
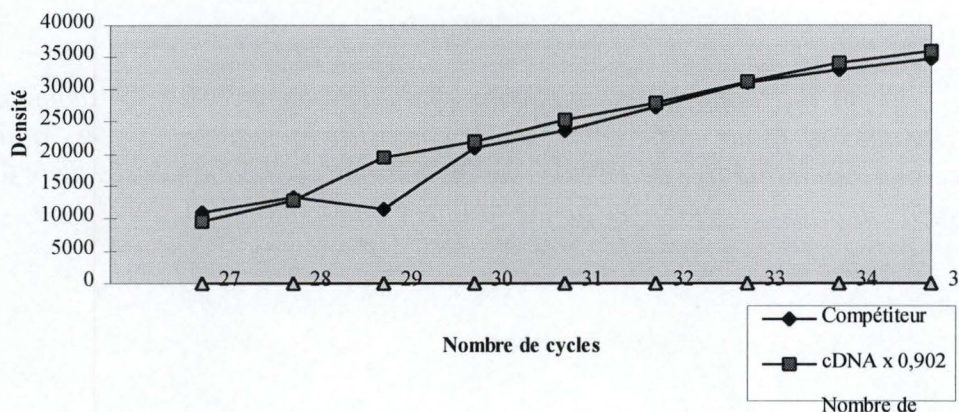


Photo C.IV.4. : 10 μ l d'une PCR compétitive entre cDNA et plasmide IL2 ont été prélevés du tube aux cycles 27 à 35 (de gauche à droite). Piste 1 :marqueur de taille pUC 19.



Graphique C.IV.2. :Test de similarité d'efficience d'amplification entre cible et compétiteur. Les deux tracés représentent les densités des amplicons du plasmides compétiteur et du cDNA multiplié par un facteur correctif pour pallier la différence de taille.

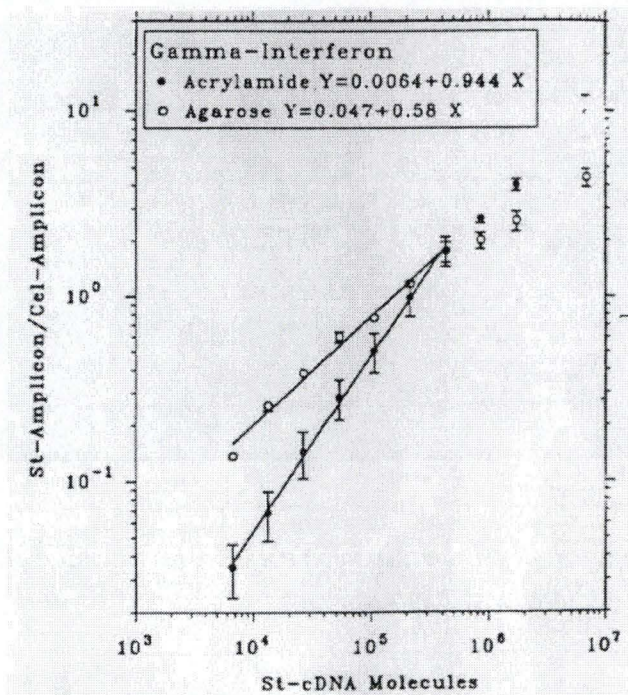


Fig. C.IV.5. : Etude du rapport des amplicons de l'ADN compétiteur (St-amplicon) et du cDNA (Cel-amplicon) pour différentes PCR compétitives contenant des dilutions en compétiteur et une quantité fixe de cDNA. Les échantillons ont été analysés deux fois : dans un gel d'agarose et dans un gel d'acrylamide (d'après Bouaboula et al., 1992).

difficulté pour le logiciel de quantifier de façon précise les bandes de faible intensité puisque, si on s'en réfère au graphique C.III.1., la quantification a été estimée correcte à partir de 6187 pixels or, tout les spots de la photo C.IV.4. sont au-delà de 10000 pixels. La variation peut alors être due, ici, à un gel d'agarose non homogène, ce qui peut, par un bruit de fond variable, donner plus d'importance à l'un ou l'autre spot. Cette variation touche évidemment plus fortement les faibles bandes. On peut conclure que l'ADN compétiteur et l'ADN cible (ici le cDNA IL2) s'accumulent de façon parallèle à travers les cycles PCR. Mais l'expérience doit être renouvelée pour vérifier la reproductibilité.

Il faut également vérifier si la similitude d'efficacité reste la même lorsque le rapport de quantité de départ n'est plus proche de 1. Pour vérifier cela, plusieurs PCR compétitives ont été effectuées avec différentes dilutions de plasmide compétiteur et une quantité constante de cDNA. En fait, ces PCR ont été faites lorsque nous avons estimé la concentration en cDNA IL2. Si on reprend le graphique C.IV.1., nous remarquons que les quatre premières dilutions varient linéairement suivant l'équation $Y=1,7955 X - 0,8559$ avec un coefficient d'écart à la linéarité de 0,9971, ensuite la pente diminue. Puisque la pente de la droite n'est pas égale à l'unité, la première réaction est de penser que les deux matrices ne sont pas amplifiées avec la même efficacité lorsqu'elles ne sont pas en concentration équimolaire. Mais, (Bouaboula et al., 1992) ont montré que cet écart à l'unité de la pente est dû au bruit de fond élevé du gel d'agarose et à son aspect non homogène dans le gel. Leur expérience fut de comparer une analyse par électrophorèse en gel d'agarose et une analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide de plusieurs PCR compétitives avec différentes dilutions en compétiteur et un même quantité en cDNA cible comme nous l'avons fait (Fig. C.IV.5.). Ils obtiennent alors une droite avec une pente très proche de l'unité pour l'analyse en gel d'acrylamide indiquant que les deux matrices sont amplifiées avec la même efficacité à travers les cycles tant que le rapport de concentration reste dans les limites où la linéarité est conservée. Par contre, la droite d'analyse des mêmes produits PCR en gel d'agarose prend une pente de 0,58. Nous pouvons corréler leurs résultats aux nôtres et considérer que, tant que nous restons dans les limites de la linéarité de la droite, une détermination correcte de la quantité de cDNA cible peut se faire par lecture directe sur le graphique. Mais un facteur de correction doit être pris en compte, celui-ci rendant la pente de la droite égale à l'unité. Dans le cas de notre graphique, l'équation de la droite devient $Y=X - 0,4767$. Ce qui signifie que la quantification en gel d'agarose n'est convenable que lorsque le cDNA et l'ADN compétiteur sont en

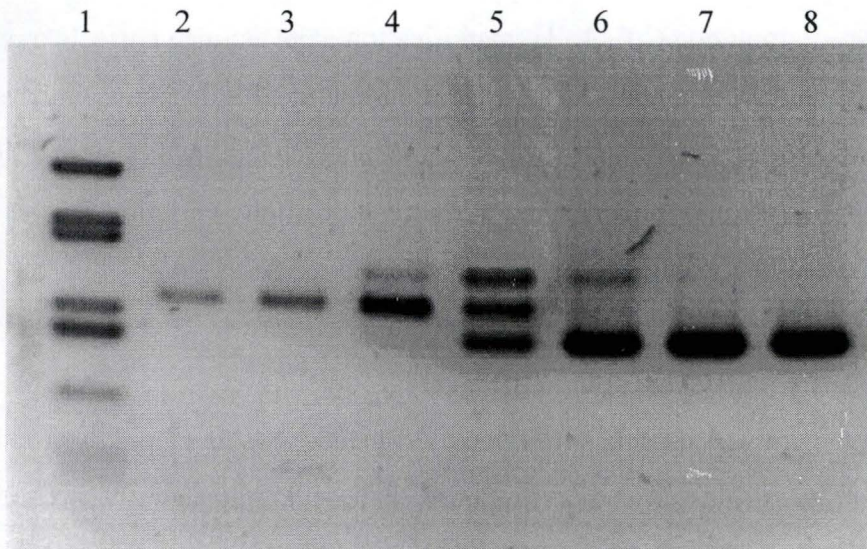


Photo C.V.1. : Différentes PCR compétitives pour l'IFN γ avec différentes dilutions en plasmide compétiteur et une même concentration en cDNA. Piste 1 :marqueur de taille pUC 19 ;piste 2 :0,5fg ;piste 3 :5fg ;piste 4 :50 fg ;piste 5 :500fg ;piste 6 :5pg ;piste 7 :50pg ;piste 8 :500pg. On voit apparaître une troisième bande parasite lorsque les concentration deviennent similaires. Cette bande est la formation d'hétéroduplex.

concentration équimolaire puisque lorsque la valeur de Y est de zéro, les deux équations : $Y=1,7955X - 0,8559$ et $Y=X - 0,4767$ donnent une même valeur pour X. Il est donc obligatoire pour quantifier en gel d'agarose de faire un graphique pour retrouver la concentration en cDNA cible. Tandis qu'avec une quantification en gel de polyacrylamide, où la pente de la droite est proche de 1 (Bouaboula et al., 1992), on peut retrouver cette concentration en comparant le rapport des quantités des amplicons d'une seule PCR compétitive. On peut aussi constater sur le graphique C.IV.1. que la linéarité du rapport des concentration ne s'étale que sur un seul ordre de grandeur. Une série de PCR compétitives avec des dilutions en compétiteur proches de la concentration à déterminer doit donc être faite pour déterminer la droite à partir de laquelle on pourra évaluer la concentration en cDNA cible. En fait, la linéarité s'estompe lorsque la concentration en plasmide devient trop élevée. Nous pouvons interpréter La diminution de la pente de deux manières : lorsque la concentration en ADN compétiteur est trop élevée dès le départ, le plateau est atteint très rapidement et donc, la matrice en quantité inférieure, ici le cDNA, n'a pas le temps d'être suffisamment amplifié pour dépasser le seuil de détection. Le rapport de densité est alors non valide. L'autre raison serait que, puisque l'ADN compétiteur est plus petit que l'ADN cible, il est avantagé lors des amplifications PCR. Cet avantage n'est pas significatif lorsque sa concentration est inférieure à celle de l'ADN cible mais prend de l'importance lorsque sa concentration augmente jusqu'à dépasser celle de l'ADN cible. L'efficacité d'amplification ne peut alors plus être considérée comme identique pour les deux matrices. Cette deuxième explication est toutefois invalidée par le fait que (Bouaboula et al., 1992) obtiennent le même genre de courbe alors que leur ADN compétiteur est au contraire plus grand que l'ADN cible, et donc désavantagé.

Pour confirmer l'indépendance de ces résultats par rapport au nombre de cycles, Bouaboula et al. ont fait la même expérience à différents cycles et obtiennent les mêmes droites. Le parallélisme d'efficacité d'amplification ne varie donc pas d'un cycle à l'autre.

V. Problèmes inhérents à la PCR compétitive concernant l'IFN γ et l'IL10

Une série de PCR compétitives de 35 cycles a été effectuée avec différentes quantités de plasmide IFN γ compétiteur pour une même quantité de cDNA chacune (Photo C.VI.1.). On voit apparaître une troisième bande parasite lorsque le cDNA et le compétiteur sont en

concentration équimolaire ou presque. Ce problème est également apparu lors de PCR compétitive avec le plasmide IL10. Cette troisième bande ne peut pas être de l'ADN génomique contaminant puisqu'une PCR sur de l'ARN total ne donne pas d'amplification (résultat non montré). Cette bande serait en fait la formation d'hétéroduplex entre les deux ADN en compétition, ce qui est facilement concevable puisque ceux-ci ont une séquence pratiquement similaire. Cette formation se ferait lors des derniers cycles de la PCR lorsque les concentrations des deux amplicons sont élevées. Afin de vérifier cela, 5 µl de produits d'une PCR à partir de cDNA seul et 5 µl de produits d'une PCR à partir de plasmide seul ont été mélangés et soumis à une dénaturation puis renaturation, en fait un cycle PCR. Après migration sur gel, ces 10 µl montrent bien les trois bandes (résultat non montré). Ceci confirme l'hypothèse de la formation d'hétéroduplex. Celui-ci serait formé à partir d'un brin « cDNA » et d'un brin « plasmide ». Il aurait alors un poids moléculaire intermédiaire aux deux amplicons mais la formation d'une structure secondaire le ralentirait dans sa migration. C'est pourquoi l'hétéroduplex se trouve au-dessus des deux autres bandes dans le gel.

La raison pour laquelle cette formation gênante ne se fait pas lorsqu'on fait une RT-PCR compétitive IL2 mais bien pour les RT-PCR compétitives IFN γ et IL10 n'est pas connue mais on pourrait spéculer la formation d'une structure en épingle à cheveux à partir de la séquence non-appariée de l'hétéroduplex IFN γ et de l'hétéroduplex IL10 qui les stabiliserait alors que cette structure n'est pas prévue pour l'hétéroduplex IL2 (Fig. C.V.2.). D'autres facteurs contribuent à la stabilisation des hétéroduplex car celle-ci ne peut pas être expliquée par la seule formation d'une structure en épingle à cheveux dont les forces impliquées sont assez faibles.

L'hétéroduplex gêne évidemment la quantification puisque les rapports de quantité entre les deux homoduplex ne sont plus les mêmes. A moins que : si l'hétéroduplex s'est formé à partir d'un brin de chacune des molécules d'ADN en compétition, une quantification de cette troisième bande pourra alors permettre de retrouver le rapport entre les deux quantités d'amplicons. La formation de l'hétéroduplex fait également perdre de la sensibilité en augmentant le seuil de détection.

Ces hétéroduplex se forment lors des derniers cycles, lorsque les concentrations en amplicons des deux tailles sont élevées. Nous pourrions alors diminuer le nombre de cycles jusqu'à ce que la formation des hétéroduplex ne soit plus possible, mais ceci diminuerait grandement la sensibilité de la RT-PCR..

La solution la plus satisfaisante serait de faire migrer l'ADN dans un gel dénaturant. Ceci nous éviterait le calcul de la densité de la bande de l'hétéroduplex, qui est une source de variabilité supplémentaire, et éviterait la perte de sensibilité.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Les cytokines sont des molécules solubles sécrétées par les cellules du système immunitaire, dont les lymphocytes T CD4⁺ ou T helper (Th) qui orchestrent la lutte contre les micro-organismes. Deux types de réponses ont été largement étudiées et ont été caractérisées par l'environnement cytokinique créé par les sécrétions des cellules Th. Une réponse de type Th1 se caractérise par la production d'IL2 et d'IFN γ et est induite lors d'une invasion par un pathogène intracellulaire, alors qu'une réponse de type Th2 est caractérisée par la production d'IL4, IL5 et d'IL10 et est induite lors d'une invasion par un pathogène extracellulaire. Cependant, la plupart des réponses immunitaires sont caractérisées par un équilibre entre ces deux profils de sécrétion. Ces profils d'expression ont été identifiées chez la souris (Mosmann et al., 1986), chez l'homme (Romagnani, 1991) et chez le bovin (Brown et al., 1993).

Le paradigme Th1/Th2 s'avère donc être un modèle très utile dans la compréhension des réponses immunitaires. L'identification des cytokines induites par différents pathogènes n'est pourtant pas suffisante car dans le cas de l'analyse de profils Th1/Th2, il est nécessaire de calculer des rapports quantitatifs entre diverses cytokines. De nombreux outils ont été développés chez la souris et l'humain pour la mise en évidence et la quantification de ces cytokines mais peu de choses ont été réalisées chez le bovin.

La détection et la quantification des cytokines au niveau protéique sont freinées par leurs faibles taux de production. Par contre la détection des ARNm après leur amplification par RT-PCR permet de diminuer grandement le seuil de détection.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons mis au point une technique de détection et de quantification des ARN messagers (ARNm) de l'IFN γ , de l'IL2 et de l'IL10 chez le bovin. Cette technique consiste en un reverse transcription (RT) non spécifique d'ARN messagers à partir d'ARN totaux suivie d'une PCR spécifique des cDNA d'une cytokine donnée. Cette PCR se fait en compétition pour les mêmes amorces entre le cDNA et un standard interne en concentration connue. Ce standard est un plasmide pCR-script Amp SK qui contient un insert dont la séquence est celle du cDNA cible mais comportant une délétion d'une cinquantaine de paires de bases. Cette délétion permet de séparer les deux amplicons suivant leur taille lors d'une migration en gel d'électrophorèse. Nous avons reçu de Fauzia Nawaz (Laboratory of Applied and Molecular Biology, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK) quatre

plasmides compétiteurs contenant chacun la séquence délétée du cDNA d'une des quatre cytokines suivantes : IFN γ , IL2, IL4 et IL10. Un problème s'est posé avec le plasmide IL4, c'est la raison pour laquelle la mise au point de la quantification des ARNm de cette cytokine n'a pas été faite. La quantification des ARNm de l'IL4 bovine pourra se faire dans le futur puisque nous venons de recevoir de nouveaux plasmides contenant la séquence compétitrice du cDNA de l'IL4.

Il serait également intéressant de mettre au point la quantification des ARNm de l'IL12 puisque cette cytokine a son importance dans le paradigme Th1/Th2.

Nous avons montré que la co-amplification du plasmide IL2 et du cDNA IL2 se faisait de manière parallèle à travers les cycles PCR, que ce soit en phase exponentielle ou en phase plateau et ce, même si les quantités de départ de l'ADN cible et de l'ADN compétiteur diffèrent d'un ordre de grandeur. Il n'est donc pas nécessaire de déterminer la phase plateau ni l'efficacité de l'amplification pour effectuer une quantification correcte. La quantification n'est toutefois pas valable lorsque la concentration en ADN compétiteur est trop élevée par rapport à la concentration en ADN cible. La raison en serait que, lorsque la concentration en ADN compétiteur est trop élevée dès le départ, le plateau est atteint très rapidement et donc la matrice en quantité inférieure, ici le cDNA, n'a pas le temps d'être suffisamment amplifié pour dépasser le seuil de détection. Le rapport de densité est alors non valable.

Ces tests devront également être réalisés pour les autres cytokines afin de valider les RT-PCR compétitives les concernant.

La technique a été optimisée et validée sur de l'ARN extrait de PBMC bovines stimulées non-spécifiquement *in vitro* par de la concanavaleine A qui induit la transcription, parmi d'autres, des ARNm étudiés.

La méthode de RT-PCR compétitive que nous avons testée dans ce mémoire n'est compétitive qu'à partir de la PCR, l'efficacité de la RT étant estimée à une valeur entre 40 et 50 %. Si on veut augmenter la précision de la quantification des ARNm, il faut que la compétition débute dès la RT en utilisant des séquences d'ARN compétitrices. Les plasmides que nous avons utilisés contiennent un promoteur T7 qui peut être utilisé par une T7 RNA polymérase mais ne contiennent pas de séquence poly(dA). Il suffirait alors d'insérer nos séquences dans des plasmides contenant le promoteur T7 et la séquence poly(dA). Ainsi, les ARN polymérisés pourront entrer en compétition avec les ARNm pour les oligo(dT) utilisés comme amorces dans la RT.

La quantification par densitométrie en gel d'agarose a les avantages d'être rapide, simple, n'utilisant pas de radioactivité, peu coûteuse et d'être assez sensible. Le bruit de fond important dû au gel d'agarose est fortement atténué par le programme du logiciel de densitométrie d'image et n'est pas un obstacle à la quantification bien qu'il impose de faire une droite de titration. Il existe cependant des techniques de détection beaucoup plus sensibles que la densitométrie. Tout d'abord, le type de support : un gel de polyacrylamide permet un rapport signal/bruit de fond bien supérieur au gel d'agarose et augmente la sensibilité de la détection. Ensuite, le type de marquage : la coloration au bromure d'éthidium peut être remplacée par une coloration au SYBR Green I (Molecular Probes, Inc) qui permet d'augmenter 20 fois la sensibilité. La technique la plus courante et extrêmement sensible est celle du marquage radioactif des produits d'amplification PCR par incorporation de nucléotides marqués, principalement au phosphore ^{32}P , mais l'instabilité du marquage due au court temps de demi-vie des isotopes, les problèmes de sécurité et le coût élevé des appareils de détection sont à son désavantage. Une autre technique de détection tout aussi sensible que le marquage radioactif mais qui est une technique « froide » consiste en une hybridation en sandwich de l'ADN cible entre un ADN capteur, fixé sur un support solide, et une sonde biotinylée. Un conjugué streptavidine-Pyruvate kinase va pouvoir réagir avec la sonde biotinylée et l'activité kinases sera détectée au moyen du système luciférine-luciférase qui produit un signal bioluminescent (production de photons). Ce type de détection permet une sensibilité 20 fois plus grande qu'une détection sur gel d'agarose (Zammatteo et al., 1995). Mais la mise au point de ce système de détection est beaucoup plus lourde.

Le problème majeur de la RT-PCR compétitive utilisant un standard interne de séquence similaire à la séquence cible est la formation d'hétéroduplex, ce qui diminue la sensibilité et rend la quantification difficile (Henley et al., 1996). Ce problème nous l'avons rencontré lorsque nous avons voulu quantifier des ARNm de l'IFN γ et de l'IL10. La raison pour laquelle cette formation ne prend pas place lors de la quantification des ARNm de l'IL2 n'est pas connue mais on pourrait penser qu'une structure en épingle à cheveux à partir de la séquence non appariée de l'hétéroduplex stabiliserait celui-ci et avantagerait sa formation, cette structure n'étant pas permise pour l'hétéroduplex IL2 mais bien pour les hétéroduplex IFN γ et IL10. Cette formation diminue la sensibilité et gêne la quantification par RT-PCR. Différentes solutions peuvent être proposées afin de contourner ce problème. On peut quantifier l'hétéroduplex et en déduire la quantité d'ADN impliquée dans sa formation. Pour

vérifier la fiabilité de ce calcul, on pourrait faire migrer un produit d'une RT-PCR compétitive dans un gel d'acrylamide dénaturant et une même quantité de ce produit dans un gel d'acrylamide non dénaturant. Il suffira de faire le calcul après la quantification en densitométrie et de vérifier si on obtient le même résultat à partir des deux gels. La migration en gel dénaturant est d'ailleurs une solution envisageable pour éviter le problème de l'hétéroduplex mais la technique est plus lourde à pratiquer. Puisque la formation de l'hétéroduplex se fait lors des derniers cycles lorsque les concentrations en amplicons sont élevées, une diminution du nombre de cycle diminuerait sa formation mais serait également accompagnée d'une diminution de la sensibilité. En fait, l'idéal pour une RT-PCR compétitive est d'utiliser un standard interne hétérologue c'est-à-dire que seules les séquences d'hybridation des amorces sont identiques avec celles de la cible, la longueur de l'ADN compétiteur et son pourcentage en GC seront identiques à ceux de la séquence cible pour que les efficacités d'amplification soient similaires. Dans ce cas, la formation d'hétéroduplex est évitée. Mieux encore, on peut utiliser un ADN compétiteur multispécifique contenant les sites d'hybridation de plusieurs cytokines. Bouaboula et al. ont montré que la différence de taille et de séquence n'interfèrent pas dans la validité de la quantification. Le standard multispécifique de Bouaboula et al. est conçu pour des cytokines humaines et une version chez la souris existe, appelée pMus3 (Shire, 1993).

Mais bien avant la RT-PCR en elle-même, plusieurs facteurs peuvent varier et rendre la quantification difficile. Par exemple, le calcul de la concentration en ARN total par la densité optique peut être biaisé par des contaminations protéiques ou en ADN génomique. L'ARN peut être dégradé durant les diverses manipulations. Tout ceci contribue à rendre la quantification imprécise. Pour y remédier, nous pourrions quantifier l'ARNm de la β -actine qui est transcrit à un taux régulier quelle que soit la stimulation de la cellule. Cette quantification reflètera la qualité et la quantité des ARN extraits. Dans cette optique nous avons alors besoin d'un plasmide contenant la séquence compétitrice pour une quantification des ARNm de la β -actine en RT-PCR.

Dans l'avenir, les résultats de quantification des ARNm bovins par RT-PCR pourront être complétés, en tout cas pour l'IFN γ et pour l'IL4, par la quantification en ELISA des cytokines elles-mêmes (Weynants, Laboratoire de Microbiologie, FUNDP). Le test ELISA est réalisé à partir des surnageants de culture des cellules stimulées *in vitro* et peut donc être

fait en même temps et à partir des mêmes cellules. Dans un premier temps, des tests seront effectués avec des antigènes dont on sait qu'ils induisent une forte réponse Th1 ou Th2. Au laboratoire, des stimulations spécifiques par des antigènes de *Brucella* ou certains antigènes du BRSV induisent des réponses de type Th1. D'autres antigènes du BRSV induisent une réponse de type Th2 chez la souris. Une adjuvantation du virus BRSV par de l'alun induit une réponse de type Th2 tandis qu'une adjuvantation par du Quil A induit une réponse Th1. Ceci pourra être vérifié dans le modèle bovin. Nous pourrions alors quantifier les rapports de concentration que prendront les différentes cytokines impliquées pour une caractérisation du profil Th1/Th2. Il est évidemment plus complexe de mettre en œuvre des modèles expérimentaux bovins dans le cadre d'infections ou d'immunisations expérimentales.

Bibliographie

Bibliographie

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.

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. (1993). Interleukine 4, 237-248. *Dans* J.M. Cavillon (ed.), *Les cytokines*. Masson, Paris France.

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

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. *Journal of Biological Chemistry* 267, 21830-21838.

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.

Brown, W.C.; Davis, W.C. ; Choi, S.H. ; Dobbelaere, D.A.E. and Splitter, G.A. (1993). Functional and Phenotypic Characterisation of WC1⁺ γ/δ T Cells Isolated from *Babesia bovis*-Stimulated T Cell Lines. *Cellular Immunology* 153, 9-27.

Brown, W.C. ; Woods, V.M. ; Dobbelaere, D.A.E. and Logan, K.S.L. (1993). Heterogeneity in Cytokine Profiles of *Babesia bovis*-Specific Bovine CD4⁺ T Cell Clones Activated In Vitro. *Infection and Immunity* 61, 3273-3281.

Brown, W.C. ; Woods, V.M. ; Chitko-McKown, C.G. ; Hash, S.M. and Rice-Ficht, A.C.(1994). Interleukin-10 Is Expressed by Bovine Type 1 Helper, Type 2 Helper, and Unrestricted Parasite-Specific T-Cell Clones and Inhibits Proliferation of All Three Subsets in an Accessory-Cell-Dependent Manner. *Infection and Immunity* 62, 4697-4708.

Cavaillon, J.M. (1993). Le monde des cytokines, 1-12. Dans J.M. Cavaillon (ed.), Les cytokines. Masson, Paris France.

Colona, M. (1996). Natural killer cell receptors specific for MHC class 1 molecules. *Current Biology* 8, 101-107.

Connors, M.; Giese, N.A.; Kulkarni, A.B.; Firestone, C.Y.; Morse, M.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 abrogated 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 Immunology and Immunopathology* 49, 39-50.

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. *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 Noncyclytic CD8- CD4- cells that make Th2 cytokines and help B cells. *Science* 260, 1802-1805.

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.

Garside, P. and A.McI.Mowat, P. (1995). Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic conséquence 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

Gilliland, G. ; Perrin, S. ; Blanchard, K. and Bunn, H.F. (1989). Analysis of cytokines mRNA and DNA : Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Genetics* 87, 2725-2729.

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

Henley, W.N. ; Schuebel, K.E. and Nielsen, D.A. (1996). Limitations Imposed by Heteroduplex Formation on Quantitative RT-PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 226, 113-117.

Jiang, Y.H. ; Davidson, L.A. ; Lupton, J.R. and Chapkin, R.S. (1996). Rapid competitive PCR determination of relative gene expression in limiting tissue samples. *Clinical Chemistry* 42 :2, 227-231.

Johnson, H. ; Bazer, F. ; Szente, B. and Jarpe, M. (1994). Les interférons contre les maladies. *Pour la science* 201, 78-85.

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+ 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 interleukine. *Immunology* 83,3 8-44.

Leclerc, C. (1993). Interleukin-10, 263-273. *Dans* J.M. Cavaillon (ed.), *Les cytokines*. Masson, Paris France.

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

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.

Nickoloff, B.J. and Turka, L.A. (1994). Immunological fonctions of non-professional antigene-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology Today* 15, 464-469.

O'Garra, A. and Murphy, K. (1994). Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current Opinion in Immunology* 6, 458-466.

Oppenshaw, P. ; Murphy, E.E. ; Hosken, N.A. ; Maino, V. ; Davis, K. ; Murphy, K. and O'Garra, A. (1995). Heterogeneity of Intracellular Cytokine Synthesis at the Single-Cell

Level in Polarised T Helper 1 and T Helper 2 Populations. *Journal of Experimental Medicine*. 182, 1357-1367.

Pellegrini, S. and Schindler, C. (1993). Early events in signalling by interferons. Elsevier Science Publishers, UK 93, 338-342.

Pernis, A.; Gupta, S., Gollob, K.J.; Garfein, E.; Coffman, R.L. Schindler, C.; Rothman, P. (1995). Lack of interferon γ receptor β chain and the prevention of interferon γ 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.

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.

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

Röken, M.; Racke, M. and Shevach, E.M. (1996). IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunology Today* 17, 225-2321.

Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunology today* 6, 263-266.

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 Immunopathology* 45, 1-18.

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

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

Siebert, P.D. and Larrick, J.W. (1993). PCR MIMICS : Competitive DNA Fragments for Use as Internal Standards in Quantitative PCR. *BioTechniques* 14, 244-249.

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

Stadecker, M.J. and Villanueva, P.O.F. (1994). Accessory cell signals regulate Th-cell responses : from basic immunology to a model of helminthic disease. *Immunology Today* 15, 571-574.

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 γ 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.; 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.

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.

Weynants, V. ; Godfroid, J. ; Limbourg, B. ; Saegerman, C. and Letesson, J.J. (1994). Specific Bovine Brucellosis Diagnosis Based on In Vitro Antigen-Specific Gamma Interferon Production. *Journal of Clinical Microbiology* 95, 706-712.

Yokoyama, W.M. (1995). Natural killer cell receptors. *Current Opinion in Immunology* 7, 110-120.

Zammatteo, N. ; Moris, P. ; Alexandre, I. ; Vaira, D. ; Piette, J. and Remacle, J. (1995). DNA probe hybridisation in microwells using a new bioluminescent system for the detection of PCR-amplified HIV-1 proviral DNA. *Journal of Virological Methods* 55, 185-197.

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