



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude fonctionnelle de la coopération T-B dans la production d'anticorps in vitro

Blavier, Laurence

Award date:
1988

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDE FONCTIONNELLE DE LA COOPERATION
T - B DANS LA PRODUCTION D'ANTICORPS
IN VITRO

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

BLAVIER Laurence

JUIN 1988

FM BY/1988/2

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles 61
B-5000 NAMUR

Tél. : 081/22.90.61 Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23.03.91

**ETUDE FONCTIONNELLE DE LA COOPERATION T - B
DANS LA PRODUCTION D'ANTICORPS IN VITRO**

LAURENCE BLAVIER

Résumé :

L'immunologie bovine occupe une place importante dans la compréhension et la prévention des maladies du bétail.

Cependant, le contrôle des mécanismes des coopérations cellulaires intervenant dans la réponse immunitaire nécessite la mise au point de modèles d'étude des cellules in vitro.

Nous avons donc entrepris l'établissement d'un tel modèle pour des cellules du sang périphérique mises en culture et stimulées avec un agent antigénique hapténique conjugué à une protéine porteuse, ceci pour mettre en évidence la spécificité des anticorps produits suite à une immunisation primaire ou secondaire in vitro.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour démontrer cette production d'anticorps, citons : le test ELISA, méthode immuno chimique qui permet la détection d'Ac au niveau des surnageants de culture ; le test des plages d'hémolyse, mettant en évidence les cellules productrices elles-mêmes ; enfin, à côté de cela, la prolifération cellulaire induite par l'adjonction d'antigène au milieu réactionnel a été suivie par incorporation de thymidine tritiée.

L'aboutissement de ces expériences sera l'optimisation des paramètres intervenant dans les cultures afin d'entreprendre plus en détail l'étude de la coopération T-B.

Abstract :

Immunology of bovine species play a great role in the understanding and prevention of cattle disease.

In order to follow cell-cell interaction accountable for Ab synthesis and to study immune responsiveness or adjuvanticity abilities we have to establish an "in vitro" model.

Then, in the present study, we described a culture system for the development of in vitro primary and secondary response to the hapten carrier conjugate, DNP-KLH and DNP-7C7.

Two technics were used to detect the anti-DNP antibodies production by peripheral blood lymphocytes. First Ab synthesis was measured in culture supernatants by a ELISA test ; on the other hand Ig-secreting-cells were numbered by hemolytic plaque assay. Finally proliferative response of

PBL to DNP-KLH and DNP-7C7 was measured thymidine ³H.

The optimisation of culture conditions will permit the demonstration of T-B interactions in more details.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1988

Laboratoire d'Immunologie Vétérinaire

Promoteur : Prof. A. DEPELCHIN

FMB4/1988/2

ABREVIATIONS USUELLES

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
BCDF	B cell differentiation factor
BCGF	B. cell growth factor
CD	Cluster of differentiation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	Concanavalline A
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
DNP	Dinitrophénol
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	Fluorescence activated cells sorter
FCS	Foetal calf serum
HLA	Human leukocyte antigen
IL	Interleukine
ISC	Immunoglobulin-secreting cells
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
MNC	Mononuclear cells
PFC	Plaque forming cells
PWM	Pokeweed mitogen
SRBC	Sheep red blood cell

Au terme de cette année , qu'il me soit permis de remercier le professeur A. DEPELCHIN qui a accepté de promouvoir ce mémoire.

Mes plus vifs remerciements vont également au docteur J.J. LETESSON pour sa grande disponibilité, ainsi qu'à madame N. LOSTRIE-TRUSSART pour m'avoir fait part de ses conseils judicieux tout au long de ce travail.

J'adresse aussi un merci tout spécial à monsieur C. DIDEMBOURG pour son aide technique spontanée et efficace ; de même qu'à madame M. MULUMBA-ALBERT et madame M.A. DIDEMBOURG-POOS pour leur sympathie.

Je remercie les professeurs WATTIAUX et FEYTMANS pour m'avoir permis l'accès à leur laboratoire, ainsi que le professeur HEVESI pour ses explications de chimiste organicien.

Je ne voudrait pas oublier la famille DENET pour leur accueil toujours sympathique, et sans l'aide desquels cette étude n'aurait pu être entreprise.

Enfin que toute personne ayant, directement ou indirectement, participé à la réalisation de ce mémoire soit assurée de mon entière gratitude.

I. INTRODUCTION

	pages
1. <u>Avant-propos</u>	01
2. <u>Les acteurs de la réponse immunitaire</u>	02
2.1. Différentes lignées cellulaires	02
2.2. Maturation de la lignée lymphoïde	02
2.3. Caractéristiques générales des lymphocytes	03
2.3.1. Les lymphocytes B	04
2.3.2. Les lymphocytes T	05
2.4. Cellules autres que lymphocytes	06
2.4.1. Les cellules nulles	06
2.4.2. Les monocytes	07
3. <u>Les molécules du SOI</u>	07
4. <u>Mécanismes gérant la production d'anticorps</u>	08
4.1. Présentation de l'antigène	08
4.2. Des récepteurs pour l'antigène	10
4.2.1. Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T	10
4.2.2. Reconnaissance par les cellules B	12
4.3. Les coopérations cellulaires	12
4.3.1. Les médiateurs de l'immunité	15
4.3.2. Rôle essentiel de l'interleukine-2	15
4.4. Production d'anticorps	15
4.4.1. Structure des anticorps	17
4.4.2. Organisation des gènes d'Ig	18
4.4.3. Réponse primaire	19
4.4.4. Réponse secondaire	19
5. <u>But du travail</u>	21

II. MATERIEL ET METHODES

1. <u>Animaux</u>	22
2. <u>Prélèvements sanguins</u>	22
3. <u>Isolement de cellules</u>	22
4. <u>Mise en culture</u>	23

	pages
4.1. Composition du milieu de culture	23
4.2. Distribution des cellules en boîtes de culture	24
5. <u>Le modèle utilisé</u>	24
5.1. Les molécules hapténiques : définition	25
5.2. Méthodes de couplage	26
5.2.1. Couplage du DNP au KLH	26
5.2.2. Couplage du DNP au 7C7	27
5.2.2.1. Préparation du 7C7	27
5.2.2.2. Principe de couplage	28
5.2.2.3. Vérification de l'efficacité du 7C7 couplé	28
5.2.3. Couplage du DNP à l'ovalbumine	29
5.3. Stérilisation des antigènes	29
5.4. Immunisation	29
6. <u>Mesure de la prolifération cellulaire</u>	30
6.1. Incorporation de thymidine tritiée	30
6.2. Récolte au "Cell-Harvester"	30
6.3. Mesure de la radioactivité β par scintillation liquide	30
7. <u>Mise en évidence de la production d'anticorps</u>	32
7.1. Temps de culture	32
7.2. Le test ELISA	32
7.3. Plages d'hémolyse	34
7.3.1. Prélèvement du sang de mouton	36
7.3.2. Couplage des globules rouges au 3B8	36
7.3.3. Réalisation du test	37
7.3.3.1. Les plages directes	37
7.3.3.2. Les plages indirectes	37
7.3.4. Mode d'action du complément	38
<u>III. R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N</u>	39
I. PREMIERE PHASE DU TRAVAIL	39
1. <u>Immunisation primaire in vitro</u>	39
1.1. Conditions de culture : première modalité	39
1.1.1. Cellules et antigène en présence	39
1.1.2. Apport d'"IL ₂ "	40
1.1.2.1. IL ₂ utilisé	41

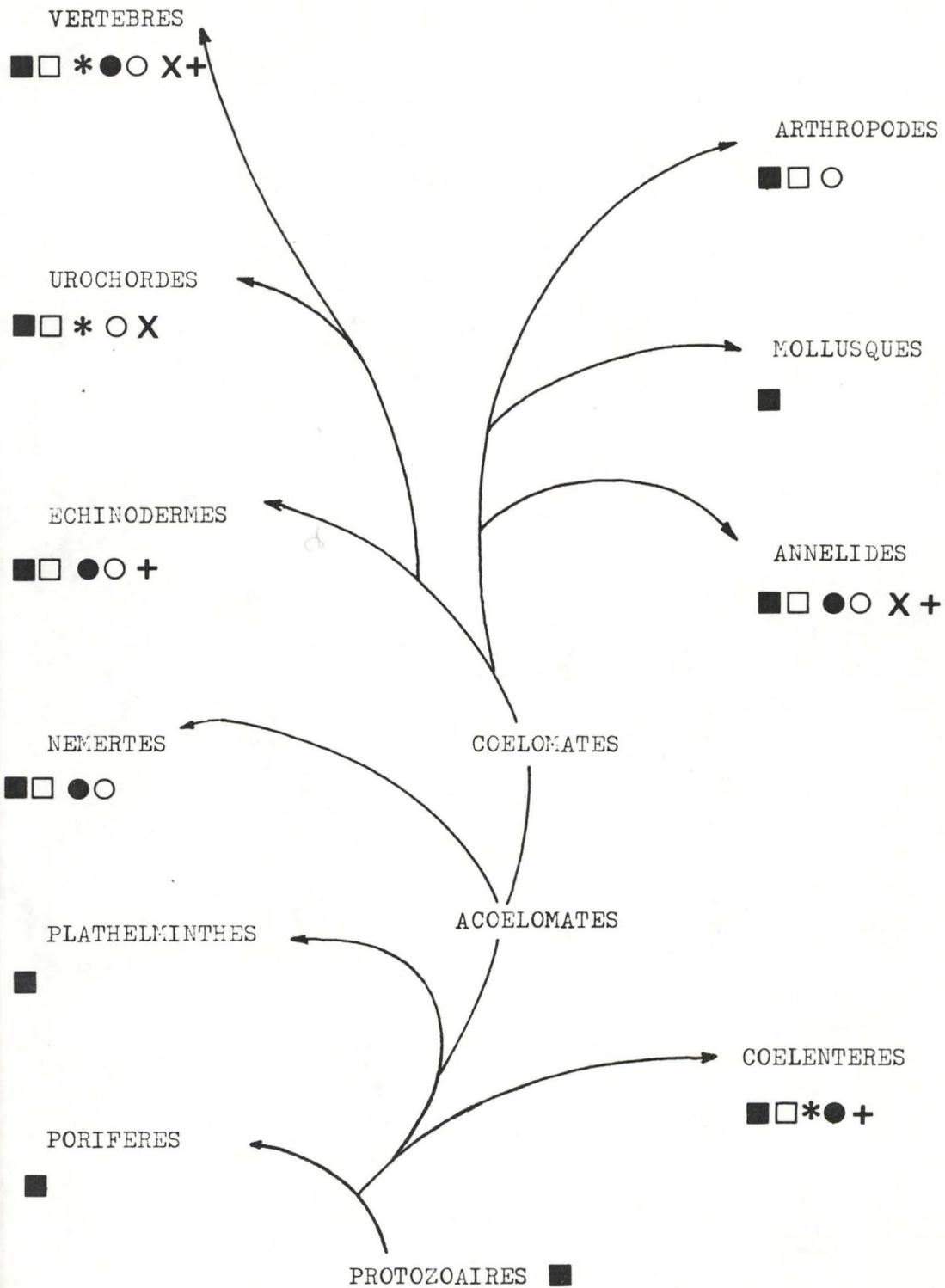
1.1.2.2. Vérification de l'efficacité du "surnageant IL ₂ "	41
1.2. Détection des anticorps produits	42
1.2.1. Résultats et interprétation	43
1.3. Deuxième modalité de culture	44
1.4. Modifications apportées au test ELISA	45
2. <u>Immunisation secondaire in vitro</u>	46
2.1. Mise en culture	46
2.2. Elisa	48
2.3. Résultats	48
3. <u>Plages d'hémolyse</u>	49
3.1. Mise au point du test PFC	49
3.2. Cinétique de la production d'immunoglobulines	50
II. DEUXIEME PHASE DU TRAVAIL	53
1. <u>Immunisation primaire in vitro</u>	53
1.1. Mise en culture	53
1.2. Résultats	55
2. <u>Immunisation secondaire in vitro</u>	56
2.1. Quinze jours après la première injection de DNP-KLH	56
2.1.1. Elisa	57
2.1.2. Résultats	58
2.2. Trente-cinq jour après la première injection	59
2.2.1. PFC	59
2.2.2. Elisa	60
2.2.2.1. Sensibilité du test Elisa	62
3. <u>Deuxième rappel in vitro</u>	63
3.1. Quinze jours après la deuxième injection	63
3.1.1. Elisa	64
3.2. Trente-cinq jours après la deuxième injection	64
3.2.1. Résultats	66
3.2.1.1. Prolifération cellulaire	66
3.2.1.2. Tests des surnageants de culture	67
3.2.1.3. PFC	69
4. <u>Troisième rappel in vitro</u>	70
4.1. Une semaine après la troisième injection	70

4.1.1. Mise en culture 70
4.1.2. Résultats 72
 4.1.2.1. Prolifération cellulaire 72
 4.1.2.2. Tests des surnageants de culture . . 75

IV . C O N C L U S I O N 77

V . B I B L I O G R A P H I E

INTRODUCTION



- reconnaissance du soi et du non-soi
- * rejet de greffe
- contrôle génétique du rejet de greffe
- spécificité et mémoire de la réponse du rejet de greffe
- présence de leucocytes variés
- X multiplication des leucocytes démontrée in vivo et in vitro
- + destruction des cellules cibles par des leucocytes

Dans certains embranchements, il n'existe pas de résultats expérimentaux

fig. 1. D'après " LA RECHERCHE " n° 103 (1979)

I N T R O D U C T I O N

1. Avant-propos

L'examen des systèmes de défense existant au sein des différents groupes phylogéniques reflète le caractère progressif de la mise en place de l'immunité au cours de l'évolution. La réponse immunitaire s'organise de façon similaire dans les différents phylums, se complexifie et augmente ses potentialités jusqu'à atteindre son apogée chez les vertébrés. (fig. 1)

L'immunité se définit comme étant la capacité d'un organisme à se défendre contre des agressions extérieures. Son émergence se serait faite en trois stades au travers desquels on peut retrouver l'origine des deux grands types de "barrières" qui protègent l'hôte de sa colonisation par des agents pathogènes; à savoir l'immunité spécifique et non-spécifique.

La capacité de réponse immunitaire commence quand évoluent les premières formes de vie, il y a 700 millions d'années. Les êtres unicellulaires (protozoaires), tout comme les cellules du système immunitaire des animaux pluricellulaires, présentent la propriété de faire la différence entre des éléments qui leur sont constitutifs et des corps étrangers. Il s'agit de l'étape de la reconnaissance, suivie de la **phagocytose** des éléments reconnus comme non-soi apparue chez les porifères (Edwin COOPER 1979). Cette première étape (reconnaissance - phagocytose) existe chez tous les groupes d'animaux, des plus simples aux plus évolués. Chez les vertébrés, ce système de défense non spécifique met en jeu une catégorie spéciale de cellules : monocytes, macrophages, polymorphonucléaires, assurant la phagocytose.

Le degré suivant dans l'évolution est marqué par l'acquisition, dès les coelentérés, de mécanismes de réponse complexes permettant le rejet de greffes. Ce pouvoir de destruction sur des cellules et des tissus étrangers repose sur une reconnaissance spécifique ainsi qu'une mémorisation de l'identité de l'"étranger". Cette étape de destruction directe d'une cellule cible correspond à la mise en place de la **cytotoxicité**. Ce type d'immunité s'appelle de manière générale l'**immunité à médiation cellulaire** et est assurée chez les vertébrés

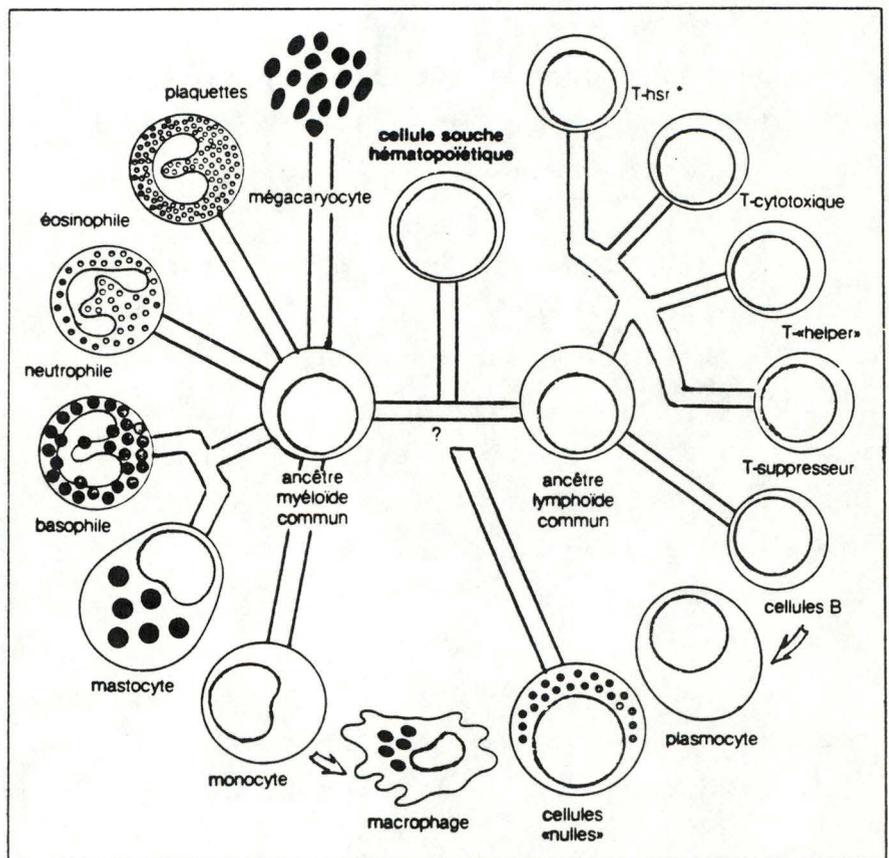


fig. 2. ROITT (1985).

I N T R O D U C T I O N

par les lymphocytes T.

La troisième étape consiste en la sécrétion de substances solubles capables de neutraliser l'antigène; c'est l'apparition de **l'immunité humorale**, déjà présente chez les invertébrés les plus évolués : annélides, mollusques, arthropodes, échinodermes et tuniciers. Chez les vertébrés, il s'agit de la sécrétion d'anticorps sous forme d'immunoglobulines produites par les lymphocytes B. Elle constitue l'immunité spécifique qui résulte de phénomènes adaptatifs liés à la présence d'antigènes stimulant la lignée lymphocytaire.

C'est plus précisément de ce dernier point qu'il sera question par la suite. Notons cependant que les deux compartiments de l'immunité (spécifique et non-spécifique) agissent de concert; les anticorps produits par les lymphocytes apportent aux phagocytes une aide dans la reconnaissance de leurs cibles. De même, les phagocytes, par leur capacité de transformation de l'Ag en facilite la reconnaissance par les lymphocytes qui, ainsi activés, déclenchent une réponse humorale spécifique (cfr §4 : "Mécanismes gérant la production d'Ac").

2. Les acteurs de la réponse immunitaire

2.1. Différentes lignées cellulaires

Au niveau médullaire, des cellules souches pluripotentes sont à l'origine des deux lignées constitutives du système immunitaire; la lignée myéloïde, qui donnera naissance aux phagocytes (éléments de la défense non spécifique), et la lignée lymphoïde dont la maturation aboutira à la mise en place des pièces maîtresses de la défense spécifique : les lymphocytes. (fig. 2)

2.2. Maturation de la lignée lymphoïde

Initialement, dans les îlots hématopoïétiques du foie foetal, puis dans la moelle osseuse foetale et adulte, les cellules souches vont évoluer suivant deux voies de maturation différentes. La première possibilité est de se cantonner à ce niveau et de se différencier

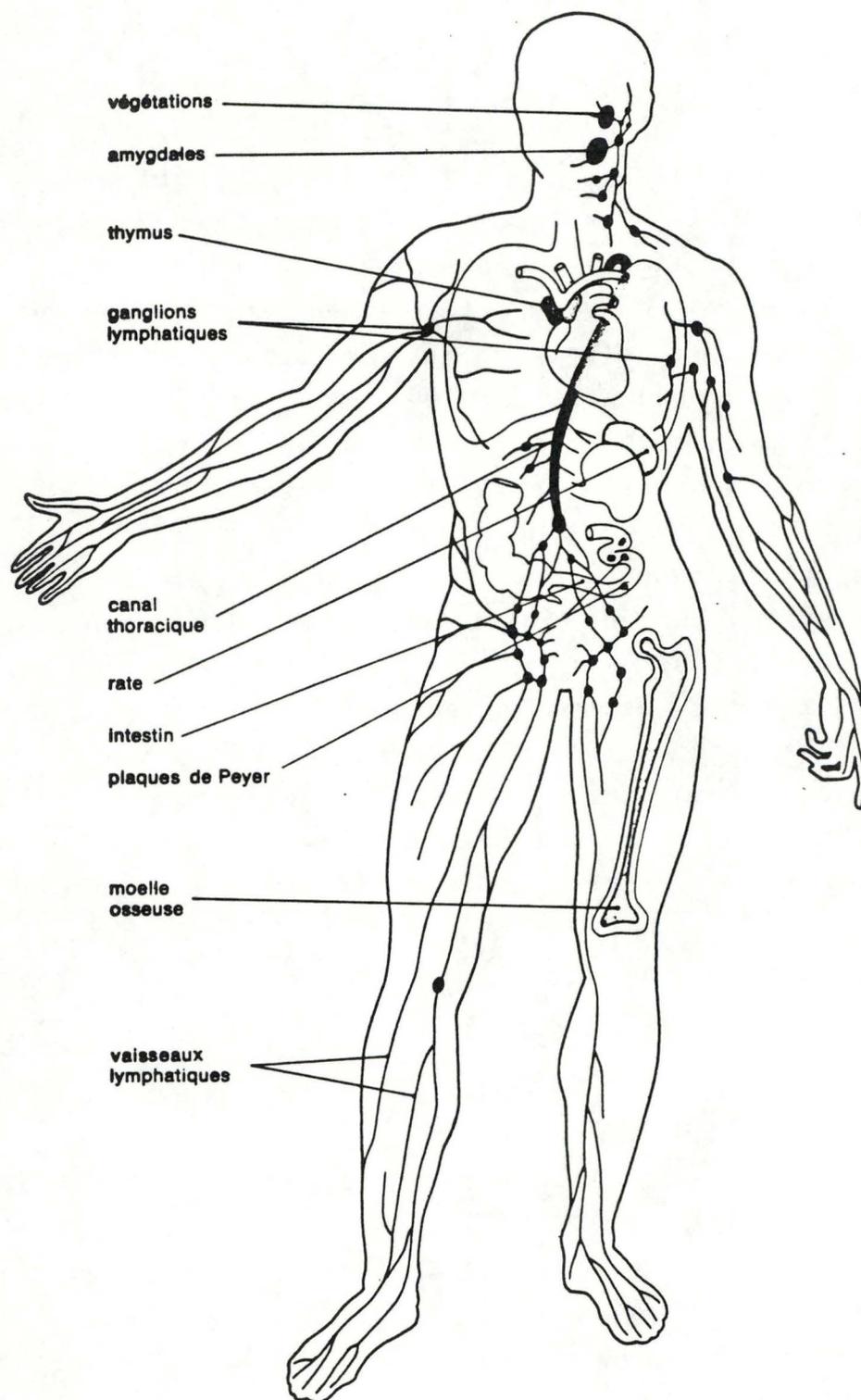


fig. 3. Localisation des différents
 organes lymphoïdes.

I N T R O D U C T I O N

alors en cellules B, l'alternative nécessitant une migration des cellules souches vers le thymus qui gère leur maturation en lymphocytes T.

Moelle osseuse et thymus sont appelés organes lymphoïdes primaires ou centraux, sites majeurs de la lymphopoïèse. C'est en ces lieux que les lymphocytes acquièrent leur répertoire de reconnaissance pour l'antigène et "apprennent" à distinguer les éléments du soi et du non-soi.

Après leur maturation, les lymphocytes colonisent les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales, des amas de tissus lymphoïdes répartis à travers tout le corps (par exemple, Plaques de Peyer) et le sang circulant où ils vont jouer leur rôle dans la réaction immunitaire. L'ensemble de ces organes forme le système lymphoïde secondaire ou périphérique. (fig. 3)

2.3. Caractéristiques générales des lymphocytes

Les lymphocytes restent quiescents et circulent librement tant qu'ils ne sont pas stimulés par la présence d'antigènes. Si cette stimulation a lieu, ils augmentent de taille et se divisent pour donner des lymphocytes fonctionnels.

Des expériences de bursectomie et thymectomie ont permis de démontrer l'existence de deux populations lymphocytaires (lymphocytes T et lymphocytes B) qui se localisent de façon préférentielle dans les zones définies des formations lymphoïdes secondaires. Les cellules de ces deux populations sont petites (5 à 8 μ m) de rapport nucléocytoplasmique élevé et non distinguables les unes des autres d'un point de vue strictement morphologique. Cependant la distinction fondamentale peut se faire sur base de marqueurs membranaires. En effet, il est possible d'assigner à chaque lymphocyte, en fonction de la présence ou de l'absence de molécules spécifiques sur sa surface, ce que l'on appelle un phénotype de surface qui le caractérise et le distingue des autres cellules.

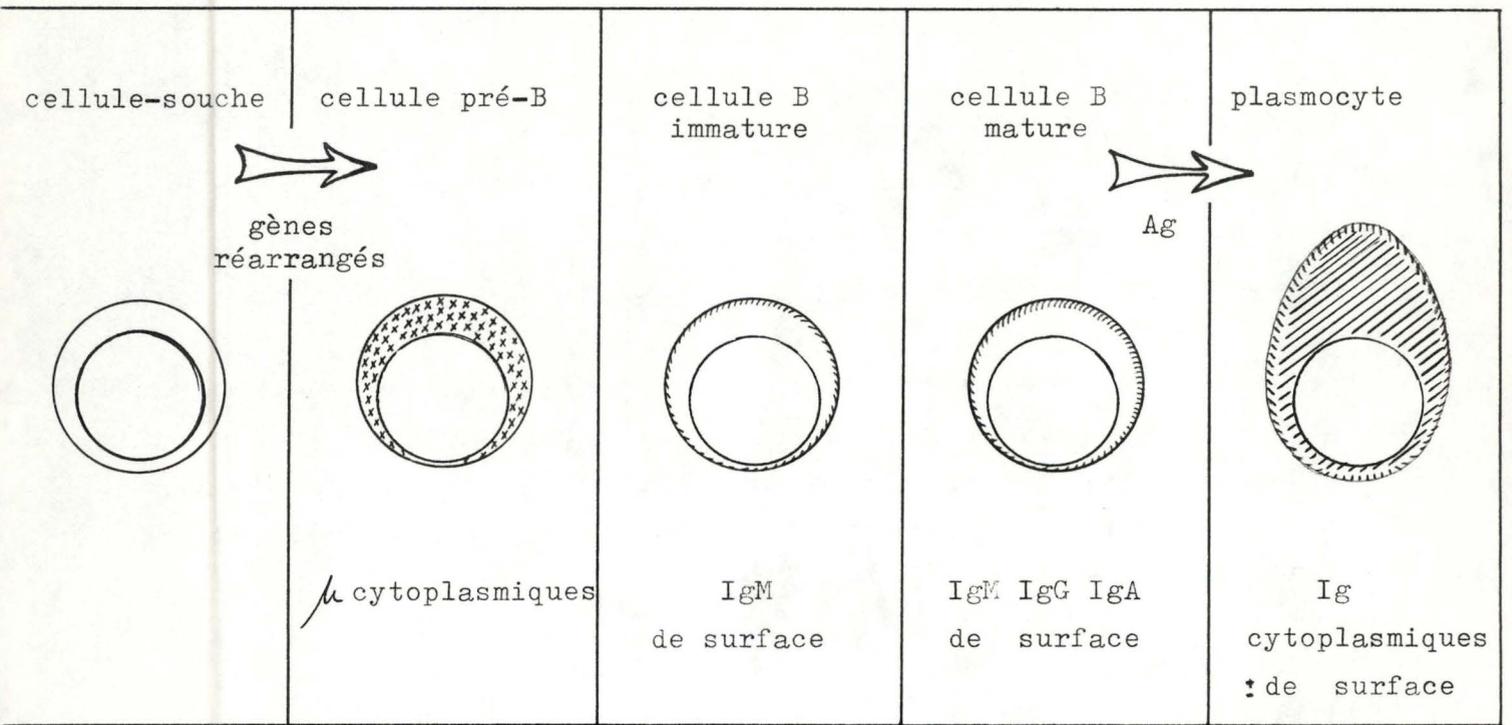


fig. 4. Maturation du lymphocyte B.

I N T R O D U C T I O N

2.3.1. Les lymphocytes B

Les mammifères ne possèdent pas d'organe exclusivement spécialisés dans la lymphopoïèse des cellules B. Le foie foetal, site initial de production des lymphocytes B, est relayé par la moelle osseuse chez l'adulte. A ce niveau, les principaux stades de la différenciation se font de façon centripète. Ainsi, à la périphérie on observe de grandes cellules lymphoblastiques à division rapide ; ce sont les progéniteurs. Au départ des cellules souches a lieu un réarrangement génique conduisant à la **synthèse de chaînes lourdes (μ) intracytoplasmiques**. Il s'agit du premier signe de différenciation, stade de la **cellule pré-B**. Lui faisant suite, on trouve les cellules **B Immatures**. Cette étape correspond à l'**acquisition d'immunoglobulines de membrane de la classe des Ig M**. Les transformations ultérieures sont : le stade des cellules **B matures**, traduit par une plus grande densité d'IgM mais aussi par la présence d'autres marqueurs (tels que Ig_D^D , récepteurs de fragments Fc d'Ig, récepteurs pour le composant C_3 du complément, et produits de gènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité) et enfin le stade **plasmocyte** (N_1) qui met en place une **machinerie de synthèse d'immoglobulines intracytoplasmiques**. Les anticorps ainsi produits n'appartiennent, pour une cellule donnée, qu'à une seule classe d'immunoglobulines. (fig. 4)

En bref : les lymphocytes B, artisans de l'immunité humorale :

- possèdent des immunoglobulines de surface grâce auxquelles ils ne reconnaissent qu'une spécificité d'antigène.
- ne peuvent produire qu'un seul type d'anticorps spécifiques.

N_1 : Une activation est nécessaire pour que la plupart des blastes de type B se différencient en plasmocytes. Ces derniers, que l'on retrouve normalement dans les organes lymphoïdes secondaires, représentent moins de 0,1 % des lymphocytes. Pour quelques autres blastes, la destinée diffère en ce sens qu'ils ne développent pas le matériel de synthèse d'Ig. Ces "cellules folliculaires" colonisent les centres germinatifs et portent également le nom de centroblaste. Il s'agirait peut-être de cellules B mémoires (ROITT 1985).

Tableau I					
LES MARQUEURS DU LYMPHOCYTE T (CD = CLUSTER OF DIFFERENTIATION)					
CD	poids moléculaire *	Nomenclature			cellules, fonction
		Ortho/Coulter	Becton Dickinson	autres	
CD1	45**	T6	leu6		thymocytes corticaux
CD2	50	T11	leu5b		rosettes E
CD3	19-29	T3	leu4		associé au récepteur de l'antigène
CD4	55	T4	leu 3a-3b		récepteur classe II du CMH
CD5	67	T1	leu1	A50	toutes cellules T, cellules B des LLC***, récepteur d'activation
CD6	120	T11			toutes cellules T, cellules B des LLC
CD7	41		leu9		récepteur du Fc des IgM, cellules T
CD8	32-33	T8	leu 2a-2b		récepteur classe I du CMH
CD16	50-70				récepteur du Fc des IgG
CD25	55				récepteur d'IL2
CD26	105				cellules T activées
CD27	55				toutes cellules T
CD28	44			9.3	toutes cellules T (récepteur d'activation)
CD29	120-160-200			4B4 K20	activateurs vrais (parmi les CD4)
CD45-R	200			2H4	activateur des suppresseurs (parmi les CD4)

* en kilodaltons

** CD1 est, de plus, associé à la β 2-microglobuline

*** LLC = leucémie lymphoïde chronique.

Tableau 1. Laurent Degos (1987).

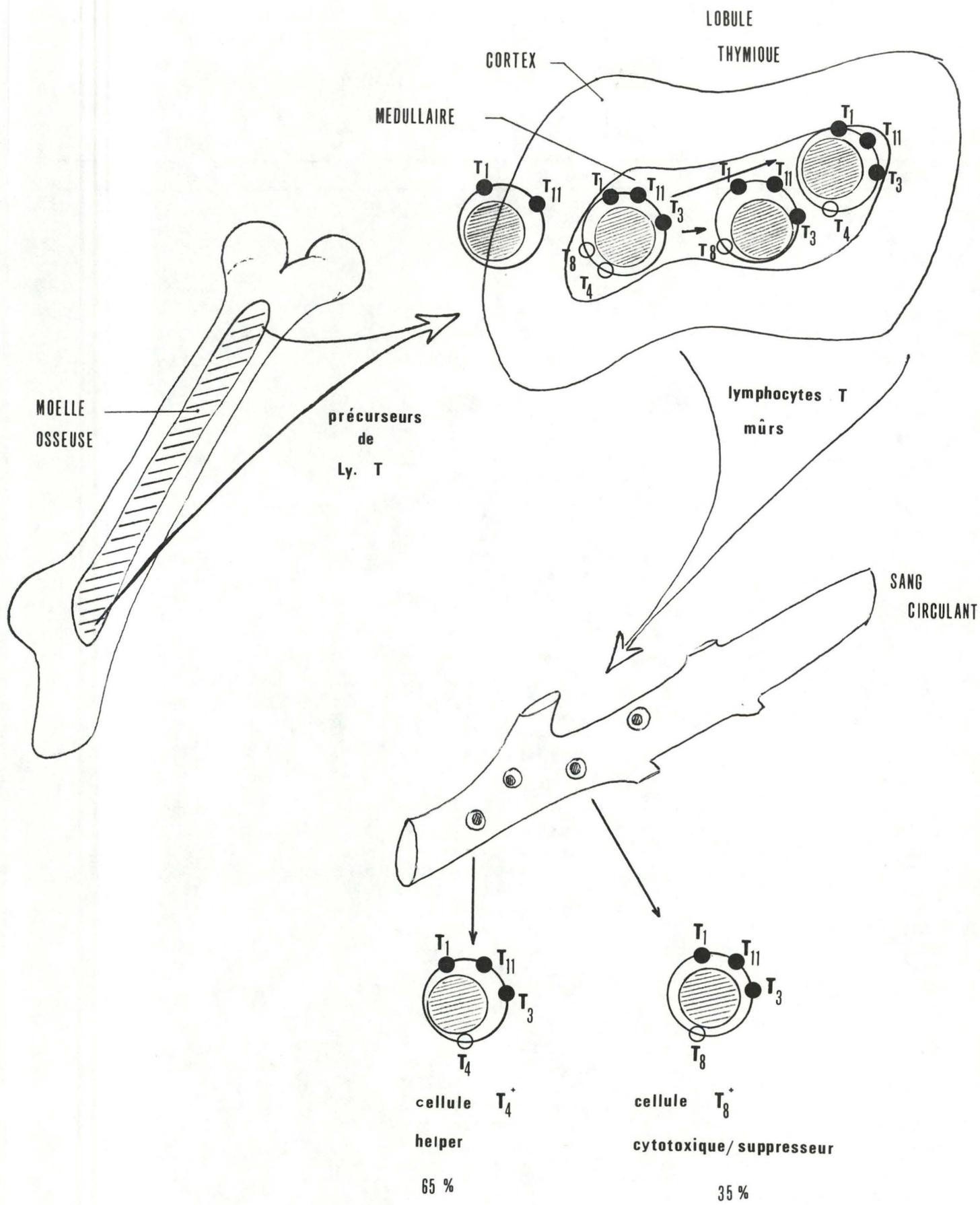


fig. 5 D'après J-P SOULILLOU (1986)

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

^aCALL = common type acute lymphoblastic leukaemia.

^bFDRC = follicular dendritic reticulum cells.

^cIRC = interdigitating reticulum cells.

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

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

I N T R O D U C T I O N

2.3.2. Les lymphocytes T

L'apport des cellules souches se fait par voie sanguine jusqu'au thymus où la transformation en thymocytes a lieu sous l'influence du microenvironnement épithélial thymique. Les lymphocytes précurseurs marquent la première étape de la différenciation. Les autres déterminants marqueurs de cette différenciation (tableau 1) vont apparaître au cours du mûrissement de la cellule qui migre du cortex vers la médullaire. (fig. 5)

Les cellules maturées en lymphocytes immuno-compétents présentent une grande hétérogénéité de fonctions. On distingue des **actions cytotoxiques directes** (visant à éliminer virus, cellules cancéreuses, greffes...), et des **effets régulateurs de la réponse immunitaire** soit **en l'augmentant** (rôle des T "auxiliaires" ou T "helper"), soit **en la déprimant** (rôle des T "suppresseurs"). Les lymphocytes T sont également capables de produire des médiateurs (voir plus loin : "Coopérations cellulaires") et de reconnaître un antigène spécifique via un récepteur constitué de deux chaînes glycoprotéiques.

Nous venons de voir que des fonctions précises de la défense spécifique peuvent être attribuées à des sous-populations différentes de lymphocytes T. Ces dernières ont été décrites grâce à une série d'Ac monoclonaux spécifiques des Ag de surface des thymocytes et des lymphocytes T périphériques. L'expression cellulaire et la fonction de ces Ag sont repris dans les tableaux 1 et 2.

L'ordre dans lequel les marqueurs apparaissent est bien établi; les Ag T_1 et T_3 (du nom du monoclonal se liant spécifiquement à cet épitope de la surface cellulaire (N_1)) figurent parmi les premiers

N_1 : Les marqueurs membranaires de lymphocytes T sont appelés différemment selon la firme qui prépare Ac. D'une façon générale, on parle maintenant en termes de CD (cluster differentiation). A ce point de vue, aujourd'hui encore, la production d'Ac monoclonaux se poursuit dans le but d'augmenter leur spécificité pour préciser la gamme de cellules reconnaissables par un monoclonal donné. Stephen Shaw rapporte qu'à ce jour le nombre de groupes et sous-groupes de CD est porté à 50 (Tableau 2 : I. Today Vol. 8 1987).

I N T R O D U C T I O N

à se mettre en place et sont toujours présents sur 100 % de cellules T circulantes (Reinherz et Schlossman 1980). Le marqueur T_{11} apparaît aussi très tôt lors de la différenciation et persiste également sur les cellules matures. T_4 et T_8 quant à eux sont exprimés de façon simultanée par des cellules déjà T_3^+ mais l'un des deux disparaît au cours de la différenciation thymique. Cette perte de T_4 ou T_8 entraîne une spécialisation de chaque cellule en une fonction particulière dans les tissus lymphoïdes secondaires. Dans le sang, T_4 est porté par 65 % des T alors que 35 % seulement ont l'Ag T_8 . T_4 et T_8 caractérisent respectivement les T "helper" et les "cytotoxiques/suppresseurs". (N_2)

2.4. Cellules autres que lymphocytes

2.4.1. Cellules nulles

Ainsi dénommées du fait qu'elles ne possèdent pas les marqueurs de membranes typiques des cellules T ou B. Elles se présentent comme de grands lymphocytes contenant ou non des granules cytoplasmiques azurophiles et appelés respectivement LGL ("Large Granular Lymphocyte") et LAL ("Large Agranular Lymphocyte") (ROITT 1985).

Parmi les cellules de cette population particulière de lymphocytes, certaines possèdent une activité cytolytique en dehors du contexte spécifique du complexe majeur d'histocompatibilité. Ces dernières portent le nom de cellules NK ("natural Killers"). Il s'agit

N_2 : Un marqueur de membrane particulier assigné à un lymphocyte ne permet pas de lui attribuer une fonction définie. Ainsi, de nombreux clones, humains de lymphocytes T_4 sont doués de cytotoxicité tout comme les T_8 et, à l'inverse, de nombreux clones T_8 prolifèrent au contact de l'Ag et se mettent à sécréter des facteurs médiateurs de l'immunité cellulaire : les lymphokines. De même, le modèle attribuant aux T_8 la capacité de reconnaître les Ag HLA ("Human Leukocytes Antigen") de classe I et aux T_4 de reconnaître ceux de la classe II (Voir "Mécanismes gérant la production d'Ac) semble entaché de nombreuses exceptions (Soulillou 1986).

I N T R O D U C T I O N

généralement de LGL qui participent à la surveillance non spécifique grâce à leur cytotoxicité naturelle dirigée contre des cellules malignes, indifférenciées, infestées de virus ou de parasites. Le mécanisme de "mise à mort" de ces cellules est mal connu; il implique la fabrication par les NK de facteurs cytotoxiques non encore purifiés et émis lors de la liaison entre un récepteur et une structure "signal" sur la cellule cible (Laurent Degos 1987).

2.4.2. Les monocytes

Issus de la lignée myéloïde, ils terminent leur maturation dans le sang qu'ils quittent pour devenir macrophages répartis dans les tissus conjonctifs. La mobilité de ces cellules les adapte bien à leur fonction de phagocytose d'Ag particuliers qui se développe tôt au cours de la vie foetale. Leur autre fonction de traitement et de présentation de l'Ag aux lymphocytes s'édifie un peu plus tard. Par ces aspects, les macrophages ont un rôle majeur dans l'immunité à médiation cellulaire car ils sont impliqués dans le déclenchement de la réponse comme cellule présentatrice de l'Ag. D'autre part, ils interviennent également lors des processus d'inflammation, phase effective de l'immunité antitumorale et antimicrobienne.

3. Les molécules du SOI

Il existe à la surface de toutes les cellules des structures particulières qui caractérisent chaque individu. Ces structures, constituées de molécules protéiques insérées dans la membrane plasmique des cellules sont les antigènes d'histocompatibilité. Ils sont déterminés par un petit groupe de gènes spécifiques situés chez l'homme sur le chromosome 6 et baptisé complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou système HLA (Human Leukocyte Antigene). Chacun de ces gènes peut se présenter sous diverses formes alléliques. Cette diversité et l'expression codominante de ces allèles rend compte du nombre de variantes pratiquement illimité sous lesquelles le système existe.

I N T R O D U C T I O N

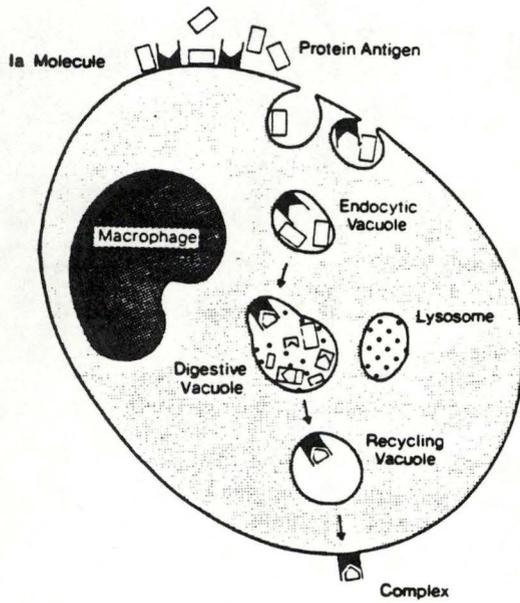
Les molécules du soi permettent aux cellules d'un individu d'échapper à l'attaque de ses propres lymphocytes puisque ceux-ci portent la même marque HLA. Ces protéines du CMH sont classées en trois catégories. Chez l'homme, la plupart des cellules nucléées expriment les Ag de **classe I** dont on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle déterminée sur base d'études cristallographiques (Axel Kahn 1988). Les molécules de **classe II** ont une distribution moins étendue. On les rencontre à la surface des macrophages des cellules B, sur des cellules réticulées des organes lymphoïdes, sur certaines cellules épithéliales, sur certains lymphocytes T après leur activation. Nous discuterons plus loin du rôle important de ces Ag pour la reconnaissance fonctionnelle entre les cellules impliquées dans la réponse immunitaire. La **classe III**, quant à elle, regroupe des gènes codant pour les protéines des composants du complément.

4. Mécanismes gérant la production d'anticorps

4.1. Présentation de l'antigène

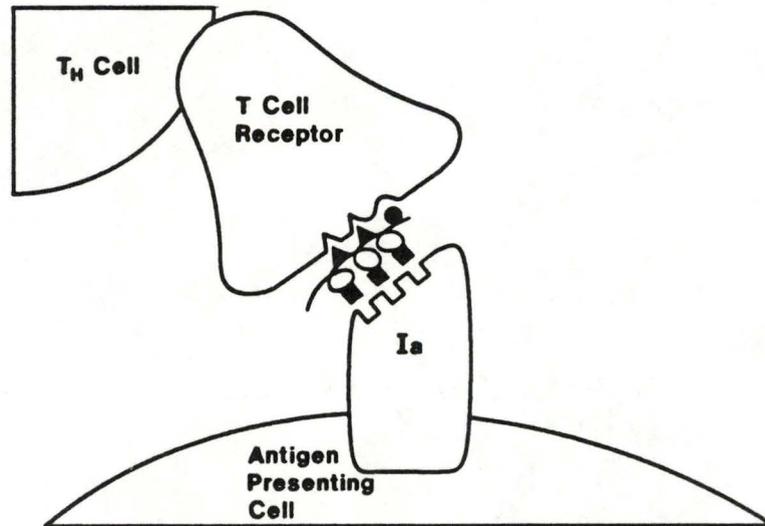
L'antigène doit être présenté aux cellules du système immunitaire qui le reconnaissent pour qu'elles se révèlent capables de mettre en place leur réponse spécifique et adaptée.

Divers types de cellules sont impliquées dans la présentation de l'Ag. Il peut s'agir de macrophages, cellules de Langerhans de la peau, cellules de Kupffer du foie et cellules dendritiques de la rate. Soit, en règle générale, toute cellule exprimant la molécule Ia (I associated : produit de gènes localisés dans la région I du CMH). Toutes peuvent être désignées sous le nom de "cellules présentatrices de l'Antigène" (CPA) ou cellules accessoires et sont les premières à réagir lors de la rencontre avec l'"étranger". Suite à ce premier contact a lieu le "processing" de l'antigène. Cette étape consiste en l'internalisation de l'Ag par la CPA et en sa ré-expression sous une forme modifiée à la surface de la cellule. Ceci est nécessaire pour que la cellule T puisse reconnaître l'Ag en association avec une molécule du CMH (Ia). (Mills 1986)



Model for the suggested handling of a large protein antigen by an antigen-presenting macrophage. The protein antigen adsorbs to the plasma membrane of the cell and is ingested by pinocytosis. The endocytic vacuole travels to a lysosome and delivers the antigen to the digestive vacuole. Lysosomal proteases hydrolyse the antigen to fragments, which display determinants, i.e. agretopes, which are not present on the intact antigen. A fragment associates with an Ia molecule derived from the plasma membrane and brought to the digestive vacuole with the endocytic vacuole. That fragment is protected against further degradation, and the complex of Ia molecule and antigen fragment is transported back to the plasma membrane where the fragment can be recognized by a T cell.

fig. 6. O. Werdelin (1986).



A representation of the recognition of the antigen-Ia complex by a T-cell antigen-specific receptor. The antigen possesses two features composed of interspersed amino acids, an epitope (\blacktriangle , \bullet) which makes contact with the T-cell receptor and an agretope (\blacksquare) which makes contact with the Ia molecule. It is probable that the T cell receptor recognizes the epitope and portions of the Ia molecule.

fig. 7. P. Allen (1987).

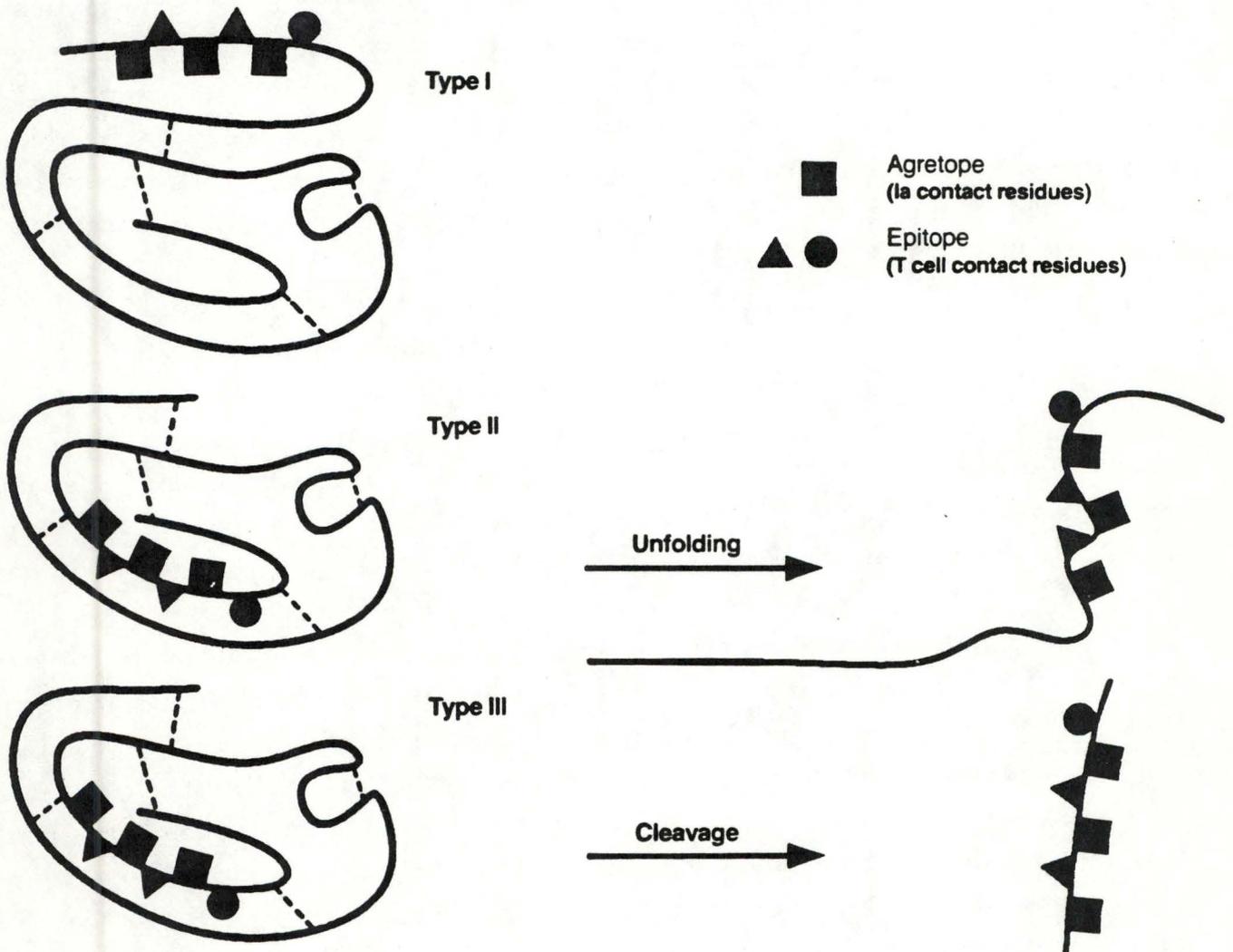
I N T R O D U C T I O N

Que l'Ag soit soluble ou non, l'internalisation se fait par un procédé analogue à l'endocytose suivie par des stades cataboliques actifs entraînant sa dénaturation aussi bien que son clivage protéolytique (Allen 1987). Il est probable que la transformation de l'Ag se déroule dans un compartiment acide intracellulaire de type Prélysosome (Cresswell 1987) (fig. 6). L'action protéolytique a été prouvée par l'utilisation d'agents lysosomotropes, (Chloroquine, par exemple) qui inhibent la dégradation des protéines par les hydrolases acides lysosomiales. La Chloroquine bloque la présentation de l'Ag par le macrophage quand elle est présente pendant le "Processing" (Grey et Chesnut 1985).

La transformation intracellulaire de l'antigène aboutit à l'externalisation de peptides immunogéniques ayant adopté, dans la plupart des cas, une conformation en hélice α (N_1). Les quelques résidus d'acides aminés qui composent cette hélice établissent d'un côté le contact avec le récepteur de la cellule T (épitope) et de l'autre le lien avec une molécule Ia (agrétope). (fig. 7)

Selon Allen (Immunity Today 1987), il y aurait au moins trois types de processing : dans le **type I**, les déterminants antigéniques sont localisés sur une portion de chaîne peptidique de telle façon qu'ils ne **nécessitent pas de transformation**. Ceci a été montré lors de l'examen du processing et de la présentation d'une protéine humaine imposante : le fibrinogène (340 000 KDa). Le déterminant de cette protéine reconnu par les cellules T "Fibrinogène - spécifique" a été localisé au niveau de la portion carboxy-terminale de la chaîne . Le

N_1 : Il n'existe qu'un site présomptif de fixation de l'antigène; une poche de 25 Å de long, 10 Å de large et 11 Å de profondeur; ces dimensions correspondent à celles d'un peptide de 10-20 acides aminés selon son état de compaction; si les peptides antigéniques sont en hélice α et pas trop longs, on peut concevoir que cette poche soit assez large, pour recevoir des peptides variés dans des positions chevauchantes légèrement différentes d'un peptide à l'autre. "Le lit est à une seule place, mais l'on peut s'y coucher de différentes manières". (Axel Kahn 1988)



T-cell determinants classified by their processing requirements.

Type I determinants are found in proteins in areas which have the conformational freedom to allow the agretope and epitope to form directly. Type II determinants simply require unfolding of the polypeptide chain to segregate the residues which form the agretope and epitope. In type II determinants, the agretope is formed but not all the epitopes are formed due to steric constraints. In the example shown, an epitope composed of two ▲ is formed by unfolding protein. If an epitope consists of a ▲ and a ●, then it is a type III determinant in that there has to be a proteolytic cleavage to allow the epitope to form. This type of pattern has been observed in the HEL system^{11,34}. The dotted lines represent disulfide bonds.

fig. 8. P. Allen (1987).

I N T R O D U C T I O N

traitement des CPA à la chloroquine n'affecte pas la présentation du fibrinogène.

Le processing de **type II** suppose simplement un **déploiement de la chaîne polypeptidique** de manière à exposer épitope et agrétope (ex. : Myoglobine).

Le **type III** quant à lui, se traduit par un **clivage protéolytique** de la structure antigénique (ex. : ovalbumine). (fig. 8)

4.2. Des récepteurs pour l'antigène

4.2.1. Reconnaissance de l'antigène par les cellules T

Les lymphocytes T réagissent spécifiquement avec l'antigène, si ce dernier se présente autrement que sous sa forme native soluble. Les cellules T ne reconnaissent l'antigène que lorsqu'il est associé aux produits de CMH. Ainsi, seul un complexe "Ia pèptide" peut être reconnu par les lymphocytes T he'per (Allen I.T. 1987). Les Th se lient donc à l'Ag en présence d'une molécule de classe II. Les lymphocytes T cytotoxiques quant à eux reconnaissent l'antigène associé à une molécule de classe I. Mais dans un cas comme dans l'autre, le déterminant antigénique reconnu par les lymphocytes T est toujours un déterminant séquentiel. Cette séquence est exogène pour les Th alors que d'ordinaire elle provient de la dégradation d'une protéine endogène pour les cellules Tc bien que la reconnaissance puisse également se faire sur les produits de dégradation d'Ag exogènes endocytés.

La nécessité d'une reconnaissance simultanée du complexe "Ag-molécule du soi" a conduit à la proposition de deux hypothèses majeures concernant la structure du récepteur des cellules T.

Hypothèse du récepteur double :

Ce premier modèle suggère que chaque lymphocyte T porte deux récepteurs différents à sa surface : l'un pour l'Ag et l'autre pour la protéine du CMH.

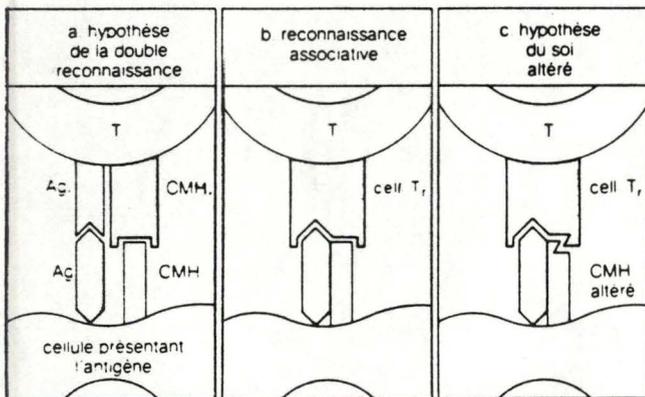
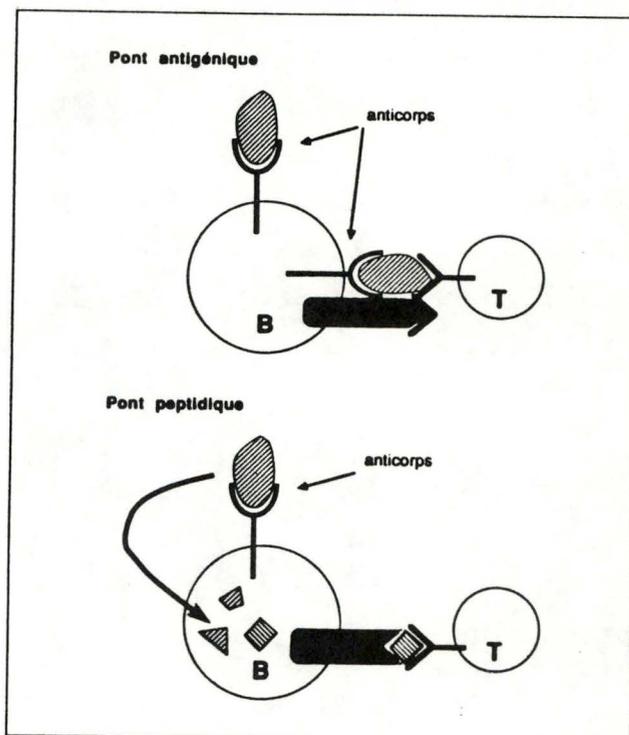


fig. 9. Roitt (1985).

Reconnaissance de l'antigène par les cellules T

fig. 10. Kourilsky et Claverie (1988).



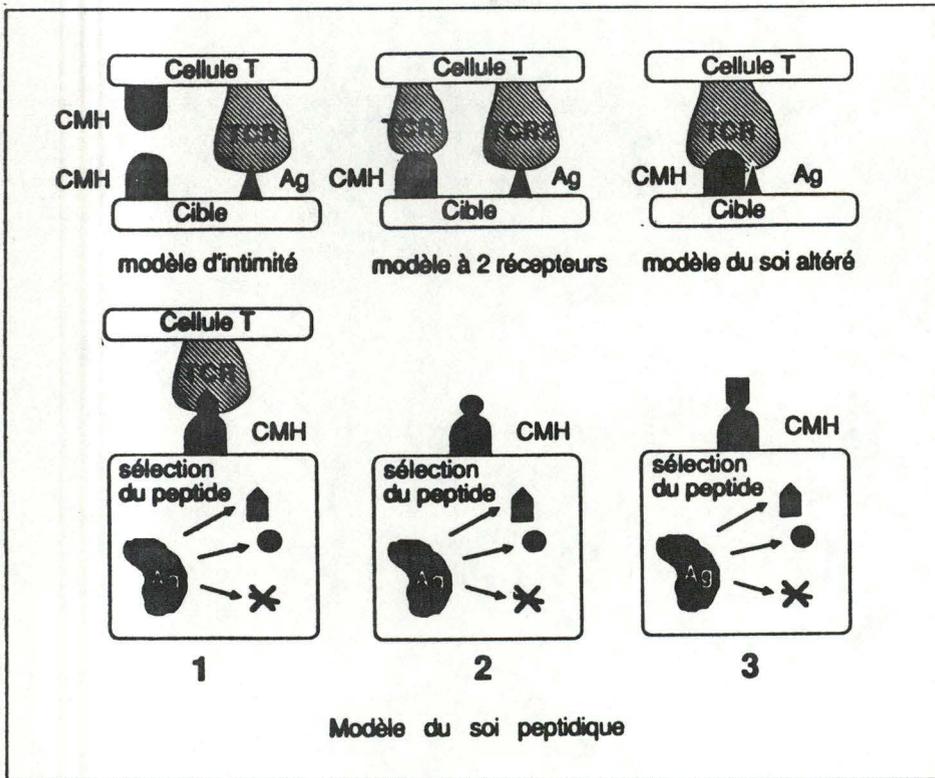


fig. 11.

Phénomène de la restriction CMH : la version extrême du modèle du soi peptidique par rapport aux modèles plus anciens.

Kourilsky et Claverie (1988).

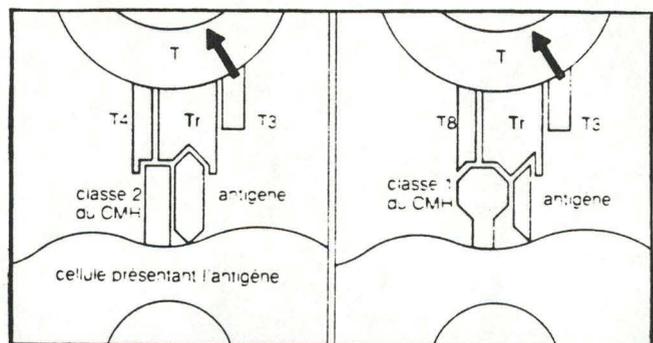


fig. 12. Roitt (1985).

Hypothèse pour expliquer la reconnaissance de l'antigène par les cellules T. Les cellules restreintes aux produits de classe 2 du CMH (par ex. Th) possèdent des molécules T4 reconnaissant les antigènes de classe 2 du CMH. Le récepteur des cellules T, Tr, reconnaît les protéines du CMH et l'antigène. Le signal d'activation est transmis aux cellules par le peptide T3 qui est associé aux récepteurs des cellules T. Les cellules restreintes aux produits de classe 1 du CMH ont des molécules T8 reconnaissant les antigènes de classe 1 du CMH. Le récepteur Tr reconnaît les produits du CMH et l'antigène. Les molécules de chacune des 2 classes du CMH ont 4 domaines globulaires ; les molécules T4 et T8 reconnaîtraient des domaines différents de ceux reconnus par le récepteur des cellules T (Tr).

I N T R O D U C T I O N

Hypothèse de la reconnaissance associative :

Elle propose que l'antigène soit reconnu avec les produits du CMH par un seul récepteur d'une cellule T. Une variante connue sous le nom d'hypothèse du "SOI ALTERE" suppose que le CMH sur la cellule qui présente l'antigène est modifié par la présence de ce dernier. Le récepteur reconnaîtrait à la fois l'Ag et le soi altéré (fig. 9).

Nous ne savons pas encore quelle théorie est exacte, mais les résultats d'expériences sont plutôt en faveur de la théorie du soi modifié, avec son modèle de récepteur unique (Manack et Kappler 1986).

Alors que les deux modèles précités expliquent la collaboration T.B. en termes de pont antigénique, un troisième modèle, celui du **soi peptidique** vient d'être proposé pour le cas particulier de la cellule B CPA. (P. Kourilsky et J.M. Claverie 1988). Selon ce dernier, l'antigène reconnu par le récepteur des lymphocytes T serait l'équivalent d'un sous produit (peptide) de l'Ag capté par l'anticorps internalisé et dégradé. Le peptide serait sélectionné par l'Ag CMH et présenté à la surface mettant alors en oeuvre un pont peptidique (fig. 10 et 11).

Qu'ils soient suppresseurs, cytotoxiques ou amplificateurs, les lymphocytes T utilisent une même structure pour reconnaître l'Ag spécifique. Cette structure consiste en un "hétérodimère" constitué d'une chaîne alpha (\pm 50 000 Da) et d'une chaîne bêta (\pm 40 000 Da) liées par des ponts disulfures. Cet hétérodimère, sur la membrane des cellules T humaines, est associé de façon non covalente à la molécule T_3 (Bensussan 1986) dont le rôle serait de transmettre un signal d'activation aux cellules T (Roitt 1985). (fig. 12). Des Ac dirigés contre T_3 inhibent la réponse de prolifération des lymphocytes T à un antigène soluble (REINMERZ et al 1982).

D'autres molécules associées au récepteur ont été décrites (Fischer et al 1987). Elles complètent l'adhésion spécifique qui a

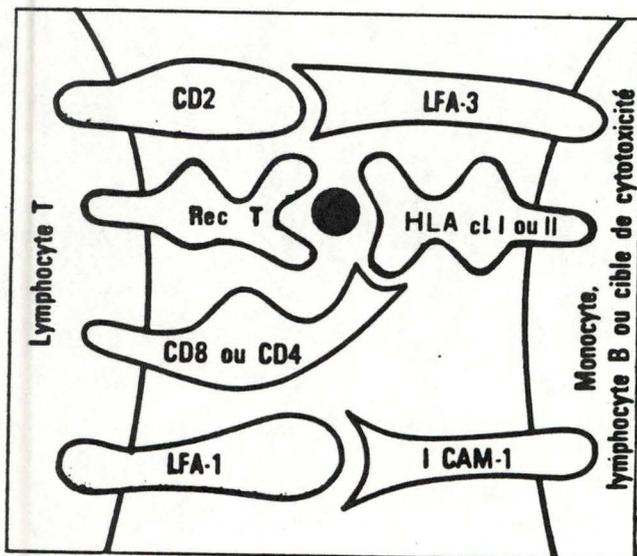


fig. 13. Schéma des protéines d'adhésion. Le point noir représente l'antigène.

Fischer et al. (1987).

Tableau I LES MOLÉCULES D'ADHÉSION DES LYMPHOCYTES T				
Dénomination	Structure Poids moléculaire	Expression cellulaire	Fonction	Ligand
LFA-1 (CD11a)*	dimérique 177,93 kD	leucocytes	adhésion	ICAM 1 + ?
CD2 (T11) (récepteur pour les globules rouges de mouton)	50 kD	T (NK)**	adhésion, activation T	LFA-3
CD4 (T4)	60 kD	T (monocyte, cellule folliculaire dendritique, système nerveux)	adhésion, régulation négative ?	molécules HLA de classe II
CD8 (T8)	30 kD dimérique	T (\pm NK)**	adhésion, régulation négative ?	molécules HLA de classe I

* CD : cluster de différenciation. Chaque molécule membranaire des leucocytes est définie par un CD et identifiée par un numéro (LFA-1 : CD11a, T11 : CD2, T4 : CD4, T8 : CD8...).

** NK = Natural Killer.

Tableau 3. Fischer et al. (1987).

I N T R O D U C T I O N

lieu entre le récepteur T et l'Ag. Quatre récepteurs principaux impliqués dans l'adhésion des lymphocytes T ont été reconnus (fig. 13). Il s'agit des molécules LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1) ou CD11a, T₁₁ ou CD₂, T₄ ou CD₄ et T₈ ou CD₈. Les ligands de ces molécules exprimés par les cellules cibles ont été identifiés ou sont suspectés : I CAM 1 (intercellular adhesion molecule 1) pour LFA-1, LFA-3 (lymphocyte function associated antigen 3) pour CD₂, molécules de classe II du CMH pour CD₄, molécules de classe I du CMH pour CD₈ (tableau 3) (Fisher et al 1987). Ces récepteurs d'adhésion augmenteraient l'affinité du lymphocyte T pour sa cible et stabiliseraient l'interaction le temps nécessaire à la fonction effective. Il a été proposé que ces molécules sont d'autant plus utiles que l'affinité du récepteur pour l'Ag est faible ou que la concentration d'antigène est suboptimale.

4.2.2. Reconnaissance par les cellules B

Les lymphocytes B contiennent dans leur membrane un récepteur protéique capable de fixer un antigène libre natif. Le déterminant antigénique reconnu est le plus souvent, conformationnel. Le récepteur est de type immunoglobulinique, tout comme les anticorps qui seront produits par la cellule et qui possèdent les mêmes propriétés de fixation sur l'antigène. La seule caractéristique qui distingue les récepteurs à la surface des cellules B des récepteurs solubles (Ac) réside en l'absence d'une chaîne d'acides aminés à l'extrémité des Ac, ceux-ci n'étant pas ancrés dans la membrane plasmique des cellules B.

En plus du rôle de reconnaissance, nous verrons que les lymphocytes B possèdent également la capacité de présentation de l'antigène.

4.3. Les coopérations cellulaires

Il est bien établi que des interactions cellulaires sont nécessaires entre les lymphocytes T et B pour l'élaboration de la réponse immunitaire traduite par la sécrétion d'anticorps spécifiques d'un

I N T R O D U C T I O N

antigène. Des hypothèses variées ont été proposées pour expliquer le mécanisme d'interaction entre les cellules T et B.

On connaît aujourd'hui le rôle immunorégulateur central du lymphocyte T helper. Ses différentes fonctions correspondraient à plusieurs sous-populations de cellules T_4^+ (Dalglish 1986).

Trois types principaux de réponses peuvent être représentés (fig. 14), celui des lymphocytes T cytotoxiques (T_8^+), celui des T amplificateurs (T_4^+) et celui des lymphocytes B.

Un antigène envahissant l'organisme est absorbé par un macrophage (1a, 1b), digéré ou dégradé en petites fractions protéiques (2a, 2b), puis présenté à la surface du macrophage sous forme partiellement digérée (3a, 3b). Là, l'antigène est lié à une protéine codée par le CMH. Un lymphocyte T, dont le récepteur est spécifique du complexe Ag - protéine CMH, se fixe sur ce dernier (4a, 4b); la cellule T ainsi "activée" se multiplie et forme un clone. De la même façon, un Ag libre active un lymphocyte B en se fixant sur un récepteur spécifique (4c). Les lymphocytes T qui forment les cellules cytotoxiques se lient aux antigènes associés aux protéines du CMH de classe I (5a), alors que les T amplificateurs se fixent sur les Ag associés aux protéines de classe II (5b).

La fixation des lymphocytes T déclenche la libération par les macrophages de molécules semblables à des hormones, l'interleukine-1 (IL-1), qui stimulent à leur tour la multiplication et la différenciation de cellules T (6a, 6b).

L'action de l'IL1 sur les T amplificateurs entraîne de la part de ces derniers la sécrétion de plusieurs lymphokines : l'interleukine-2 (IL2) notamment va permettre la différenciation des lymphocytes pré-cytotoxiques en lymphocytes cytotoxiques. Ainsi l'IL2 déclenche la prolifération des lymphocytes T tueurs mais elle provoque également l'émission en cascade de plusieurs interleukines agissant sur les lymphocytes B. Enfin, l'IL2 stimule la production par les

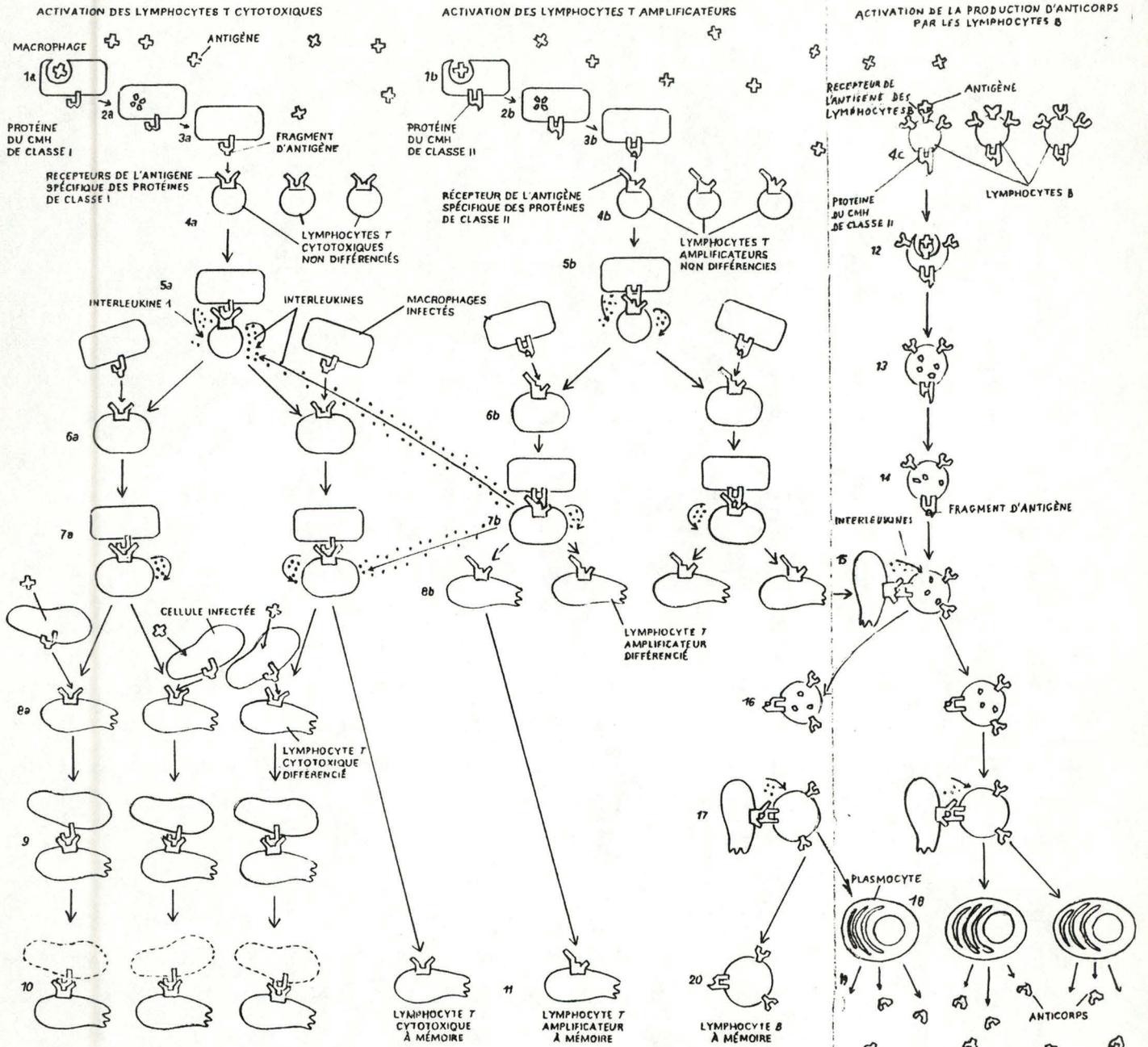


fig. 14.

I N T R O D U C T I O N

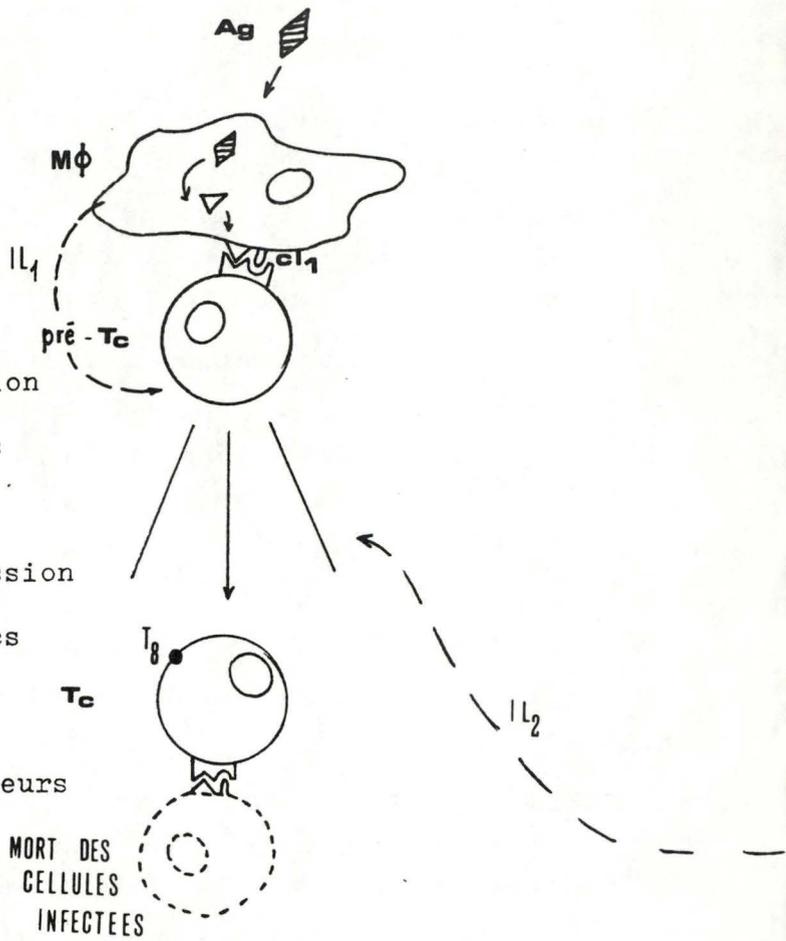
lymphocytes T d'interféron gamma (IFN γ), qui contribue à la lutte antivirale. Ces modes d'action variés de l'IL2 soulignent le rôle prépondérant qu'elle tient dans le déroulement de la phase effective de la réponse immunitaire.

La prolifération cellulaire continue tant qu'elle est stimulée par des cellules présentant des antigènes de surface (7a, 7b). Un lymphocyte T différencié (8a, 8b) peut ensuite remplir son rôle. Si ce lymphocyte est cytotoxique, il peut, soit se lier à une cellule infectée portant un Ag (9) et tuer la cellule (10), soit rester en circulation dans le sang et la lymphe comme cellule mémoire pouvant réagir rapidement à la présence d'un éventuel Ag de la même espèce (11). Les cellules T amplificatrices différenciées peuvent également devenir cellules mémoires. Une autre fonction de ces cellules est de stimuler la multiplication des lymphocytes B activés. Une cellule B ayant absorbé (12) et dégradé (13) l'Ag sur lequel elle s'est fixée porte sur sa surface un morceau de l'antigène lié à une protéine de classe II (14).

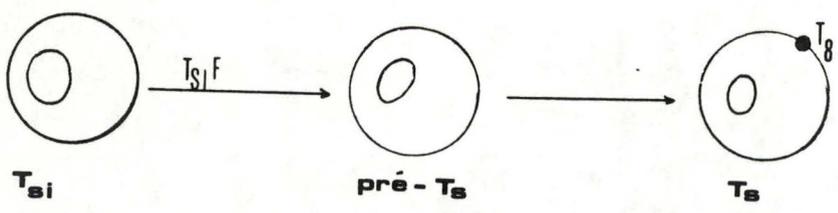
Le lymphocyte T amplificateur peut ensuite se fixer au complexe Ag-protéine du lymphocyte B (15). Cette fixation provoque la libération des interleukines déjà évoquées qui permettent la multiplication et la différenciation des lymphocytes B (16). On nomme ces interleukines BCGF et BCDF pour "B cell Growth Factor" et "B cell differentiation Factor". Cette prolifération cellulaire se poursuit tant qu'elle est stimulée par les lymphocytes T amplificateurs (17). Les plasmocytes différenciés (18) libèrent ensuite leurs Ac qui se lient aux Ag libres et les marquent, ce qui permet leur destruction ultérieure (19). D'autres lymphocytes B différenciés du clone restent en circulation comme cellules mémoires (20). (Marrack et Kappler 1986).

Ajoutons à ce schéma, déjà simplifié (!), qu'il existe également des cellules T suppressives qui arrêtent la réponse immunitaire une fois que l'Ag étranger est éliminé ainsi que d'autres mécanismes régulateurs de l'amplitude de cette réponse.

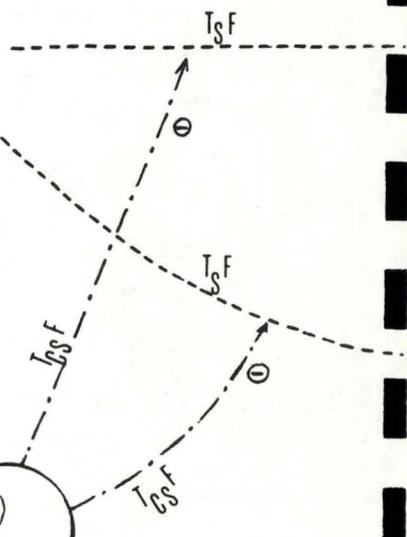
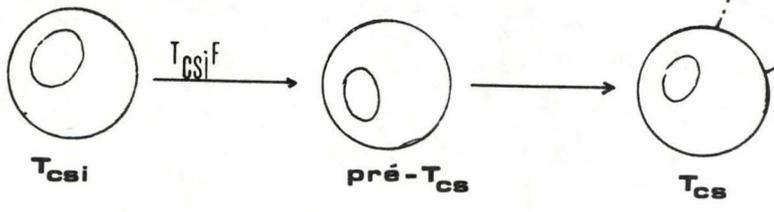
- T_c cellule T cytotoxique
- T_h cellule T helper
- T_{si} cellule inductrice de suppression
- T_{si}^F facteur inducteur de cellule T_s
- T_s cellule T suppressive
- T_s^F facteur de suppression
- T_{csi} cell. induct. de contre-suppression
- T_{csi}^F facteur inducteur de cellule T_{cs}
- T_{cs} cellule contre-suppressive
- T_{cs}^F facteur de contre-suppression
- MAF } facteurs activateurs et inhibiteurs
- MIF } des macrophages



SUPPRESSION



CONTRE - SUPPRESSION



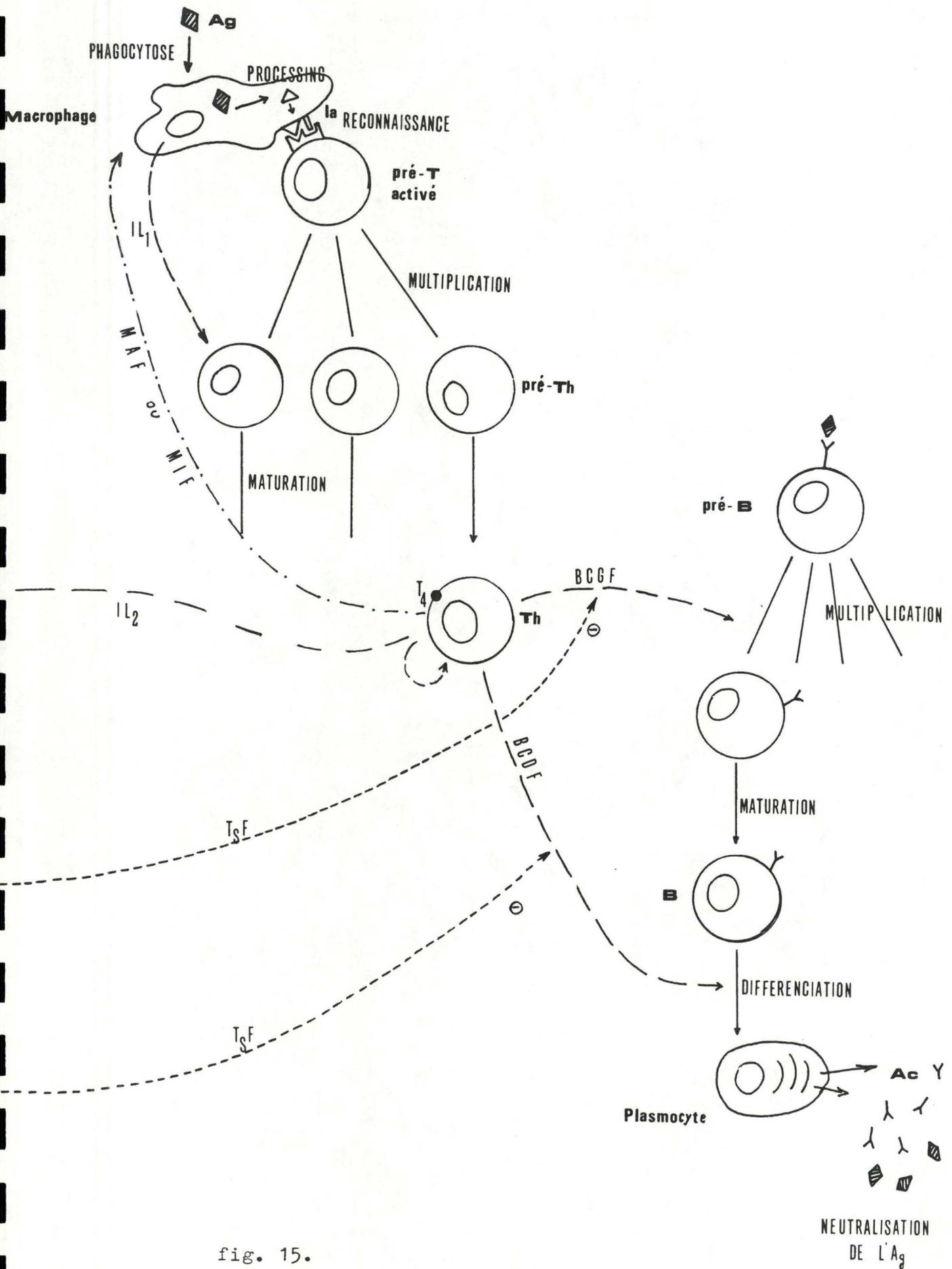


fig. 15.

I N T R O D U C T I O N

La description qui précède rend bien compte de la complexité de la réponse du système immunitaire à un antigène spécifique. La figure 14 met aussi en évidence le rôle central des lymphocytes T amplificateurs; rôle que l'on pourrait résumer comme suit :

- prolifération en réponse à un Ag;
- induction de la sécrétion d'Ig par les cellules B;
- transformation des cellules pré-cytotoxiques en cellules cytotoxiques;
- contrôle de la suppression;
- libérateur de lymphokines

(Dalglish 1986)

4.3.1. Les médiateurs de l'immunité

Le paragraphe qui précède mentionne l'intervention de substances particulières qui circulent à distance et complètent les intersections de contact lors des coopérations cellulaires "macrophages - cellules T", "T-T" et "T-B". Ces messagers de l'immunité, connus sous le nom de lymphokines, constituent un vaste groupe de facteurs solubles dont les poids moléculaires s'étalent de 20 000 à 200 000 Daltons. Nous avons cités l'interleukine-2, le BCDF et le BCGF libérés par les cellules T helper. Il en existe d'autres, qui, par exemple, modulent la fonction des cellules phagocytaires - tels sont les facteurs activateurs et inhibiteurs (M.A.F. et M.I.F.) de la migration des macrophages - ou régulent divers lymphocytes : facteurs suppresseurs (T_S^F) spécifiques de l'antigène.

La figure 15 résume l'action de chacun de ses médiateurs.

4.3.2. Rôle essentiel de l'interleukine-2

L'IL₂ joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la prolifération des cellules T activées. Cette réponse est médiée par l'interaction du facteur avec un récepteur de membrane à haute affinité.

La libération de l'IL₂ par les cellules T_H s'effectue en réponse à deux signaux : la présentation d'un déterminant antigénique associé à une molécule de CMH et la présence de l'IL1. (Certaines lecti-

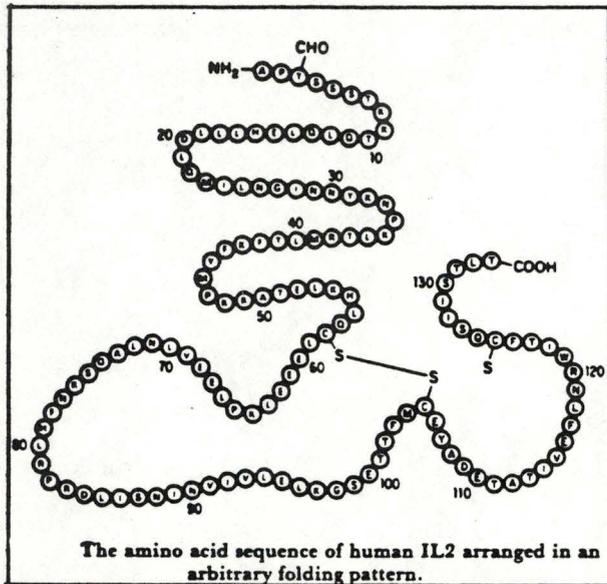


fig. 16. Robb (1984).

I N T R O D U C T I O N

nes peuvent avoir le même effet).

Structure moléculaire de l'IL₂

Il a été démontré que chez l'homme et le singe, l'IL₂ est sécrétée sous la forme d'un polypeptide hydrophobe à simple chaîne et dont le poids moléculaire est estimé à 19.22000 Da ou 15.17000 Da suivant que la molécule est isolée sur gel de chromatographie ou sur SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) (Robb 1984).

L'IL₂ humaine consiste en un polypeptide de 133 acides aminés contenant un simple pont disulfure intramoléculaire (fig. 16) qui joue un rôle important dans le maintien de la conformation active de la molécule.

Mode d'action : les récepteurs à IL₂

Après la stimulation antigénique, les cellules activées "disposent" de 4 à 12 000 sites récepteurs d'IL₂ à leur surface. Il s'agit du passage de la cellule à l'état sensible à l'IL₂ qui fait qu'elle progresse de la phase G₁ à la phase S.

C'est par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs à IL₂ que l'on a pu les dénombrer. On a ainsi constaté que la quantité de ces récepteurs varie grandement dans une population donnée de cellules; à faible concentration d'IL₂, le pourcentage de sites récepteurs occupés sera faible, mais la petite fraction de cellules avec un nombre de récepteurs élevés génèrera assez de messagers internes pour passer le seuil nécessaire pour entraîner la division.

Des études récentes sur cellules humaines ont démontré l'existence de deux chaînes polypeptidiques de 55 KDa (chaîne L) et de 75 KDa (chaîne H). Il s'agit de deux récepteurs qui, indépendamment l'un de l'autre possèdent respectivement une affinité faible et intermédiaire pour l'IL₂. Cependant un complexe formé de l'agencement des

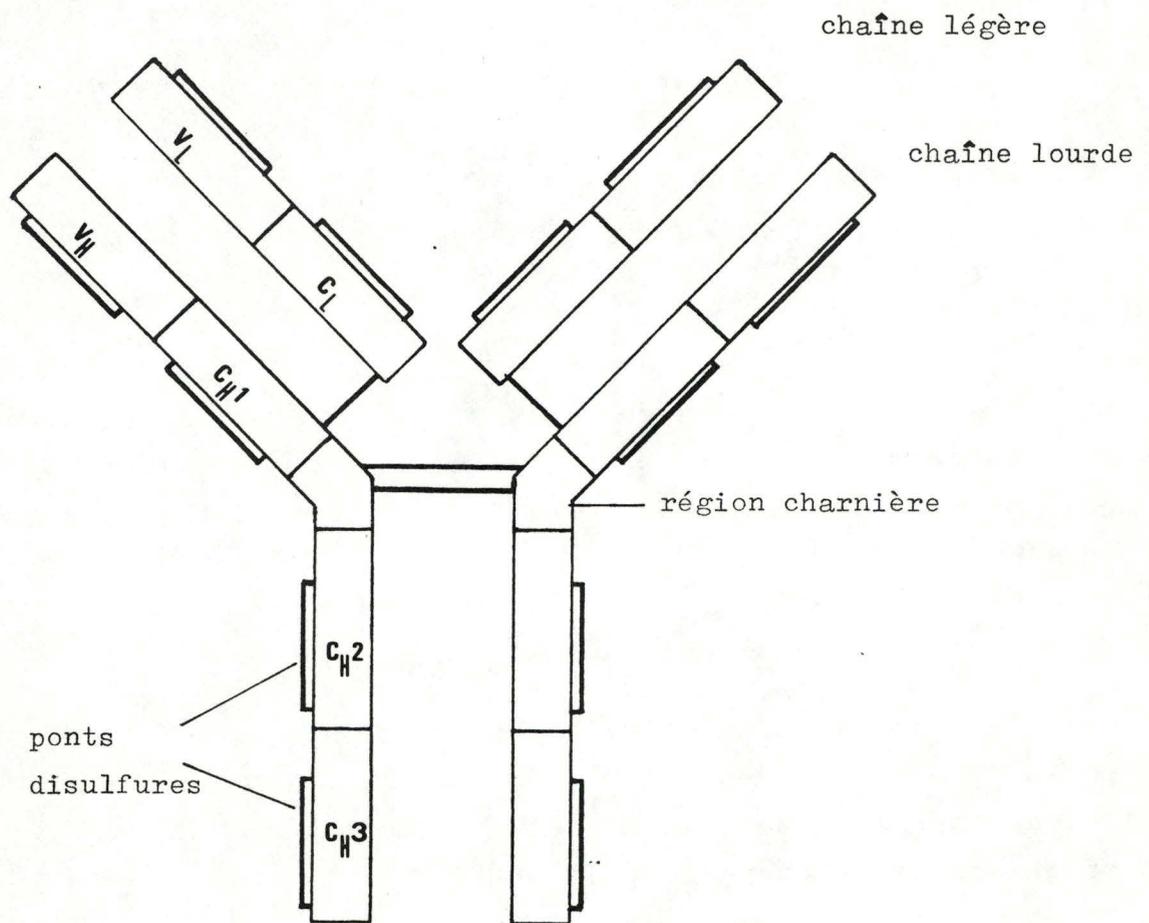


fig. 17 Structure d'une IgG

I N T R O D U C T I O N

chaînes H et L constitue un récepteur de haute affinité envers l'interleukine-2. L'expression du récepteur L est hautement régulée par une stimulation antigénique ou mitogène (Miyuki Nishi et al 1988).

Autres rôles de l'IL₂

En dehors de ses fonctions de croissance pour les lymphocytes T et de générateurs de T cytotoxiques (Miedema et Melief 1985), l'IL₂ peut aussi agir sur les "natural killer" et induire la sécrétion d'interféron γ (MAF) par les cellules T.

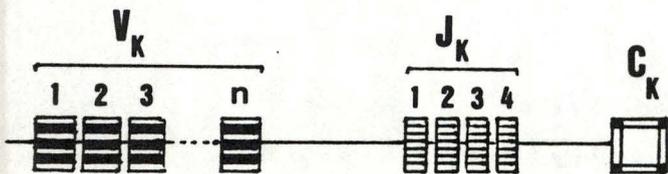
4.4. Production d'anticorps

Nous avons antérieurement fait état des coopérations cellulaires dans le cas d'une réponse à un antigène. Nous avons également évoqué les différents types de réponses possibles. C'est plus précisément la réponse humorale qui va être abordée à présent.

4.4.1. Structure des anticorps

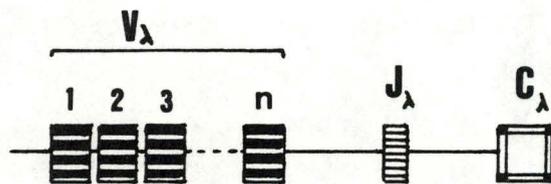
La structure de base des anticorps compte quatre chaînes protéiques : deux chaînes lourdes (H) de 55 000 Da et deux chaînes légères (L) de 25 000 Da. On ne rencontre, chez la plupart des vertébrés, que deux types de chaînes L : Kappa (K) et Lambda (λ). Par contre les chaînes H peuvent être μ , δ , α etc... caractérisant la classe (IgM, IgG, IgA...) et la fonction des anticorps. Pour une même molécule d'anticorps, les deux chaînes H et les deux chaînes L sont de même type. De plus, l'analyse biochimique a montré que chaque chaîne comporte une région variable d'un anticorps à l'autre (V_L et V_H) ainsi qu'une région constante (C_L et C_H) (fig. 17). C'est par la région variable que se fait la reconnaissance, sur une petite région de l'antigène : le déterminant antigénique.

La nature compte une infinité de tels déterminants. La quantité d'anticorps que doit produire un organisme pour répondre à cette diversité est également importante. Cependant, tous ne peuvent être totalement programmés dans l'ADN chromosomique. Il n'existe pas un



ADN de chaîne légère k

fig. 18.



ADN de chaîne légère λ

fig. 19.

I N T R O D U C T I O N

gène qui code pour chaque anticorps. On explique la variété de leur spécificité par un remaniement génique au sein des gènes codant pour les parties variables et constantes des immunoglobulines.

4.4.2. Organisation des gènes d'Ig

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

Il existe trois familles de gènes V et C : une pour les chaînes légères λ , une pour les chaînes légères K et une qui regroupe les gènes des différentes classes de chaînes lourdes ($\mu - \alpha - \epsilon - \gamma - \delta$). Sur le chromosome codant pour la chaîne λ , se trouve un pool de gènes V. Un seul sera transcrit après avoir été transloqué auprès d'une pièce de jonction unique (J), elle-même amenée en amont du seul segment C codant pour la région constante (fig. 18). C'est ce mécanisme de recombinaison d'un segment variable et d'une pièce de jonction qui est à la base de la diversité des anticorps. Les segments codant pour les chaînes légères de type kappa subissent le même sort que ceux des chaînes λ mais les combinaisons possibles sont beaucoup plus nombreuses du fait de la plus grande hétérogénéité des chaînes K. Environ 250 segments V_K sont régulièrement espacés les uns des autres en amont de quatre pièces J différentes. La partie constante est toujours unique (fig. 19).

Ce qui vaut pour les chaînes légères vaut aussi pour les chaînes lourdes; la diversité de la partie variable de celles-ci résulte également de la combinaison de différents segments génétiques, mais dans ce cas, les possibilités de diversification sont beaucoup plus vastes. L'ADN codant pour cette partie variable est formé de

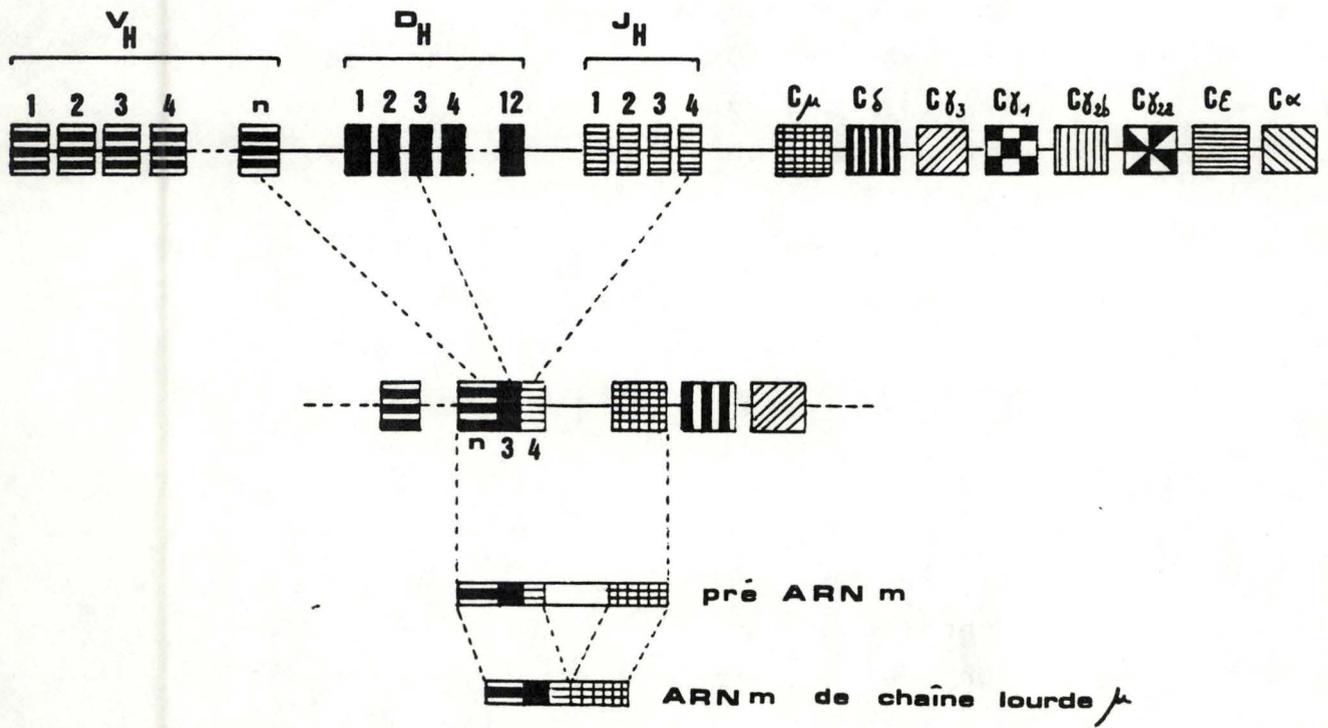


fig. 20

I N T R O D U C T I O N

l'association de trois types de segments génétiques : une centaine de V_H et quatre pièces de jonction J_H en amont de la série de gènes codants pour la région constante. Entre les deux groupes de V_H et J_H , l'ADN compte une douzaine de petits segments, les pièces de diversité ou D_H (fig. 20)

On connaît cinq classes d'anticorps (IgM, IgG, IgD, IgA, IgE) ayant chacune un rôle particulier suivant le type de réponse qui a lieu : les IgM sont les premiers à être produits lors d'une vaccination alors que les autres classes apparaissent plus en cas de rappel. Les IgG sont efficaces dans la lutte contre les cellules et les bactéries. On trouve les IgA au niveau des muqueuses alors que les IgE se fixent sur les mastocytes et interviennent dans les phénomènes d'allergie. Les IgE ont un rôle de défense contre les parasites. Quand aux IgD, rien n'a encore été bien défini pour ce qui concerne leur fonction.

4.4.3. Réponse primaire

On peut caractériser la réponse par la succession de quatre phases (fig. 21) :

- la phase de latence, durant laquelle aucun anticorps n'est détectable.
- la phase de production, où le titre d'anticorps augmente de façon exponentielle.
- la phase stationnaire ou le plateau de la production.
- le déclin métabolique qui correspond à la dégradation naturelle des anticorps ou à leur fixation sur l'antigène, jusqu'à ce qu'ils disparaissent du sang circulant.

Les anticorps de la réponse primaire sont essentiellement des IgM alors que la réponse secondaire est presque entièrement constituée d'IgG .

4.4.4. Réponse secondaire

Les quatre phases décrites pour la réponse primaire existent aussi pour la réponse secondaire mais la cinétique diffère quelque peu; la phase de latence est plus courte, le plateau plus prolongé

taux
d'anticorps

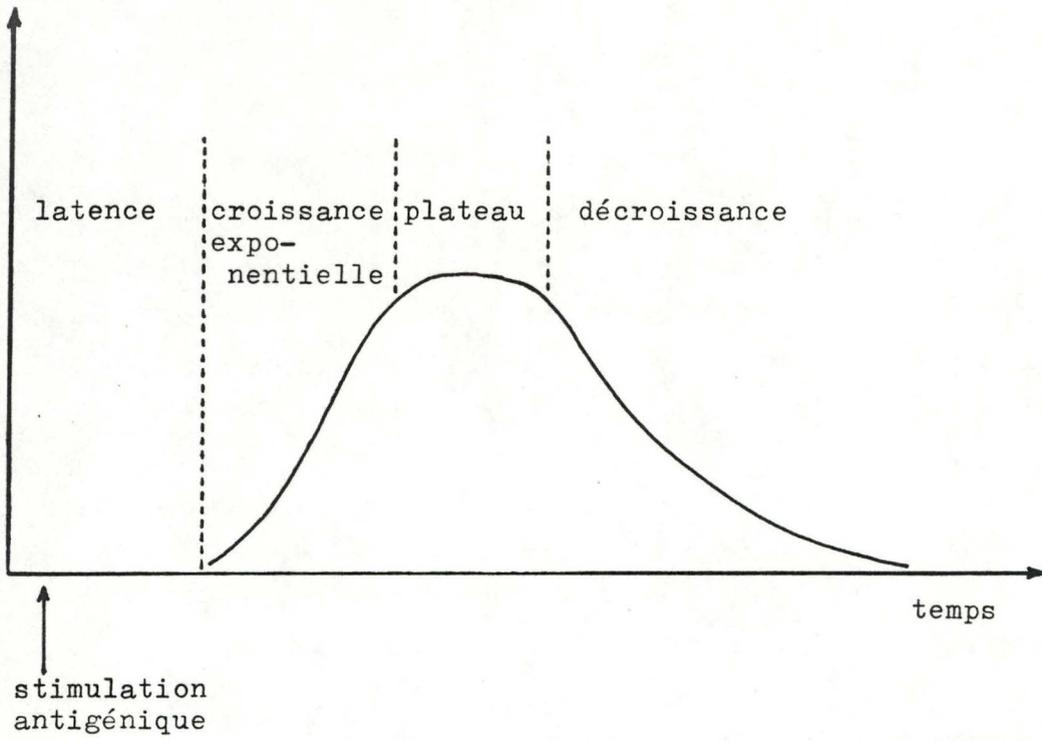


fig. 21

taux
d'anticorps

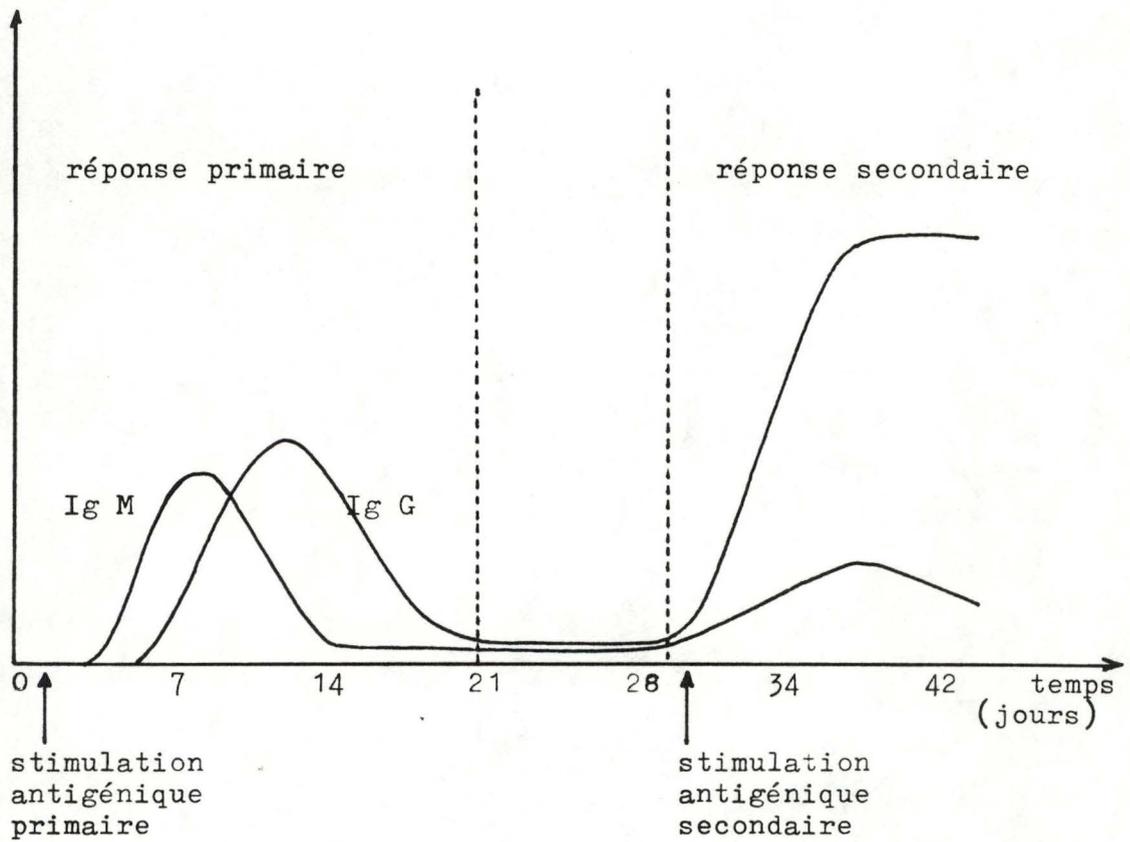


fig. 22

I N T R O D U C T I O N

et la décroissance plus lente. (fig. 22)

Sous d'autres points de vue, les différences existant entre réponse primaire et secondaire concernent :

- le taux d'Ac, dont le maximum peut être 10 fois plus élevé que lors d'une réponse primaire;

- la classe des Ac : le passage des IgM aux IgG (switch) se fait par délétion, sans variation de l'expression du gène V. De ce fait, la spécificité est conservée. Comme la spécialisation d'un clone en producteur d'IgG, IgA ou IgE résulte d'une délétion plus ou moins étendue de DNA, il en ressort l'impossibilité de retrouver la spécialisation IgM initiale;

- l'affinité des anticorps est généralement plus élevée dans une réponse secondaire.

Notons pour terminer qu'un second stimulus antigénique induit normalement une réponse plus importante et plus efficace que le premier et que cette réponse secondaire est due à la mémoire immunologique.

I N T R O D U C T I O N

5. But du travail

Les tests qui ont été réalisés dans le cadre de ce mémoire ont à leur base des cultures de cellules in vitro. C'est l'optimisation des paramètres intervenant dans ces cultures qui a été entreprise dans ce travail afin de mettre en évidence la production d'anticorps spécifiques suite à une immunisation primaire ou secondaire in vitro.

Le but poursuivi est de mettre au point un modèle d'étude des cellules bovines, principalement suite à l'induction d'une réponse antigène-spécifique, ceci pour éclairer les mécanismes d'immunorégulation impliquant des interactions communicatives entre de multiples sous-populations lymphocytaires ayant des fonctions différentes. Dans ce cas, l'étude fera intervenir l'utilisation d'anticorps monoclonaux, soit pour la déplétion d'un type cellulaire de la population totale, soit comme élément de ciblage visant à rendre immunogènes des substances qui, considérées seules, ne le sont pas.

MATERIEL ET

METHODES

(1) - PBS (Phosphate buffer saline)

en mgr/litre d'eau distillée

KCl (ucb)	200
K H ₂ PO ₄ (Merck)	200
Na Cl (Merck)	8 000
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Merck)	1 440

pH : 7,4

(2) - PBS - EDTA

Na₂ EDTA : sel bisodique de l'acide éthylène diamine tétra
acétique (ucb)

1,5 % en PBS

pH : 7 - 7,2

(3) - FICOLL - UROGRAFINE

FICOLL 400 (Pharmacia)	7,65 gr
Urograffine 76 % (Schering)	18 ml
H ₂ O distillée	100 ml

Ajuster à - pH 7,4

- densité 1,077 (amener à 136 au réfractomètre)

I I . M A T E R I E L E T M E T H O D E S

1. Animaux

Les cellules qui font l'objet de notre étude sont isolées à partir de sang bovin récolté à l'abattoir de Namur, ou sur des animaux de la race bleu-blanc-belge d'une exploitation agricole privée de la région.

2. Prélèvements sanguins

Le sang est prélevé stérilement par ponction au niveau de la veine jugulaire de l'animal vivant ou récolté après section de cette veine à l'abattage. Quelle que soit son origine, le sang est immédiatement mélangé à 10 % de PBS-EDTA (2) (phosphate buffer saline - éthylène diamine tétraacétate). L'EDTA est un agent anticoagulant qui agit en chélateur des ions calcium, éléments essentiels au processus de coagulation.

3. Isolement des cellules

Le sang est réparti dans des tubes de 50 ml stériles (Nunc) que l'on soumet à une centrifugation de 1 500 g pendant 15 minutes. Au terme de cette première étape, le plasma est séparé du culot par une couche de cellules mononucléées : le buffy-coat. Ce dernier est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur et dilué minimum deux fois dans du tampon PBS (1).

Pour la suite des opérations :

- Déposer 20 ml de la suspension cellulaire obtenue sur 15 ml de Ficoll-Urografine (3) et centrifuger dans ce gradient de densité pendant 25 minutes à 1 000 g. Ceci pour séparer les cellules mononucléées des globules rouges prélevés en même temps lors de la récupération du buffy-coat (Spooner et al 1978).
- Récolter les cellules à l'interface avec un minimum de surnageant et diluer en PBS.

(4) - NH₄Cl (ucb)

- . 0,75 gr pour 100 ml d'eau distillée
- . pH 7,4

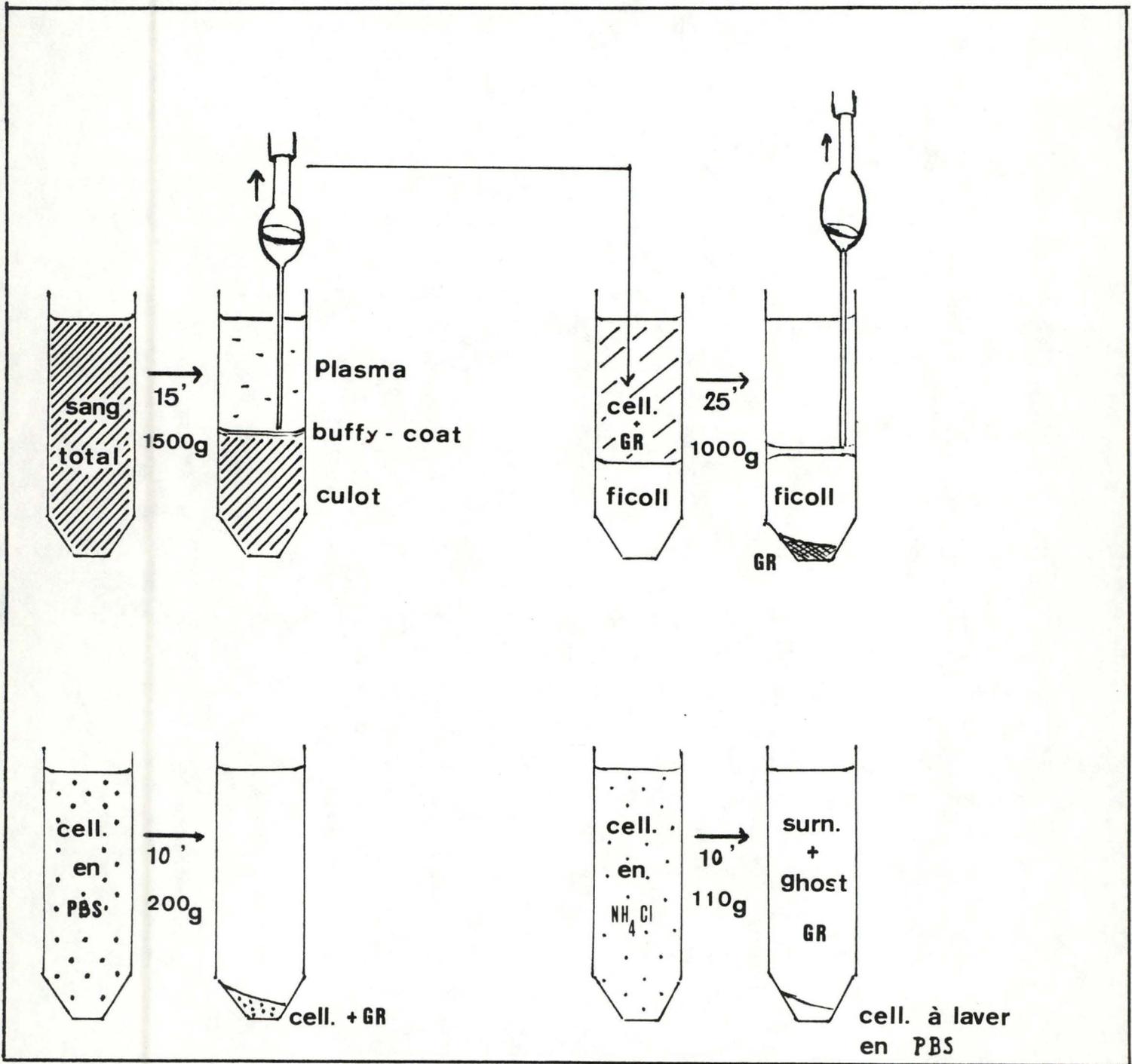


fig. 23.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

- Centrifuger 10 minutes à 200 g. pour sédimenter les cellules.
- Resuspendre le culot dans du NH_4Cl 0.14 M (4). Ce traitement est lytique pour les globules rouges persistant.
- Centrifuger 10 minutes à 200 g.
- Eliminer le surnageant et laver les cellules en PBS par des centrifugations de 10 minutes à 110 g. Cette réduction de vitesse limite la sédimentation des thrombocytes et permet ainsi leur élimination par lavages.

La figure 23 résume les différentes étapes de cette série de centrifugations.

Toutes les manipulations qui viennent d'être décrites se réalisent dans des conditions stériles : PBS, NH_4Cl et Ficoll sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes, sous 2 atmosphères. La verrerie utilisée est rendue stérile par passage dans un four à chaleur sèche.

Le maintien de la stérilité du matériel est assuré en travaillant sous une hotte à flux laminaire.

4. Mise en culture

Les cellules sont comptées sur lame de Thomas (Assistent) et suspendues à la concentration souhaitée dans du RPMI 1640 (GIBCO).

4.1. Composition du milieu de culture (pour 1 litre)

- RPMI - 1640' : milieu en poudre (1 pot) (Gibco)
- HEPES (N-2- hydroxyéthylpiperazine -N-2- éthanesulfonique) (Gibco) : 4,77 gr.
- NaHCO_3 (Merck) : 0,85 gr.
- Pyruvate de Na (Gibco) : 10 ml.
- Foetal calf serum décomplémenté (Gibco) : 10 %
- Glutamine (Gibco) 200 mM : 10 ml.

Le mélange est mis à pH 7,4 et filtré sur filtre 0,22 μ (Millipore). Au moment de son utilisation, le RPMI est supplémenté par du

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

2-Mercaptoéthanol (Gibco) 5.10^{-5} mM (en concentration finale) et par un mélange Pénicilline-Streptomycine (Gibco).

4.2. Distribution des cellules en boîte de culture

Les cellules suspendues dans le milieu de culture sont distribuées dans des microplaques à 96 puits à fonds plats (Nunc) à raison de 100 μ l par puits. Seuls les 60 puits internes sont utilisés pour des raisons d'évaporation au niveau des puits périphériques. Pour pallier cet inconvénient, le pourtour de la boîte est rempli avec un liquide stérile.

Aux cellules est ajouté suivant le cas : soit du milieu RPMI contenant l'antigène dans différentes gammes de concentration, soit du milieu seul. Ces derniers puits servant alors de contrôle. L'utilisation des 60 puits est organisée de telle façon qu'il soit possible de répéter dans plusieurs d'entre eux une même condition de culture (au point de vue choix de la quantité de cellules et de la concentration de l'antigène). Des cultures peuvent également se faire en flacon (Nunc). Nous avons choisi de suspendre les cellules à une concentration de 4.10^6 par ml dans 10 ml de milieu seul ou additionné d'antigène.

Dans un cas comme dans l'autre, les boîtes sont mises à 37°C sous 5 % CO₂.

5. Le modèle utilisé

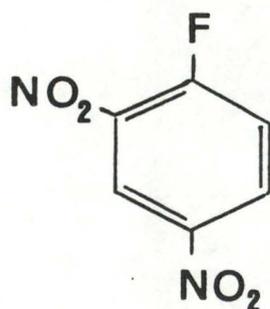
Le mécanisme précis de la coopération cellulaire menant à l'induction d'une réponse antigène-spécifique et à l'expansion clonale des cellules B sécrétrices d'anticorps reste embrouillé, faute d'une modélisation simple et reproductible de la synthèse d'anticorps in vitro. Induire cette synthèse implique une stimulation antigénique. Les substances les plus diverses ont été utilisées dans ce but. Par exemple, un peptide synthétique mis au point pour l'induction d'anticorps anti-HIV (Human immunodeficiency virus) (Chank et al 1986). D'autres expériences ont été réalisées, utilisant comme antigènes, soit la toxine tétanique, le virus influenza et des globules rouges

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

de mouton (Villa et al. 1983) ou encore des billes de polyacrylamide couplées avec du TNP (trinitrophénol) (Villa M.L. et al 1985). D'autres encore ont décrit la réponse primaire in vitro de lymphocytes du sang périphérique humain ou KLH (Keyhole Limpet ~~Hémoc~~cyamine) (Morinroto et al. 1981b)

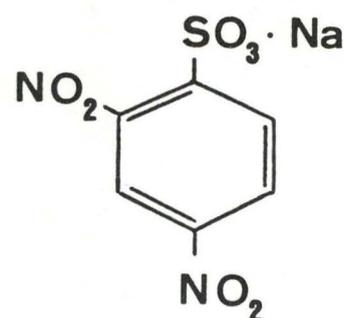
Les investigations suivantes ont porté sur la réponse primaire au DNP-KLH en vue de définir les effets régulateurs (inducteurs et suppresseurs) des sous-populations de cellules sur la réponse anti-DNP (Morinroto et al. 1981a et 1982). Le but poursuivi par ces études est, bien souvent, d'élucider le mécanisme d'activation spécifique des lymphocytes B par un stimulus antigénique.

Afin de faciliter la mise au point de tests vérifiant le caractère spécifique des anticorps produits, il nous fallait stimuler les cellules avec une molécule simple. Nous avons choisi le DNP (dinitrophényl) parce que ce composé ne présente qu'un seul épitope et qu'il est aisément couplé à diverses protéines. Le couplage de cet haptène se fait via une de ces deux formes réactives :



(D N F B)

2.4 Dinitrofluorobenzène
(EGA - CHEMIE)



(D N B S)

2.4 Dinitrobenzènesulfonate
(KODAK)

5.1. Les molécules hapténiques

Un haptène est une petite molécule qui ne possède qu'un seul déterminant antigénique et qui, à elle seule, ne peut stimuler la dif-

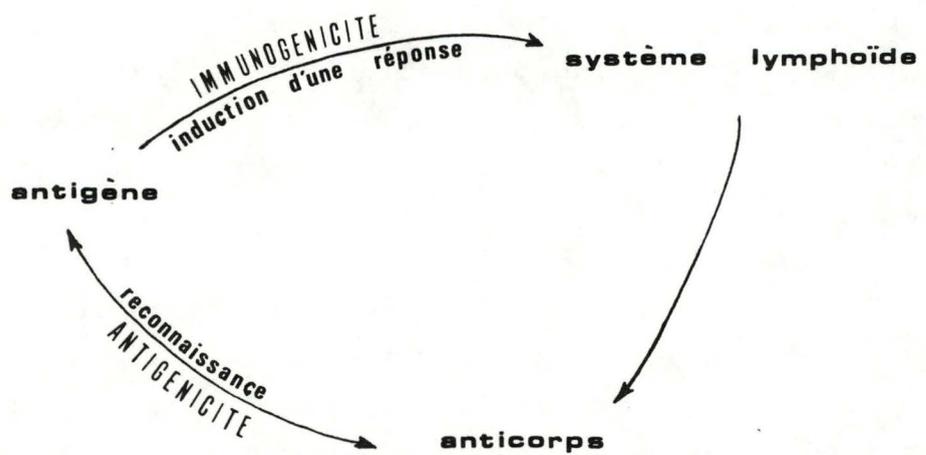


fig. 24.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

férenciation des cellules B en cellules productrices d'anticorps. L'haptène est bien antigénique, mais pas immunogénique du fait qu'il n'enclenche pas de réponse (fig. 24). Dans la majorité des cas, la réponse des cellules B à un antigène nécessite une coopération des cellules T. Cependant, de par sa petite taille, l'haptène ne parvient pas à stimuler les deux cellules de façon simultanée. Si l'haptène est conjugué à une protéine immunogène, alors les cellules T reconnaissent cette molécule porteuse et peuvent ainsi coopérer avec les cellules B pour qu'elles synthétisent les anticorps anti-haptène. (Des Ac anti-porteurs sont également produits; on parle d'"effet carrier".) (Hay and Hudson 1976).

5.2. Méthodes de couplage

Les trois molécules porteuses que nous avons utilisées sont d'une part le KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), pigment respiratoire de la Patelle (*Patella vulgata*), et d'autre part le 7C7. On attend du KLH qu'il joue son rôle de carrier alors que le 7C7, un monoclonal de souris produit au laboratoire d'immunologie (Letesson et al. 1983) et spécifique des molécules de classe II bovine, devrait cibler l'antigène vers les CPA. Enfin, l'ovalbumine a également été couplée au DNP et lui servira de support dans les tests de détection des anticorps produits (cfr § 7.2).

5.2.1. Couplage du DNP au KLH

Le KLH est une grosse molécule de poids moléculaire égal à 3.10^6 Da contre 270 Da pour le DNP. La quantité de DNP qu'il est donc possible d'y fixer est appréciable. Pour réaliser un couplage dans des conditions de "high substitution ratios", on préfère la forme DNFB qui est hautement réactive avec les groupements aminés des protéines en milieu basique.

- 100 mgr KLH (CALBIOCHEM) sont dissous dans 5 ml de NaHCO_3 (Merck) 1M.
- ajouter 50 μl de DNFB (EGA-CHEMIE).
- agiter vigoureusement 45 minutes à 37°C.
- dialyser contre du PBS pour séparer le DNP-KLH conjugué du DNFB libre.

(5) - Columns PD-10
Sephadex G-25 M
(Pharmacia)

(6) - Dialysis membrane
Medecell international LTD

(7) - Sepharose 4B - protéine A (Pharmacia)
(Protéine de Staphylococcus aureus souche COWAN)

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

La dialyse peut se faire sur une colonne Sephadex G-25 (5) ou au travers d'une membrane à dialyse (6) pendant une nuit à 4°C. La détermination du coefficient de couplage se fait par lecture de la densité optique (D.O.) au spectrophotomètre. Le rapport généralement obtenu se situe au delà de 300 molécules de DNP pour une de KLH.

- . DNP : à 360 nm : D.O. = 1 pour 0.067 mmole
 - . KLH : à 278 nm : D.O. = 1 pour 0.00018 mmole
- (lecture au travers d'une cuvette de 1 cm)

(NOTE : la présence de DNP sur la protéine intervient pour 38,5 % de l'absorbance lue à 280 nm) (Hay and Hudson 1976).

5.2.2. Couplage du DNP au 7C7

Le poids moléculaire du 7C7 est de 150 000 Da. Nous ne pouvons pas réaliser le couplage avec le DNFB au risque d'abîmer la protéine et de lui faire perdre sa spécificité. L'emploi du DNBS est la manière douce d'obtenir le conjugué DNP-7C7. Cependant cette méthode donne un coefficient de couplage bien moindre que dans le cas précédent : il est difficile d'obtenir un rapport supérieur à 3 molécules de DNP par molécule de 7C7.

5.2.2.1. Préparation du 7C7

. Purification du monoclonal :

Des cellules productrices du monoclonal sont injectées dans la cavité péritonéale d'une souris où elles trouvent un milieu propice à leur prolifération. L'anticorps est alors produit en grande quantité dans un liquide d'ascite récolté après sacrifice de l'animal.

Pour utiliser le 7C7, il faut l'isoler de tous les éléments contenus dans l'exsudat inflammatoire que constitue l'ascite. Cette purification se fait par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A [la protéine A (7) fixe les Ig par leur fragment Fc] selon le protocole suivant :

- Equilibrer une colonne de protéine A avec 25 ml de tampon
- | | | |
|-------------|-----------------------|--|
| "binding" : | - 1,5 M Glycine (ucb) | } ajusté à pH 8.9 avec
du NaOH 5N (Merck) |
| | - 3 M NaCl (Merck) | |

- (8) - Les purifications de monoclonaux et les dialyses sont suivies sur :
- lecteur à 280 nm
 - collecteur de fractions
 - et enregistreur de la firme LKB.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

- Déposer l'échantillon (ascite diluée dans un même volume de tampon binding).
- Laver la colonne avec du tampon d'équilibration pour enlever les protéines non fixées.
- Eluer (8) avec de l'acide citrique (ucb) 0.1 M ajusté à pH5 avec du NaOH 5N. Le pH dépend de la sous-classe d'Ig à éluer : le 7C7 est une Ig G 2a.
- Régénérer la colonne avec de l'acide citrique 0.1 M pH3 de manière à enlever tout ce qui s'y serait attaché de façon non spécifique.
- Concentrer le 7C7 purifié jusqu'à 2 ml avec un immersible CX (Millipore).
- Dialyser ces 2 ml contre du tampon carbonate 0,5 M pH 8 et concentrer jusqu'à 20 mgr/ml au moyen d'un centricon (Amicon).

5.2.2.2. Principe du couplage

- Ajouter du Na dinitrobenzène sulfonate dans un rapport de 4 mgr/ml au 7C7 concentré à 20 mgr/ml et agiter une nuit à 4°C.
- Dialyser contre PBS sur G-25
- Mesurer le coefficient de couplage :
 - . DNP à 360 nm : D.O. = 1 pour 0;067 mmole
 - . 7C7 à 280 nm : D.O. = 1 pour 0;0049 mmole.

5.2.2.3. Vérification de l'efficacité du 7C7 couplé

Le 7C7 est spécifique des molécules d'histocompatibilité de classe II bovines. Le coupler au DNP pourrait occasionner un changement conformationnel au niveau du paratope et l'empêcher de pouvoir encore correspondre avec l'épitope (ou déterminant antigénique). Il est possible de contrôler s'il s'est produit une modification de la spécificité de l'anticorps par un test d'immunofluorescence indirecte.

- Incuber des cellules pendant une heure avec :
 - . du PBS (témoin négatif)
 - . du 7C7 seul (témoin positif)
 - . du DNP-7C7 (test)

- (9) - SAM-FITC (Sheep anti-mouse - Fluorescein Isothiocyanate)
(Anti-Mouse Ig Fluorescein linked whole antibody)
(Amersham)

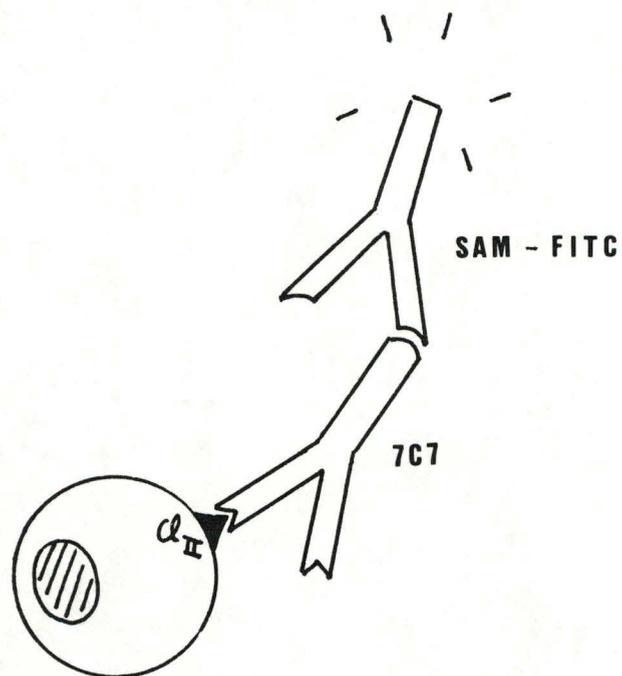


fig. 25. Représentation schématique
du contrôle de reconnaissance
des Ag de Cl II par le 7C7.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

- Laver en PBS et resuspendre le culot 30 minutes avec un deuxième anticorps fluorescent spécifique des Ig murines (SAM - FITC (9) 1/50 en PBS).

- Laver et resuspendre en PBS à pH 8-8.5

- Observer au microscope à fluorescence (fig. 25) (La réactivité du 7C7 à l'égard des cellules cibles sera vérifiée par la fixation du deuxième anticorps fluorescent. Les cellules positives apparaîtront entourées d'un anneau vert brillant).

5.2.3. Couplage du DNP à l'ovalbumine

Le couplage se réalise avec la forme DNBS suivant le protocole exposé pour le DNP-7C7.

5.3. Stérilisation des antigènes

Afin de les rendre stériles, les solutions contenant les antigènes sont réparties en aliquots de 1 ml dans une boîte en plastique à macropuits et sont soumises aux rayons ultraviolets pendant 30 minutes.

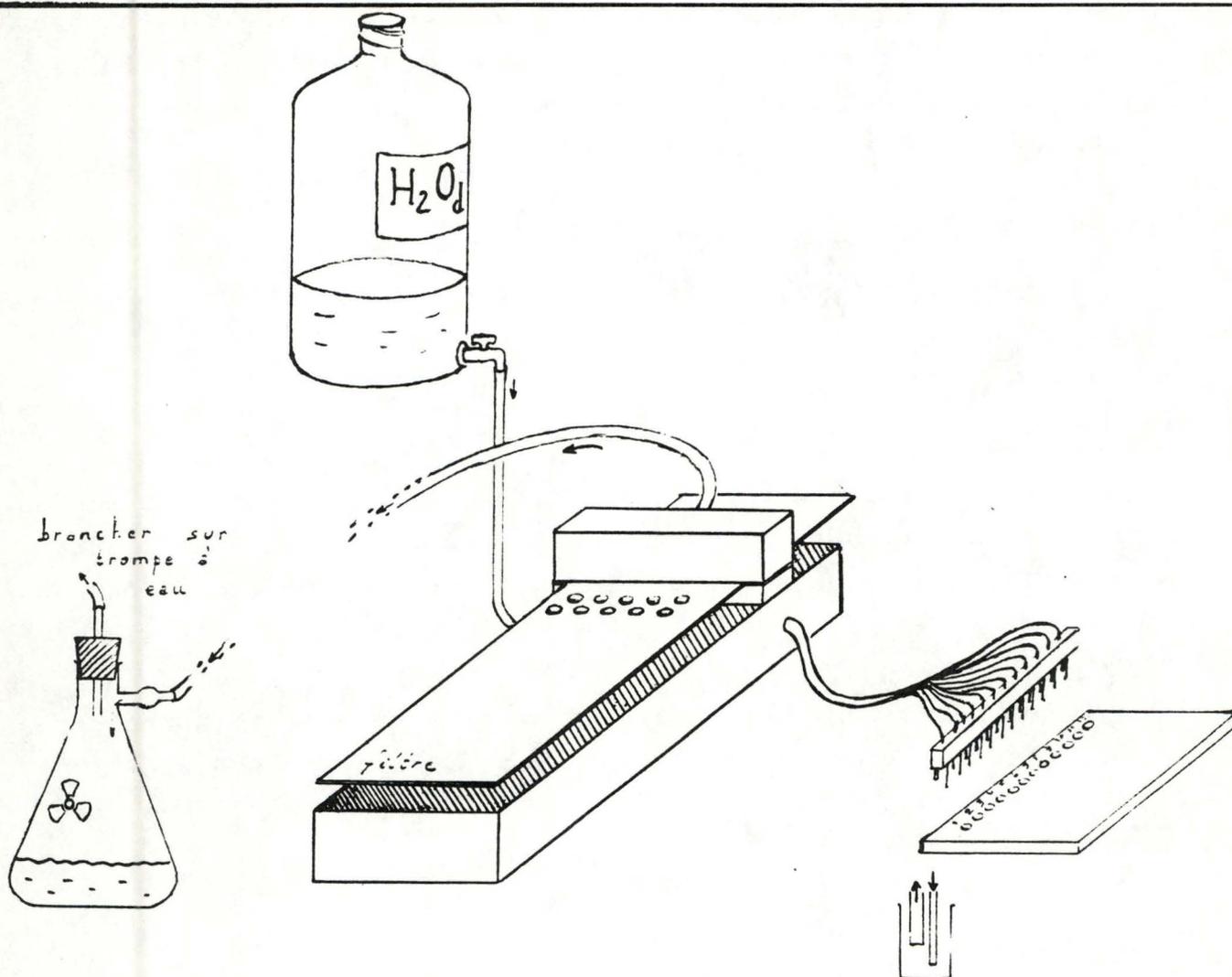
Les protéines antigéniques s'organisent en multimères et leur taille ne nous permet pas de les filtrer sur filtre 0,22 μ (Millipore). C'est pour cette raison que nous nous sommes tournés vers ce moyen de stérilisation.

5.4. Immunisation

Pour réaliser nos expériences d'immunisation secondaire in vitro, nous travaillons avec des cellules bovines provenant d'un animal injecté avec un mélange de DNP-KLH et d'adjuvant incomplet de Freund (GIBCO). L'adjuvant est composé d'huiles minérales et des substances pétrochimiques et forme avec la solution aqueuse d'antigène une émulsion peu résorbable. L'emploi d'adjuvant augmente l'immunogénicité de la substance antigénique et rend la réponse plus intense et plus prolongée.

Dans le cas qui nous occupe, 8 mgr de DNP-KLH ont été injectés en intramusculaire à une génisse bleu-blanc-belge de 6 mois. Une

(10) - (Methyl - 3H) Thymidine
(Amersham)



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

fig. 26. Utilisation du Cell Harvester.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

Une deuxième et une troisième injections ont été effectuées (chacune espacée d'un mois par rapport à la précédente) avec des doses ramenées à 4 mgr et 1 mgr respectivement;

6. Mesure de la prolifération cellulaire

6.1. Incorporation de Thymidine tritiée

Une série de boîtes avec des cellules en culture sont préparées comme indiqué au § 3.2. Le but poursuivi ici est de montrer, au cours des jours, à quel moment les cellules stimulées se trouvent au maximum de leur blastogénèse. Pour ce faire, de la Thymidine tritiée (10) est ajoutée dans chaque puits de culture. Les cellules en mitose incorporent ce précurseur radioactif pour leur synthèse d'ADN. Après récolte, la mesure de la radioactivité sera indicatrice de l'importance du taux de prolifération cellulaire.

6.2. Récolte au "Cell-Harvester" (Titertek Cell Harvester 550)

Le principe de cet appareil est de faire éclater les cellules au moyen d'eau distillée et de récolter leur contenu par aspiration sur un filtre en fibre de verre (Titertek) (fig. 26). La récolte se fait 16 heures après l'incorporation de $T3_H$; la radioactivité précipite sur le filtre qui est mis à sécher puis à compter après addition de 2 ml de scintillant (Instafluor II (PACKARD) par fiole.

6.3. Mesure de la radioactivité β par scintillation liquide

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

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

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

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

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

Pour produire cette lumière, plusieurs interactions sont nécessaires :

- Une partie de l'énergie des électrons est absorbée par les molécules du solvant (toluène ou xylène par exemple), qui sont à leur tour dans un état d'excitation.

- Cette énergie d'excitation est transférée aux autres molécules du solvant pour finalement aboutir aux molécules du scintillant qui émettent des photons en retournant à leur état initial.

Il est possible que la lumière émise à partir du premier scintillant ne soit pas dans la bonne gamme de longueur d'onde pour le photomultiplicateur. Un second scintillant est alors ajouté au mélange pour absorber l'énergie en provenance du premier et la réémettre à une longueur d'onde plus élevée.

Le photomultiplicateur est une cellule photoélectrique qui convertit la mesure du photon en mesure électrique. Ses impulsions sont additionnées puis amplifiées pour être comptées par l'appareil. Il faut noter que de nombreuses pertes peuvent avoir lieu entre le rayonnement β initial et l'impulsion électrique mesurée.

Tous les phénomènes qui tendent à affaiblir l'efficacité d'un comptage portent le nom de "quenching". L'efficacité étant le rapport du nombre de coups par minute indiqués par l'appareil de comptage et le nombre de désintégrations par minute des atomes radioactifs :

$$\frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

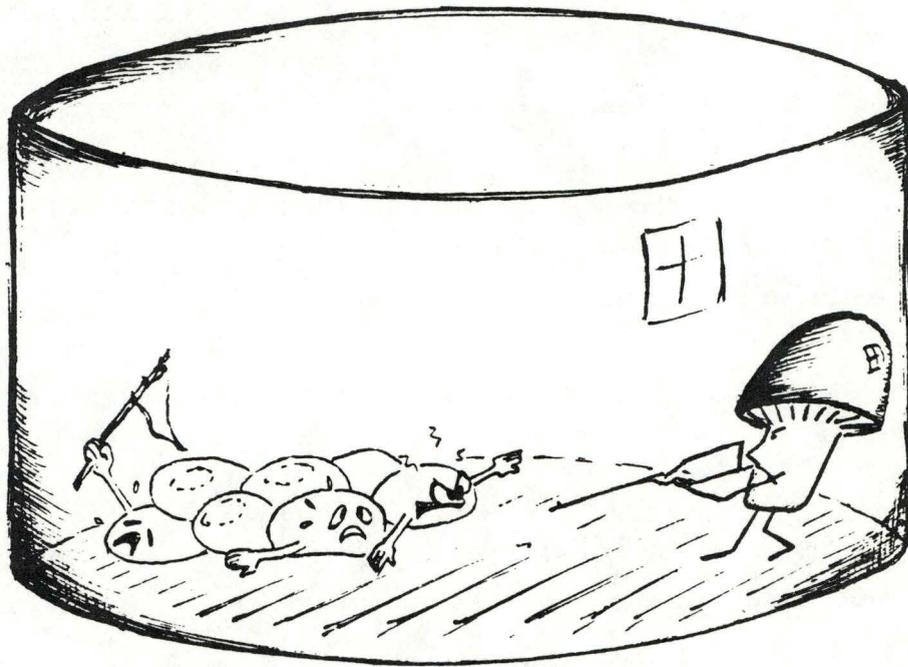


fig. 27 : Les contaminations bactériennes sont évitées dans les premières heures de culture par le mélange Pénicilline-Streptomycine contenu dans le milieu. Cependant nous évitons l'emploi de fongicides afin de minimiser le nombre d'agents qui pourraient influencer le comportement des cellules.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

Les conséquences des différentes formes de "quenching" sont à la fois une réduction du nombre d'impulsions enregistrées à la sortie du photomultiplicateur, et une diminution de l'amplitude de ces impulsions.

7. Mise en évidence de la production d'anticorps

7.1. Temps de culture

Suivant les protocoles expérimentaux de Morimoto et al 1981 et 1982 pour l'immunisation primaire in vitro chez l'homme et de Emery et al 1988 pour l'immunisation secondaire chez le bovin, les cellules sont laissées cinq jours en présence de l'antigène à 37°C et sous 5 % de CO₂. Il faut ensuite laver ces cellules pour éliminer l'antigène. Pour ce faire, 150 µl de surnageant sont enlevés de chaque puits et sont remplacés par le même volume de milieu RPMI minimum (sans Foetal Calf Serum). Les cellules sont resuspendues dans ce nouveau milieu à l'aide d'une pipette "multichannel". Les plaques sont ensuite centrifugées 10 minutes à 200 g. Ce procédé est répété trois fois avant de resuspendre les cellules dans du RPMI-1640 10 % de FCS (Volume total par puits : 200 µl) et de remettre les boîtes à incuber pour quatre jours.

7.2. Le test E.L.I.S.A.

Après le temps imparti, si toutefois les nombreuses manipulations que compte la procédure de lavage n'ont pas entraîné d'infection dans les cultures (fig. 27), les surnageants sont testés pour y mettre en évidence la présence d'anticorps.

La méthode que nous avons retenue est celle du test E.L.I.S.A. ("Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay"). Ce test immunochimique permet la détection d'anticorps fixés sur un antigène par une réaction enzymatique donnant lieu à une coloration mesurable.

Principe du test :

- Déposer dans le fond des boîtes à ELISA (PVC Flow ou Microwell Module Immuno-Quality 160 PCS High binding capacity.(Nunc)). 50 µl de DNP-OVA (en concentration à optimiser par l'expérience).

(11) - Composition du "révélateur" :

- . ABTS (Boehringer) 4,2 mgr
- . tampon citrate (pH 5.6) 5,6 ml
- . H₂O₂ 30 % 10 μ l

- Tampon citrate :

- . Na₂HPO₄ 2H₂O (Merck) 2 050 mgr
- . acide citrique (ucb) 890 mgr
- . eau distillée 100 ml

pH 5.6

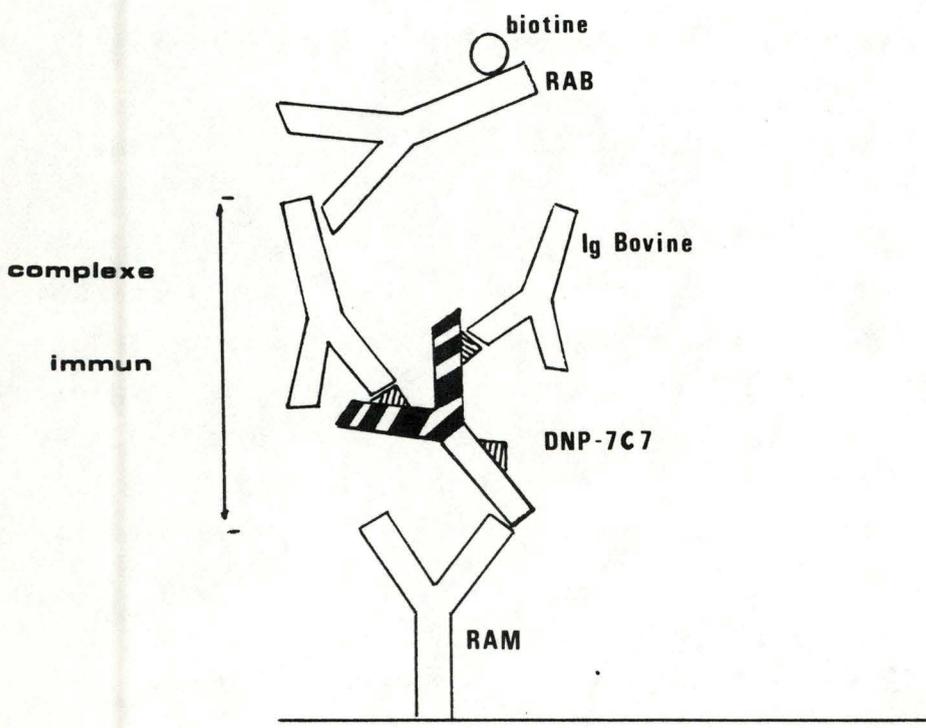
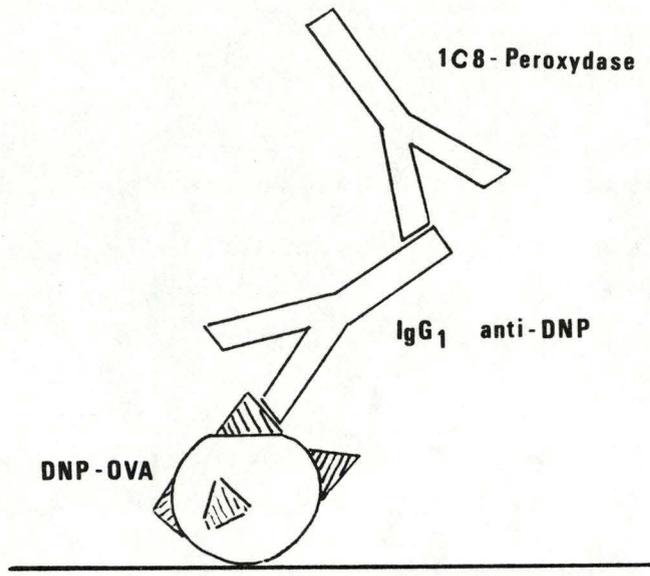
M A T E R I E L E T M E T H O D E S

- Laisser une nuit à 4°C.
- Enlever l'excès et laver plusieurs fois en PBS.
- Remplir les puits avec 200 μ l de PBS 2 % ovalbumine (Sigma) et incuber 2 heures à 37°C pour saturer les sites de fixation du plastique restés libres.
- Laver, puis déposer les surnageants de culture (50 μ l par puits) et laisser 3 heures à 37°C. Les anticorps anti-DNP vont reconnaître le DNP fixé au fond de la boîte lors de la première étape.
- Laver énergiquement plusieurs fois en PBS.
- Incuber une heure avec un deuxième anticorps monoclonal anti Ig bovine couplé à la peroxydase. Dans le cas de nos expériences, il s'agit du 1H₄- peroxydase et du 1C8-peroxydase respectivement anti IgM et anti Ig G₁ (Letesson et al. 1985).
- Révéler (11) la fixation de l'anticorps par une réaction colorée avec un substrat. Ce dernier est l'H₂O₂ et le chromogène utilisé l'ABTS (2,2 - Azino-di-[3-äthyl - benzthiazolinsulfonat (6)]. Boehringer).
- Lire l'absorbance, après 15 minutes, à 405 nm au lecteur ELISA.

Une autre méthode, inspirée de Emery (1988), consiste à démontrer l'existence de complexes immuns dans les surnageants de culture par la technique de l'ELISA en sandwich. Déceler les complexes immuns plutôt que les anticorps nous dispense de laver les cellules et ne nécessite donc pas quatre jours de culture supplémentaires. Le principe de l'ELISA en sandwich est de "trapper" le complexe immun entre deux anticorps.

Les étapes successives du test sont les suivantes :

- Couvrir le fond des boîtes avec du RAM (Rabbit Anti mouse) 50 μ l à 10 μ g/puits et laisser une nuit à 4°C.
- Laver et saturer avec du PBS-OVA comme dans le cas précédent.



ELISA
EN
SANDWICH

fig. 28.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

- Laver, puis incuber avec les surnageants 3 heures à 37°C. Seuls les surnageants de culture au DNP-7C7 peuvent être testés de cette façon : le 7C7 se fixant sur le RAM.

- Laver et ajouter le deuxième anticorps : RAB biotinylé (Rabbit anti bovin couplé à la biotine) qui va reconnaître les immunoglobulines bovines présentes sous forme de complexe avec le DNP-7C7.

- Laisser 1 heure à 37°C.

- Laver et incuber 30 minutes avec de la Streptavidine-Peroxydase (Amersham) 1/750 en PBS. (La Streptavidine se lie à la biotine);

- Révéler la peroxydase avec ABTS 15 minutes.

- Lire à 405 nm.

(Représentation schématique des deux types de test ELISA utilisés à la fig. 28).

7.3. Plages d'hémolyse

Cette technique, beaucoup plus sensible que la précédente, permet d'apprécier la proportion de cellules sécrétrices d'anticorps et de les distinguer des cellules porteuses d'immunoglobulines de surface. (La distinction entre cellules porteuses d'Ig et cellules contenant des Ig peut se faire par marquage fluorescent, mais il n'est alors pas possible de faire la différence, parmi les cellules contenant des Ig, entre celles qui sont sécrétrices d'Ig et celles qui ne le sont pas (Eby et al 1975). A l'origine décrite par Jerne (1963), la méthode de détection des "Immunoglobulin-secreting cells" (ISC) par "plaque-forming cells" (PFC) a été reprise de nombreuses fois. La procédure initiale proposait d'immobiliser, dans un gel d'agarose, les cellules à étudier en suspension avec des globules rouges porteurs d'anti-Ig (hématie sensibilisées) (Eby et al 1975).

Cependant, les tests se sont avérés plus sensibles avec une monocouche de globules rouges (Egeland et al 1982).

La mise en route du test qui va permettre l'énumération des cellules sécrétrices d'immunoglobulines est simple et rapide. Il suffit, comme nous venons de l'indiquer, de mettre en présence des cellules et des érythrocytes "coâtés" avec un anti-Ig et de les maintenir immobiles dans un milieu liquide ou gélifié. Durant l'incubation, les anticorps diffusent autour de chacune des cellules qui les sécrètent.

(12) - Tampon Barbitone 5 x concentré (HAY et HUDSON 1976)

- A | . NaCl (Merck) 85 gr
| . + Sodium diéthylbarbiturate 3,75 gr dans 1 400 ml d'H₂O distillée
- B | . Acide diéthylbarbiturique 5,75 gr dans 500 ml d'H₂O distillée chaude
- C | . MgCl₂ . 6 H₂O (2M) 20,3 gr dans 50 ml d'H₂O distillée
| . + Chlorure de Ca (1M) 30 ml
| . ajuster à 100 ml avec H₂O distillée

1. mélanger A et B (en chambre froide)
2. additionner 5 ml de C
3. compléter jusqu'à deux litres avec de l'eau distillée et tenir à 4°C.

Ce tampon est dilué 5 fois juste avant son utilisation.

Remarque : le sérum de Cobaye en tampon Barbitone est mis en contact pendant 1 heure à 37°C avec des globules rouges de mouton avant d'être récupéré après centrifugation à 1 500 g pendant 10 minutes. Cette précaution est prise afin d'éviter une lyse non spécifique des globules rouges par le sérum.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

Dans les cas où l'anticorps possède la spécificité qui lui permet de réagir avec l'Ac fixé sur les globules rouges, il y a hémolyse s'il existe du complément (1) dans le milieu. C'est cette hémolyse qui donne lieu à la formation de plages claires autour de la cellule productrice d'anticorps.

Nous avons choisi la technique des PFC afin d'établir la cinétique de la production d'anticorps pour des cellules cultivées en flacon (cfr § 4.2.) et stimulés avec du PWM (Pokeweed mitogen 5 μ l/ml de milieu) ou avec les antigènes utilisés pour les cultures en micropuits. Le Pokeweed est une plante (*Phytolacca americana*) dont on peut extraire un agent mitogène pour les cellules B : le PWM. Il réagit avec les glycoprotéines de la surface cellulaire et stimule la transformation lymphocytaire et la prolifération des cellules. Par l'utilisation de ce mitogène, nous cherchons à comparer le nombre de cellules induites à la production totale de cellules B par le PWM et d'autres part en réponse à un agent antigénique (DNP-KLH ou DNP-7C7).

Pour la réalisation des plages d'hémolyse, il nous faut réunir : - des cellules bovines (dont nous allons tester la capacité de production d'Ac).

- du sérum frais de cobaye en tampon Barbitone (12) qui constituera notre source de complément).

- et des globules rouges de mouton que nous aurons couplé à un Ac monoclonal anti-chaîne légère des immunoglobulines bovines (le 3B8 (Letesson et al 1983)) suivant la méthode décrite au § 7.3.2.

(1) : Le complément est un ensemble d'une vingtaine de protéines plasmatiques qui agissent en cascade. Cette cascade du complément est mise en marche de deux manières. La première, dite voie classique, dépend de la présence d'Ac; elle est importante pour la défense antimicrobienne (Milon et Marchal 1986). La seconde, dite voie alterne, joue un rôle essentiel dans la réaction inflammatoire (Gualde 1986).

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

7.3.1. Prélèvement du sang de mouton

Le sang est prélevé au niveau de la jugulaire et récolté dans un tube hépariné (Heparine (NOVO)). Il est ensuite centrifugé 10 minutes à 1 500 g et débarrassé du buffy coat ainsi que du plasma.

7.3.2. Couplage des globules rouges de mouton au 3B8

L'agent couplant est le CrCl_3 . Il présente l'avantage d'une réaction rapide par rapport à d'autres méthodes de couplage comme, par exemple, celle utilisant la parabenzquinone.

- Laver trois fois les globules rouges en NaCl 0,9 % à pH 7,4.
- Mélanger les globules rouges en culot avec du 3B8 (3 mgr/ml) en NaCl 0,9 %.
- Ajouter la solution de CrCl_3 0,05 % en NaCl et à pH 5. (les trois composants du mélange sont mis ensemble à volume égal, vortexés et laissés, le temps de la réaction, 5 à 10 minutes).
- Stopper la réaction par deux lavages en NaCl 0,9 % suivis d'un lavage en PBS.

(GODING 1976)

Il est possible de vérifier l'efficacité du marquage en observant au microscope à fluorescence des globules rouges incubés avec du SAM-FITC 1/50. Les hématies bordées de vert indiquent un marquage réussi. Mieux, l'utilisation du FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter, de Becton - Dickinson) peut donner le pourcentage de globules rouges marqués.

Les globules rouges, une fois couplés, sont suspendus en PBS 0.02 % NaN_3 et conservés à 4°C pendant une semaine. Ils sont lavés en PBS avant chaque utilisation, afin d'éliminer les globules rouges lysés.

(13) - Bromure d'Ethidium - Acridine orange (100 x concentré)

- 50 mgr d'éthidium bromide
- 15 mgr d'acridine orange
- dissoudre dans un ml d'éthanol 95 % + et 49 ml d'eau distillée
- répartir en aliquots de 1 ml et stocker à -20°C.

pour une solution 1 fois concentrée, un aliquot est dilué 100 fois en PBS et stocké 1 mois à 4°C.

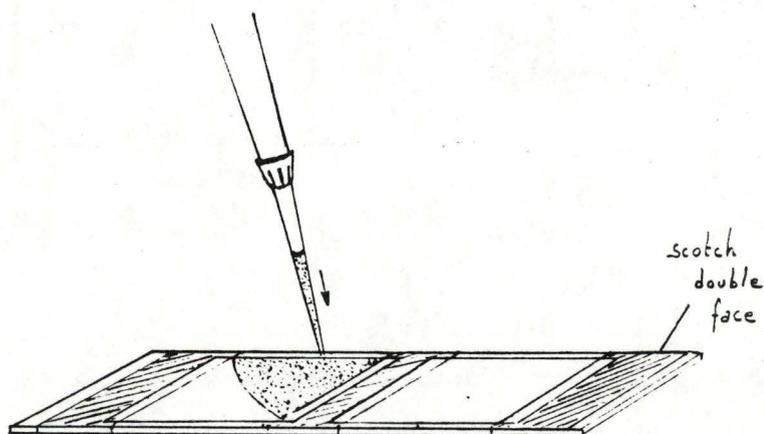


fig. 29.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

7.3.3. Réalisation du test

Si nous voulons suivre l'évolution de la production d'anticorps sur plusieurs jours, il nous faut préparer une série de flacons de cellules en culture et vérifier leur viabilité avant chaque test. Les cellules sont donc lavées en PBS. Une fraction de la suspension cellulaire est prélevée et mélangée dans un même volume d'une solution de Bromure d'Ethidium - Acridine orange (13). Les cellules vivantes apparaissent en vert à la lumière ultraviolette et sont comptées sur lame de Thomas.

Deux types de PFC peuvent être obtenues : les plages dites directes et les plages indirectes. La technique que nous avons utilisée pour les réaliser est dérivée de celle décrite par Cunningham et Szenberg (1968).

7.3.3.1. Les plages directes

Par cette méthode, seules les cellules sécrétrices d'IgM peuvent être détectées.

Principe : - mélanger : . 40 μ l de cellules en PBS (à $10-15 \cdot 10^6$ cellules/ml)
. 50 μ l de globules rouges à $2 \cdot 10^9$ /ml
. 10 μ l de complément

- introduire, par capillarité, entre lame et lamelle, 40 μ l du mélange suivant le schéma de la fig. 29.
- sceller les bords avec de la paraffine.
- incuber une heure à 37°C.
- compter le nombre de plages et l'exprimer en PFC/ 10^6 cellules.

(le nombre de plages que l'on peut compter est variable suivant la température et le temps d'incubation, mais il est aussi fonction du degré de couplage des globules rouges (Molinaro et al 1974)).

7.3.3.2. Les plages indirectes

Les cellules sécrétant d'autres classes d'immunoglobulines (principalement IgG) ne forment pas de plages de lyse sans l'addition d'un anti-Ig qui réagit avec les anticorps sécrétés (Molinaro et al 1974). Nous ajoutons donc au mélange décrit pour les plages directes,

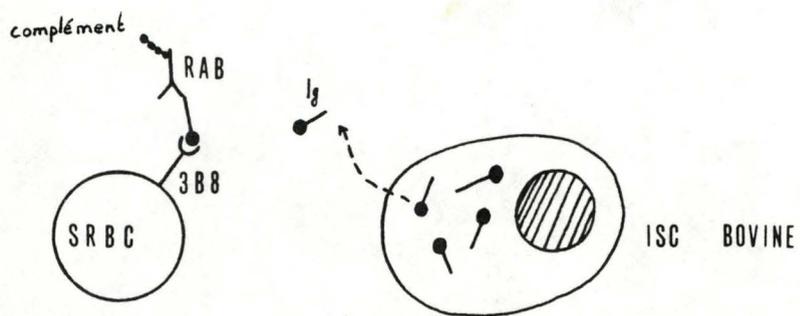


fig. 30. d'après Egeland T. (1982).



Exemple d'une plage d'hémolyse;
au centre de cette plage, deux cellules sécrétrices
d'immunoglobulines sont visibles.
(des fantômes de globules rouges sont également discernables).
(Grossissement : 200 X)

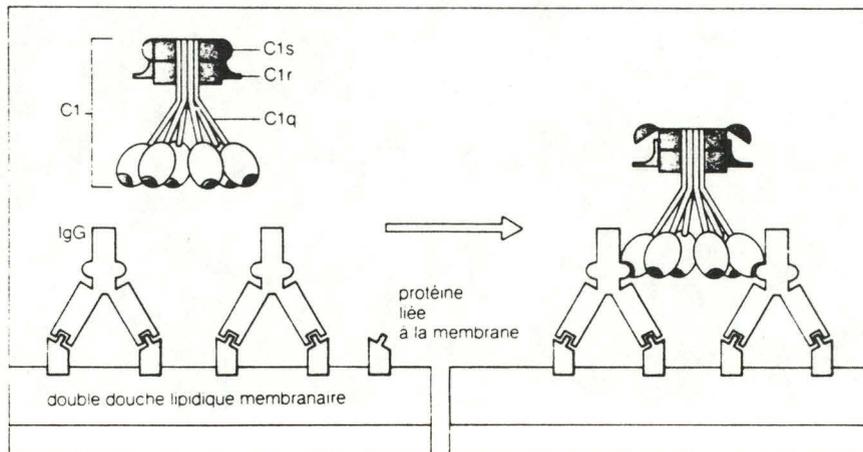


fig. 31. Fixation du c_1q sur deux IgG

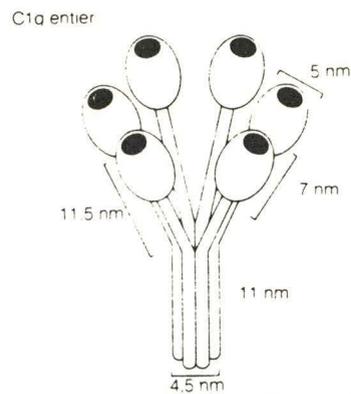


fig. 32.

Les six valences de la sous-unité c_1q du complément

fig. 31 et 32 ROITT (1985)

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

10 μ l de RAB (Rabbit anti-Bovin) 0,05 mgr/ml.

Cet anticorps supplémentaire, en réagissant avec les IgG, permet au complément d'exercer son action lytique (fig. 30)

7.3.4. Mode d'action du complément

La lyse des globules rouges est induite par la voie classique d'activation du complément, elle-même initiée par la formation de complexes Ag-Ac spécifiques. La séquence des événements composant cette voie est assurée par trois unités fonctionnelles (Hirsh 1982) :

- l'unité de reconnaissance
- l'unité d'activation
- l'unité lytique.

L'unité de reconnaissance du système complémentaire est le complexe C_1 formé des trois sous-composants C_{1q} , C_{1r} , C_{1s} . C'est le C_{1q} qui se lie directement au site activateur du complément présent sur le fragment Fc des immunoglobulines. Pour les IgG, le site est au niveau du domaine CH_2 , il y en a donc deux (un pour chaque chaîne γ). Cependant un seul est fonctionnel et il n'est libéré que lorsque l'Ac réalise un complexe avec l'Ag (transconformation de l'IgG).

L'activation du complément nécessite l'entrée en conjonction avec deux sites minimum, situés sur des immunoglobulines voisines (fig. 31). Or le C_{1q} possède 6 séquences capables de réagir (fig. 32), c'est pourquoi la fixation sur une IgM (qui est pentamérique) est suffisante pour l'activer. Ainsi la réaction d'hémolyse a lieu, en plages directes, sans addition d'anticorps supplémentaires. Par contre 2 000 à 3 000 IgG sont nécessaires pour obtenir la probabilité que deux IgG soient voisines et permettent au C_{1q} de se fixer par deux valences (Depelchin 1985). D'où la nécessité d'ajouter du RAB pour les plages indirectes.

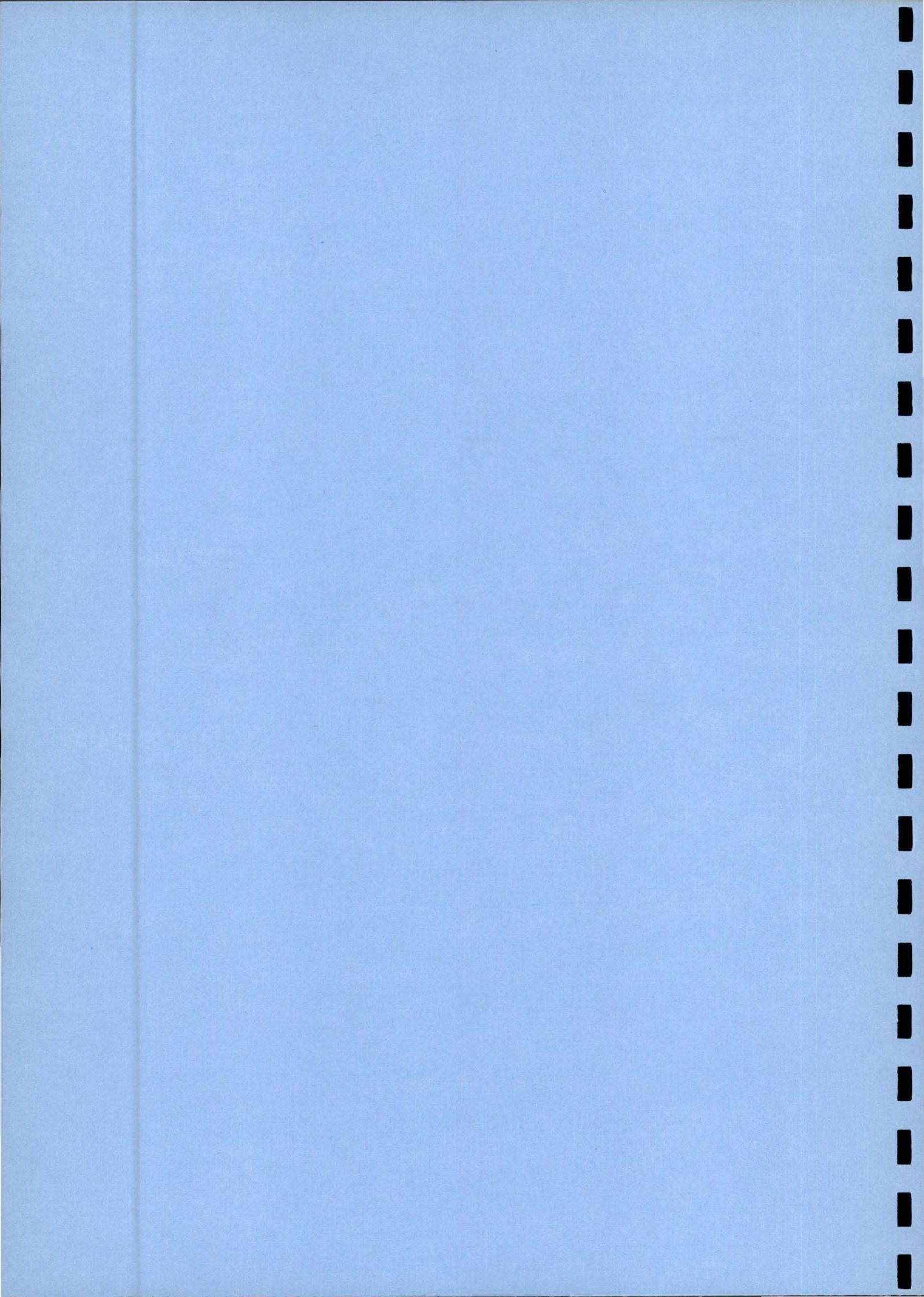
A N N E X E

Anticorps utilisés

NOM	SPECIFICITE	UTILITE DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL
7C7	anti-classe II	couplage au DNP pour cibler l'haptène vers les C.P.A.
3B8	anti-chaînes légères d'Ig bovines	couplage aux globules rouges de mouton lors des tests de PFC
1H4-Peroxydase	anti-IgM	rôle de deuxième anticorps pour les Elisa testant les surnageants d'une réponse primaire.
1C8-Peroxydase	anti-IgG ₁	même rôle que le précédent pour une réponse secondaire
4F4	anti-classe I	couplage au DNP pour comparaison avec le DNP-7C7

RESULTS ET

DISCUSSION



III. R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

I. PREMIERE PHASE DU TRAVAIL

1. Immunisation primaire in vitro

1.1. Conditions de culture : première modalité

Lors de notre première mise en culture, il nous faut décider des conditions de stimulation optimales tant du point de vue du nombre de cellules par puits que du point de vue de la concentration en antigène.

1.1.1. Cellules et antigène en présence

Pour ne pas partir en aveugle, nous nous basons sur une expérience du même type, également réalisée sur des cellules du sang périphérique, mais adaptée aux cellules humaines (Morimoto et al 1981). Cette étude renseigne un optimum dans la production d'anticorps anti-DNP pour des cellules portées à 1.10^6 par puits et stimulées avec 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ de DNP-KLH.

Le schéma d'une boîte de culture à 96 puits présenté ci-dessous reprend les conditions appliquées à notre cas, pour une stimulation des cellules au DNP-KLH et au DNP-7C7 dans la même gamme de concentration

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	750 $\mu\text{g/ml}$ DNP-KLH						ou DNP-7C7					
C	500											
D	250											
E	100											
F	50											
G	C			témoin			cellules et milieu seul					
H												

1.10^6 cell/puits

2.10^6 cell./puits

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

(Chaque condition est réalisée en quintuple; seuls les 60 puits internes sont utilisés).

Après 5 jours de culture, l'observation des boîtes au microscope inversé montre des cellules arrondies et disposées en tapis plus ou moins uniforme pour ce qui concerne la rangée de puits témoins. Par contre, là où la substance antigénique est présente en solution, on observe des agrégats de cellules d'autant plus marqués que les concentrations en DNP-KLH ou DNP-7C7 sont plus élevées.

1.1.2. Apport d'"IL₂"

Au terme des 5 premiers jours de culture avec l'antigène, les cellules sont lavées et remises en incubation dans un milieu frais sans Ag pour 4 jours supplémentaires. Pour cette deuxième phase de la culture cellulaire, la production d'immunoglobulines pourrait être facilitée par un apport d'IL₂. En effet, les cellules du système immunitaire échangent sans cesse des signaux entre elles; les interleukines en font partie, et l'IL₂ joue un rôle important dans la phase effective de la réponse. Elle entraîne la prolifération des cellules T et provoque la sécrétion en cascade de plusieurs interleukines agissant sur les lymphocytes B, induisant leur maturation et la synthèse d'anticorps (cfr Intro. § 4.3.2.).

Nous ne disposons pas d'IL₂ purifié à ajouter à nos cellules. Ce que nous leur apportons est en fait du sur-nageant de culture de cellules stimulées à la Concanavalline A (Con A). N₁.

N₁ : La Concanavalline A est une lectine, mitogénique extraite de *Canavalia ensiformis*. Il s'agit d'une protéine qui reconnaît spécifiquement et relie entre eux des déterminants hydrocarbonés de la surface cellulaire. Elle induit des modifications intracellulaires aboutissant à la transformation des lymphocytes en lymphoblastes.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

1.1.2.1. IL₂ utilisé

L'obtention d'un tel surnageant nécessite une mise en culture en flacon : des cellules sont suspendues à $3 \cdot 10^6$ /ml dans 50 ml de milieu RPMI 1640 avec 10 g/ml de Con A pendant 24 heures.

Par centrifugation, on sépare ensuite les cellules du surnageant. Ce dernier, avant son utilisation, doit être supplémenté de méthyl α -D mannopyranoside 0,1 M (m α -D m (Sigma)). Il s'agit d'un sucre qui a pour effet de "bloquer" la Con A et de l'empêcher de poursuivre son action stimulante sur la multiplication cellulaire. Le surnageant ainsi préparé (et contenant de l'IL₂) est filtré sur filtre 0,22 μ (Millipore) et ajouté à raison de 50 μ l par puits (ceci dans deux puits d'une série de cinq).

Dans les jours qui suivent cet apport d'IL₂, les cellules semblent en "meilleure forme" (plus arrondies) que celles des puits voisins.

1.1.2.2. Vérification de l'efficacité du "surnageant IL₂"

Plusieurs lots de surnageant IL₂ sont disponibles au laboratoire. Nous en avons testé trois afin d'utiliser celui qui remplit au mieux son rôle de support à la blastogénèse.

Les cellules mises de côté lors de la préparation du surnageant-IL₂ sont lavées plusieurs fois en RPMI + m α -Dm sur 0,1 M et resuspendues à 200 000 et 500 000 cellules par puits. A ces cellules sont ajoutés soit les différents lots d'IL₂ à tester, soit du RPMI + m α -D m ou de la Con A 10 μ g/ml comme témoins négatifs.

L'efficacité des surnageants IL₂ est mesurée par incorporation de Thymidine tritiée. Au comptage, un nombre de CPM (coups par minute) élevé indique une importante incorporation de l'isotope radioactif par la cellule; soit une blastogénèse induite

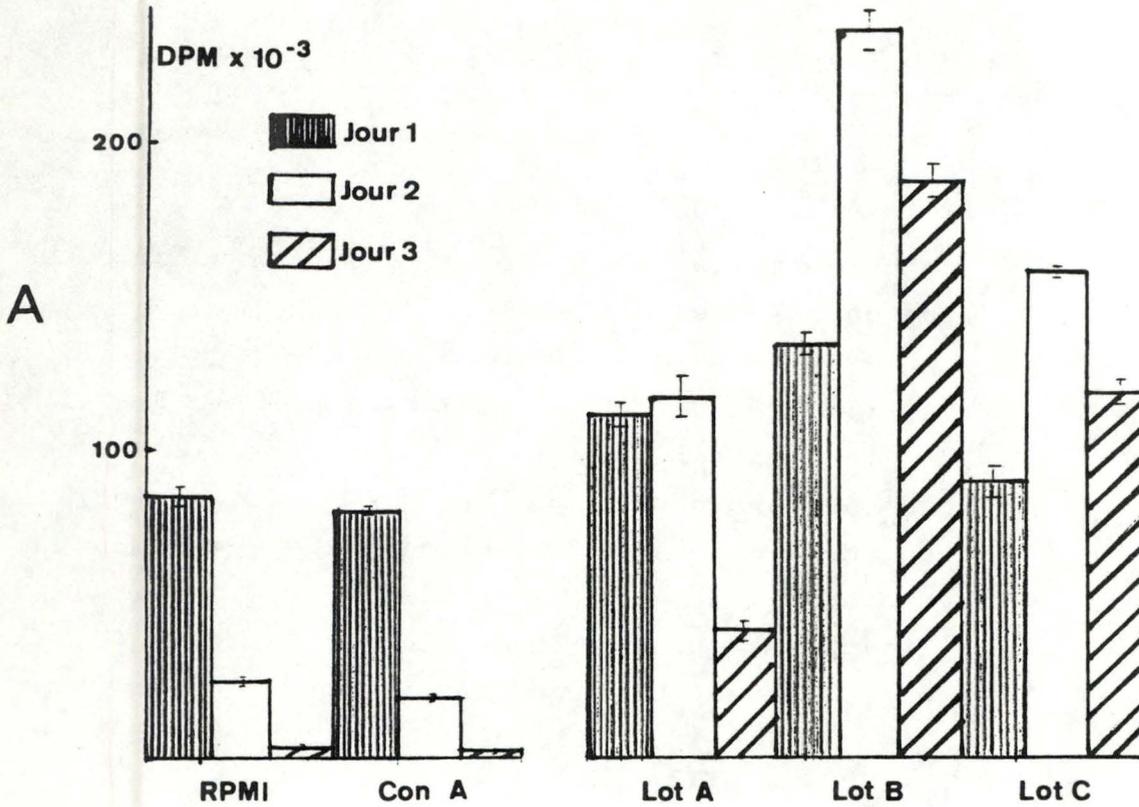
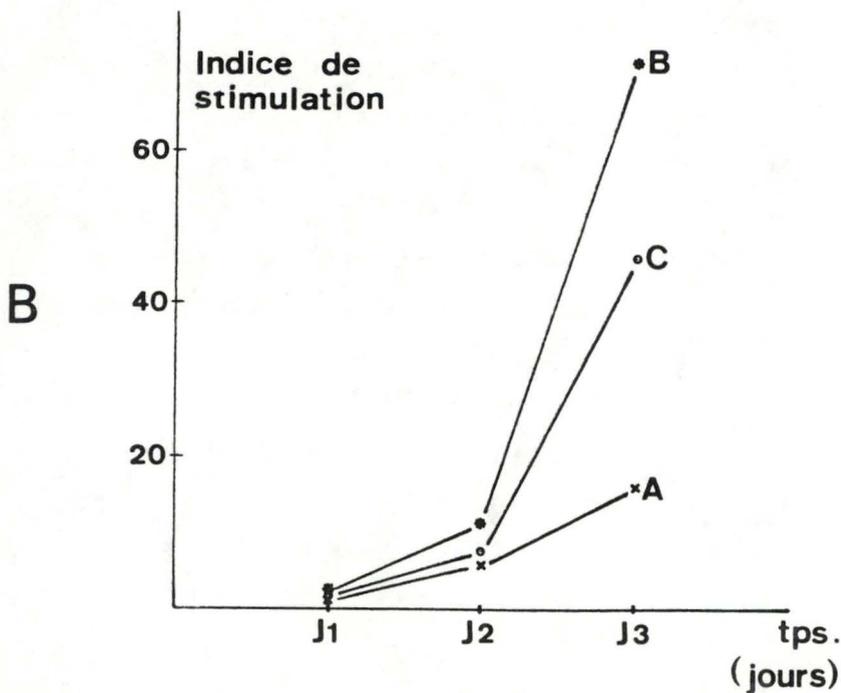


FIG.33 Vérification de l'efficacité des surnageants IL-2
 A) Incorporation de thymidine tritiée au cours du temps pour des "blastes" à 200.000 cellules par puits en présence de surnageants témoins (RPMI, ConA) ou de trois surnageants différents contenant de l'IL-2.
 B) Indice de stimulation calculé au cours du temps pour les trois mêmes lots de surnageants IL-2.



R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

par l'IL₂. Cette vérification s'est faite sur 3 jours pour les trois lots, et, comme l'indique la figure 33 c'est dans chaque cas au deuxième jour que l'on constate le maximum de prolifération cellulaire. (L'efficacité est exprimée en indice de stimulation : le nombre de CPM du test sur le nombre de CPM du témoin).

Dans la suite, nous ajouterons tous les deux jours à nos cellules, 50 μ l de surnageant IL₂ du lot (B) dans chaque puits de culture.

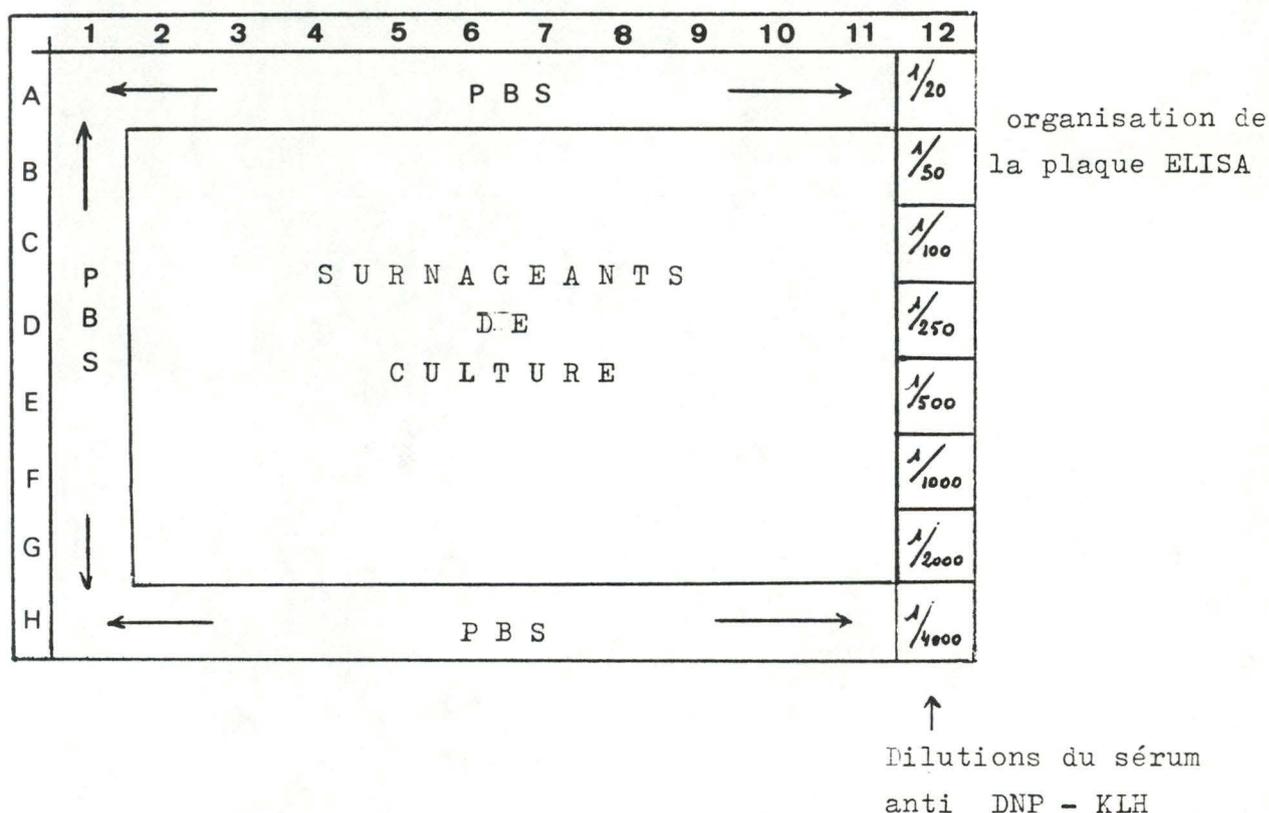
1.2. Détection des anticorps produits

Le test de détection est réalisé sur les surnageants au dixième jour de la culture cellulaire, suivant la méthode de l'ELISA sur plaques en PVC flexibles.

Le DNP-OVA adsorbé au fond des boîtes est à 50 μ g/ml (fixation non spécifique par liens hydrophobes). L'ovalbumine sert de support au DNP et présente ces haptènes de façon à ce qu'ils soient reconnus par les anticorps qui seraient présents en solution dans les surnageants. Dans ce cas, le monoclonal utilisé pour détecter les immunoglobulines bovines produites par les cellules en culture est le 1H₄-Peroxydase parce que les anticorps caractéristiques de la réponse primaire sont de type IgM.

Une série de dilution du sérum d'une vache immunisée contre DNP-KLH constitue notre témoin positif. Le témoin négatif quant à lui est obtenu en incubant du PBS au lieu des surnageants et devrait normalement rester blanc à la révélation.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

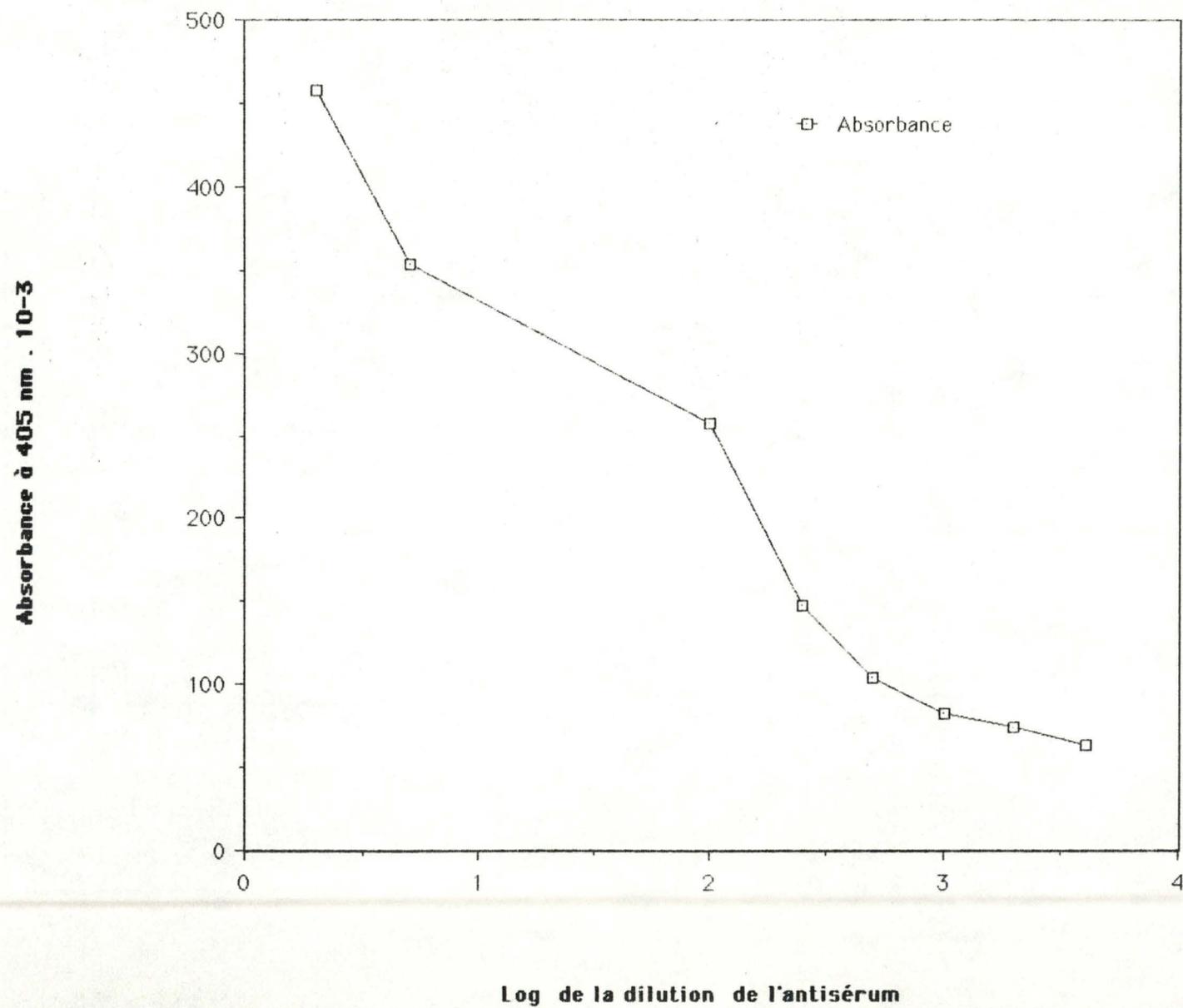


1.2.1. Résultats et interprétation

Les valeurs obtenues après lecture de l'absorbance au lecteur de plaques ELISA (Dynatech) rendent cette première expérience difficilement interprétable. Les témoins négatifs, constitués de PBS seul, présentent une coloration verte parfois assez prononcée et, par ce fait, nous empêche de conclure à une réaction positive (présence d'anticorps) dans les puits internes. On observe par endroits des colorations plus intenses, mais elles ne se remarquent que sur des puits isolés alors que les tests ont été réalisés en double (avec IL_2) ou en triple (sans IL_2).

Ces valeurs disparates pourraient indiquer une mauvaise façon de procéder au moment de déposer les surnageants. Cette phase de l'expérience doit se faire de manière telle qu'il n'y ait aucune projection dans les puits avoisinants. (Des microgouttes tombées à côté entraînent des différences de concentration immédiatement mises en évidence lors de la révélation). Quoi qu'il en soit, les témoins positifs quant à eux, présentent bien une coloration qui va en dé-

Titration de l'antisérum



R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

croissant de la dilution 1/20 à la dilution 1/4 000 du sérum (fig. 34). Ce dégradé de couleur indique une quantité d'anticorps de moins en moins importante au plus le sérum est dilué.

Ce contrôle est en faveur de l'efficacité du test de détection des anticorps par ELISA. Il faut donc chercher ailleurs la source du problème et nous modifierons, dans les expériences qui vont suivre, les divers paramètres pouvant être mis en cause en commençant par la quantité de cellules.

1.3. Deuxième modalité de culture

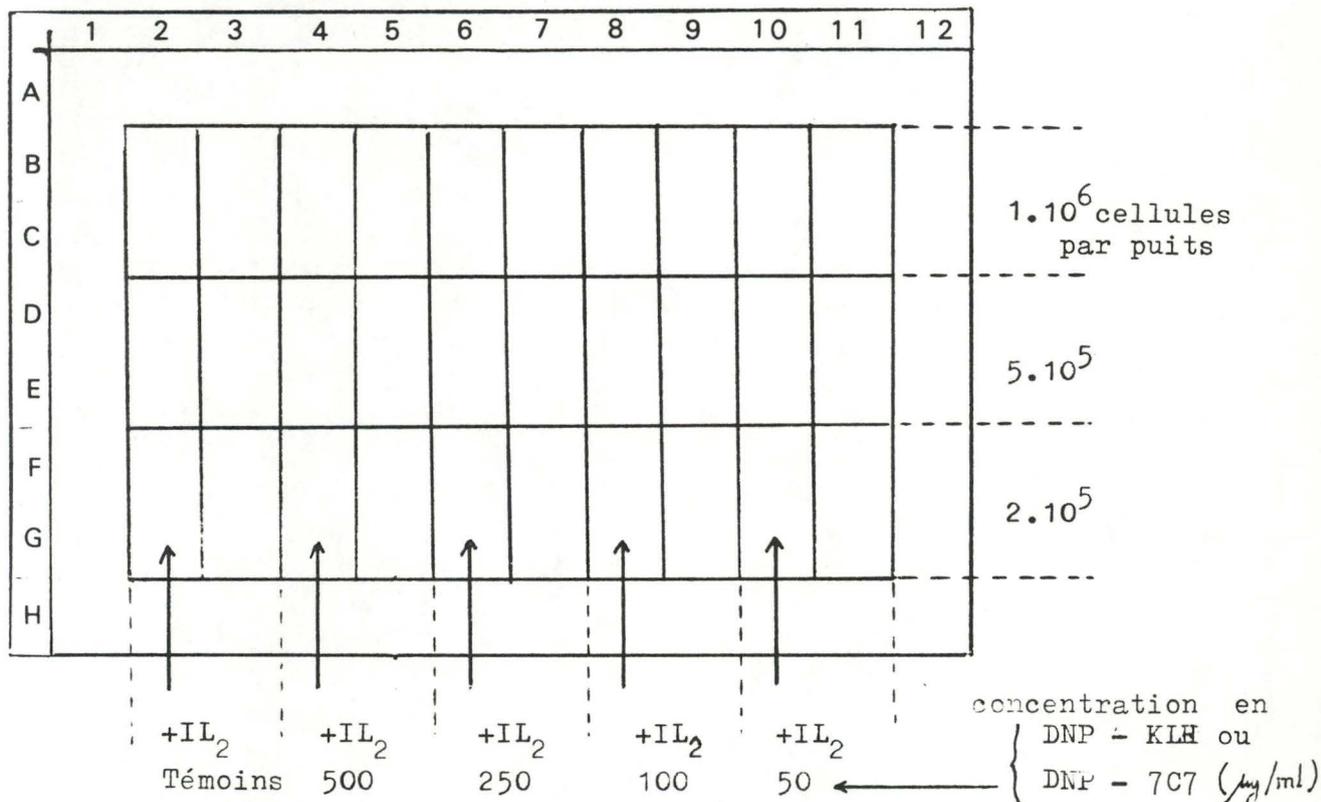
Nous abandonnons les cultures à 2.10^6 cellules par puits pour ne pas dépendre d'une trop grande quantité de sang. De plus, une telle concentration dans un volume de 200 μ l épuise trop rapidement le milieu entraînant une diminution de la viabilité cellulaire. D'autre part, les expériences de mises en culture, couramment effectuées au laboratoire, se révèlent souvent être meilleures pour des concentrations cellulaires inférieures au million. Nous avons donc remis en route une deuxième modalité d'immunisation primaire in vitro dans les conditions de 1.10^6 , 5.10^5 , et 2.10^5 cellules par puits pour des concentrations antigéniques (DNP-KLH ou DNP-7C7) de 50, 100, 250 et 500 μ g/ml.

La suite des opérations concorde avec celles présentées pour la première modalité (5 jours de culture avec l'Ag + 4 jours sans) avec, dès le début, un apport d'IL₂ tous les deux jours. (Là où cet apport n'a pas lieu, 50 μ l de milieu sont additionnés pour respecter de part et d'autre les mêmes conditions de concentration en antigène).

Remarque : Les manipulations répétées qui nécessitent ces apports d'IL₂ sont autant de risques de contamination supplémentaires pour nos cultures cellulaires. Il faut donc veiller à la parfaite stérilité du matériel utilisé.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Deux essais ont été réalisés suivant ce modèle d'une boîte de culture à 96 puits.



(les tests sont en double)

Pour les deux essais réalisés, les résultats à l'ELISA montrent encore une grande variabilité au niveau des blancs. De plus, de nombreuses valeurs sont négatives : le lecteur ELISA lit le puits 1A et le prend comme blanc dont il déduit la valeur à la lecture de chacun des autres puits. Or, si ce puits 1A est plus coloré que certains puits internes concernés par le test, ces derniers seront traduits par un chiffre précédé du signe moins (sans signification pour nous).

Les ELISA une fois de plus négatifs nous obligent à remettre en question le "timing", les concentrations ou les températures appliquées aux différentes phases de ce test.

1.4. Modifications apportées au test ELISA

Dans leurs travaux sur les cellules humaines, l'équipe de

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Morimoto (1981) contrôle la quantité d'anticorps produits par RIA (Radio Immuno Assay). Mise à part l'utilisation d' ^{125}I couplé à leur anticorps anti-immunoglobulines humaines et l'expression des résultats en CPM (coups par minute) plutôt qu'en ABS (absorbance), la succession des étapes est la même que dans le test ELISA.

Quelques différences existent entre leur protocole et celui que nous utilisons jusqu'à ce moment. A savoir que les plaques sont préparées avec du DNP-OVA à 1 mgr/ml plutôt que 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que les surnageants de culture sont laissés 3 heures à 4°C au lieu de 1 heure à 37°C et que le deuxième anticorps marqué à ^{125}I reste une nuit à 4°C.

Nous avons appliqué ces conditions à notre étude pour tester des surnageants de culture stockés un mois à -20°C. Il s'agissait de surnageants obtenus pour une culture avec 1.10^6 , 5.10^5 et 2.10^5 cellules par puits mises en présence de 500, 250, 100 ou 50 μg par ml de DNP-KLH ou DNP-7C7.

Les résultats négatifs, nous font chercher le problème ailleurs que dans les conditions du test ELISA puisqu'il marche toujours pour le témoin positif.

2. Immunisation secondaire in vitro

Les expériences d'immunisation primaire n'ayant jusqu'ici rien donné comme résultat, nous soupçonnons une quantité d'anticorps trop faible pour être détectable. Nous nous tournons donc vers une immunisation secondaire in vitro; soit un rappel in vitro suite à une immunisation in vivo.

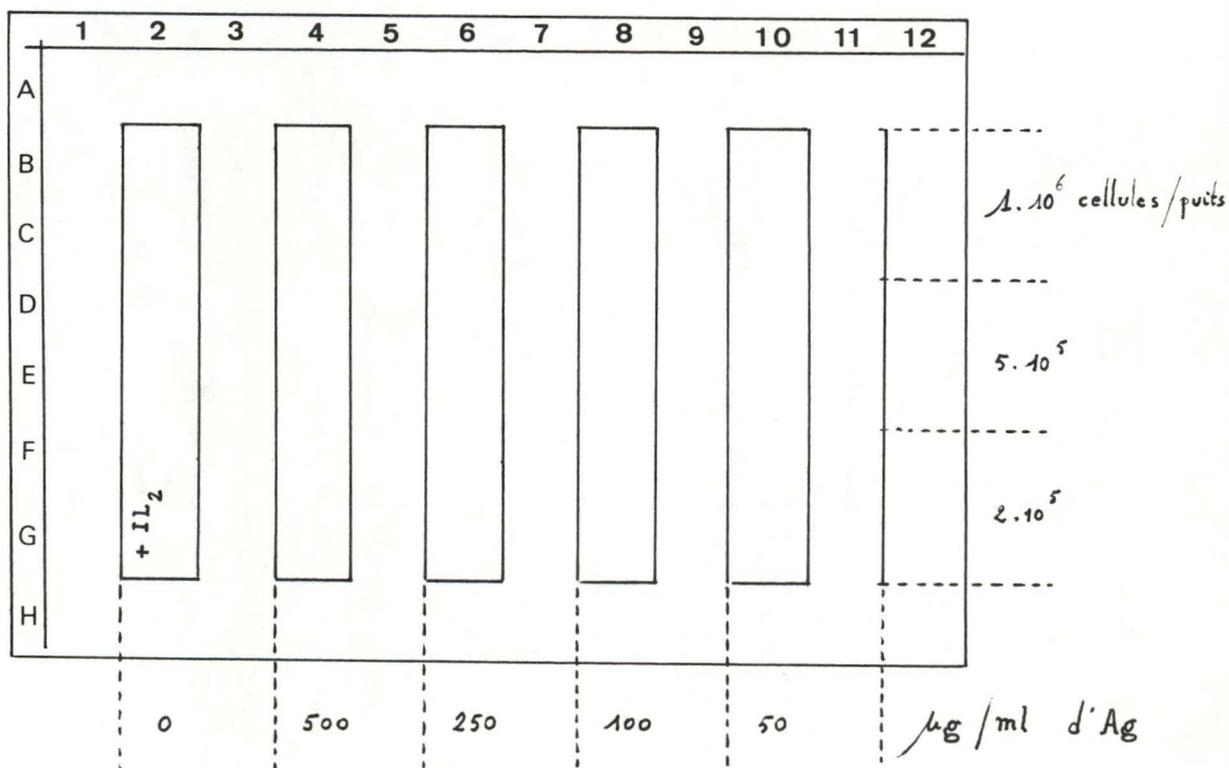
2.1. Mise en culture

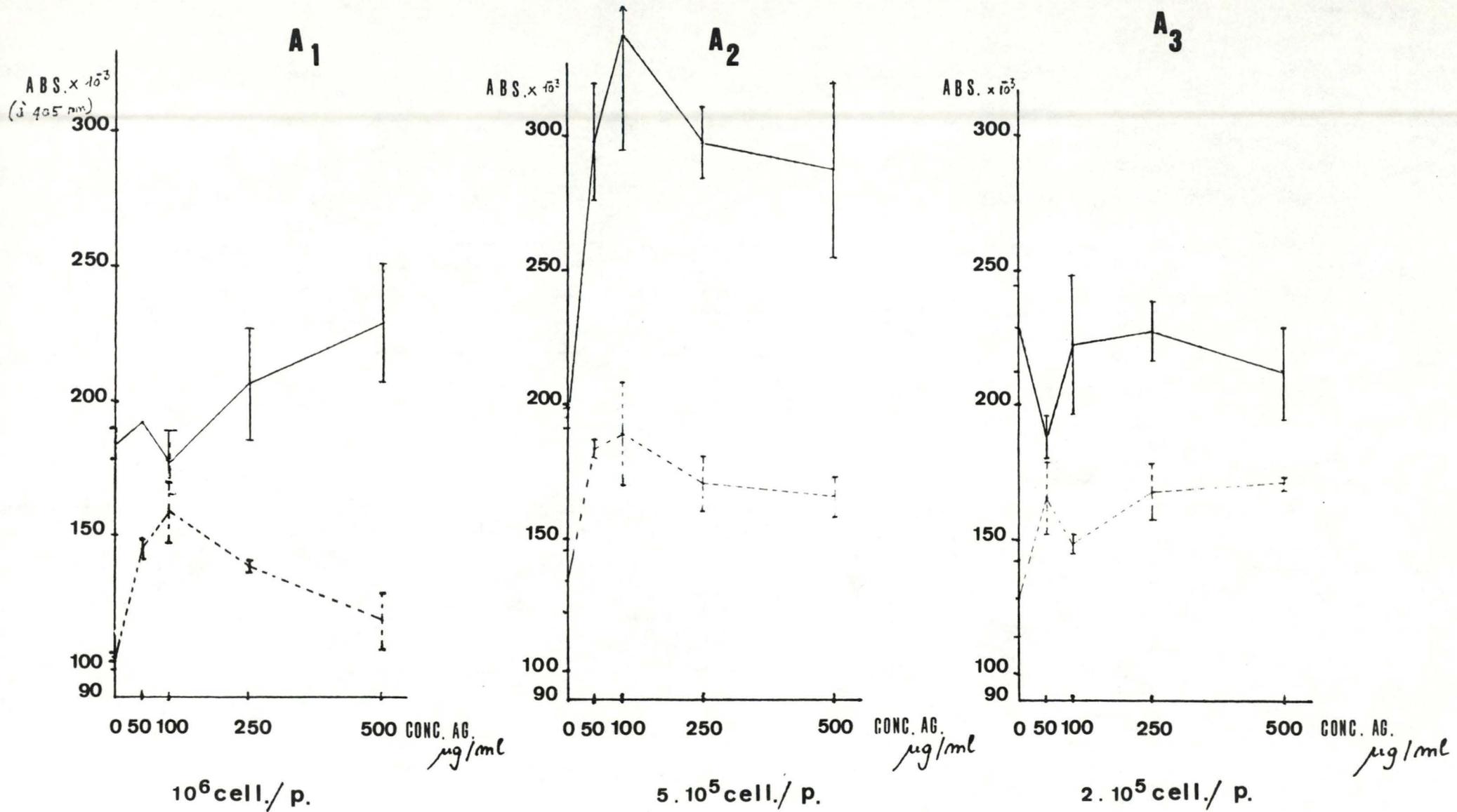
La mise en culture des cellules d'un animal immunisé contre DNP-KLH (celui-là même dont nous utilisons le sérum comme témoin positif lors des ELISA) revient à stimuler les lymphocytes B mémoires, mais aussi les lymphocytes T helper mémoires intervenant dans la coopération cellulaire et enfin toutes les cellules impliquées dans le processing et la présentation de l'antigène. Nous nous attendons à ce que la production d'anticorps soit plus marquée qu'après une stimulation primaire (cfr Introduction : § 4.4.3.).

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

La mise en culture des cellules pour une stimulation secondaire ne diffère pas de la procédure suivie pour l'immunisation primaire in vitro; les cellules sont mises en boîte, suspendues dans du RPMI 1640 additionné d'antigène DNP-KLH ou DNP-7C7 en concentration variable. La culture en présence d'antigène se déroule pendant 5 jours au bout desquels les cellules sont lavées et remises en culture pour 4 jours supplémentaires avec du milieu frais sans antigène.

Les conditions choisies pour cette culture sont des cellules suspendues à 1.10^6 , 5.10^5 et 2.10^5 par puits pour des concentrations antigéniques de 50, 100, 250 et 500 $\mu\text{g/ml}$. Nous réalisons toujours une série de puits témoins dans lesquels on retrouve les mêmes suspensions cellulaires que pour les tests, mais les cellules sont simplement cultivées dans du RPMI 1640 seul, sans addition d'antigène.

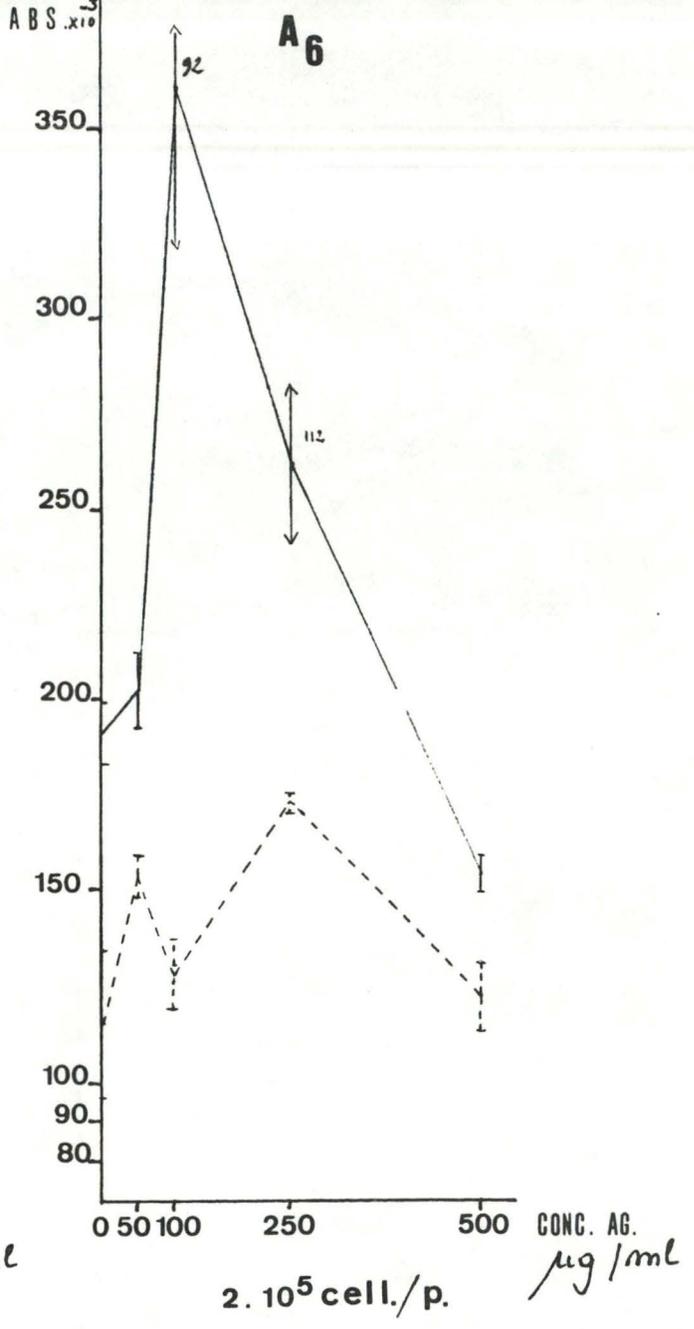
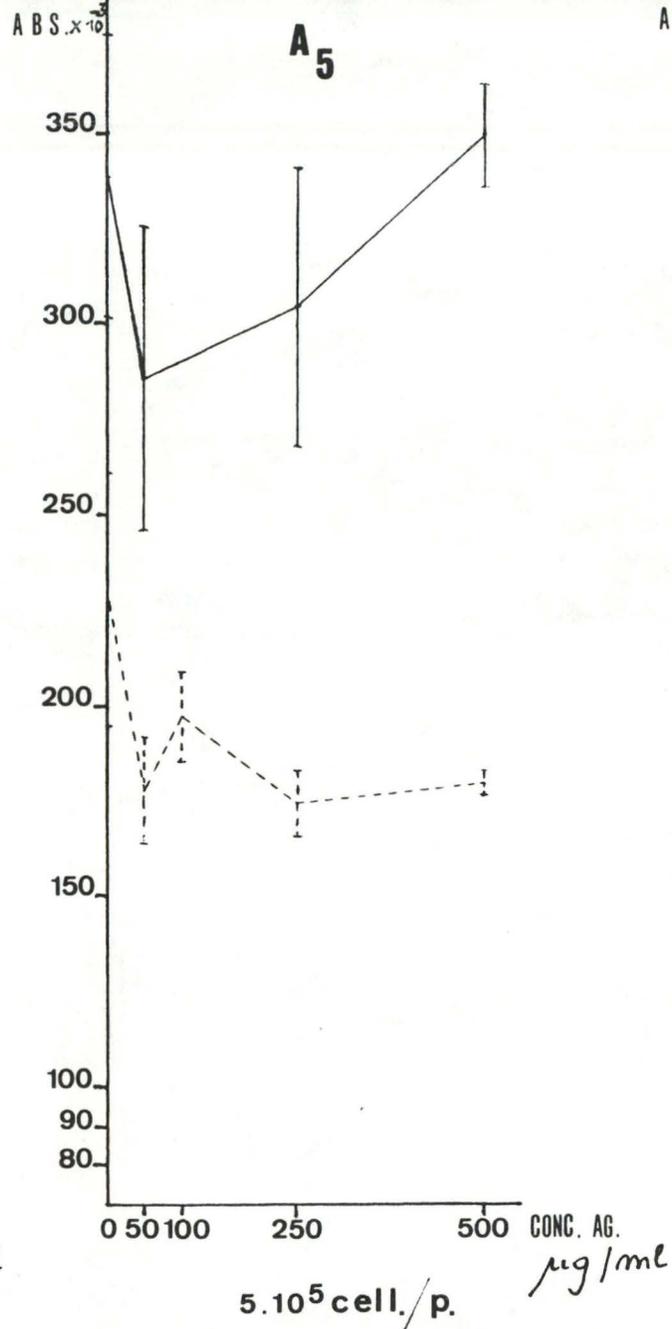
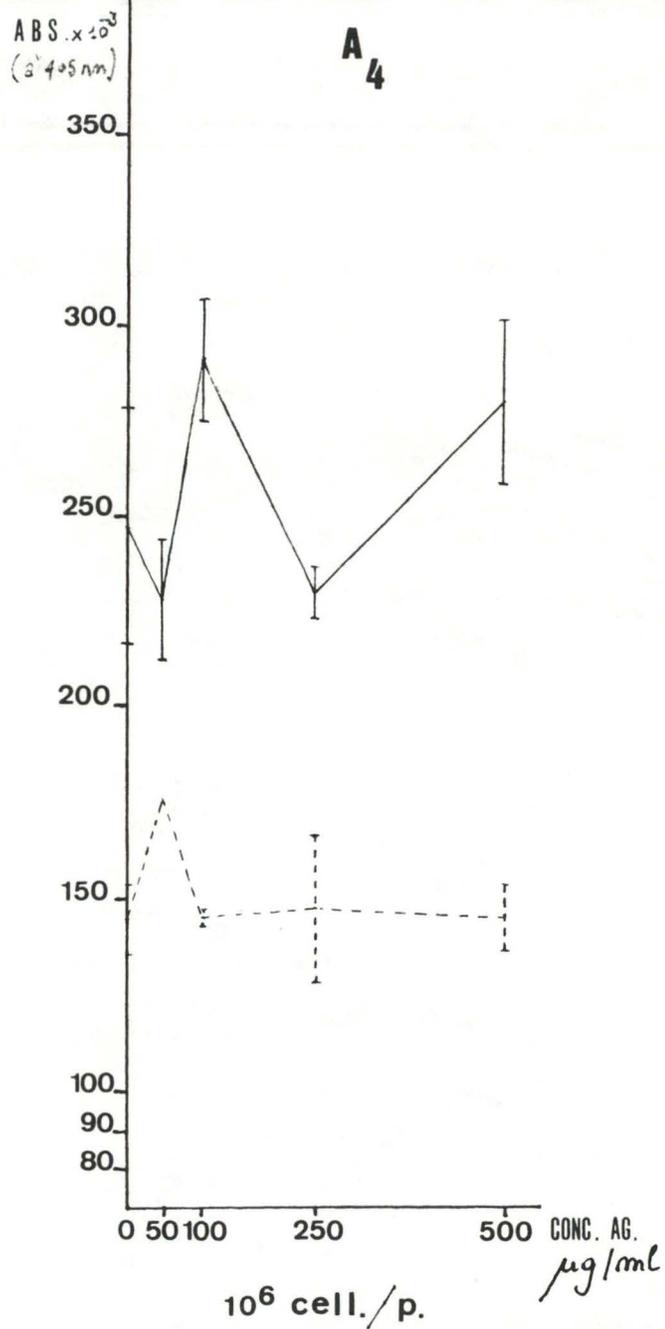




— IL₂
 - - - SANS IL₂

fig. 35. A_{1,2,3} cellules stimulées au DNP-KLH

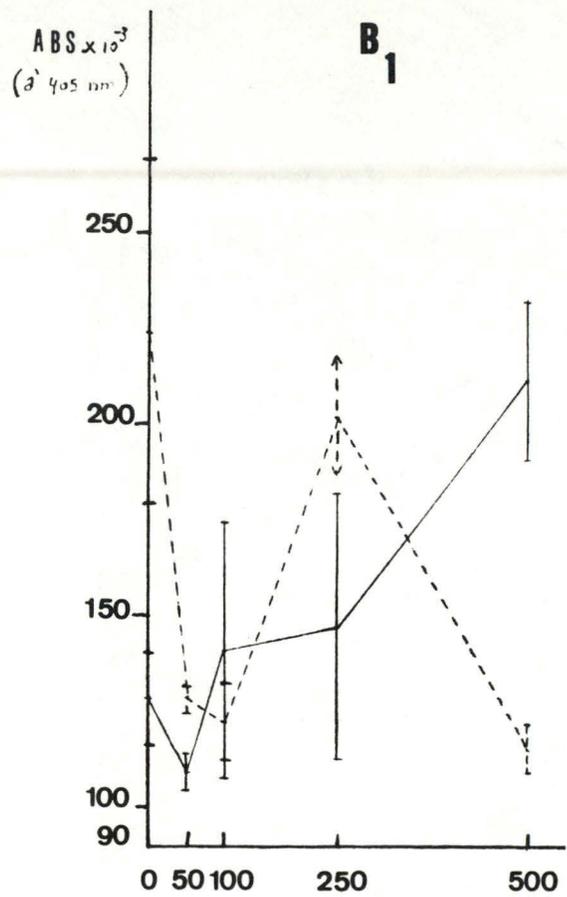
récolte des surnageants après 10 jours de culture



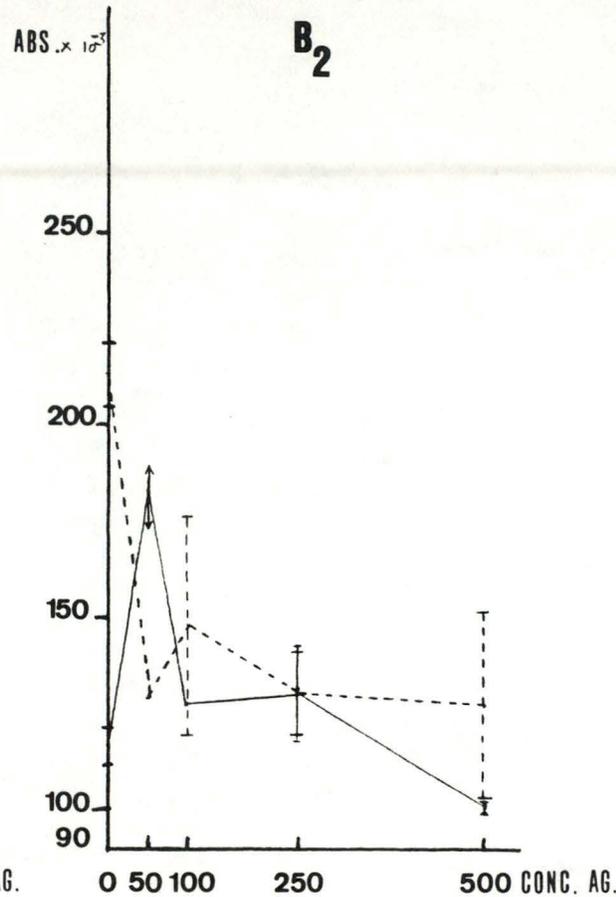
— L₂
 - - - SANS IL₂

fig. 35. A_{4,5,6} cellules stimulées au DNP-KLH

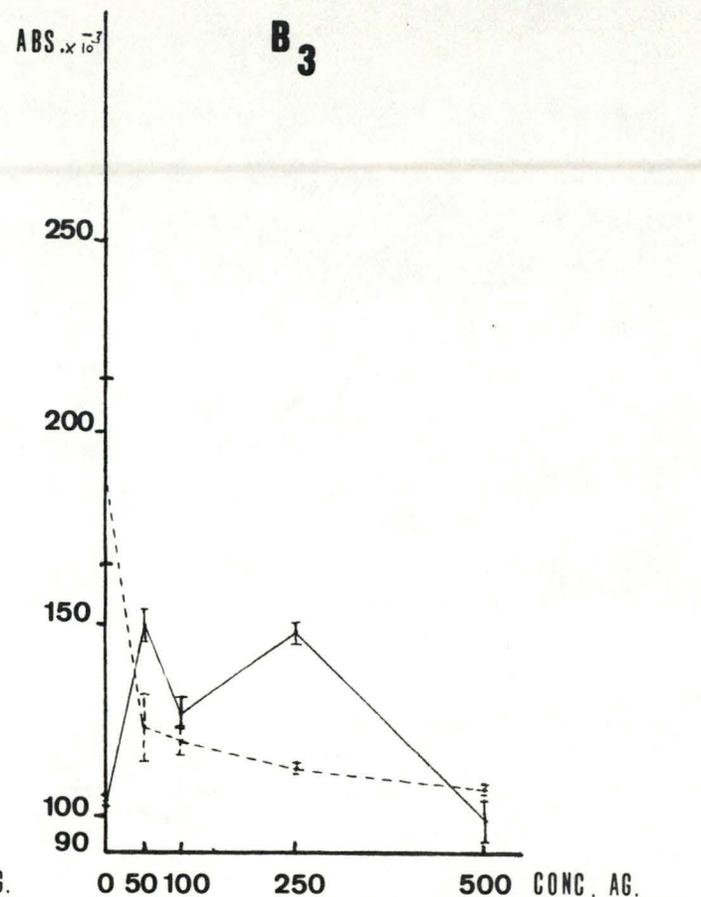
récolte des surnageants après 11 jours de culture



10^6 cell./p.



$5 \cdot 10^5$ cell./p.

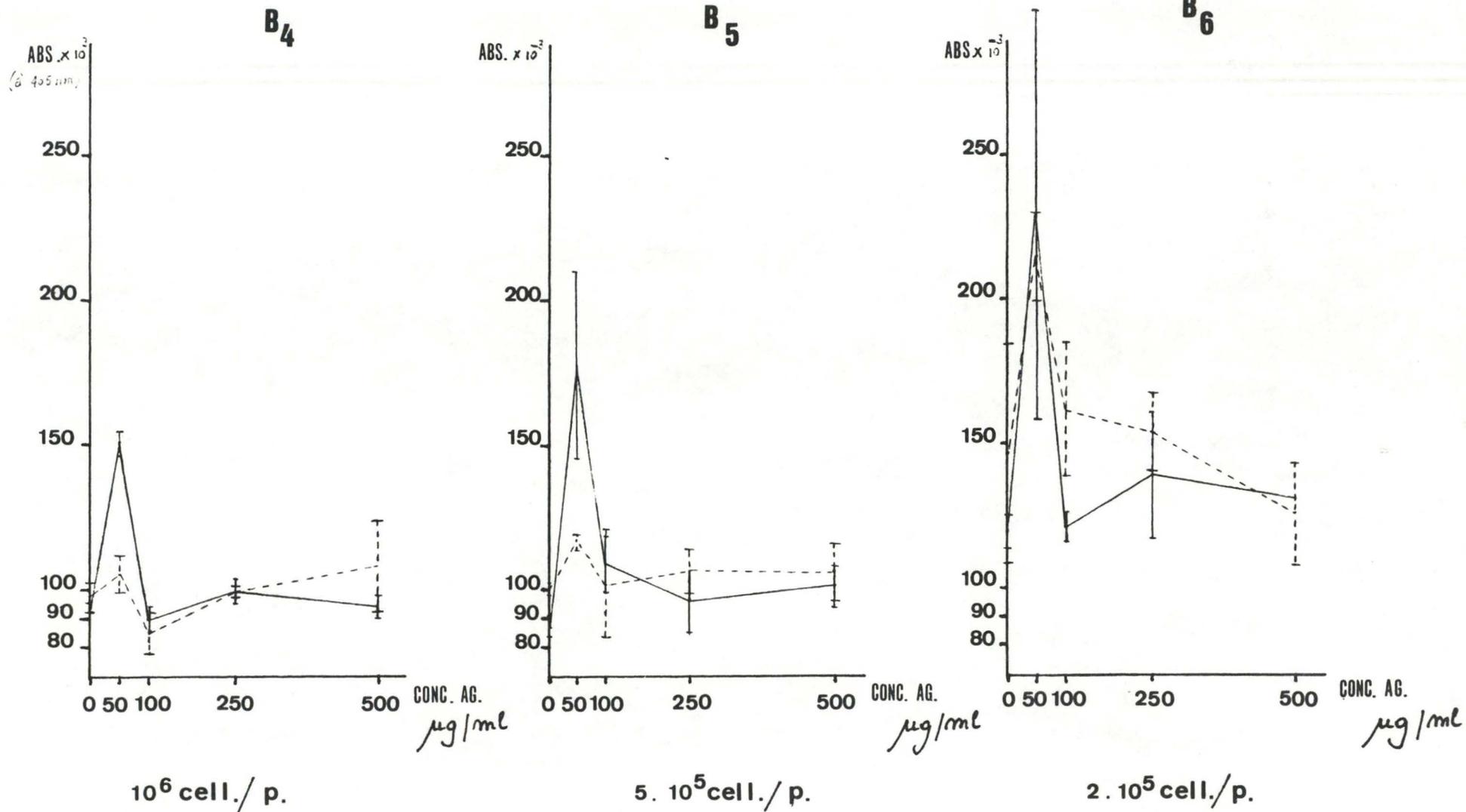


$2 \cdot 10^5$ cell./p.

— IL₂
- - - SANS IL₂

fig. 35. B_{1,2,3} cellules stimulées
au DNP-7C7

récolte des surnageants
après 10 jours de culture



—— IL₂
 - - - - SANS IL₂

fig. 35. B_{4,5,6} cellules stimulées au DNP-7C7

récolte des surnageants après 11 jours de culture

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Deux boîtes de cellules stimulées au DNP-KLH et deux boîtes de cellules stimulées au DNP-7C7 sont réalisées suivant ce modèle.

2.2. Elisa

La récolte et le test des surnageants au dixième jour de culture ont lieu pour une boîte de chaque sorte. Les deux boîtes restantes sont laissées à l'étuve jusqu'au lendemain afin de voir l'influence d'un jour de culture supplémentaire sur la production d'anticorps. Dans chaque cas, le test est fait suivant le protocole de "l'ELISA modifié". (cfr § 1.4)

2.3. Résultats (fig. 35)

L'observation des graphiques représentant l'absorbance en fonction de la concentration en antigène donne des informations concernant trois paramètres :

- l'influence de l'IL₂
- les concentrations en cellules optimales
- et les concentrations en antigène optimales.

Les graphiques de la série A rapportent les résultats pour des cultures de cellules stimulées au DNP-KLH dont les surnageants ont été testés au dixième jour (A1, A2, A3) et au onzième jour (A4, A5, A6). De l'allure générale de ces représentations, il ressort dans chaque cas une nette influence de l'apport d'IL₂ sur la production d'anticorps. Il semble que cette influence soit plus marquée au dixième jour de culture et pour des cellules suspendues à $5 \cdot 10^5$ /puits (A2).

Les graphiques de la série B représentent les résultats obtenus pour des cellules stimulées au DNP-7C7 et dont les surnageants ont également été récoltés au dixième jour (B1, B2, B3) et onzième jour (B4, B5, B6) de culture.

Pour cette série, l'apport d'IL₂ ne semble pas avoir eu le même effet (ou du moins dans une moindre mesure) que celui constaté dans le cas précédent. Par contre, la stimulation serait plus efficace pour une concentration de 50 g/ml de DNP-7C7 (Ceci pour les surnageants testés au onzième jour).

tableau 4.

	dilution RAB	concentration en cellules (10^6 /ml)	nombre de cellules par chambre	PFC par chambre	PFC/ 10^6 MNC
A	1	20	260000	0 *	0
B	1/10	20	260000	0 *	0
C	1/100	20	260000	30 et 36	122
D	1/500	10	130000	22 et 29	160
E	1/1000	10	130000	13 et 15	110
F	1/2000	10	130000	10 et 11	80
G	1/4000	10	130000	9 et 9	70

* lyse totale

tableau 5

	dilution RAB	concentration en cellules (10^6 /ml)	nombre de cellules par chambre	PFC par chambre	PFC/ 10^6 MNC
A	1/100	20	260000	77 et 86	356
B	1/500	20	260000	19 et 20	90

PFC / chambre = nombre de plages de lyse comptées à l'observation d'une chambre

PFC / 10^6 MNC = nombre de plages de lyse ramené au million de cellules mononucléées, soit le nombre de cellules sécrétrices d'immunoglobulines par million de cellules mononucléées

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

A la suite de ces résultats, pour les expériences d'immunisation qui vont suivre, nous appliquerons les conditions de culture rassemblant 5.10^5 ou 2.10^5 cellules par puits pour des concentrations en antigène de 50 et $100 \mu\text{g/ml}$.

3. Plages d'hémolyse

Vu la difficulté de mettre en évidence la présence d'anticorps dans les surnageants de culture par test ELISA, et avant de poursuivre les expériences sur les cellules d'un nouvel animal immunisé, nous avons décidé de mettre au point un test de plages d'hémolyse. Il s'agit d'une méthode de détection beaucoup plus sensible (cfr Matériel et Méthodes § 7.3.) que nous utiliserons pour détecter les anticorps au niveau des cellules productrices. Dans un premier temps, cette technique PFC nous permettra d'estimer la production globale d'immunoglobulines lors d'une activation polyclonale des lymphocytes B par du Pokeweed mitogen (PWM) et de suivre la cinétique de cette production sur plusieurs jours. Une fois les conditions du test bien établies, nous utiliserons cette technique des PFC pour démontrer la production d'anticorps suite à une activation antigéno-spécifique.

3.1. Mise au point du test PFC

Les essais sont réalisés pour des cellules isolées du sang le jour même et n'ayant pas subi de stimulation préalable. Les plages de lyse directe ne mettent en évidence que les cellules productrices d'IgM. Pour révéler les cellules sécrétrices des autres classes d'anticorps, nous avons vu que l'addition de Rabbit Anti-bovin (RAB) était nécessaire (cfr Matériel et Méthodes § 7.3.3.2). On parle de plages de lyse indirectes.

La solution stock de RAB (stockée à -20°C) est à 5 mgr/ml. Différentes dilutions de ce RAB ont été essayées (tableau 4). L'utilisation du RAB tel quel ou dilué 10 fois en tampon barbitalone (tampon dans lequel est suspendu le complément de cobaye) entraîne, après incubation, une lyse générale du tapis de glo-

Tableau 6.

Jour		concentration en cellules (10^6 /ml)	cell./ch.	PFC/ch.	ISC/ 10^6 MNC
5	T	17	109 000	41 et 34	344 ± 45.9
	PW	13	92 000	55 et 52	581 ± 23.3
6	T	3.3	36 000	9 et 7	222 ± 39.6
	PW	8.3	90 500	78 et 78	862 ± 0
7	T	7	89 000	30 et 28	325 ± 15.5
	PW	12	152 800	149	975

T = cellules témoins (non stimulées)

PW = cellules stimulées au pokeweed

seules les cellules vivantes sont comptées avant d'estimer le nombre mis dans chaque chambre

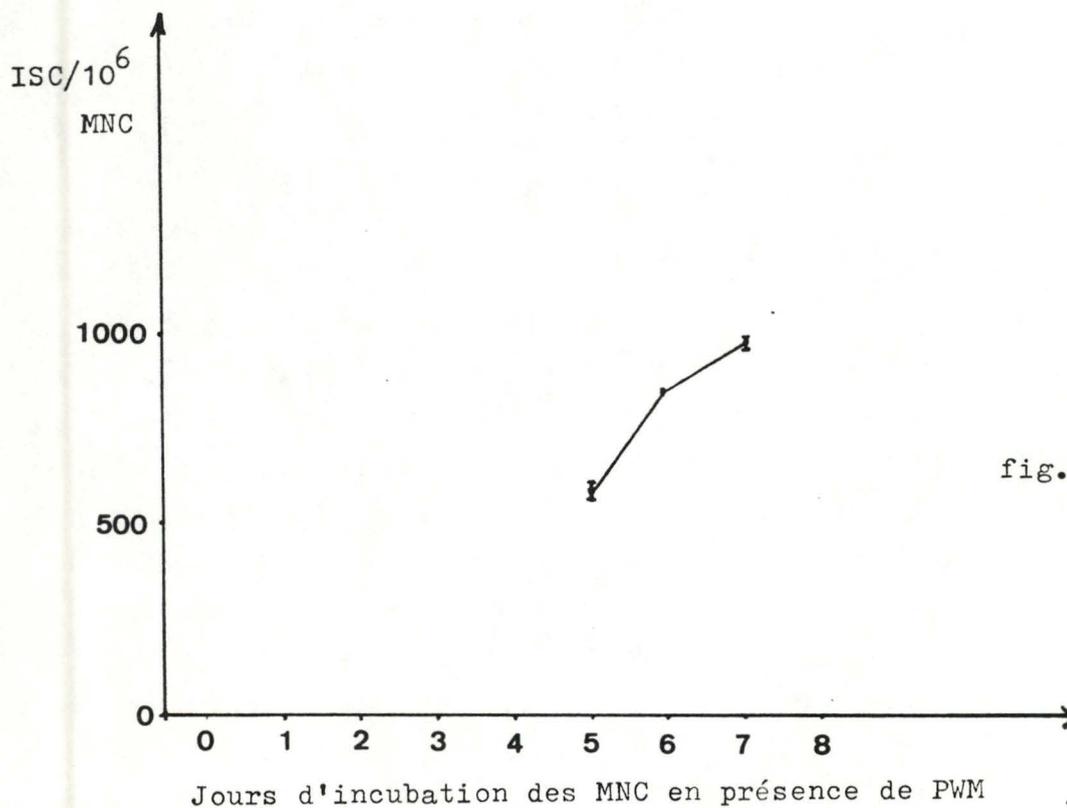


fig. 35.

ISC = immunoglobulin secreting cells

MNC = mononuclear cells

Tableau 7.

Jour		concentration en cellules (10^6 /ml)	cell./ch.	PFC/ch.	ISC/ 10^6 MNC
1	T	20	291 000	/	/
	PW	12	174 545	/	/
2	T	11.2	162 909	113 et 93	632 ± 86.3
	PW	12	174 545	129 et 127	733 ± 8.5
3		/	/	/	/
4		/	/	/	/
5		/	/	/	/
6		/	/	/	/
7	T	3.3	42 000	67-74-76-67	1690 ± 111.4
	PW	5.4	68 727	193-213-119	2546 ± 720.6
8	T	3	43636	100 et 85	2119 ± 243.2
	PW	2.5	36 363	190 et 213	5541 ± 446.9
9	T	2	29 090	64 et 58	2096 ± 146.4
	PW	4.5	65 454	148 et 104	1925 ± 475.2

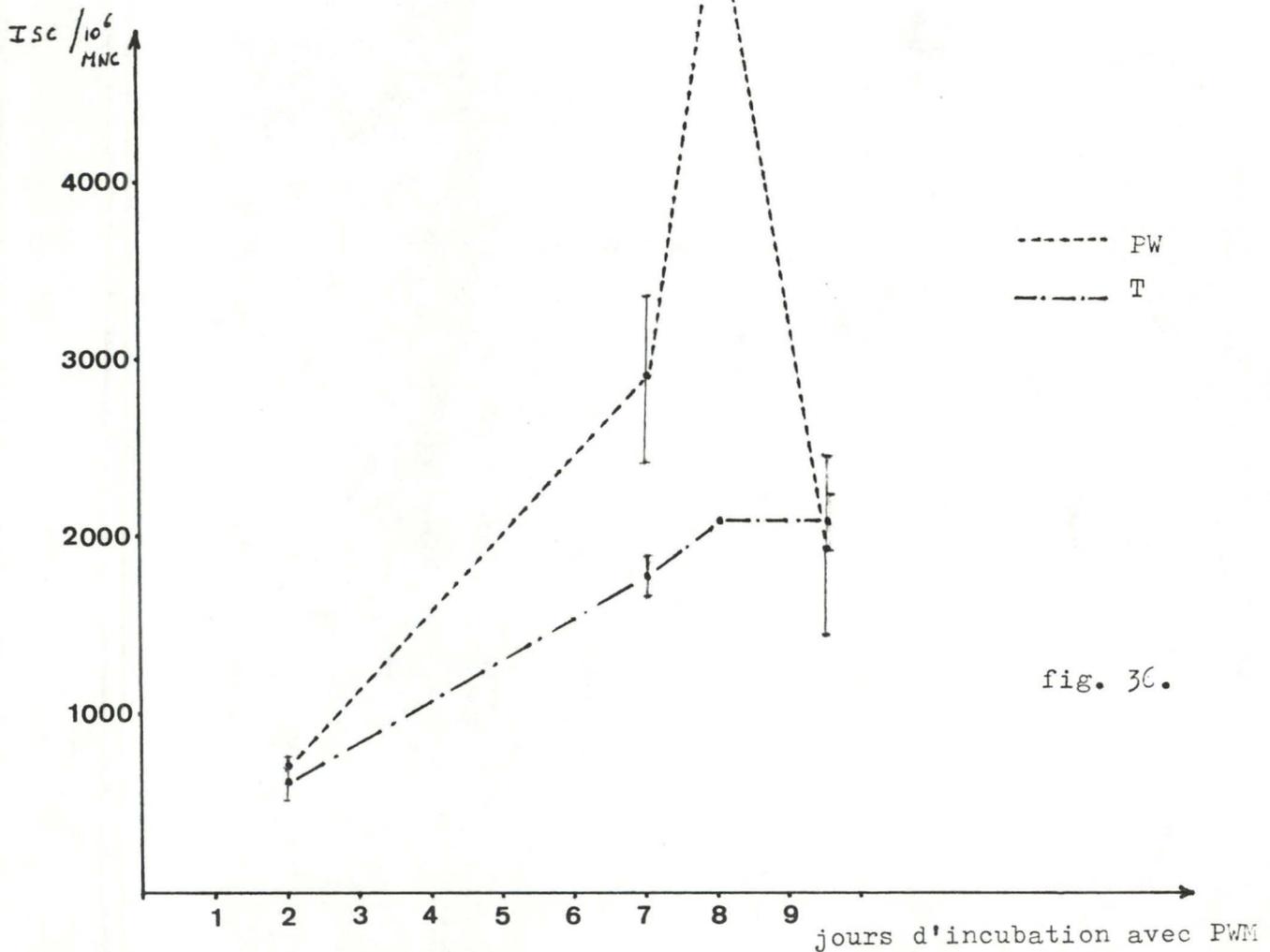


fig. 3C.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

bules rouges qui de ce fait est trop peu dense pour que le comptage soit possible. Les résultats les plus intéressants sont obtenus pour les dilutions 1/100 et 1/500. Nous avons recommencé un test avec ces dilutions sur les cellules du sang d'un autre animal également prélevées le jour même. Ceci pour utiliser, dans les tests qui vont suivre, la meilleure dilution du RAB (tableau 5). A la comparaison des deux tableaux, on remarque les nettes différences qui peuvent exister d'un animal à l'autre dans la proportion de cellules immunosécrétantes; et cela dans les mêmes conditions de réalisation du test. Suite à ces résultats, nous retenons la dilution 1/100 du RAB lors des expériences suivantes.

3.2. Cinétique de la production d'immunoglobulines

Des travaux réalisés sur cellules humaines (Egeland et al 1982) renseignent un optimum dans la proportion des cellules sécrétrices d'immunoglobulines (ISC) après 7 jours d'incubation des cellules mononucléées en présence de Poke weed mitogen (PWM).

L'addition du PWM dans les flacons de culture provoque la multiplication polyclonale des lymphocytes B induisant de ce fait une synthèse immunoglobulinique. Nous cherchons à quantifier la proportion de cellules sécrétrices d'anticorps et à suivre son évolution sur plusieurs jours.

Nous avons mis des cellules en culture pour démontrer cette cinétique de production d'anticorps. Trois flacons de 10 ml de RPMI 1640 sont incubés avec des cellules suspendues à 4.10^6 /ml et stimulées avec du PWM 5 μ l/ml. Les tests PFC ont été réalisés après 5, 6 et 7 jours d'incubation (fig. 35 et tableau).

Le nombre de cellules immunosécrétantes augmente bien jusqu'au jour 7 comme prévu mais cependant, pas d'une manière très frappante. De plus, nous ignorons ce qu'il se produirait au delà de ce septième jour.

Comme nous n'avons pas pu obtenir un cinétique complète, nous relançons une culture en préparant un plus grand nombre de flacons afin de suivre la variation des PFC sur un temps plus long (fig. 36 et tableau).

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Le graphique représente le nombre de cellules sécrétrices d'immunoglobulines en fonction des jours d'incubation des MNC stimulés au PWM. Il indique un optimum dans la proportion d'ISC au jour 8. De nombreux résultats sont manquants; ceci est dû aux problèmes rencontrés lors de l'utilisation de la technique des PFC. En effet, dans les mêmes conditions de température, de concentration en RAB, de concentration en cellules, et de lot de complément, la méthode peut une fois donner de très jolies plages de lyse sur un tapis de globules rouges bien uniforme, tout comme elle peut très bien également occasionner une lyse totale des érythrocytes de mouton.

Ainsi, soit la technique marche, soit elle ne marche pas. Mais quand les plages de lyse apparaissent clairement sur un fond homogène de globules rouges, la méthode des PFC est faible comme le montrent les résultats du tableau pour des tests réalisés en double, triple ou quadruple.

Nous avons tenter d'éclairer la situation face à ce problème d'hémolyse générale; rappelons que pour la réalisation de PFC, les éléments suivants doivent être mis en présence :

- globules rouges de mouton couplés à un monoclonal anti-Ig bovines (50 μ l)
- complément (sérum frais de Cobaye en tampon Barbitone) (10 μ l)
- cellules mononucléées bovines (40 μ l)
- Rabbit anti-bovin 1/100 en tampon Barbitone (10 μ l)

Plusieurs combinaisons de ces éléments mis en présence l'un de l'autre ont été essayées sans parvenir à isoler celui responsable de la lyse.

Remarque : Indépendamment des problèmes qui viennent d'être soulevés, il faut émettre une réserve quant aux résultats obtenus par PFC sur une dizaine de jours. Ainsi, ces derniers peuvent être légèrement faussés, et principalement en fin de parcours, dans la mesure où le lot de globules rouges marqués reste le même de jour en jour. De ce fait, alors que nous tentons

R E S U L T A T S E T M E T H O D E S

la démonstration d'une cinétique positive de la part des cellules bovines, les globules rouges, eux, vieillissent et interfèrent notre projet en suivant une cinétique négative.

C'est ces "vieux" globules rouges que nous rendons responsables de l'augmentation du nombre de PFC pour les cellules témoins non stimulées. En effet, s'il se fragilisent au cours du temps, leur lyse est rendue plus facile. L'idéal serait de soustraire le nombre de plages comptées pour les témoins du nombre compté pour les cellules stimulées afin de mettre en évidence celles qui sont uniquement induites par la stimulation.

Malgré cela, nous ne pouvons pas chaque jour faire le test avec des nouveaux globules rouges puisque, pour une même technique, la proportion de SRBC marqués est variable d'un couplage à l'autre. Or, nous devons respecter au maximum les mêmes conditions de réalisation des tests pour pouvoir en comparer les résultats.

Mis à part les ennuis imprévisibles et inexplicables d'hémolyse générale qui parfois surviennent, les résultats de la cinétique établie sont intéressants. Les conditions du test PFC semblent donc être au point et nous pourrions utiliser cette technique en parallèle avec l'autre méthode de détection d'anticorps : l'ELISA.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

II. DEUXIEME PHASE DU TRAVAIL

Remarque : L'animal immunisé (cfr I. § 2) n'étant plus disponible, nous ne pouvons pas continuer l'étude entreprise au départ de ses cellules sanguines. Nous sommes donc contraints de reprendre à zéro la démarche d'immunisation sur un nouvel animal : HARDIE, génisse de 6 mois.

Ceci ne nous avantage pas point de vue temps puisque nous sommes désormais dépendants de l'installation de la réponse immunitaire et de ses fluctuations faisant suite aux injections successives.

Le point positif que l'on retient de cette obligation est que nous allons repartir avec du matériel sûr, dont nous connaissons parfaitement les conditions d'immunisation. Ce n'était pas vrai pour le cas précédent, et poursuivre sur cette voie n'aurait pas été en faveur de notre objectif d'établissement d'un test reproductible.

Toutes les expériences dont il va être question dans cette partie, constituent une étude réalisée sur les cellules du seul animal qui vient d'être présenté.

1. Immunisation primaire in vitro

1.1. Mise en culture

Des derniers tests réalisés (cfr § 2.3.), il ressort que les cellules suspendues à 2.10^5 et 5.10^5 par puits donnent des meilleurs résultats et que ceux-ci semblent marquer un optimum dans la production des anticorps pour une stimulation au DNP-KLH ou DNP-7C7 à raison de 50 et $100 \mu\text{g/ml}$. Ces conditions de culture sont donc appliquées aux cellules mononucléées isolées de 150 ml de sang prélevés avant de réaliser la première injection de DNP-KLH.

Les cellules sont distribuées en boîtes de culture suivant ce modèle :

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

(= tests en quintuplets).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Témoin											
C	50 μ S / ml											
D	100 μ S / ml											
E	Témoin + IL ₂											
F	50 μ S / ml + IL ₂											
G	100 μ S / ml + IL ₂											
H												
	2.10 ⁵ cellules / puits						5.10 ⁵ cellules / puits					

Trois boîtes de ce type sont préparées avec du DNP-7C7 et trois autres avec du DNP-KLH (soit : 3 séries à tester à des jours différents).

Le plan de travail poursuivi est résumé dans le tableau ci-dessous :

- Jour 1 (J₁) : récolte de sang et mise en culture des cellules avec antigène et IL₂ s'il y a lieu.
- J₃ : deuxième apport d'IL₂ (50 μ l/puits).
- J₆ : lavage des cellules après 5 jours de culture en présence d'Ag + troisième apport d'IL₂.
- J₈ : quatrième apport d'IL₂.
- J₁₀ : prélèvement des surnageants et ELISA au dixième jour de culture. (1ère série)
- J₁₃ : prélèvement des surnageants et ELISA (2ème série).

		10 ^{ème} jour de culture			
		2.10 ⁵ cell./p	5.10 ⁵ cell./p	sérum positif	
<u>DNP-7C7</u>	T	-77.25 ± 18.2	-	1806	
	50 µg/ml	-64.8 ± 33.3	-56.75 ± 22.8	1548	
	100	-0.2 ± 27.8	25.6 ± 45.9	1039	
	+I ₂	T	-31.2 ± 37.1	-6.2 ± 33.6	559
		50	-52 ± -	-77 ± -	279
		100	-58.2 ± 53.1	-46.3 ± 21.9	169
	Blancs				280
	= -65.9 ± 52.7				80
	<u>DNP-KLH</u>	T	-33.5 ± 58.7	-73.7 ± 29.1	sérum positif
		50 µg/ml	-22.8 ± 45.2	17.2 ± 34.5	1837
100		-43.8 ± 36.8	-16.2 ± 51	1464	
+I ₂		T	179.8 ± 178.6	62.2 ± 60.9	1079
		50	-33.3 ± 39.3	-43.5 ± 39.9	472
		100	-50.8 ± 41.3	-27.5 ± 30.6	453
Blancs				179	
= -48.7 ± 67.3				259	
				135	

Tableau 8. (ABS lue à 405 nm X 10⁻³)

		<u>13^{ème} jour de culture</u>		sérum positif
		2.10 ⁵ cell./P	5.10 ⁵ cell./P	
<u>DNP-7C7</u>	T	-50.6 ± 60.4	-93 ± -	1928
	50 ^{µg/ml} 53	± 36.1	-71 ± 31.1	1548
	100	-26.6 ± 18.2	33.4 ± 52.6	1095
	T	- 2.2 ± 21.6	-45.6 ± 15.4	454
+IL ₂	50	-93 ± -	-87 ± 8.7	160
	100	-47.2 ± 31.2	-50.4 ± 17.4	15:
	Blancs	= -43.8 ± 59.5		40
				-13
				sérum positif
				over
<u>DNP-KLH</u>	T	88.4 ± 41.6	37 ± 8.2	1893
	50 ^{µg/ml}	15.6 ± 13.9	41 ± 13	1324
	100	48.8 ± 21	60.4 ± 31.2	675
	T	171.8 ± 54.5	132.6 ± 50.3	353
+IL ₂	50	70.6 ± 46.2	98.6 ± 56.7	248
	100	103 ± 19.4	106.4 ± 51.6	155
	Blancs	= 46.4 ± 53.3		66

Tableau 9. (ABS lue à 405 nm X 10³)

13^{ème} jour de culture (Elisa sur boîte rigide Nunc)

	210 ⁵ cell./p	5.10 ⁵ cell./p	1136
<u>DNP-7C7</u>	T 15 ± 6.8	15.5 ± 3.7	681
	50 μ g/ml 7.8 ± 11.1	10 ± 8.6	368
	100 10.6 ± 3.2	8.4 ± 2.4	221
+IL ₂	T 23.6 ± 4.8	17.8 ± 8.6	67
	50 1.2 ± 10.9	7 ± 8.9	50
	100 3.4 ± 10.1	6.8 ± 5.2	38
	Blancs = 18.3 ± 17.8		48

sérum positif

Tableau 10. (ABS lue à 405 nm X 10⁻³)

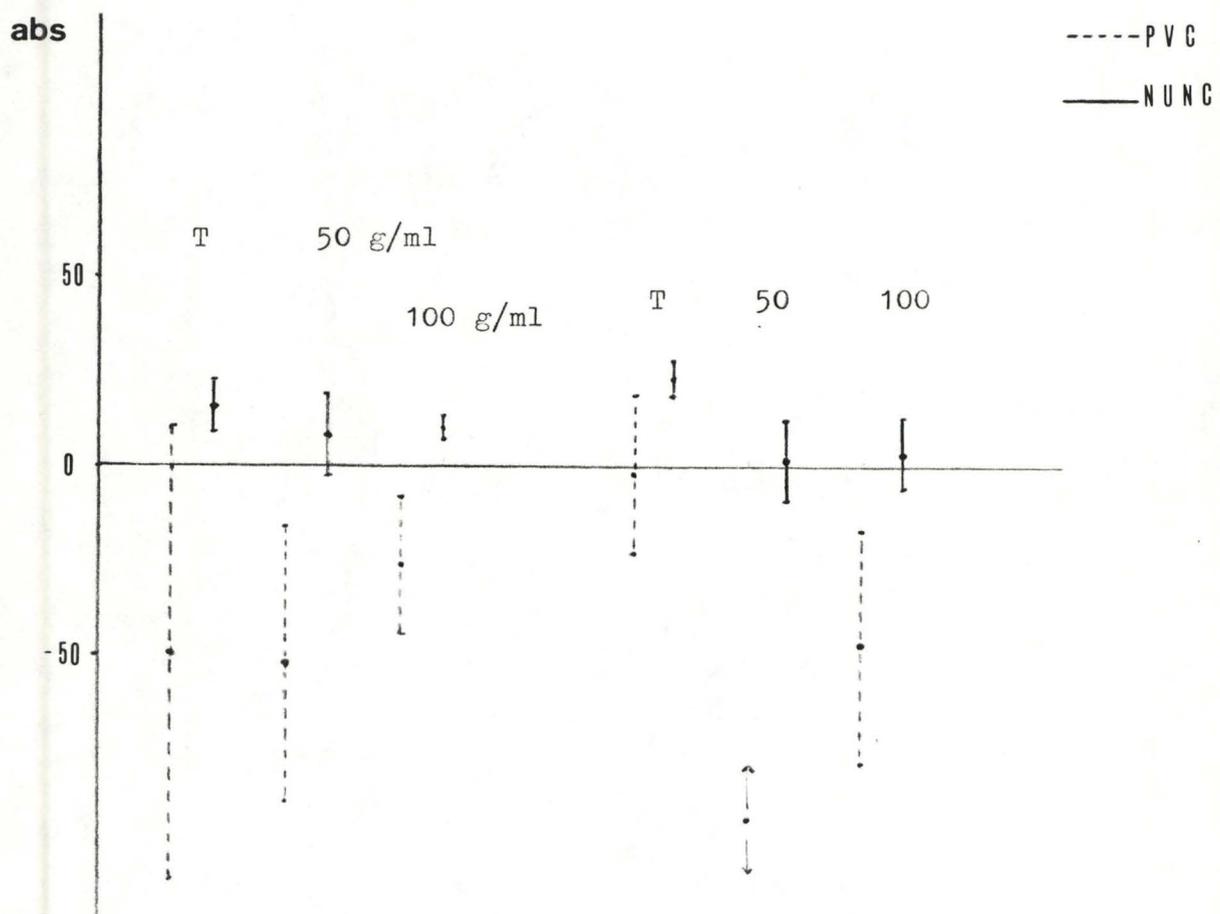


fig. 37. (pour 2 10⁵ cell./puits)

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

La troisième série est gardée en vue de restimulation antigénique in vitro. Pour ce faire, les boîtes sont maintenues à l'étuve pour une culture de 5 jours comme dans les autres cas, mais au terme de cette première phase, les cellules ne sont pas lavées afin d'enlever l'antigène. Au contraire, après une centrifugation de 10 Minutes à 200 g pour sédimenter les cellules, 150 μ l de surnageant sont prélevés dans chaque puits et remplacés par 100 μ l de milieu RPMI 1640 frais avec Ag. Cette deuxième stimulation in vitro tient lieu de rappel en vue d'augmenter le taux d'anticorps produits.

1.2. Résultats

L'ELISA a été réalisé suivant le dernier protocole proposé, mis à part que le LH4-Peroxydase est laissé une heure à 37°C.

Les tableaux présentés ci-contre reprennent les moyennes avec écarts-type des valeurs d'absorbance lues au lecteur de plaque ELISA pour des surnageants de culture testés au dixième et au treizième jour. Il s'agit de moyennes de quintuplets dont les valeurs n'étaient pas répétitives (comme l'indiquent les écarts-type).

Nous attribuons cette variabilité des valeurs d'absorbance obtenues aux lavages en PBS qui ont lieu entre les étapes successives de l'ELISA et qui peut-être n'agissent pas avec la même efficacité dans chaque puits de la plaque PVC. Par contre, la décroissance d'absorbance correspond toujours bien à la croissance des dilutions du sérum positif bien que l'on constate des irrégularités dans la gradation des valeurs qui pourraient confirmer un mauvais lavage des plaques.

On ne peut rien conclure quant à l'influence de trois jours de culture supplémentaires sur la production d'anticorps et la comparaison des tableaux ne fait pas non plus ressortir une quelconque influence de l'IL₂. Il importe peu de s'attarder sur le fait que les valeurs soient toutes positives ou négatives; ce qui nous intéresse, c'est de pouvoir comparer les valeurs obtenues pour les tests aux valeurs témoins. Or il se fait que, sans raisons apparentes, ces derniers sont presque toujours supérieurs. Ainsi, devant ces valeurs parfois plus élevées pour les puits témoins, on ne peut conclure à une production d'anti-

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

corps pour les autres puits.

Puisque nous remettons en question l'efficacité des lavages à la main, le test des surnageants de culture au DNP-7C7 a été réalisé en double.

Pour ce deuxième essai, nous avons utilisé le dispositif du "cell-Harvester" pour laver la plaque avant chaque addition d'un nouvel élément. Ce dispositif respecte le principe d'un laveur ELISA qui est d'envoyer du tampon PBS avec la même force dans chaque puits, évitant aussi les propulsions de microgouttes de puits en puits. Notons de plus que cette fois-ci, l'ELISA est réalisé sur une plaque différente de celles en PVC flexibles utilisés jusqu'ici. Ces nouvelles plaques (Nunc) sont rigides et possèdent une plus haute capacité de liaison par unité de surface.

Les résultats obtenus pour cet "essai particulier" sont beaucoup plus parlant au niveau des quintuplets, qui sont plus homogènes, mais ne signalent toujours pas une éventuelle production d'anticorps si on compare les valeurs-tests aux valeurs-témoins, ou même aux blancs (tableau 40).

Le graphique de la figure 37 reflète bien l'avantage de l'utilisation de ces nouvelles plaques ELISA.

NOTE : Il a été question d'effectuer des essais de restimulation des cellules après 5 jours de culture. Ces expériences n'ont pu être menées à bien suite à des contaminations.

2. Immunisation secondaire in vitro

2.1. Quinze jours après la première injection de DNP-KLH

Des expériences de cultures cellulaires sont remises en route deux semaines après que nous ayons injecté "Hardie" avec 8 mgr de DNP-KLH en adjuvant de Freund incomplet. Après ce délai, la réponse en anticorps devrait être au maximum de production (= phase de plateau dans la dynamique de la réponse : cfr

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Introduction : § 4.4.3.)

La distribution de cellules en micorplaques à 96 puits se fait suivant le schéma présenté au § 1.1. avec les mêmes concentrations de DNP-KLH ou DNP-7C7 : 50 ou 100 μ g/ml. Les temps de culture avec et sans antigène restent également les mêmes : 5 jours en présence de DNP-KLH ou DNP-7C7 et 4 jours sans, avec récolte des surnageants au dixième jour.

2.1.1. Elisa

Le protocole de l'ELISA suivi est le même que celui présenté dans l'expérience précédente :

- DNP-OVA 1 nuit à 4°C
- PBS-OVA 2 heures à 37°C
- et surnageants de culture 2 heures à 37°C (contenant le 1er Ac).

Cependant, le deuxième anticorps utilisé dans ce cas est le 1C8, peroxydase qui détecte les IgG produites en plus grande quantité lors d'une réponse secondaire.

Le DNP-OVA adsorbé au fond des puits a été essayé à deux concentrations différentes sur une même plaque : 50 μ g/ml et 1 mg/ml selon ce modèle :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	DNP-OVA 1mg/ml	DNP-OVA 50 g/ml	Sérum positif
<u>DNP-KLH</u>	Blancs : -9.36 ± 5.54		
- $2 \cdot 10^5$ cell./p	T 14.5 ± 2.1	8 ± 1	799
	50 μ g/ml 20.5 ± 12	8 ± 3	558
	100 μ g/ml 6.5 ± 4.9	6.3 ± 3.2	433
avec IL ₂	T -10 ± 0	-11.7 ± 0.6	294
	50 μ g/ml -6.5 ± 0.7	-6 ± 1	131
	100 μ g/ml -0.5 ± 3.5	-5 ± 0	45
			14
- $5 \cdot 10^5$ cell./p	T 16.5 ± 0.7	16 ± 6	4
	50 μ g/ml 9.5 ± 4.9	19 ± 5.6	
	100 μ g/ml -2 ± 9.9	11.3 ± 1.2	
avec IL ₂	T -2.5 ± 0.7	-4.3 ± 0.5	
	50 μ g/ml -9.5 ± 10.6	-4.3 ± 2.5	
	100 μ g/ml -1.5 ± 2.1	-2 ± 1	
<hr/>			
<u>DNP-7C7</u>	Blancs : -3 ± 4.1		
- $2 \cdot 10^5$ cell./p	T 6.5 ± 6.4	7.3 ± 2.9	353
	50 μ g/ml 2.5 ± 2.1	3.7 ± 0.6	361
	100 μ g/ml -3.5 ± 0.7	4.7 ± 4.6	375
avec IL ₂	T -2 ± 2.8	-3 ± 3.6	228
	50 μ g/ml 4 ± 2.8	0.7 ± 3.5	120
	100 μ g/ml 14 ± 19.6	3.3 ± 2.5	62
			35
- $5 \cdot 10^5$ cell./p	T 21 ± 1.4	19.7 ± 8.3	19
	50 μ g/ml 3.5 ± 4.9	3.7 ± 0.6	
	100 μ g/ml 0.5 ± 0.7	0.3 ± 2.1	
avec IL ₂	T -0.5 ± 2.1	2 ± 2.6	
	50 μ g/ml -0.5 ± 2.1	2 ± 0	
	100 μ g/ml -5 ± 7.1	3.3 ± 4.2	

(absorbances lues à 405 nm)
AFS $\times 10^3$

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

- A = DNP-OVA 1 mg/ml : duplicate
 B = DNP-OVA 50 μ g/ml : triplicate

Deux boîtes sont ainsi préparées : l'une testant les surnageants d'une culture de cellules stimulées au DNP-7C7 et l'autre ceux d'une culture au DNP-KLH.

Remarque : - tous les lavages entre chaque phase du test ELISA sont effectués au Cell-Harvester.

- le PBS jusqu'ici constituant les "blancs" est remplacé par du RPMI 1640, ce qui nous permettra de mieux comparer les résultats des puits extérieurs par rapport aux valeurs obtenues pour les surnageants de culture puisque ceux-ci résultent d'une culture de cellules dans ce même milieu.

2.1.2. Résultats

Les tableaux présentent les moyennes et écarts-type des valeurs d'absorbance lues après test ELISA des surnageants de culture. Le test se révèle un peu meilleur que ceux réalisés jusqu'ici dans le sens où cette fois, les blancs ont des valeurs plus faibles. Les absorbances obtenues pour les puits internes restent basses et, que ce soit pour des cultures stimulées au DNP-7C7 ou au DNP-KLH, on ne peut pas non plus conclure à un effet de l'utilisation du DNP-OVA à une concentration plus élevée. A ce propos, on connaît la concentration à laquelle on trouve le DNP-OVA que l'on dépose dans les puits, mais on ne peut pas vérifier la quantité qui se fixe réellement dans le fond. Peut-être est-elle sensiblement la même pour les deux concentrations utilisées puisque l'on devrait normalement déjà se trouver dans une situation d'excès avec 50 μ g/ml.

Nous nous attendions à une réponse plus marquée dans cette situation de rappel in vitro. Notons que le sérum de "Hardie" est positif à l'ELISA, prouvant que l'animal

tableau 11

	[] en cellules (10 ⁶ /ml)	nombre de cellules par chambre	PFC/chambre	ISC/10 ⁶ MNC
. Cellules Témoins	13.5	171 818	23 et 18	119 ± 20
. Cellules stimulées avec 50 µg DNP-KLH/ml	11.5	146 363	20 et 15	119 ± 25
. Cellules stimulées avec 50 µg DNP-KLH/ml + IL ₂	10.6	134 909	14.9.12 et 18	98 ± 28

tableau 12

Jours	5	6	7	8	9
<u>ISC/10⁶ MNC (1)</u>					
- cellules témoins	158	121	125	/	/
- cellules stimulées au DNP-KLH	153	112	228	/	/
<u>Rosettes (2)</u>					
- cellules témoins	25	27	22	21	
- cellules stimulées au DNP-KLH	42	43	38	42	

(1) Nombre de cellules sécrétrices d'Immunoglobulines par million de cellules mononucléées (MNC)

(2) Cellules formant des rosettes /10² MNC.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

répond bien au DNP-KLH que nous lui avons injecté.

Afin de vérifier l'efficacité de la stimulation des cellules avec l'antigène en micropuits, nous prélevons ces dernières hors d'un puits témoin, un puits où elles ont été stimulées avec 50 g/ml de DNP-KLH et un autre où il y a eu apport d'IL₂ en plus des 50 g/ml de DNP-KLH. Ces cellules sont lavées, comptées et testées en PFC alors qu'elles ont 10 jours de culture (tableau 11).

Les cellules proviennent du même animal, les tests sont réalisés le même jour et dans les mêmes conditions. Les résultats peuvent donc être comparés mais on ne constate pas de différences marquées entre ces derniers. Ceci peut peut-être expliquer que nous n'ayons pas encore pu observer de différences entre les surnageants de cellules témoins et les surnageants de cellules stimulées.

2.2. Trente-cinq jours après la première injection

Nous recommençons l'expérience au moment d'injecter l'animal pour la deuxième fois. En plus des cellules mises en culture en micropuits, d'autres sont cultivées en flacons dans le but de les tester par PFC. Lors de ces cultures les cellules sont suspendues à raison de $4 \cdot 10^6$ par ml dans 10 ml de RPMI contenant du DNP-KLH en concentration intermédiaire à celles appliquées aux cultures en micropuits, soit 75 µg/ml. Plusieurs flacons sont ainsi préparés, de même qu'une série de flacons témoins (sans antigène) en vue d'établir une cinétique de la blastogénèse antigéno-spécifique induite par l'adjonction de DNP-KLH et mesurée par PFC.

2.2.1. PFC

Nous avons ainsi pu suivre l'évolution de la proportion d'ISC du jour 5 au jour 7 (tableau 12). Les essais pour les jours 8 et 9 n'ont rien donné comme résultat pour les raisons de lyse totale déjà évoquées. On note cependant l'augmentation qui s'est produite du jour 6 au jour 7. Peut-être le début d'un pic qu'il ne nous a pas été possible de démontrer.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Afin de ne pas remettre en cause le couplage des globules rouges au 3B8, nous avons, au cours des mêmes jours, réalisé des tests de rosettes. Ces dernières se forment autour des cellules bovines porteuses d'immunoglobulines en surface par réaction avec l'anti-Ig Bovines dont les SRBC sont couverts.

Pour observer ces rosettes, des globules rouges de mouton couplés au 3B8 suspendus à 2 % dans du PBS doivent être mis en contact avec des cellules bovines (3.10^6 /ml). Le mélange est réalisé volume pour volume de chaque composant et maintenu une nuit à 4°C. L'observation se fait au microscope à fluorescence après avoir resuspendu délicatement cellules et globules rouges dans un même volume d'une solution de Bromure d'Ethidium - Acridine orange. Seules les cellules vivantes formant des rosettes sont comptées.

Les résultats obtenus indiquent une plus grande proportion de cellules porteuses d'immunoglobulines lorsqu'elles sont stimulées, mais aucune variation n'est constatée au cours du temps.

2.2.2. Elisa

Pour tester les surnageants des cultures en micropuits réalisés suivant le schéma ci-dessous, nous avons préparé des plaques Elisa (Nunc) en essayant le DNP-OVA dilué en tampon carbonate 0.1 M pH 9.6 (Demeur and Vaeck 1983) pour le comparer à la dilution en PBS. (Nous sommes revenus à une concentration en DNP-OVA de 50 μ g/ml puisque nous n'avons pas constaté d'amélioration à l'utilisation d'une concentration supérieure. L'adjonction d'IL₂ a également été abandonnée).

RESULTATS ET DISCUSSION

Schéma de la mise en culture :

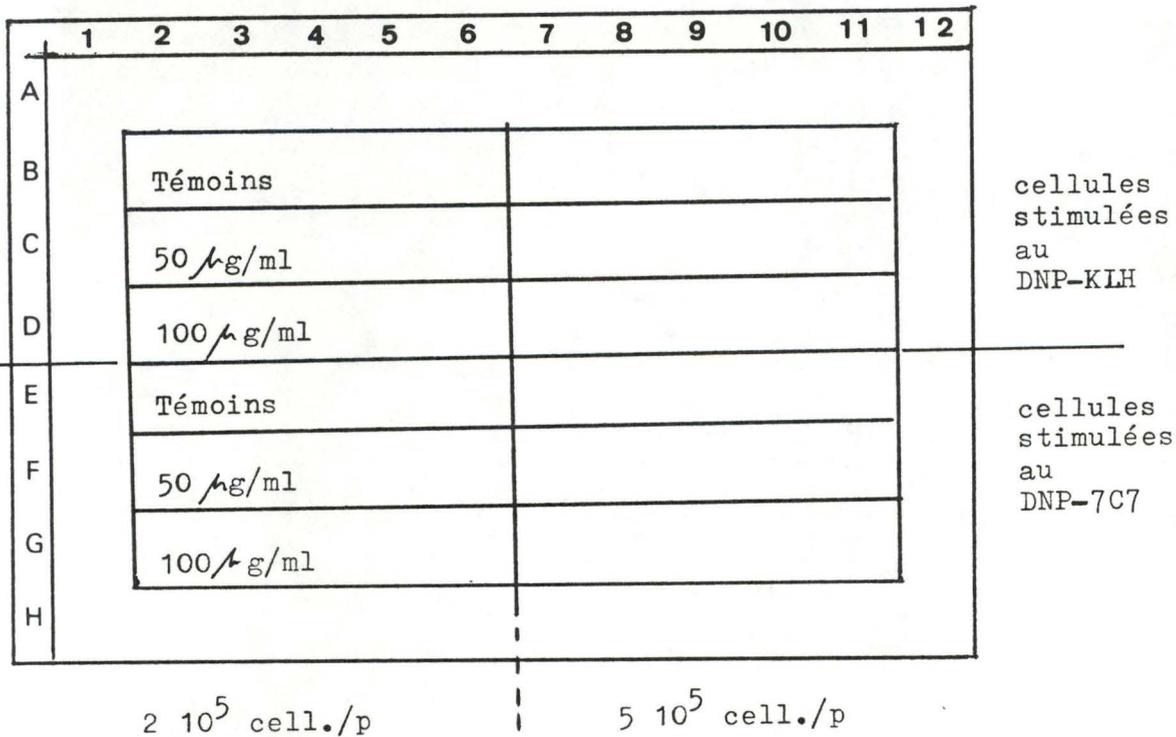
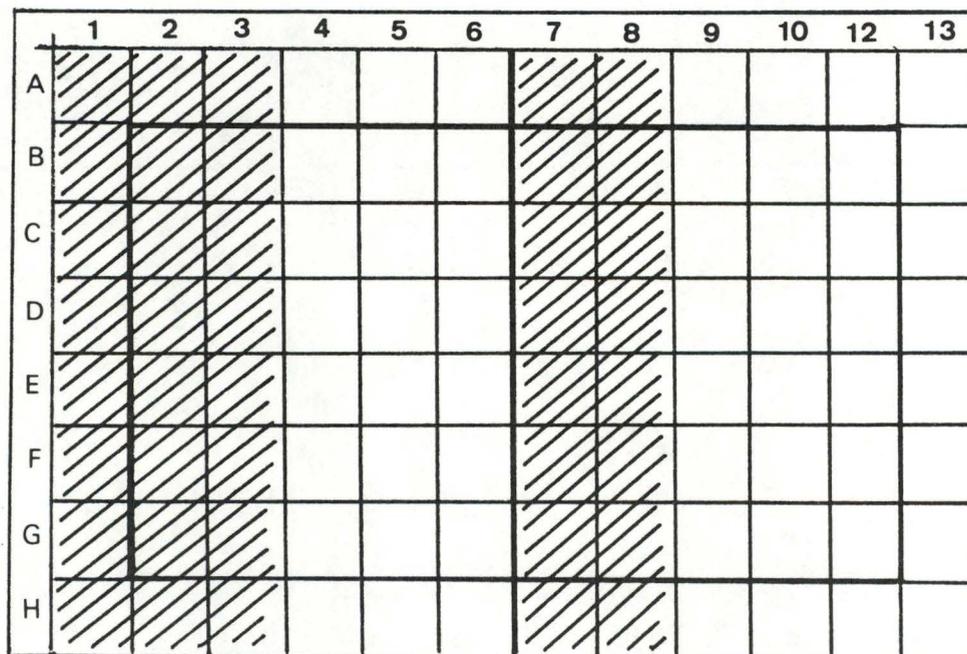


Schéma de la plaque Elisa :



▨ DNP-OVA 50 µg/ml en PBS
 □ DNP-OVA 50 µg/ml en tampon Carbonate

	DNP-OVA en tampon carbonate	DNP-OVA en tampon PBS	Sérum positif
<u>DNP-KLH</u>	Blancs : 75.3 ± 5.5	58.7 ± 18.8	458
2 10 ⁵ cell./p	T 49.5 ± 3.5	40.3 ± 6.4	353
	50 µg/ml 50.5 ± 13.4	41.7 ± 10	258
	100 µg/ml 40 ± 8.5	31 ± 2	148
5 10 ⁵ cell./p	T 38.3 ± 0.6	38 ± 8.5	104
	50 µg/ml 53 ± 3.6	46.5 ± 2.1	83
	100 µg/ml 38.6 ± 2.5	32 ± 0	74
—————			
<u>DNP-7C7</u>			
2 10 ⁵ cell./p	T 44.7 ± 1.5	57.5 ± 12	
	50 µg/ml 40.3 ± 4	48 ± 14	
	100 µg/ml 45 ± 5.6	44 ± 8.5	
5 10 ⁵ cell./p	T 42 ± 2	50 ± 9.9	
	50 µg/ml 36.7 ± 4	43 ± 9.9	
	100 µg/ml 42 ± 1.7	47.5 ± 3.5	

Tableau 13. moyennes des absorbances (lues à 405 nm)
 $\times 10^3$
pour des surnageants
testés au 10^{ème} jour de culture

- N.B. - tests en triplicates pour le tampon carbonate
- tests en duplicates pour le tampon PBS
- T = cellules témoins : non stimulées

	DNP-OVA en tampon carbonate	DNP-OVA en tampon PBS	Sérum positif	
<u>DNP-KLH</u>	Blancs :	108.5 ± 30.3	73.2 ± 12.2	777
2 10 ⁵ cell./p	T	56.7 ± 3.2	69.5 ± 0.7	619
	50 μg/ml	61.3 ± 2.1	55.5 ± 2.1	576
	100 μg/ml	55.3 ± 12	77.5 ± 20.5	273
				176
5 10 ⁵ cell./p	T	98.5 ± 88.4	57 ± 3	129
	50 μg/ml	67 ± 21.2	60.7 ± 5	91
	100 μg/ml	51 ± 18.4	57.3 ± 11.9	91
<hr/>				
<u>DNP-7C7</u>				
2 10 ⁵ cell./p	T	77.7 ± 24.7	87 ± 1.4	
	50 μg/ml	65 ± 10.6	72.5 ± 23.3	
	100 μg/ml	73.6 ± 1.2	67 ± 2.8	
5 10 ⁵ cell./p	T	49.3 ± 3.2	103 ± 83.4	
	50 μg/ml	63 ± 17.1	50 ± 8.5	
	100 μg/ml	61 ± 10.4	48.5 ± 2.1	

Tableau 14. moyennes des absorbances (lues à 492 nm x 10³)
pour des surnageants
testés au 13^{ème} jour de culture

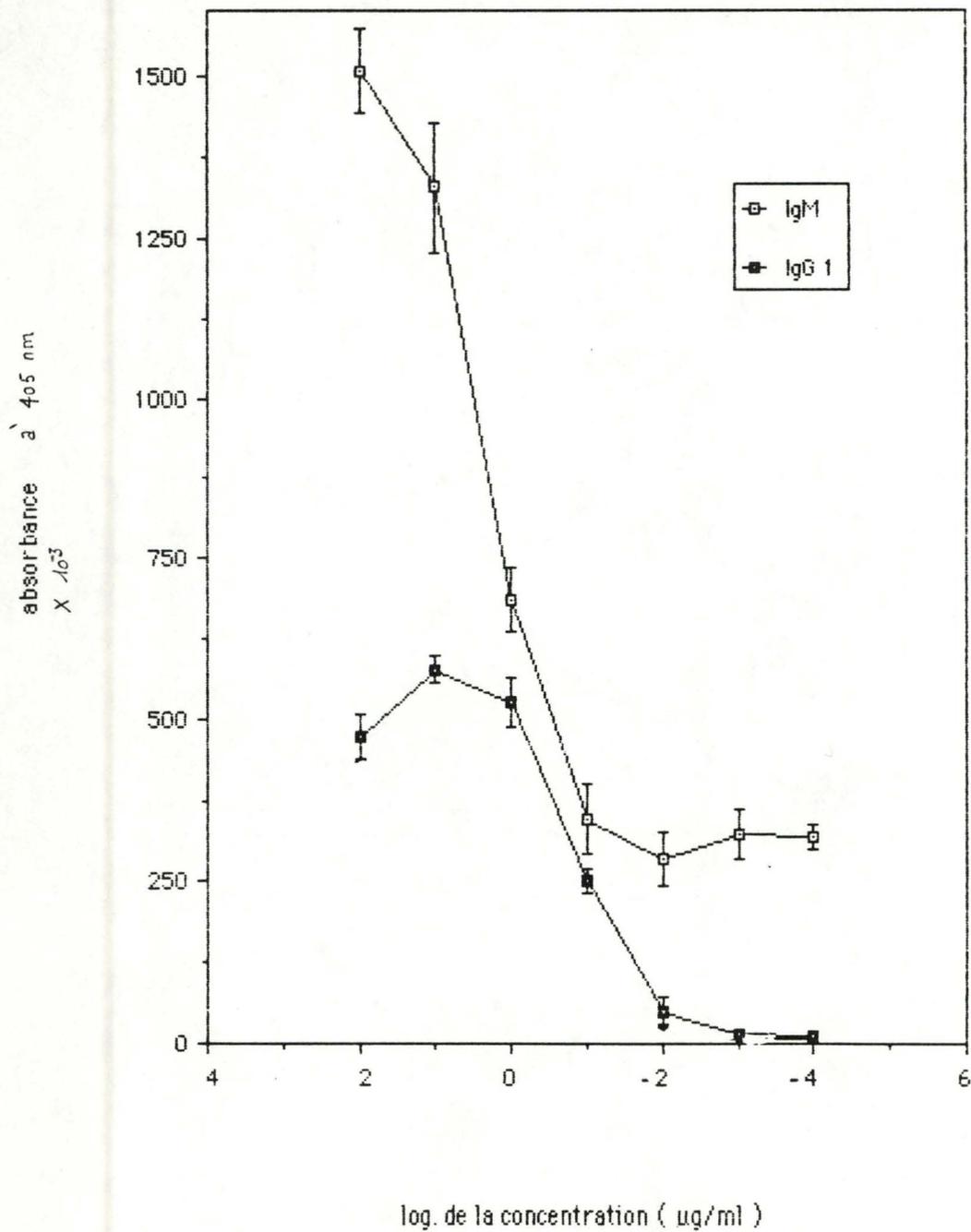


fig. 38.

Test de sensibilité des plaques

ELISA

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Aucune différence n'est apparente, que l'on ait utilisé du DNP-OVA en tampon carbonaté ou en PBS et rien non plus ne varie, que l'on ait prélevé les surnageants après 10 ou 13 jours de culture. (tableaux 13 et 14)

Devant le caractère une fois de plus négatif de l'expérience, nous avons vérifié jusqu'à quelle limite de concentration les anticorps sont détectables.

2.2.2.1. Sensibilité du test Elisa

Nous avons utilisé la méthode de l'Elisa en sandwich pour déterminer jusqu'à quelle limite de concentration les anticorps peuvent encore être décelés.

Pour ce faire, une plaque (Nunc) est préparée avec du 3B8 absorbé dans le fonds des puits à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant une nuit à 4°C. Le 3B8 (anti-chaîne légère d'immunoglobuline bovine) va "capter" les immunoglobulines purifiées dont nous disposons quand nous les aurons déposées, à différentes dilutions, dans les puits de la plaque. Elles seront révélées par l'adjonction d'un deuxième anticorps couplé à la peroxydase.

Les immunoglobulines purifiées en question sont des IgM et des IgG₁. Nous connaissons leur concentration, et plusieurs dilutions ont été réalisées en tampon carbonate. Ces dernières sont incubées 2 heures à 37°C et la sensibilité du test est déterminée après l'addition d'1C8-Peroxydase pour les IgG₁ et 1H₄-Peroxydase pour les IgM.

Le graphique de la figure 38 représente l'absorbance en fonction des dilutions des Ac qui vont de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à 0,1 ng/ml (de 10 en 10). Il s'agit des moyennes avec écarts-type pour les test réalisés en quadruple.

Les résultats obtenus pour ce test de sensibilité indiquent que les anticorps sont encore

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

détectables pour des concentrations se situant entre 0,1 et 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Comme nous n'avons encore rien pu mettre en évidence dans les tests Elisa réalisés jusqu'ici, nous pouvons à présent apporter deux types de réponses :

- soit - nous n'avons pas eu production d'anticorps dans nos surnageants de culture,
- ou - des anticorps ont bien été produits mais ils ne se trouvent pas à une concentration suffisante pour être détectables.

Afin de vérifier laquelle de ces deux affirmations s'avère être la plus plausible, nous avons concentré des surnageants de culture pour les jours 6, 7, 8 et 9 après une stimulation antigénique au DNP-KLH ou au DNP-7C7. Un millilitre de chacun de ces surnageants a été ramené à 100 μl au moyen d'un centricon, mais aucune différence n'a pu être mise en évidence à l'Elisa entre les valeurs correspondant aux surnageants dilués et celles des surnageants concentrés.

S'il s'agit d'une absence totale d'anticorps dans nos surnageants, peut-être allons nous voir une différence pour des cultures cellulaires mises en route après une deuxième injection de DNP-KLH.

3. Deuxième rappel in vitro

3.1. Quinze jours après la deuxième injection

Des cellules sont mises en culture 15 jours après que l'animal ait subi une seconde injection. Les stimuler avec DNP-KLH et DNP-7C7 dans les micropuits constitue un rappel in vitro après immunisation secondaire in vivo. Les conditions de culture restent celles appliquées depuis le début de l'étude des cellules de cet animal; à savoir $5 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^5$ cellules par puits en présence de 50 ou 100 $\mu\text{g/ml}$, mais les boîtes utilisées ici possèdent des puits à fonds ronds gardant les cellules groupées

culture avec IL₂

Blancs : 4.9 ± 4.5

DNP-KLH

2 10 ⁵ cell./p	T	2.6 ± 1.9
	50	1.8 ± 3.0
	100	2.2 ± 5.9
5 10 ⁵ cell./p	T	4.8 ± 6.3
	50	1.4 ± 3.4
	100	5.8 ± 3.6

DNP-7C7

2 10 ⁵ cell./p	T	-1.2 ± 3.3
	50	3.0 ± 2.4
	100	7.6 ± 4.9
5 10 ⁵ cell./p	T	4.2 ± 5.9
	50	3.4 ± 2.9
	100	10.2 ± 3.3

Tableau 15.

culture sans IL₂

Blancs : 13.3 ± 13.1

	T	-1.8 ± 4.8
	50	-2 ± 4
	100	-2 ± 6.3
	T	11.2 ± 10.3
	50	8 ± 3.4
	100	9.2 ± 8.0

Tableau 16.

Moyennes et écarts-type des absorbances lues à 405 nm ($\times 10^3$) pour des surnageants de culture récoltés au 10^{ème} jour.

D'une part les cellules ont été stimulées au DNP-KLH et DNP-7C7 avec adjonction d'IL₂ tous les deux jours, et d'autre part sans IL₂.

T = cellules témoins (non stimulées)
 50 = cellules stimulées avec 50 µg/ml d'antigène
 100 = cellules stimulées avec 100 µg/ml d'antigène

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

au centre de chaque puits.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Témoins											
C	50 µg/ml											
D	100 µg/ml											
E	Témoins											
F	50 µg/ml											
G	100 µg/ml											
H												

cellules stimulées au DNP-KLH

cellules stimulées au DNP-7C7

$2 \cdot 10^5$ cell./p
 $5 \cdot 10^5$ cell./p

Deux boîtes sont ainsi préparées, l'une des deux reçoit de l'IL₂ tous les deux jours.

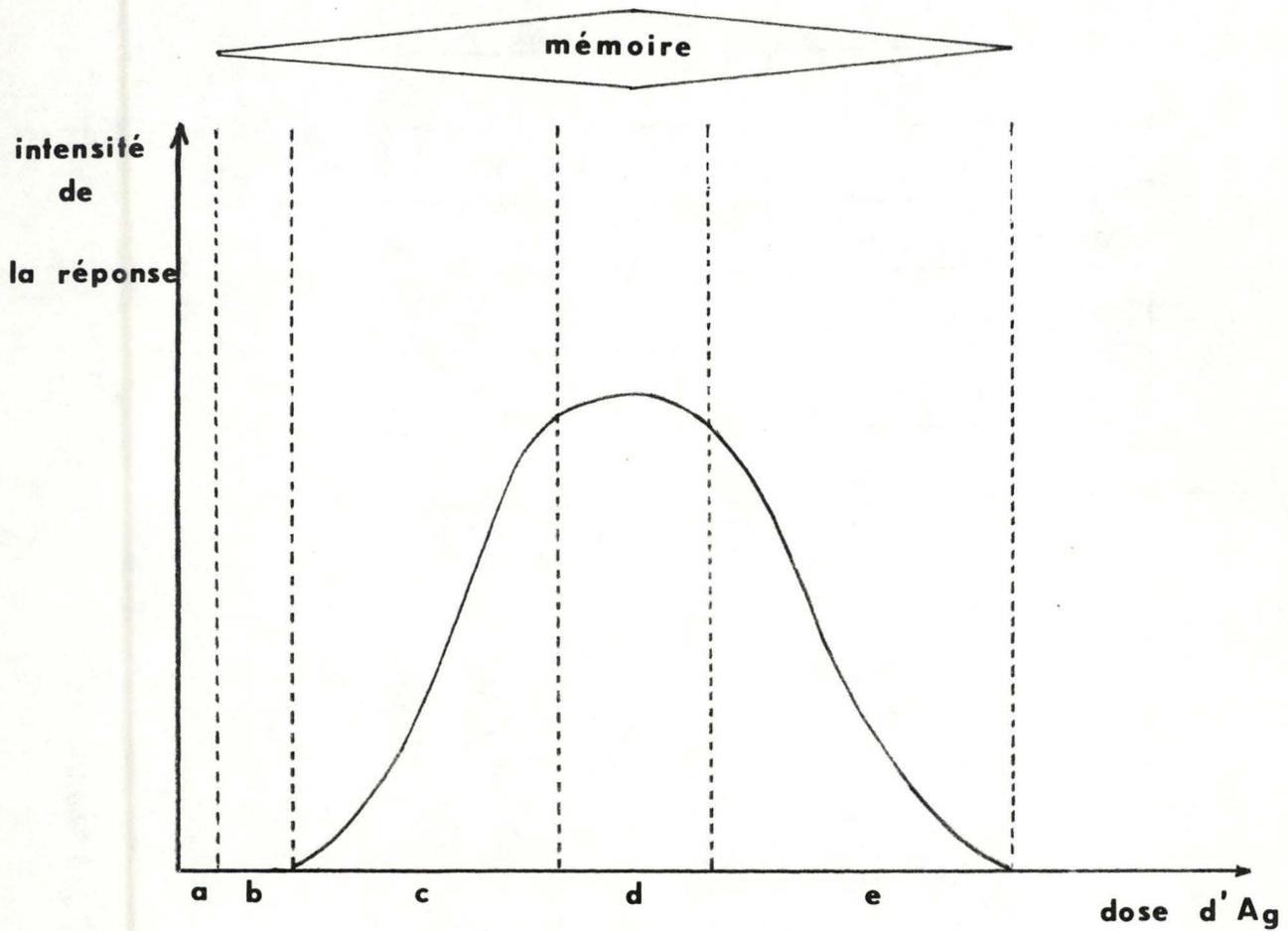
3.1.1. Elisa

Les résultats obtenus (tableaux 45 et 46) n'indiquent de nouveau rien d'apparent entre les valeurs tests, les témoins et blancs d'autant plus que ces derniers apparaissent encore parfois à des absorbances plus élevées que celles lues pour les puits internes de la boîte.

La dernière tentative d'utilisation de surnageant IL₂ n'est pas non plus concluante et nous abandonnerons définitivement dans les expériences suivantes ces apports successifs aux cellules en culture.

3.2. Trente-cinq jours après la deuxième injection

Nous recommençons une mise en culture des cellules de "Hardie" près d'un mois après la deuxième injection pour en modifier les conditions de stimulation d'un point de vue concentration antigénique. (Ceci sur base des publications de



- a : dose sub-immunogène
- b : dose primante car enclenche une réponse lors d'une deuxième injection
- c : dose immunogène
- d : dose optimale qui stimule toutes les cellules sensibles
- e : forte dose entraînant le phénomène de tolérance

fig. 39.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Emery et al 1988). Peut-être utilisons-nous des doses trop fortes d'antigène. Nous expliquerions alors nos manques de résultat par une quantité trop importante de cellules B rendues tolérantes par contact direct avec l'antigène (Roitt 1985). (fig. 39). Cette "tolérance à forte dose" est un phénomène spécifique qui entraîne une "paralysie immunitaire" (situation de non réponse) qui se complique souvent par la mise en place de cellules T supresseurs.

Nous essayons donc une gamme de dilution de l'Antigène plus étendue suivant ce modèle :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

$2.5 \cdot 10^5$ cellules/puits

$5 \cdot 10^5$ cellules/puits

6 boîtes de ce type sont préparées pour une stimulation au DNP-KLH et 6 autres boîtes pour une stimulation au DNP-7C7. La culture se déroule toujours dans une étuve à 37°C et 5 % de CO₂, mais nous ne suivons plus le même protocole de détection des anticorps produits.

Si nous avons préparé un tel nombre de boîtes de culture, c'est pour vérifier si, de jour en jour, la stimulation des cellules par la substance antigénique entraîne leur blastogénèse.

Mesure de la prolifération cellulaire
pour des cellules stimulées au DNP-7C7

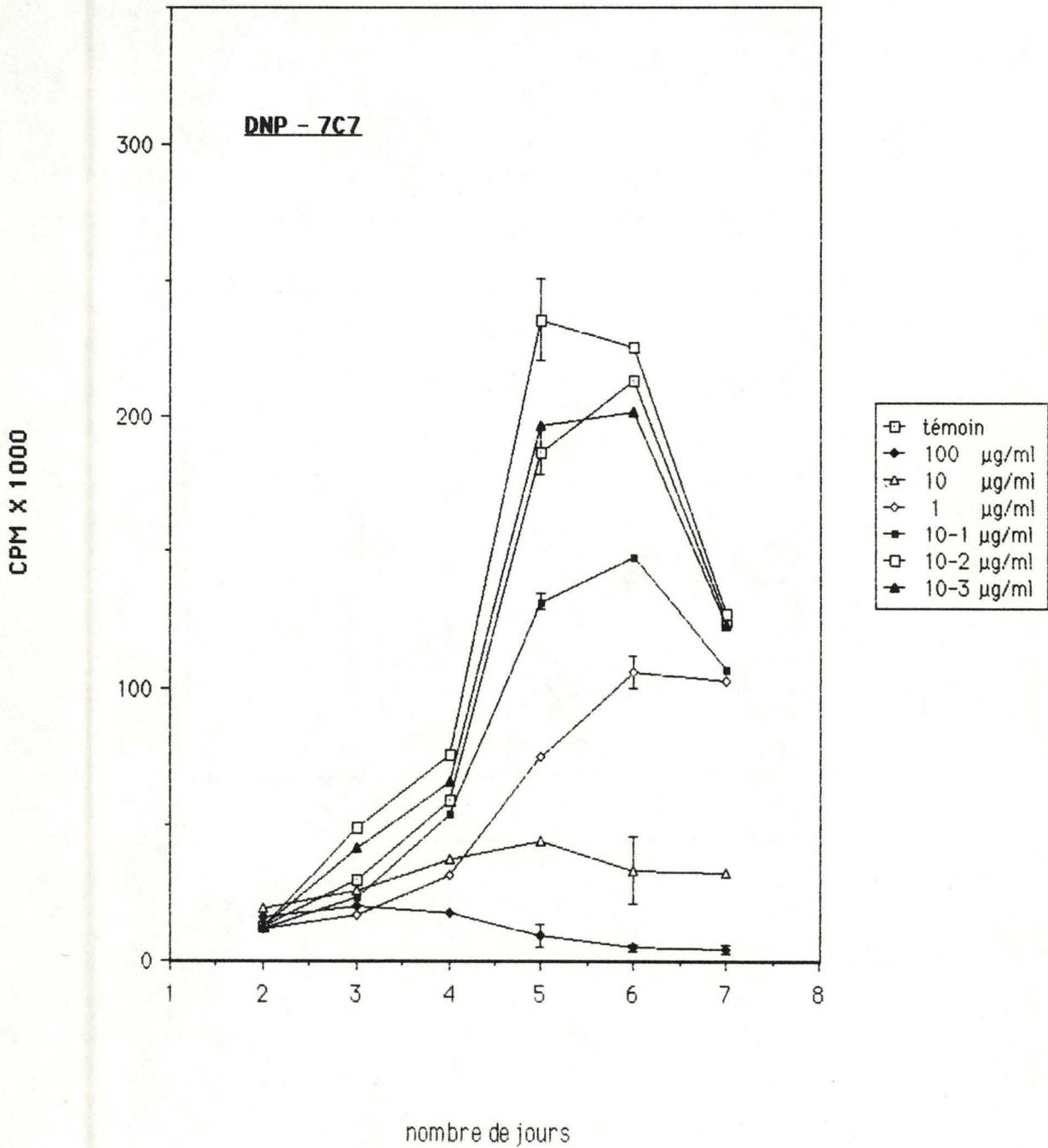


fig.40.

Mesure de la prolifération cellulaire
pour des cellules stimulées au DNP-KLH

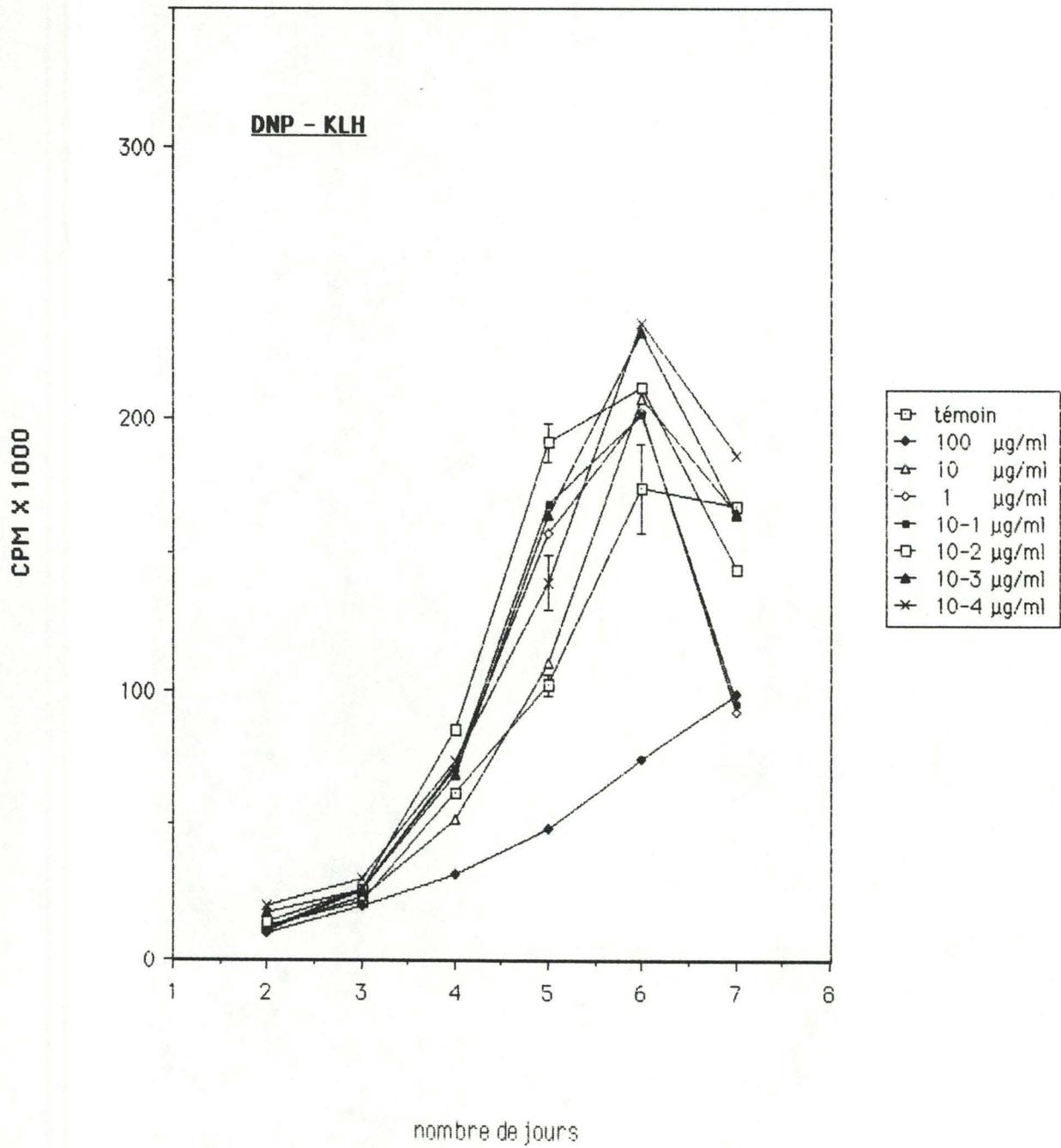


fig.41.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Cette vérification se fait par incorporation de thymidine tritiée en fin de journée, et les cellules sont récoltées le lendemain (après 16 heures d'incorporation). Après comptage au compteur à scintillation, nous pourrions voir à quelle dilution l'antigène agit au mieux sur la blastogenèse cellulaire.

Avant la récolte des cellules au Cell-Harvester, 100 μ l par puits de surnageant sont prélevés et stockés à -20°C en attendant d'avoir la série complète pour y déceler la présence d'anticorps.

Entre-temps, des tests de PFC sont réalisés pour des cellules cultivées en flacon et isolées le même jour que celles utilisées pour les cultures en micropuits. La concentration en DNP-KLH ou DNP-7C7 ajouté au milieu de culture de ces flacons a également été modifiée et n'est plus que de 1 μ g/ml.

3.2.1. Résultats

3.2.1.1. Prolifération cellulaire

Seuls les résultats de la culture à $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits sont repris aux fig. 40 et 41 ; ceux de la culture à $5 \cdot 10^5$ ne montrant pas de gradation nette au cours du temps et renseignant cette concentration cellulaire comme encore trop élevée pour une culture dans des conditions adéquates.

La première chose qu'il faut noter au vu des graphiques présentés est le nombre de CPM très élevé même au niveau des cellules témoins qui n'ont pas été restimulées.

- Stimulation -
au
DNP-7C7

La figure 40 montre un effet supprimeur marqué pour les concentrations de 100, 10 et dans une moindre mesure 1 μ g/ml. Toutes les courbes présentent la même allure générale d'un plus grand nombre de CPM pour les jours 5 et 6. Un point se détache, marquant un optimum de prolifération cellulaire pour une stimulation avec 10^{-2} μ g/ml d'antigène au cinquième jour de culture. Cette valeur

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

diffère bien de celle correspondant au témoin du même jour (comme l'indiquent les écarts-type) bien que l'indice de stimulation reste faible : (1,3)

- Stimulation -
 au
 DNP-KLH

On ne constate pas dans ce cas les mêmes effets que ceux observés pour une stimulation au DNP-7C7. Seule la concentration de 100 µg/ml semble être suppressive. Pour toutes les autres dilutions de l'antigène, les points expérimentaux se placent avec leur maximum au jour 6. On est tenté de retenir les dilutions 10^{-4} et 10^{-3} comme étant meilleures stimulatrices de la prolifération cellulaire, cependant, ici aussi, l'indice de stimulation reste faible.

3.2.1.2. Tests des surnageants de culture

La différence que nous apportons dans la manière de tester les surnageants est que nous n'avons plus cherché à mettre les anticorps directement en évidence, mais bien sous leur forme de complexe avec l'antigène.

Pour la première méthode jusqu'ici utilisée, il nous fallait laver les cellules et les remettre quatre jours en culture afin que les anticorps soient présents seuls dans les surnageants. Dans la deuxième façon de procéder, que nous avons appliquée ici, cette phase supplémentaire à la culture cellulaire n'a pas lieu. C'est pourquoi nous avons prélevé les surnageants alors qu'ils contenaient encore les antigènes en solution; ces derniers formant, avec les anticorps produits par les cellules bovines, des immuns-complexes.

La technique utilisée pour les mettre en évidence est l'ELISA en SANDWICH (cfr Matériel et Méthodes § 7.2.). Cependant, par cette méthode, il ne nous a été possible de tester que les surnageants de culture au DNP-7C7. La raison en est que, pour

	jour 2	3	4	5	6	7
Témoins	-16.3	-1.6	-5	15.7	-9.3	15.3
100	-2.6	-5.3	0.3	-1	-25.3	-9.3
10	-7.3	-7.3	-8.6	-6	-29	-12
1	7.3	-4.6	-7	-4.6	-30	-2.3
10 ⁻¹	7.6	-6.6	-4.3	11	-19	3.7
10 ⁻²	0.3	7.6	2	5.6	3.3	9.3
10 ⁻³	8.6	2.3	6	6.6	-8.6	10
10 ⁻⁴	6.3	0.3	0.6	5	-10	4.3
10 ⁻⁵	8.3	-4	0.6	6.3	-12.6	-0.6
10 ⁻⁶	13	-7.6	5.6	10.3	7.6	-0.1

Tableau 17.

Résultats obtenus par test ELISA
sur une série de surnageants de
culture prélevés à des jours
différents.

(ABS lue à 405 nm X 10³)

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

"trapper" les complexes-immuns, il faut adsorber au fond des boîtes Elisa un premier anticorps qui reconnaisse la molécule porteuse du DNP. Le RAM (Rabbit anti-Mouse) joue bien ce rôle d'"anti-porteuse" pour le 7C7, mais nous ne disposons pas au laboratoire d'un anti-KLH.

Les différentes étapes de la réalisation de ce test sont les suivantes :

- RAM 10 g/ml 1 nuit à 4°C
- PBS-OVA 2 % 2 heures à 37°C
- surnageants avec complexes-immuns 2 heures à 37°C
- RAB-biotine 30 minutes à 37°C
- Streptaridine-Peroxydase 30 minutes à 37°C (cfr Matériel et Méthodes § 7.2.)

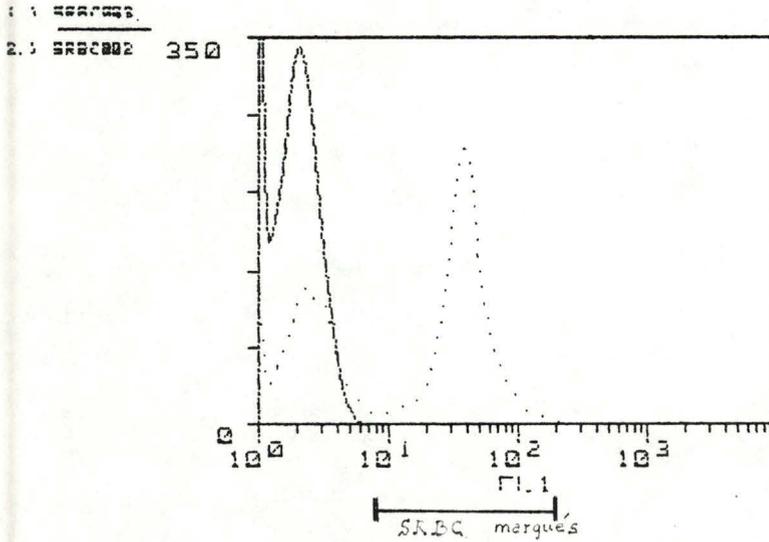
Le tableau 17 présente les absorbances lues à l'Elisa des surnageants de 7 jours de culture. Il s'agit de moyennes de triplicates pour les différentes dilutions de l'antigène et pour les différents jours.

Il faut interpréter ces valeurs avec une vue d'ensemble permettant de constater une tendance générale à des absorbances positives pour les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} . (Ce qui correspondrait aux quantités d'antigène les plus adéquates à la stimulation de la prolifération cellulaire comme nous l'avons constaté à la fig. 4°).

Il ne faut pas chercher à comparer les résultats obtenus sur plusieurs jours pour une même dilution de l'antigène. Cela voudrait dire ici que la production d'anticorps varie en augmentant ou diminuant de jour en jour. Ce qui est un non-sens. Il n'est pas non plus question de quantifier les anticorps produits, mais seulement dans un premier temps de démontrer les conditions propices à leur production. La quantification serait pour nous un point d'aboutissement après avoir mis le test au

Vérification de l'efficacité
du marquage des SRBC au 3B8

Merge graphs



Graph: #12:SRBC003 Events: 9993 Smoothed: 5
Graph: #12:SRBC002 Events: 9997 Smoothed: 5

fig. 42.

Tri des globules rouges au
FACS.

----- population globale

..... proportion de SRBC marqués et non marqués

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

point et après avoir établi une courbe d'atolage ramenant les valeurs d'absorbance à des concentrations données d'immunoglobulines.

3.2.1.3. PFC

Nous avons couplé les globules rouges de mouton (SRBC) au 3B8 par la technique du Chlorure de chrome et vérifié ce couplage grâce au FACS (fig. 42). Il est ainsi possible de connaître la proportion de SRBC marqués. Dans ce cas, le couplage se révèle efficace à 60 %.

Des tests de PFC ont été réalisés sur plusieurs jours de culture de cellules stimulées au DNP-KLH ou au DNP-7C7.

Il s'agit une fois de plus de démontrer l'augmentation de la proportion des cellules sécrétrices d'immunoglobulines au cours du temps et ceci pour la population totale d'immunoglobulines induites par la stimulation antigénique. L'idéal serait de coupler les globules rouges de mouton au TNP pour démontrer une réponse antigéno-spécifique. Il ne nous a pas été possible de réaliser cette expérience, le réactif commandé ne nous étant toujours pas parvenu.

Remarque : La technique de couplage du TNP aux SRBC est décrite par Hay et Hudson 1976. L'utilisation du TNP pour démontrer la production d'anticorps anti-DNP est efficace pour des raisons de structures spatiales stéréospécifiques communes au TNP et au DNP qui font que ces molécules peuvent être reconnues par le même anticorps.

Aucun résultat ne peut être présenté pour les tests de PFC. Ceux-ci n'ont rien donné alors que nous sommes sûr de l'efficacité du couplage des SRBC. Nous mettons en doute le sérum de Cobaye qui doit être utilisé frais. Nous utilisons cependant des aliquots d'une même lot stocké à -70°C. depuis 4 mois.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

4. Troisième rappel in vitro

4.1. Une semaine après la troisième injection

Pour avoir des résultats plus marqués nous recommençons juste une semaine après une troisième injection afin d'être sûr de prendre les cellules alors qu'elles se situent encore dans la phase de leur réponse maximale Emery (1988) rapporte à ce sujet que 10 jours après un rappel, les cellules se trouvent déjà en phase de déclin métabolique).

En plus des stimulations antigéniques au DNP-KLH et au DNP-7C7 comme nous l'avons fait dans l'expérience précédente, nous avons mis des cellules en culture avec d'autres substances en solution dans le milieu et ceci afin d'obtenir des témoins peut-être plus probants que des cellules seules (sans stimulation).

Ces substances ajoutées aux cultures sont :

- DU DNP non couplé (ce qui nous permettra de voir si, à lui seul, il peut déclencher une réponse).
- du 7C7 seul.
- et du DNP-4F4 couplé suivant la méthode appliquée pour le DNP-7C7. Le 4F4 est un anticorps monoclonal dirigé contre les molécules de classe I (Letesson et al 1986).

4.1.1. Mise en culture

Seule la concentration cellulaire à $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits a été retenue pour ce nouvel essai. Des concentrations antigéniques ont également été laissées de côté.

Organisation des boîtes de culture

a) boîtes tests

RESULTATS ET DISCUSSION

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1 $\mu\text{g/ml}$											
C	10^{-1} $\mu\text{g/ml}$											
D	10^{-2} $\mu\text{g/ml}$											
E	10^{-3} $\mu\text{g/ml}$											
F	10^{-4} $\mu\text{g/ml}$											
G	10^{-5} $\mu\text{g/ml}$											
H												

DNP - 7C7
DNP - KLH

- une seule concentration en cellules $2,5 \cdot 10^6/\text{ml}$
- tests en quintuples

b) boîtes témoins

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1 $\mu\text{g/ml}$

10^{-1} $\mu\text{g/ml}$

10^{-2} $\mu\text{g/ml}$

10^{-3} $\mu\text{g/ml}$

10^{-4} $\mu\text{g/ml}$

10^{-5} $\mu\text{g/ml}$

DNP 7C7 DNP-4F4 cell. seules

cellules suspendues à $2,5 \cdot 10^6/\text{ml}$

Mesure de la prolifération cellulaire
pour des cellules stimulées au DNP.

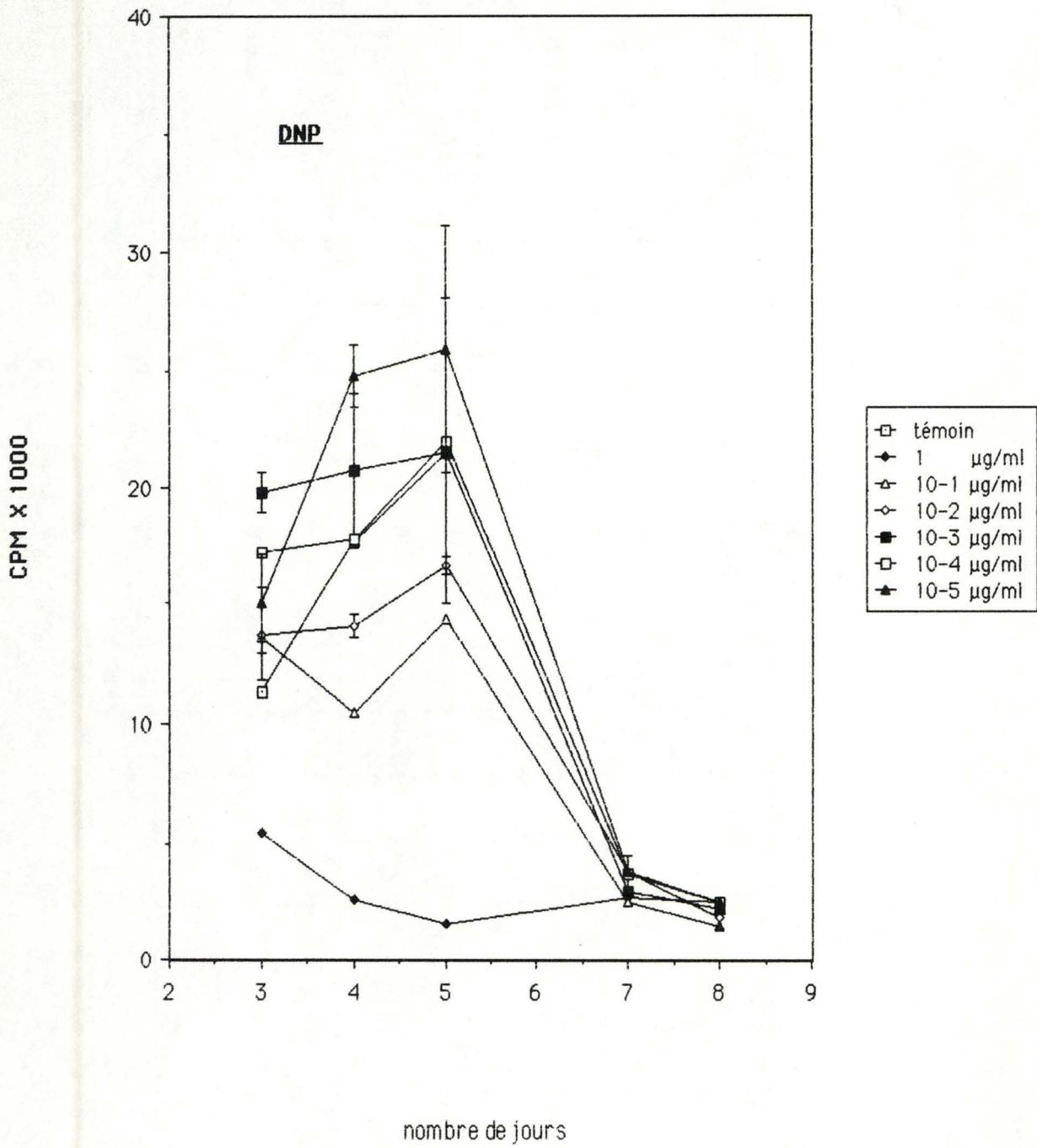


Fig. 43.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

Six boîtes de chaque type ont été mises en culture le même jour et nous avons commencé à suivre la prolifération cellulaire, à partir du troisième jour, par incorporation de thymidine tritiée. Avant la récolte des cellules, les surnageants ont également été prélevés et stockés à - 20°C pour être testés plus tard par Elisa en sandwich.

4.1.2. Résultats

4.1.2.1. Prolifération cellulaire

Avant de commenter les graphiques, une remarque s'impose quant au nombre de coups par minute qui est beaucoup moins élevé pour cette deuxième série d'expériences d'incorporation à la Thymidine tritiée. Les conditions expérimentales ont pourtant été réalisées de la même façon pour les deux séries :

- mêmes quantités de cellules par puits
- mêmes volumes et mêmes mesures de Thymidine-³H
- mêmes temps d'incorporation (16 heures)
- cellules provenant du même animal.

En expérience courante, le nombre de CPM normalement comptés se situe en-dessous de 50 000. C'est donc la première série qui sort de cette "norme". Peut-être faut-il mettre le nombre de coups élevé en rapport avec l'état physiologique de l'animal au moment du prélèvement sanguin. Nous avons en effet isolé ce jour-là une quantité impressionnante de cellules au départ de 300 ml de sang. Ce n'est peut-être aussi qu'une coïncidence; quoi qu'il en soit, une semaine seulement sépare les deux tests et a suffi à ce que les situations soient complètement différentes.

a. Témoins

- DNP -
(fig. 43)

Additionné aux cultures à raison de 1 μ g/ml, le DNP a un effet supprimeur. Les points expérimentaux correspondant aux concentrations de 10⁻¹

Mesure de la prolifération cellulaire
pour des cellules stimulées au 7C7.

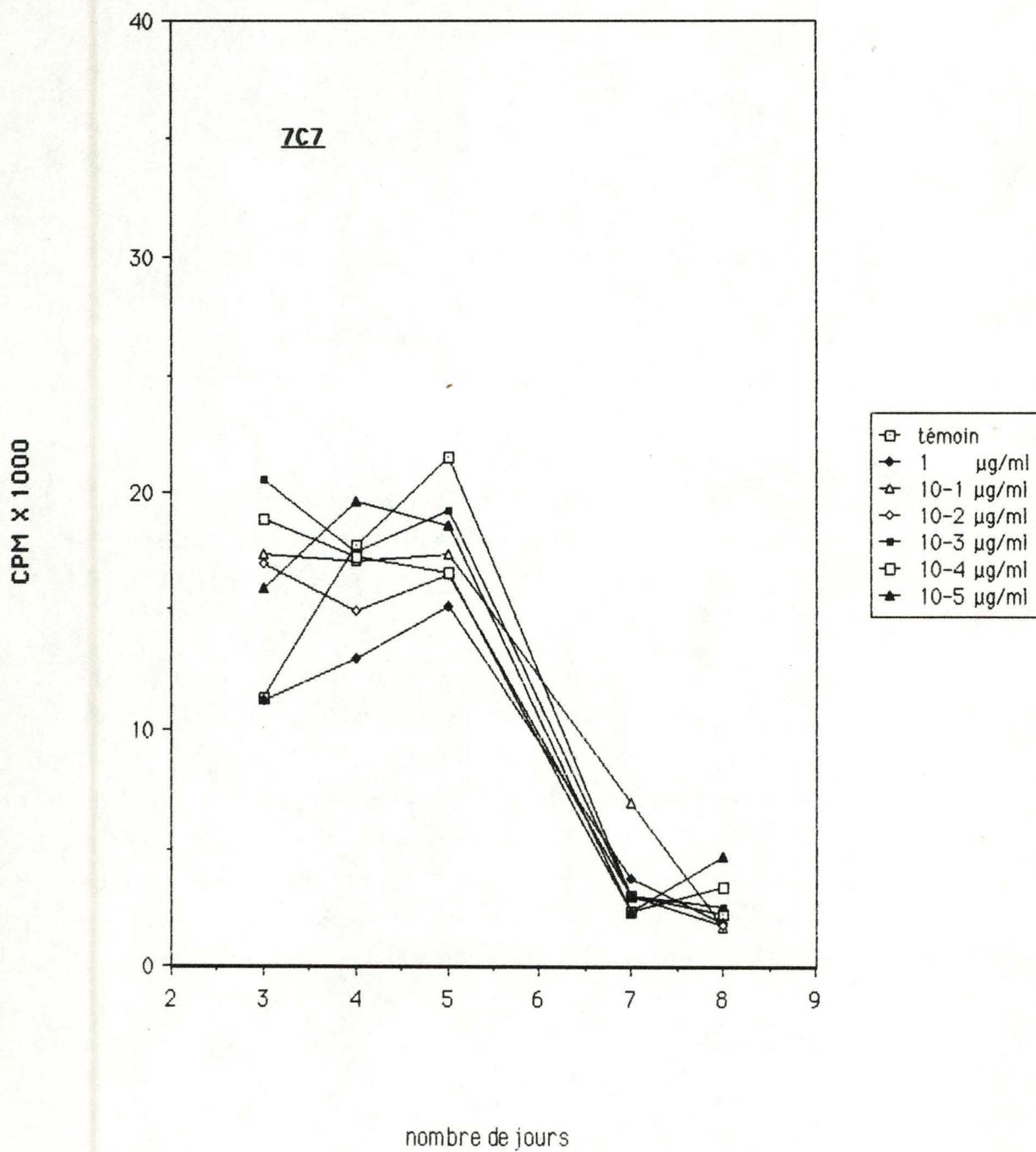


fig. 44.

Mesure de la prolifération cellulaire
pour des cellules stimulées au DNP-4F4.

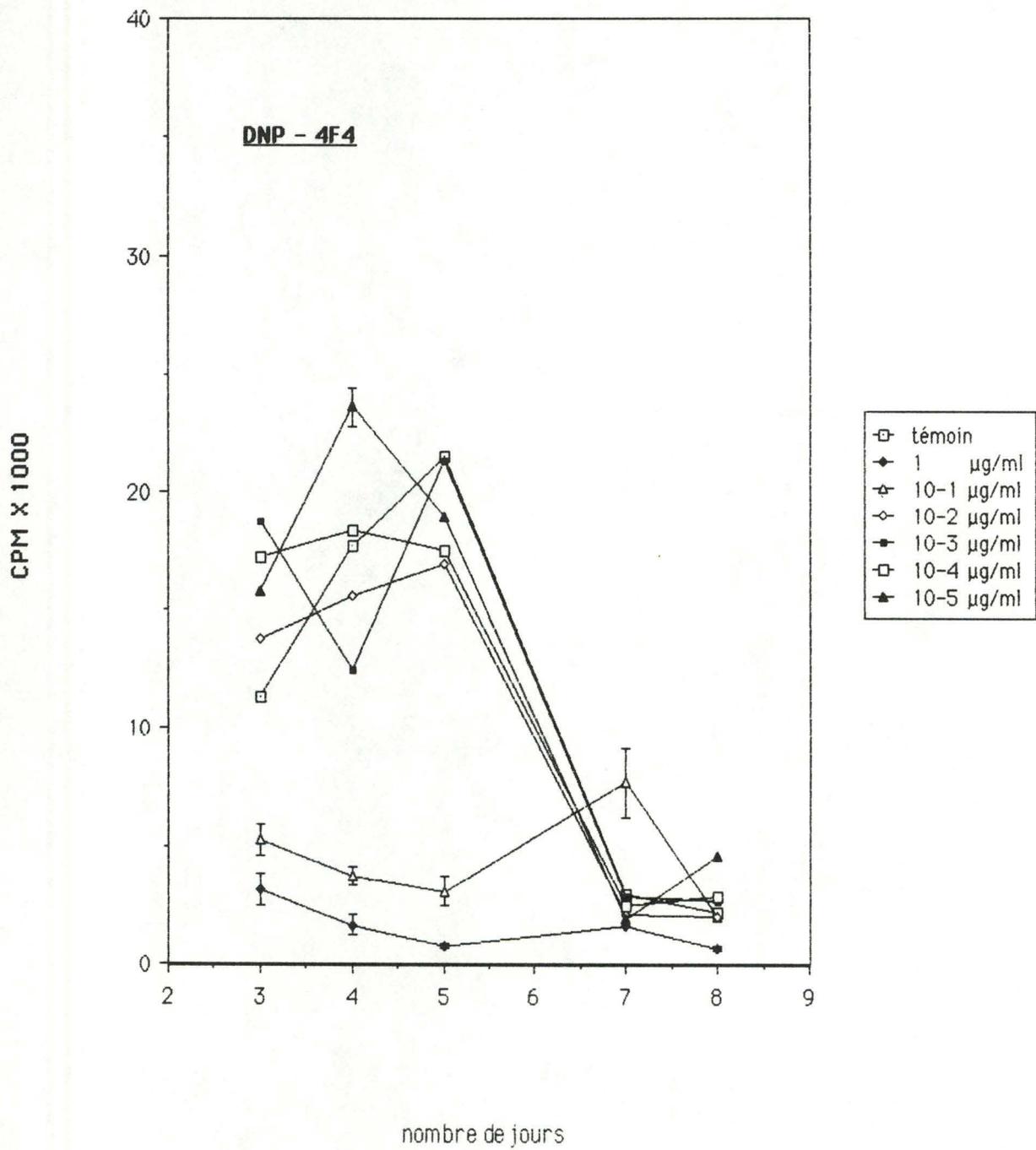


fig. 45.

Mesure de la prolifération cellulaire
pour des cellules stimulées au DNP-7C7.

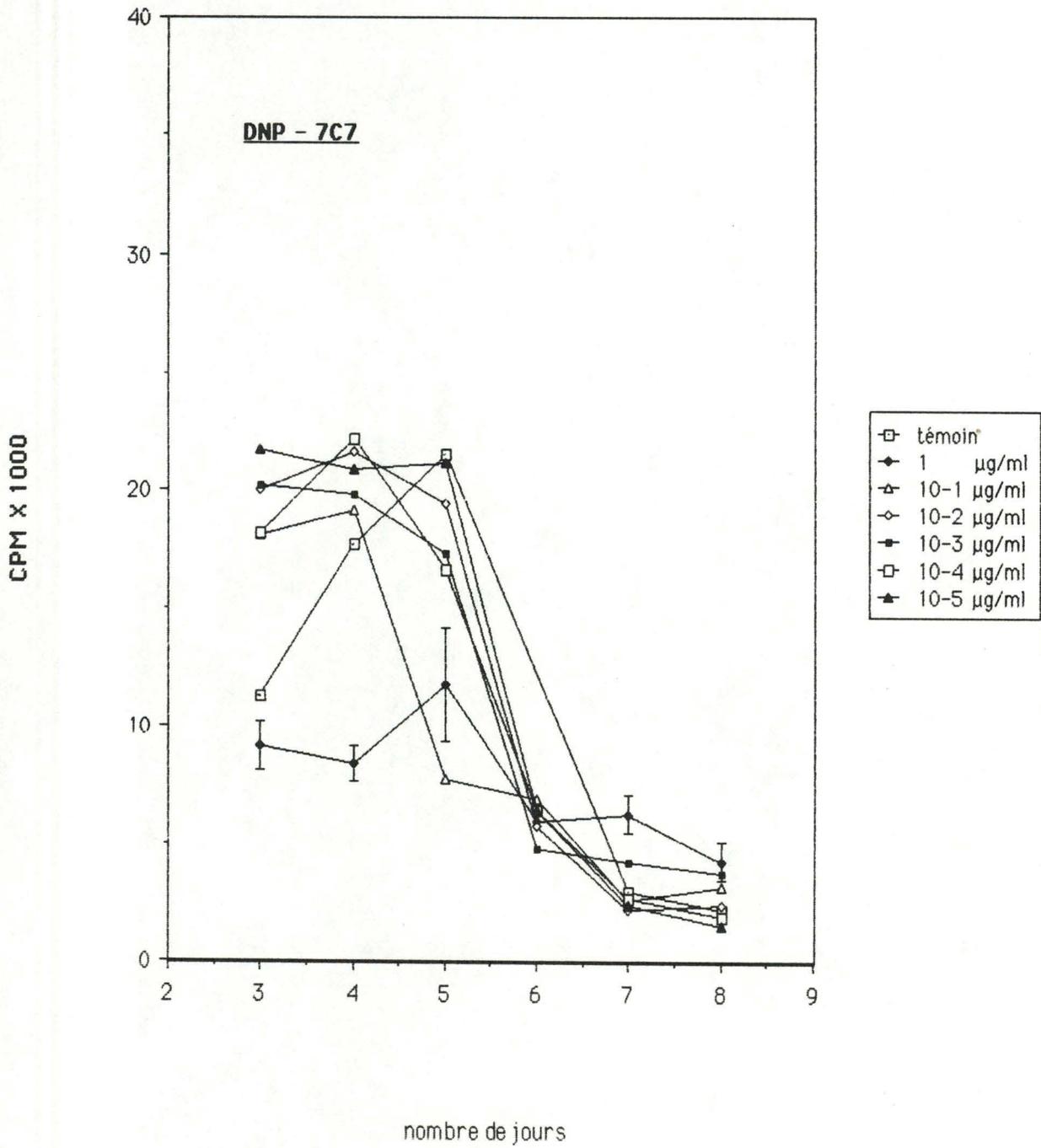


fig. 46.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

et 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ se situent également en-dessous des valeurs obtenues pour les cellules non stimulées. Par contre pour les concentrations 10^{-3} et 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ les points se situent au-dessus des valeurs témoins, cependant les écarts-type se chevauchent et on ne peut conclure à une stimulation efficace du DNP ajouté seul puisque les cellules elles-mêmes, sans adjonction aucune, incorporent énormément de thymidine.

- 7C7 -

(fig. 44)

Mis à part pour le troisième jour, tous les points restent en-dessous de la couche témoin indiquant ainsi un effet supprimeur total de blastogénèse quand du 7C7 seul est ajouté aux cultures cellulaires.

-DNP-4F4-

(fig. 45)

L'effet supprimeur est ici bien marqué pour les plus fortes concentrations (1 et 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$): Les dilutions supérieures (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$) ne semblent pas avoir un effet particulier sur la prolifération cellulaire puisqu'elles suivent les valeurs de la courbe témoin. Quant à la dilution 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$, elle se détache au quatrième jour pour atteindre 23 500 CPM mais l'indice de stimulation correspondant reste faible : n'atteignant que 1,3.

b. Tests

- DNP - 7C7 -

(fig. 46)

On peut comparer ce graphique au précédent afin de faire ressortir les différences qui existent du fait que le DNP est couplé à un anti-classe I (4F4) d'une part et à un anti-classe II (7C7) d'autre part.

L'allure générale de ces deux graphiques est fort semblable : l'effet supprimeur pour les concentrations 1 et 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ existe, mais est moins

Mesure de la prolifération cellulaire
pour des cellules stimulées au DNP-KLH.

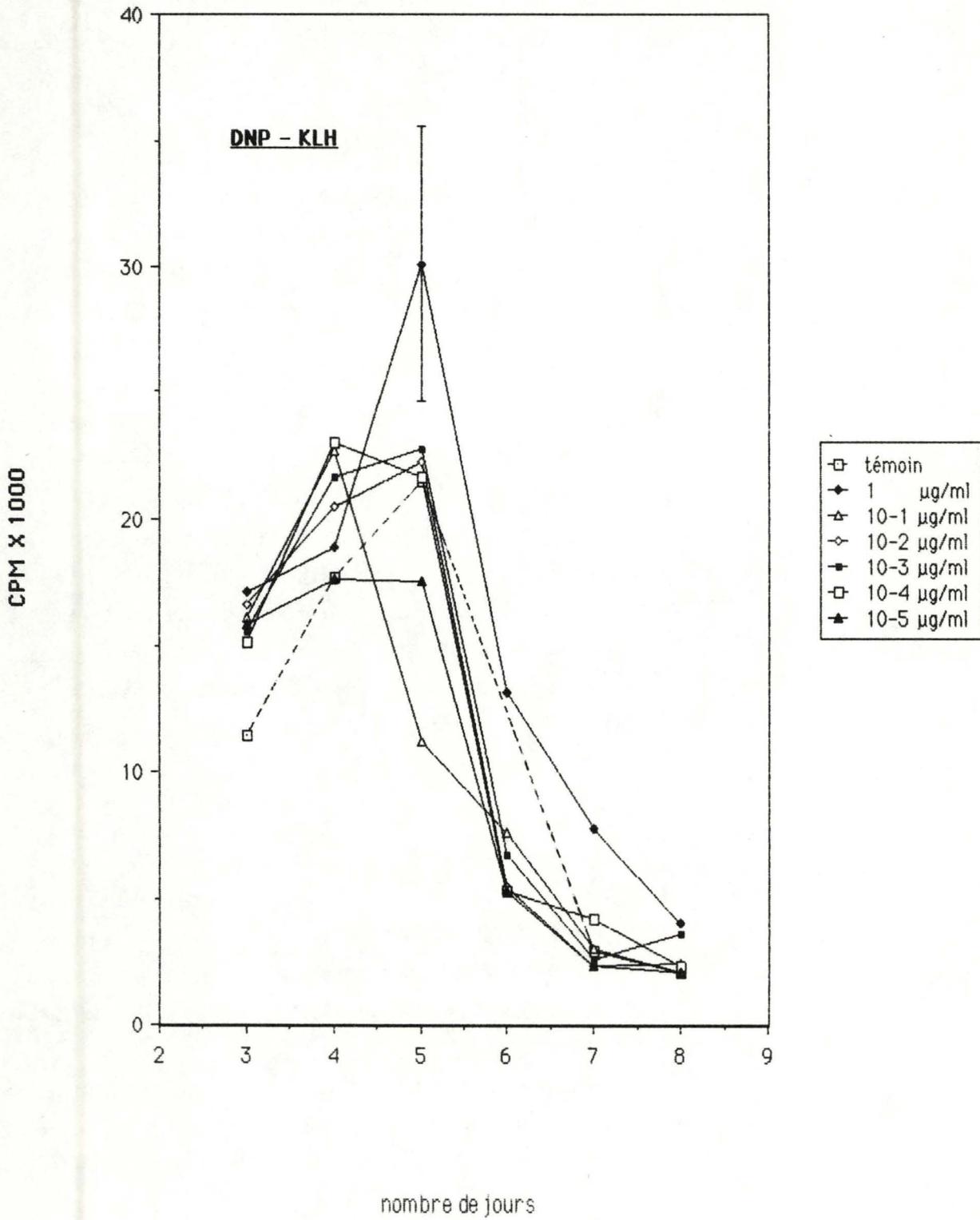


fig. 47.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

marqué pour le DNP-7C7. Pour les autres dilutions, les points se trouvent au-delà de la courbe témoin pour les jours 3 et 4. Cependant, compte tenu des écarts-type on ne peut pas dire qu'il y en ait une dont l'effet soit supérieur.

- DNP - KLH -

(fig. 47)

Alors que dans tous les autres cas la concentration de $1 \mu\text{g/ml}$ a tendance à montrer un effet supprimeur, on constate tout à fait le phénomène inverse après stimulation des cellules au DNP-KLH. Mais l'écart-type peut ramener ce pic à une valeur beaucoup plus proche de celle témoin pour que finalement toutes les courbes suivent presque à la trace celle obtenue pour les cellules non stimulées.

Retenons que, alors que la série précédente semblait indiquer les jours 5 et 6 comme étant ceux traduisant les maxima de prolifération cellulaire, ici, quand un point tend à ressortir du graphique, la tendance est au jour 4.

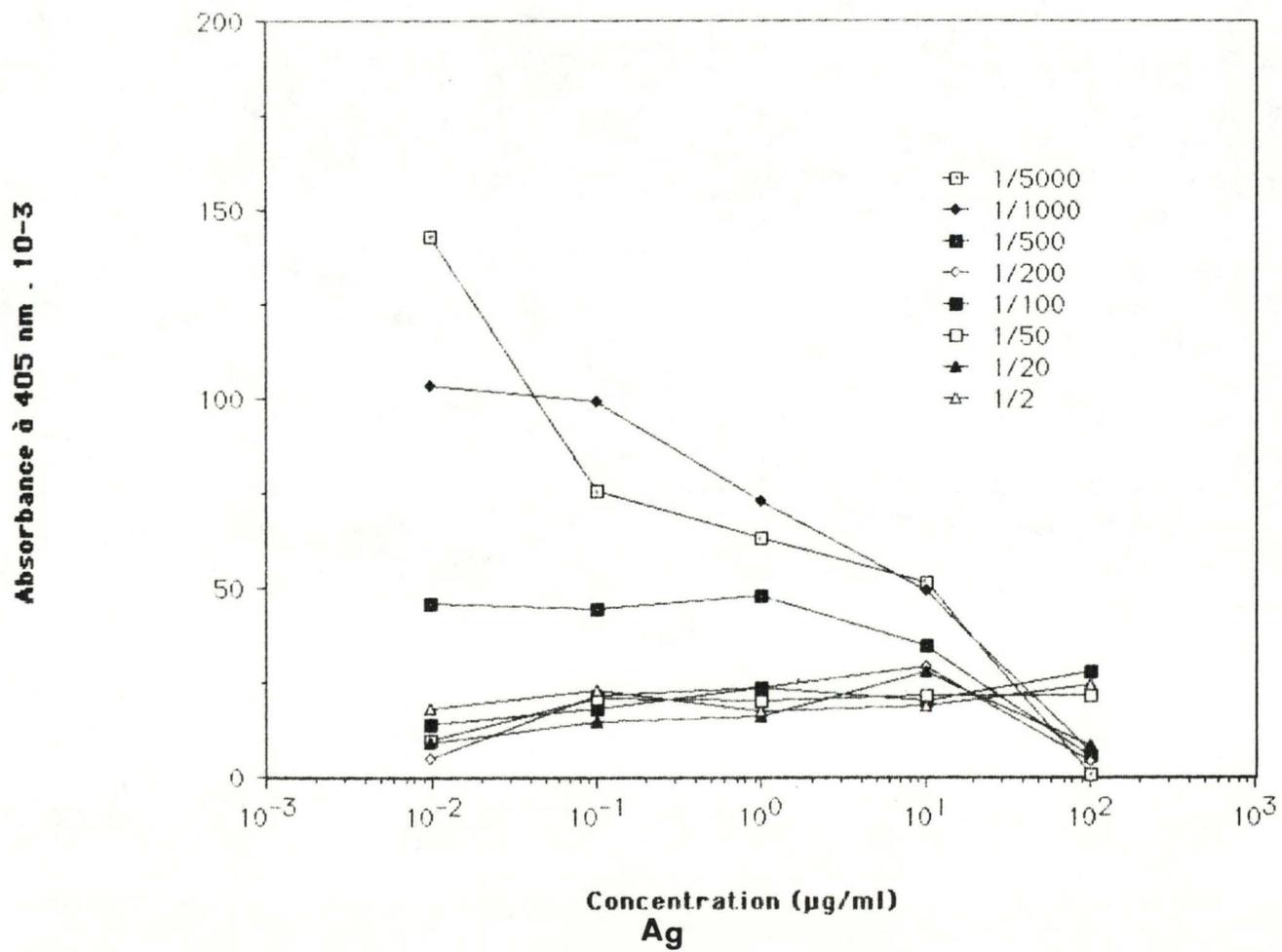
Il est difficile de faire correspondre les résultats des deux études qui viennent d'être présentées. Ainsi, nous concluons au § 3.2.1.1. à $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ pour les meilleures conditions de stimulation au DNP-7C7 sans que nous ayons pu la vérifier ici. De plus, avec des cellules témoins qui incorporent autant de thymidine, comment conclure à l'effet de quoi que ce soit additionné aux cultures ?

Remarque générale concernant les représentations graphiques :

Pour ne pas surcharger, les écarts-type n'ont pas été systématiquement rapportés pour tous les points expérimentaux.

ABS pour des complexes-immuns induits
par l'incubation d'un antiserum avec
des concentrations croissantes d'Ag

fig. 48.



R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

4.1.2.2. Tests des surnageants de culture

Rappelons que nous utilisons la technique de l'Elisa en sandwich. Il n'y a donc plus lieu de réaliser des dilutions d'un sérum anti-DNP-KLH pour nous servir directement de témoin positif puisque nous détectons des complexes immuns. Nous avons donc induit la formation de tels complexes afin de disposer de nouveaux témoins positifs.

Comme nous ignorions les rapports de concentration adéquats entre les éléments à mettre en présence, plusieurs combinaisons ont été effectuées.

dilutions
d'un sérum ->
anti-DNP-KLH

$1/2$
$1/20$
$1/50$
$1/100$
$1/200$
$1/500$
$1/1000$
$1/5000$

En bout de plaque Elisa, testant les surnageants de culture, une module est toujours réservé pour les essais d'induction à la formation de complexes immuns.

Aux différentes dilutions du sérum positif sont ajoutées des solutions de DNP-7C7 en concentration variable : 100, 10, 1, 10^{-1} et 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$.

Le graphique de la fig. 48 représente l'absorbance en fonction de la concentration en DNP-7C7 ajoutée aux différentes dilutions d'un sérum anti-DNP-KLH.

Les valeurs obtenues renseignent clairement des absorbances plus élevées pour des très hautes

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

dilutions de sérum positif (1/5000) et pour des faibles concentrations de DNP-7C7 (10^{-2} μ g/ml). Peut-être aurions-nous pu continuer en deçà de ces dilutions pour obtenir une absorbance encore plus élevée.

Il n'a pas été possible, pour cette deuxième série de surnageants à tester par l'Elisa en sandwich, de faire ressortir des résultats plus probants que dans l'expérience précédente. Deux possibilités de réponse s'offrent à nous une fois de plus :

- soit l'Elisa ne met rien en évidence par absence d'anticorps dans le surnageant de culture.
- soit des anticorps sont présents mais pas dans un rapport de concentration adéquat avec le DNP-7C7 pour qu'il soit possible de détecter les complexes immuns.

CONCLUSION

IV. DISCUSSION GENERALE

ET CONCLUSIONS

Tout au long de ce travail, nous nous sommes efforcés, sur base de données disponibles dans la littérature (MORIMOTO et al., 1981a; MORIMOTO et al., 1982 ; EMERY et al., 1987 ; EMERY et al., 1988) de développer une méthode d'immunisation primaire et/ou secondaire in vitro en utilisant d'une part des cellules du sang périphérique de bovin et d'autre part, comme immunogène, un haptène, le DNP, couplé à une protéine porteuse (soit "inerte" : le KLH, soit "active" : le 7C7).

Il est clair que tout essai de transposition d'une technique d'une espèce à une autre nécessite des adaptations, et dans le temps imparti pour ce mémoire, nous n'avons pas su entreprendre tous les agencements de protocoles qui auraient pu être envisagés pour construire ce "modèle".

L'absence de "résultats" positifs ne doit pas être considérée comme un échec mais doit devenir un moyen d'orienter la poursuite de ce travail dans d'autres voies peut-être plus prometteuses. Nous allons en effet considérer les divers paramètres pouvant être, ensemble ou isolément, rendus responsables des problèmes rencontrés lors de ce travail.

1. Techniques de détection.

Trois approches de plus en plus générales ont été envisagées.

- a) La sensibilité du test ELISA utilisé a été vérifiée, à la fois pour le dosage des anticorps et des immuns complexes. La limite de détection semble se situer aux alentours de $0,1 \mu\text{g/ml}$ pour les IgM et de $0,01 \mu\text{g/ml}$ pour les IgG. Si pour le dosage des Ig totales produites in vitro cette sensibilité semble suffisante (production variant de $2 \mu\text{g}$ à $18 \mu\text{g/ml}$ selon les auteurs, REINHERZ et al., 1980a; KHANSARI et al., 1984) il est moins sûr que nous soyons capables de détecter la faible quantité d'Ig spécifiques ($15 - 70 \text{ ng/ml}$, KHANSARI et al., 1984 ; 1 à 10 ng/ml , EMERY et al., 1988) d'autant plus

DISCUSSION GENERALE

ET CONCLUSIONS

que dans notre cas, nous nous limitons à la reconnaissance de l'haptène et non du "carrier".

- b) D'un autre côté, la détection des cellules formant plage de lyse est une technique réputée pour sa grande sensibilité (EGELAND et al., 1982) et ne peut donc être mise en cause. Pour des raisons indépendantes de notre volonté nous n'avons pas pu l'appliquer à la détection des cellules produisant des anticorps spécifiques.
- c) Enfin, la mesure de la blastogenèse antigénospécifique est d'un usage courant (REINHERZ et al., 1980a; KHANSARI et al., 1984 ; EMERY et al., 1987 ; EMERY et al., 1988) et sa fiabilité n'est plus à démontrer.

Le manque de résultats concrets par utilisation de ces méthodes permet d'orienter l'origine des problèmes à un autre niveau.

2. Variations individuelles de la réponse immunitaire.

L'utilisation d'un nombre restreint d'animaux, pour cette mise au point, est aussi en elle-même une sévère limitation.

Les variations individuelles de capacités de réponse immunitaire sont clairement mises en exergue à travers tout la littérature (EMERY et al., 1988).

Néanmoins la positivité du sérum des animaux immunisés permet de dire qu'ils sont répondeurs, sans pouvoir, faute de comparaison, affirmer s'ils sont bons ou mauvais répondeurs.

N'ayant pas à notre disposition de troupeaux expérimentaux et dépendant pour nos expériences de l'accueil bénévole d'exploitants agricoles bienveillants, nous ne pouvons pas modifier ce paramètre.

3. Les cellules en culture.

L'utilisation de cellules du sang périphérique (PBL) comme cellules

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

E T C O N C L U S I O N S

répondantes d'un test de stimulation antigénique in vitro, si elle a été décrite (MORIMOTO et al, 1981a ; MORIMOTO et al, 1982 ; EMERY et al., 1987 ; EMERY et al., 1988) est aussi clairement reconnue comme non optimale.

Cette limitation de réponse des PBL non fractionnés est sans conteste due à l'action des cellules T suppressives (T_8) présentes dans l'échantillon et qui modulent négativement la réponse.

Chez l'homme, des tests effectués sur des mélanges artificiels de sous-populations (T+B) (REINHERZ et al., 1980 ; MORIMOTO et al., 1981a ; MORIMOTO et al., 1982) indiquent un net accroissement de la potentialité de réponse par rapport à la population totale. N'ayant pas à notre disposition les outils susceptibles de nous permettre une telle séparation nous ne pouvons l'envisager à l'heure actuelle.

D'un autre côté, il est évident que l'utilisation de cellules d'organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) non envisageable chez l'homme pour des raisons éthiques, devrait permettre une réponse facile in vitro de par la densité des cellules répondantes actives. L'emploi de telles cellules, envisageable chez le bovin (ENGLISH and WHITEHURST, 1984), n'est néanmoins pas aisément réalisable en routine, pour des raisons de coût et de maintenance des animaux opérés.

4. La stimulation antigénique.

En ce qui concerne l'adjonction de l'antigène au milieu cellulaire réactionnel, la gamme de doses utilisées correspond aux doses décrites en stimulation similaires tant chez le bovin (EMERY et al., 1987 ; EMERY et al., 1988) que chez l'homme (MORIMOTO et al., 1981a et 1982) et ne devrait pas être responsable des manquements constatés. On note cependant l'existence de variantes quant à la concentration optimale d'antigène à utiliser suivant que l'on cherche à démontrer un maximum de prolifération cellulaire ou un maximum de production d'immunoglobulines spécifiques (EMERY et al., 1987 et 1988).

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

E T C O N C L U S I O N S

On peut néanmoins moduler ce paramètre en réalisant une préincubation des monocytes autologues avec l'antigène, ces cellules ainsi primées sont réintroduites dans la culture en concentrations variables. Cette manière de procéder, décrite par EMERY et al. (1988), offre en outre l'avantage de ne plus devoir effectuer de lavages des cellules répondantes au jour 4 pour enlever l'antigène, et en plus de pouvoir contrôler un autre point crucial d'une réponse in vitro, à savoir la concentration en cellules présentatrices de l'antigène. Ces cellules peuvent dans certains cas avoir une action suppressive sur la réponse, soit via l'activation sélective de sous-populations de cellules T "suppressor", soit par une action directe de ceux-ci (EMERY et al., 1988).

Finalement, au niveau du choix de l'antigène utilisé, nous nous sommes orientés vers le DNP couplé à une protéine porteuse afin de détecter une réponse dirigée vers un seul épitope, ceci pour mettre en évidence la spécificité des anticorps produits. Notre "carrier", le KLH, permet un excellent rapport de couplage avec le DNP et s'avère efficace dans des expériences du même type mises au point pour une étude des cellules humaines (MORIMOTO et al., 1981a). Des résultats ont également été obtenus pour d'autres travaux utilisant le DNP sous forme d'un complexe conjugué avec la sérum-albumine bovine (BSA) alors que dans ce dernier cas l'efficacité de couplage est bien moindre qu'avec le KLH (EMERY et al., 1988).

PERSPECTIVES

L'étude devra se poursuivre, tentant l'optimisation des paramètres intervenant dans les conditions de culture. Cette première étape franchie, la séparation des sous-populations lymphocytaires T et B puis leur mise en culture en proportions variables permettra de voir pour quel rapport des deux types

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

E T C O N C L U S I O N S

cellulaires la production d'anticorps est maximale. On pourra alors envisager l'utilisation du modèle *in vitro* établi comme une possibilité d'étude des modifications de l'immunorégulation résultant de divers traitements que l'on appliquera aux cellules, ces derniers pourront être des déplétions de sous-populations cellulaires par exemple ; des tests d'immunogénicité de substances pourront également être réalisés, de même que des tests de ciblage par couplage d'une molécule à un anticorps monoclonal donné (par exemple anti-classe II) rendant ainsi possibles des réponses vis-à-vis de peptides normalement non-immunogènes.

BIBLIOGRAPHIE

V. BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN Paul M. (1987)
Antigen processing at the molecular level
Imm. Today; 8, 270-273
- BENSUSSAN Armand (1986)
Les lymphocytes T et ses récepteurs
Pour la Science; Avril 86 18-29
- CHANH T.C., DREESMAN G.R., KANDA P., LINETTE G.P., SPARROW J.T.,
HO D.D. and KENNEDY R.C. (1986)
Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides
The EMBO Journal; 5, 3065-3071
- COOPER Edwin L. (1979)
L'évolution de l'immunité
La Recherche; 10, 824-833
- CRESSWELL Peter (1987)
Antigen recognition by T Lymphocytes
Imm. Today 8, 67-69
- CUNNINGHAM A.J. and SZENBERG A. (1968)
Further improvements in the plaque technique for detecting single
antibody-forming cells.
Immunology; 14, 599
- DALGLEISH Angus G. (1986)
The T₄ molecule : function and structure
Imm. Today 7, 142-144
- DEGOS Laurent (1987)
Les lymphocytes T
Medecine/Sciences; 3, 229-230

- DEGOS Laurent (1987)
 Activité ou cellule "natural killer" (NK)
 Médecine/Sciences; 3, 360-361

- DEMEUR M. and VAECK M.
 Antigen-specific Ig production by peripheral blood lymphocytes
 Report of Belgian Immunological Society
 autumn meeting - november 4, 1983
 "Technical aspects of functional lymphocyte tests".

- DEPELCHIN (1985)
 Immunologie fondamentale FNDP Namur

- EBY W.C., CHONG C.A., DRAY S. and MOLINARO G.A. (1975)
 Enumerating immunoglobulin-secreting cells among peripheral human
 lymphocytes.
 A hemolytic plaque assay for a B cell function.
 Journal of Immunology; 115, 1700-1703

- EGELAND T., LEA T. and MELLBYE O.J. (1982)
 Demonstration of Immunoglobulin-Secreting Cells in a Sensitive
 Reversed Hemolytic Plaque Assay
 Elsevier Biomedical Press 373-382

- ENGLISH L.S. and WHITEHURST M. (1984)
 The Production of T-Cell Growth Factor (TCGF) in vivo in sheep
 Cellular Immunology ; 85, 364-372

- EMERY D.L., MACHUGH N.D. and ELLIS J.A. (1987)
 The properties and functional activity of non-lymphoid cells from
 bovine afferent (peripheral) lymph.
 Immunology; 62, 177-183

- EMERY D.L., DUFTY J.H. and WOOD P.R. (1988)
 An Analysis of Cellular Proliferation, and Synthesis of Lymphokines
 and Specific Antibody in vitro by Leucocytes from Immunized Cattle.
 Veterinary Immunology and Immunopathology; 18, 67-80

- FISCHER Alain, AUFRAY Charles, DURANDY Anne (1987)
 Les molécules d'adhésion des lymphocytes T
 Médecine/Sciences; 3, 334-342

- GODING J.W. (1976)
The Chromic chloride method of coupling antigen to erythrocytes
definition
of some important parameters.
J of immunology Meth.; 10, 61

- GREY H.M., CHESNUT R. (1985)
Antigen processing and presentation to T cells
Imm. Today; 6, 101-106

- GUALDE N. (1986)
La réaction inflammatoire, une défense agressive
La Recherche; 17, 622-635

- HAY et HUDSON (1976)
Practical Immunology
Blackwell scientific publications

- HIRSH R.L. (1982)
The complement system
Microbio Revue; 46, 71-85

- JERNE N.K., NORDIN R.A. et HENRY C. (1963)
The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells.
In Celle-bound Antibody (eds Amos B. & Koprowski H.) p. 109
Wistar Institute Press, Philadelphia.

- KAHN Alex (1988)
La troisième dimension pour les molécules de classe I du complexe
majeur d'histocompatibilité : un cristal de HLA-A2
Médecine/Sciences; 4, 52-54

- KHANSARI N. and FUDENBERG H. (1984)
Specificity of antigen induced helper factor for antibody
synthesis in vitro and its relation to lymphocytes interaction.
Immunological communications ; 13(4), 351-360

- KOURILSKY Ph. et CLAVERIE J.M. (1988)
La molécule du soi peptidique
Médecine/Sciences; 4, 177-183

- LETESSON J.J., COPPE Ph., LOSTRIE-TRUSSART N. and DEPELCHIN A. (1983)
A bovine "Ia-like" antigen detected by a xenogenetic monoclonal anti-
body. Animal Blood Groups and
Biochemical Genetics; 14, 239-250

- LETESSON J.J., LOSTRIE-TRUSSART N., DEPELCHIN A. (1985)
Production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'isotypes d'immunoglobulines bovines.
Ann. Méd. Vét.; 129, 131-141

- LETESSON J.J., COPPE Ph., LOSTRIE N., AREIMERS R., DEPELCHIN A. (1986).
Production and characterization of monoclonal antibodies raised against BOLA class I antigens
Veterinary Immunology and Immunopathology; 13, 213-226

- MARRACK Ph. et KAPPLER J. (1986)
Le lymphocyte T et ses récepteurs
Pour la science Avril 86, 18-29

- MIEDEMA F. and MELIEF J.M. (1985)
T-cell regulation of human B-cell activation. A reappraisal of the role of interleukine-2.
Immunology Today; 6, 258-259

- MILON G. et MARCHAL G. (1986)
La défense antibactérienne
La Recherche; 17, 652-661

- MILLS Kingston H.G. (1986)
Processing of viral antigens and presentation to class II restricted T Cells.
Immunology Today; 7, 260, 263

- MIYUKI NISHI, YASUMASA ISHIDA et JASUKU HONJO (1988)
Expression of functional interleukin-2 receptors in human light chain/Tac transgenic mice.
Nature; 331, 267

- MOLINARO A.G., MARON E., DRAY S. (1974)
Ag-Secreting cells : Enumeration of Immunoglobulin-Allotype Secreting Cells in Nonimmunized Rabbits by Means of Hibrid-Antibody-Coated Erythrocytes in a Reverse Hemolytic Plaque Assay.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 71, 1229-1233

- MORIMOTO C., REINHERZ E.L. and SCHLOSSMAN S.F. (1981);
Regulation of in vitro primary anti-DNP antibody production by functional subsets of T lymphocytes in man.
J. of Immunology; 127, 69-73

- MORIMOTO, REINHERZ and SCHLOSSMAN (1981) ^b
 Primary in vitro anti-KLH antibody formation by principal blood lymphocytes in man; detection with a radioimmunoassay
 J. of Immunology, 127, 514-517

- MORIMOTO, DISTASO, BOREL, SCHLOSSMAN and REINHERZ (1982)
 Communicative interaction between subpopulations of human T lymphocytes required for generation of suppressor effector function in a primary antibody response.
 J. of Immunology; 128, 1645-1649

- REINHERZ E.L., MORIMOTO C., PENTA A.C., SCHLOSSMAN S.F. (1980)^a
 Regulation of B cell immunoglobulin secretion by functional subsets of T lymphocytes in man.
 Eur. J. Immunol. ; 10, 570-572

- REINHERZ and SCHLOSSMAN (1980)^b
 The Differentiation and Function of Human T Lymphocytes
 CELL; 19, 821-827

- REINHERZ, MEUER, FITZERALD, HUSSEY LEVINE and SCHLOSSMAN (1982)
 Antigen Recognition by Human T Lymphocytes Is Linked to Surface Expression of the T₃ Molecular Complex.
 CELL; 30, 735,743

- ROBB R.J. (1984)
 Interleukin-2 : the molecule and its function
 Imm. Today; 5, 203-209

- ROITT I., BROSTOFF J., MALE D. (1985)
 Immunologie fondamentale et appliquée
 MEDSI, Médecine et Sciences internationales. Paris.

- SHAW S. (1987)
 Characterization of Human Leukocyte differentiation antigens
 Imm. Today; 8, 1-3

- SOULILLOU J.P. (1986)
 Les Greffes d'organe
 La Recherche; 17, 586-599

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

- VILLA et CLERICI E. (1981)
Antibody-forming foci in soft-agar cultures of human peripheral
blood cells
Journal of Immunological Methods; 45, 129-136

- VILLA M.L., DE BIASI S. (1983)
Antigen - Dependent colonies of Human Peripheral Blood Lymphocytes :
An Immunomorphologie Study.
Cellular Immunology; 81, 323-332

- VILLA M.L., RAPPOCCIOLO G., PIAZZA P., CLERICI E. (1985)
Monocyte mediated modulation of the antibody response in vitro
Immunology Letters; 11, 29-37

- WERDELIN O. (1986)
Determinant Protection. A Hypothesis for the Activity of Immune
Response Genes in the Processing and Presentation of Antigens by
Macrophages
Scand J. Immunol.; 24, 625-636