50376
1994
181

CCO jan 2010 2353

50376
1994
181

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
SCIENCES
LILLE

A mon fils Jean,

A ma sœur,

A ma famille,

A Hervé,

Merci pour la tendresse et l'affection avec lesquelles tu as orchestré ce mémoire,
Merci pour ta patience et ton courage,
Merci pour ta rigueur et ton dynamisme dans la recherche.

D 030 060429 1

Je tiens à remercier très vivement :

Monsieur le Professeur André Capron,

Pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire, pour me faire l'honneur de juger ce travail, pour votre vision humaniste de la recherche, soyez assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur André Dhainaut,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury, soyez assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Bernard Vandenbunder,

Pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail, je tiens à vous remercier chaleureusement.

Monsieur le Docteur Claude Auriault,

Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour la confiance et l'amitié aveugles dont vous m'avez gratifiées, pour votre passion communicative de la recherche et enfin parce que sans vous ce mémoire n'existerait pas.

Je tiens à remercier vivement pour la qualité de leur intervention :

Didier,

pour la qualité de ses conseils scientifiques, pour m'avoir appris la perservérance et pour avoir accepté de corriger ce travail.

Christine,

pour ses conseils judicieux, sa rigueur et sa disponibilité.

Chrystel,

pour l'effort important qu'elle a bien voulu consentir dans la correction de ce mémoire.

Jean-Pierre,

pour sa maîtrise de la microscopie confocale, pour la qualité de la synthèse des oligonucléotides et surtout pour sa disponibilité.

Eliane,

pour ses superbes photos de microscopie électronique.

Yvan,

pour son dynamisme et son sens de la communication.

A Béatrice, à Véro,

qui m'ont donnée leur amitié .

A ce travail j'associe tout le personnel technique de l'IFR qui participe dans l'ombre aux avancées scientifiques de ce laboratoire.

Je tiens à associer également les gens de notre unité et d'ailleurs,

Han, Zaza, Maria, Jean-Loup, Marco, Sylvie-Anne, Nadine, Claudie, Bertrand, Sylvie, Monique, Dominique, Sandra Alain, Jacques...

à tous merci de votre soutien, de vos conseils et de votre disponibilité.

Je remercie la direction de l'Institut Pasteur de Lille d'avoir accepté les contraintes horaires que ce travail m'a imposé.

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

Cottrez, F. , Auriault, C., Capron, A. and Groux, H. Analysis of Vβ specificity of superantigen activation with a rapid and sensitive method using RT-PCR ans a automatic DNA analyser. 1994. *J. Immunol. Methods* (in press).

Cottrez, F., Auriault, C., and Groux, H. Validation of the use of a multispecific standard molecule for quantitative PCR.*Nucleic Acids Research* (in press)

Cottrez, F., Auriault, C., Kusznier, J.P., and Groux, H. Murine IL-4 production with baculovirus : an easy an rapid method for a small scale production of interleukins (submitted).

Autres travaux

Mazingue, C., Carrière, V., Desaint, J.P., **Detœuf-Cottrez, F.**, Turz, T., Auriault, C., Capron, A. Regulation of IgE synthesis by a macrophages expressing FcE-receptors : role of Interleukine 1. 1987.*Clin. Exp. Immunol.* 67 : 587.

Mazingue, C., **Cottrez-Detœuf, F.**, Louis, J., Kweider, M., Auriault, C., and Capron, A. *in vitro* and *in vivo* effects of interleukine 2 on the protozoan parasite leishmania. 1989. *Eur. J. Immunol.* 19 : 487

Mazingue, C., **Cottrez, F.**, Auriault, C., Cesbron, J.Y., and Capron, A. Obtention of a human primary humoral response against schistosome protective antigens in severe combined immunodeficiency mice after the transfer of human peripheral blood mononuclear cells. 1991. *Eur. J. Immunol.* 21 : 1763.

Ce travail a été accompli :

Au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
de l'Institut Pasteur de Lille
sous la direction du Pr. A. Capron et dans le groupe du Dr. C. Auriault

puis
dans l'URA-CNRS 1854
de l'Institut Pasteur de Lille
sous la direction du Dr. C. Auriault

Abréviations

ACF : ---------- Adjuvant complet de Freund
AcNPV : ---------- Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus
ADCC : ---------- Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity
ADN : ---------- Acide désoxyribonucléique
ADNc : ---------- Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : ---------- Acide ribonucléique
ARNc : ---------- Acide ribonucléique complémentaire
ARNm : ---------- Acide ribonucléique messager
BET : ---------- Bromure d'éthidium
$CD4^+$: ---------- Cellules T porteuses de la molécule CD4
$CD8^+$: ---------- Cellules T porteuses de la molécule CD8
ConA : ---------- Concanavalline A
CPA : ---------- Cellules Présentatrices de l'Antigène
ELISA : ---------- Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FsF-1 : ---------- Fibroblast Stimulating Factor-1
$\gamma\delta^+$: ---------- Cellules T porteuses du récepteur T $\gamma\delta$
IFN-γ : ---------- Interféron-γ
IL- : ---------- Interleukine
kb : ---------- kilobases
kDa : ---------- kilodalton
MCA1, MCA2 : ---------- plasmides comportant notre molécule d'ADN standard (Multi Cytokine Analysis)
NK : ---------- Cellules cytotoxiques des cellules tumorales (Natural killer)
NO : ---------- Oxyde nitreux (Nitrix Oxid)
pb : ---------- paire de bases
PCR : ---------- Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
RT-PCR : ---------- Réaction de polymérisation en chaîne précédée d'une étape de transcription inverse des ARNs
SDS-PAGE : ---------- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate sodium
SEA : ---------- Antigène d'œufs de schistosomes
Sm28-Gst : ---------- Glutathion S-Transférase de 28 kDa de *Schistosoma mansoni*
Th : ---------- cellules T auxilliaires (T helper)
TGF : ---------- Transforming Growth Factor
TNF : ---------- Tumor Necrosis Factor

RESUME

Dans le domaine de l'immunologie et notamment dans l'étude des interactions qui régissent les échanges d'informations entre les cellules du système immunitaire, on a assisté ces dernières années à l'émergence de nouvelles approches technologiques. Ces nouvelles techniques, beaucoup plus performantes, permettaient pour la première fois d'analyser le rôle de chacun des acteurs du système immunitaire *in vivo* et non plus dans des système artificiels de restimulation ou de cultures *in vitro*. Il était donc nécessaire pour tous les laboratoires impliqués dans ces études de développer ces nouveaux outils. En fait, c'est à partir de la découverte de la technique de polymérisation en chaîne ou PCR que l'on a pu assister à cet essor de nouvelles approches plus sensibles. Cette technique de PCR consiste en l'amplification exponentielle et spécifique d'une séquence d'ADN, ce qui permet ensuite de détecter facilement le produit amplifié. Cette technique a rapidement été appliquée à l'étude des ARN messagers qui sont le reflet de l'activité des cellules et notamment à l'étude de la transcription des cytokines par les cellules du système immunitaire dans des conditions pathologiques (comme la Schistosomiase) ou suite à l'injection d'un antigène (comme dans le contexte d'une stratégie vaccinale). Toutefois, si la détection d'un faible nombre de copies était facile, la quantification ou la comparaison se révélait plus délicate car l'efficacité d'amplification n'était pas égale entre les différents échantillons. La solution était d'utiliser une molécule d'ADN contrôle qui permettait de suivre l'amplitude de ces variations. Nous avons choisi de construire une molécule d'ADN standard polyspécifique synthétique qui nous permettait d'analyser les transcrits de 6 interleukines (IL-2,4,5,6,10, et IFN-γ) et de la β-Actine. Nous avons ensuite validé l'utilisation de cette molécule standard dans nos conditions expérimentales et nous l'avons utilisée dans une étude préliminaire sur les réponses du système immunitaire à l'injection d'un antigène.

Nous avons également appliqué cette technique de RT-PCR à l'analyse des différentes chaînes Vβ du récepteur T. Le couplage de la technique de PCR à l'analyseur automatique d'ADN nous permet maintenant d'apprécier les différents réarrengements de la région CDR3 du récepteur T et donc une analyse plus fine des modifications du récepteur T. Cette technologie a été appliquée à l'analyse des modifications induites par l'activation avec un superantigène sur le répertoire des cellules T.

Enfin, l'utilisation de plus en plus fréquente dans les laboratoires de recherche de cytokines recombinantes, nous a incité à rechercher une technique d'expression de protéines en grande quantité. Nous avons donc développé l'expression de protéines par le système du baculovirus, et nous l'avons appliqué à la production d'IL4 murine recombinante.

Qu'est-ce qu'une technique? Au sens le plus général du terme, c'est un ensemble de moyens, convenablement ordonnés, qui permettent d'atteindre une fin désirable. L'ingénieur calcule l'efficacité de ces moyens et en assure la convergence; le technicien transforme les plans en machines; il réalise le projet de l'ingénieur ou aide à son élaboration.

Beaucoup de nos contemporains ne voient pas clairement le caractère universel de la technique et se posent ainsi d'illusoires problèmes. En réalité, le domaine de la technique est aussi vaste que celui de l'action humaine. Le propre de l'homme est de découvrir, par l'observation, les causes des phénomènes, puis de les mettre en œuvre consciemment pour obtenir le résultat qu'il désire. L'agriculture est une technique, comme la médecine, la pédagogie ou la construction des lampes de radio. Pour l'homme, il n'y a point de création sans technique. Une sonate, un tableau ou un poème ne font pas exception à cette règle. Seuls les incompétents ignorent ou méprisent la part que prennent dans la littérature ou dans les arts la connaissance, la lucidité et le travail, c'est à dire le "métier".

Aussi est-il parfaitement vain d'opposer l'univers de la technique à l'univers de la culture. Les œuvres qui constituent celui-ci sont construites sur les mêmes procédés que les machines de celui-là. L'invention a partout les mêmes traits généraux; ici ou là, elle exige toujours un esprit ouvert et attentif, l'art des rapprochements inattendus, quelques hasards heureux que l'on sait saisir et utiliser, l'aptitude à se concentrer, la ténacité dans le travail, la rigueur dans la critique... En réalité, il n'y a qu'un monde, celui où l'homme, cet animal technique, soumis à la dure loi du temps, construit petit à petit l'idée ou la chose qu'il désire. Là où son opération est consciente, raisonnée, volontaire, il y a technique. Là où la lucidité s'affaiblit et où la rigueur défaille, il ne convient pas de parler de culture mais de négligence.

Gaston Berger

Le raisonnement sera toujours juste quand il s'exercera sur des notions exactes et sur des faits précis; mais il ne pourra conduire qu'à l'erreur toutes les fois que les notions ou les faits sur lesquels il s'appuie seront primitivement entachés d'erreur ou d'inexactitude. C'est pourquoi, l'expérimentation, ou l'art d'obtenir des expériences rigoureuses et bien déterminées, est la base pratique et en quelque sorte la partie exécutive de la méthode expérimentale appliquée à la médecine. Si l'on veut constituer les sciences biologiques et étudier avec fruit les phénomènes si complexes qui se passent chez les êtres vivants, soit à l'état physiologique, soit à l'état pathologique, il faut avant tout poser les principes de l'expérimentation et ensuite les appliquer à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique. L'expérimentation est incontestablement plus difficile en médecine que dans aucune autre science; mais par cela même, elle ne fut jamais dans aucune plus nécessaire et plus indispensable. Plus une science est complexe, plus il importe, en effet, d'en établir une bonne critique expérimentale, afin d'obtenir des faits comparables et exempts de causes d'erreur. C'est aujourd'hui, suivant nous, ce qui importe le plus pour les progrès de la médecine.

Pour être digne de ce nom, l'expérimentateur doit être à la fois théoricien et praticien. S'il doit posséder d'une manière complète l'art d'instituer les faits d'expérience, qui sont les matériaux de la science, il doit aussi se rendre compte clairement des principes scientifiques qui dirigent notre raisonnement au milieu de l'étude expérimentale si variée des phénomènes de la nature. Il serait impossible de séparer ces deux choses : la tête et la main. Une main habile sans la tête qui la dirige est un instrument aveugle; la tête sans la main qui réalise reste impuissante.

Claude Bernard

Ce mémoire a été conçu de telle sorte que chaque partie soit indépendante des autres et puisse être lue séparément.

Bien que mon rôle soit de mettre en avant l'interface technique, il ne faut pas omettre de considérer l'approche fondamentale qui détermine et oriente les recherches et par là même, les outils technologiques nécessaires à leur réalisation. En fait, les concepts scientifiques qui nécessitent une démonstration des principes élaborés, sont basés sur la réflexion à deux niveaux, l'un plus conceptuel, et l'autre plus appliqué. L'un et l'autre sont étroitement associés et ne peuvent exister séparement qu'en dehors d'un laboratoire de recherche, l'un tourné vers la pensée philosophique ou vers la dynamique de la recherche, et l'autre vers l'application industrielle ou diagnostique.

Le travail qui a fait l'objet de ce mémoire est la concrétisation de cette approche technique, et a puisé son inspiration dans l'étude de la réponse immune vis à vis de *Schistosoma mansoni*. La pathologie associée au trématode *Schistosoma mansoni* est la fibrose hépatique suite à la ponte des œufs des parasites dans le canal hépato-biliaire, créant autour de ceux-ci une inflammation locale à médiation cellulaire, appelée granulome. De l'induction du granulome à la fibrose, l'équilibre entre l'hôte et le parasite va nécessiter l'intervention de nombreux mécanismes immunitaires essentiellement modulés par des facteurs solubles d'origine cellulaire, pléïotropiques, les cytokines. Les études visant à la compréhension de ce système complexe ont donné lieu à de nombreuses publications et ont permis de mieux définir le rôle de chaque intervenant. Cependant, de nombreuses questions restent posées. Une des façons de parvenir à les résoudre serait un support technique plus fiable et plus sensible; la discussion de l'article de Wynn et coll.pose clairement le problème et soulève l'importance d'un support technique de qualité. Cette notion sera discutée tout au long de ce mémoire dont le premier chapitre est articulé de la façon suivante: après une introduction générale sur la schistosomiase et sur l'immunorégulation du granulome, j'ai choisi d'analyser les résultats en fonction des différentes approches fondamentales et techniques dans le modèle de la réaction granulomateuse autour de l'œuf de schistosome, mais aussi d'introduire de nouvelles idées de technologies qui pourraient aider à la compréhension de ces mécanismes.

La suite de ce mémoire aborde l'étude de l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour les cytokines. Après de nombreux essais infructueux dans l'étude des ARNm codant pour l'IL-4 murine, il a fallu reconsidérer l'approche expérimentale. Les travaux de Mac Knight sur l'IL-4 de rat m'ont amenée à introduire la technique de PCR (polymerase chain reaction) dans l'analyse des transcrits. Une première étude *in vivo* des ARNm codant pour les cytokines chez le rat dans le cadre d'une immunisation m'a permis de comprendre la nécessité de standardiser et de contrôler cette technique. L'extrême sensibilité de la technique de PCR repose sur l'amplification exponentielle des matrices initiales. Tout serait simple si cette amplification

suivait un calcul mathématique tout au long de la réaction, qui permettrait de déterminer la quantité de produit initial en fonction de la quantité finale. Or cette amplification subit un écrasement à un moment donné, difficile à maîtriser, qui est fonction de la baisse de l'activité enzymatique et de la qualité des nombreux composants intervenant dans cette réaction. D'où la nécessité de standardiser cette technique par l'introduction de contrôles internes à chaque échantillon au début de l'amplification. C'est ainsi que sont nées les constructions MCA1 et MCA2 qui sont des contrôles internes exogènes pour l'étude des cytokines murines. Ce chapitre est constitué dans sa première partie d'une description des différentes techniques adaptées à l'étude de l'activité transcriptionnelle des gènes, puis dans sa deuxième partie, de l'étude de la RT-PCR (PCR précédée d'une étape de transcription inverse) et des différents contrôles utilisés pour sa standardisation. La troisième partie concerne les résultats et le travail de mise en place et de l'application de cette technologie dans le laboratoire. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Nucleic Acids Research. Enfin, la conclusion mettra l'accent sur les améliorations à apporter à ce système de façon à le simplifier.

Le troisième chapitre est une application de la RT-PCR à l'étude des différentes sous-familles des chaînes Vβ du récepteur T. Cette étude a été entreprise pour pallier le manque de sensibilité de la cytométrie de flux. Le problème alors posé était de mesurer au sein du répertoire T une diminution spécifique d'une sous-population suite à l'activation par des superantigènes. Ceci afin d'évaluer une différence de réponse entre les cellules de sujets sains et celles de sujets infectés par le VIH. La RT-PCR associée à un analyseur automatique d'ADN nous a permis d'objectiver ces modifications mais également d'introduire une notion supplémentaire avec la visualisation des différentes longueurs des régions CDR3 des chaînes Vβ. Ce travail a fait l'objet d'une publication technique dans Journal of Immunological. Methods.

Le quatrième chapitre introduit quant à lui le problème de la production de protéines *in vitro* qui de façon idéale aboutirait à l'obtention d'une protéine pure et biologiquement active, en quantité importante, avec un coût relativement modéré. L'IL-4 était un candidat prioritaire pour les différentes applications de cette cytokine dans nos programmes de recherche. Suite à la lecture d'un article paru dans le journal Cell montrant l'expression de molécule du complexe majeur d'hiscompatibilité de classe II dans le système d'expression en baculovirus, je fus convaincue que cette démarche permettait de répondre aux restrictions sur la qualité de la protéine soulevées précédemment. Une collaboration avec le Dr.Yvan De Launoit, qui travaille dans le laboratoire du Pr. D. Stéhelin, m'a permis d'obtenir le matériel de base pour la mise en place de ce système au sein du campus de l'Institut Pasteur de Lille. Après une analyse du sujet, il était clair que la difficulté essentielle résidait dans le sélection des virus recombinants. Pour simplifier cette approche, les améliorations techniques vont d'ailleurs dans ce sens et utilisent en général divers marqueurs de sélection. Le système BlueBac élaboré par la société Invitrogen

m'a séduite par son ingéniosité et par son efficacité et c'est ce dernier que j'ai choisi pour la mise en place de cette technologie. La première partie de ce chapitre m'a amenée à faire une synthèse sur les différents systèmes d'expression de protéines en terminant sur les avantages et les inconvénients de chacun d'entre-eux. Ceci afin de donner des éléments de choix à tout un chacun qui désirerait s'intéresser à l'expression de protéines *in vitro*. La deuxième partie expose les résultats obtenus après l'expression de l'IL-4 en baculovirus, c'est à dire l'approche technique et l'étude des propriétés biochimiques et biologiques de l'IL-4m synthétisée en baculovirus. Ce troisième travail s'est concrétisé par un article soumis à ce jour dans European Cytokine Network.

McKnight, A.J., A.N. Barclay, and D.W. Mason. : Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire subsets of $CD4^+$ T cells.(1991) *Eur. J. Immunol.* **21** : 1187.

Stern, L.J. and D.C. Wiley. : The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty $\alpha\beta$ heterodimers in the absence of antigenic peptide. (1992) *Cell* **68** : 465.

Wynn, T.A., I. Eltoum, A.W. Cheever, F.A. Lewis, W.C. Gause, and A. Sher. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Shistosoma mansoni*. (1993)*J. Immunol.* **151** : 1430.

PLAN

La schistosomiase en tant que modèle d'étude de la réponse immune à médiation cellulaire

1. LA SCHISTOSOMIASE : RAPPELS DE PARASITOLOGIE p.B-3

2. LES PRINCIPAUX MECANISMES CELLULAIRES A *Schistosoma mansoni* p.B-4

3. IMMUNOREGULATION DU GRANULOME p.B-5

4. ETUDE DES CYTOKINES DANS LE GRANULOME ET NECESSITE DE LA MISE AU POINT DE NOUVEAUX OUTILS TECHNOLOGIQUES p.B-7

5. ANNEXE p.B-14

6. BIBLIOGRAPHIE p.B-18

PCR comparative

A. GENERALITES TECHNIQUES CONCERNANT LA DETECTION DES ARNm p.C-1

1. PURIFICATION DES ARNS p.C-3
- 1.1. Purification des ARNs totaux:
  - 1.1.1. Préparation des ARNs par leurs propriétés physiques: le gradient de densité.
  - 1.1.2. Préparation des ARNs par séparation chimique
- 1.2.Purification des ARN Poly A+

2. LES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DES ARNS MESSAGERS p.C-6
- 2.1. Principe
- 2.2. Le concept de sonde
- 2.3. Le Northern blot
- 2.4. La RNAse protection
- 2.5. L'hybridation "*in situ*"
- 2.6 La PCR *in situ (Polymerase Chain Reaction)*

3. PRINCIPE ET GENERALITES SUR LA TECHNIQUE DE PCR p.C-13
- 3.1. Matériel et réactifs
  - 3.1.1 Matériel
  - 3.1.2. Réactifs
  - 3.1.3. Validation de la PCR.
- 3.2. La détection des produits d'amplification
  - 3.2.1. Gel d'agarose
  - 3.2.2. Le Southern blot
  - 3.2.3. Incorporation d'un nucléotide radiomarqué
  - 3.2.4. Marquage des amorces
  - 3.2.5. Séparation par HPLC
- 3.3. Les précautions à prendre lors d'une analyse par PCR
- 3.4. La RT-PCR

B. PRINCIPE DE LA RT-PCR COMPARATIVE p.C-25

1.APPLICATION DE LA RT-PCR POUR LA DÉTECTION DES TRANSCRITS CODANT POUR LES CYTOKINES p.C-26
1.1. Avantages et inconvénients de la RT-PCR

2. LA "QUANTIFICATION" PAR RT-PCR p.C-28
2.1. Les standards internes endogènes
2.2. Le standard interne exogène
2.2.1. Standard avec mutation ou délétion d'un ADN connu.
2.2.2. Les standards internes synthétiques

C. RESULTATS p.C-38

1. CHOIX DU STANDARD p.C-39
1.1. Données du problème
1.2. Choix du standard

2. CHOIX DES AMORCES p.C-42

3 CHOIX DE LA TECHNIQUE DE DETECTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION p.C-45

4. CONSTRUCTION DU STANDARD p.C-47
4.1. Principe
4.2 Contrôle du standard polyspécifique
4.3 Modification du standard polyspécifique en vue de son utilisation sur un analyseur automatique d'ADN
4.4 Transcription *in vitro* de l'ARN compémentaire du standard

5. ETUDE DE L'EFFICACITE ENZYMATIQUE DU STANDARD INTERNE EXOGENE POLYSPECIFIQUE MCA1 ..... p.C-57
5.1 La méthode utilisée pour la validation

6. ARTICLE p.C-58
6.1. Conclusions

7. EXEMPLES D'UTILISATIONS DU STANDARD INTERNE PAR L'ETUDE DES CYTOKINES *IN VIVO* p.C-59
7.1. Utilisation des amorces spécifiques avec un standard interne endogène standard interne endogène
7.2 Utilisation d'un standard interne exogène
7.2.1. Evaluation de la quantité de β-actine
7.2.2 Mesure de la quantité d'ADNc de manière comparative
7.2.3 Analyse des résultats
7.3 Discussion sur l'intérêt d'utiliser la molécule d'ADN standard dès l'étape de transcription inverse

8. CONCLUSIONS p.C-67

9. DIRECTIONS FUTURES p.C-68
9.1. Amélioration de la technique de préparation des ARNs
9.2 Simplification de l'étape de quantification des produits d'amplification

10. BIBLIOGRAPHIE p.C-71

Analyse des chaînes Vβ du récepteur T

1. LES GENES DU RECEPTEUR T p.D-1

1.1. Introduction
1.2. Les gènes du récepteur T
1.2.1. La chaîne α
1.2.2. La chaîne β
1.3. Le répertoire des régions V du récepteur T
1.4. Le répertoire des cellules T
1.5. Le rôle des superantigènes dans la sélection thymique
1.6. Les superantigènes.
1.7. Importance de l'analyse du répertoire T

2. LES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES p.D-8

2.1. Analyse à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des chaînes V
2.2. RNASE protection
2.3. Analyse par PCR
2.3.1. Les amorces spécifiques des chaînes variables
2.3.2. la PCR ancrée
2.3.3. Primers consensus.
2.3.4. la PCR inverse
2.3.4. La PCR quantitative

3. ANALYSE DE LA SPECIFICITE V DE L'ACTIVATION PAR LES SUPERANTIGENES AVEC UNE MÉTHODE UTILISANT LA RT-PCR ET UN ANALYSEUR AUTOMATIQUE D'ADN p.D-13

4. ARTICLE p.D-14

5. DISCUSSION p.D-15

6. BIBLIOGRAPHIE p.D-16

Expression d'IL-4 en baculovirus

A. INTRODUCTION p.E-1

1. JUSTIFICATION DU TRAVAIL p.E-2
1.1. Données actuelles du sujet
1.2. Les études déterminent les besoins

2. L'INTERLEUKINE 4 ..... p.E-4
2.1. Introduction
2.2. Biochimie et génétique de l'IL-4 murine
2.3. Activité biologique

3. CONCLUSION p.E-7

B. LES SYSTEMES D'EXPRESSION DE PROTEINES p.E-8

1. LES VECTEURS p.E-10
1.1. Les vecteurs d'expression chez la bactérie
1.2. Les vecteurs d'expression chez la levure

1.2.1. Les vecteurs épisomiques
1.2.2. Les vecteurs intégratifs
1.2.3. Le chromosome artificiel de levure:YAC
1.3. Les vecteurs plasmidiques d'expression dans les cellules de mammifère
1.3.1. Les promoteurs et séquences activatrices
1.3.2. Signaux de polyadénylation
1.3.3. Contrôle de la réplication
1.3.4. Contrôle de la sélection des recombinants
1.4. Les vecteurs viraux
1.4.1. Les poxvirus
1.4.2. Le virus SV40
1.4.3. Les Adénovirus
1.4.4. Les rétrovirus
1.4.5. Les baculovirus

2. LES SYSTEMES DE TRANSFECTION p.E-24
2.1. Le phosphate de calcium
2.2. Le DEAE dextran
2.3. La fusion de protoplasme
2.4. Les liposomes
2.4.1. Les liposomes non fusogènes
2.4.2. Les liposomes fusogènes, virosomes et pH sensibles
2.4.3. Les liposomes cationiques
2.5. L'electroporation
2.6. La micro-injection
2.7. Conclusion

3. LES CELLULES HÔTES p.E-28
3.1. Les bactéries
3.2. Les levures
3.3. Les cellules de mammifères
3.4. Les cellules d'insectes

4. CONCLUSION GÉNÉRALE p.E-33

C. CHOIX DU SYSTEME D'EXPRESSION DE L'IL-4m p.E-35

1. INTRODUCTION p.E-36

2. LA BIOLOGIE DES BACULOVIRUS p.E-37

3. IDENTIFICATION ET PURIFICATION DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS p.E-39

D. ETUDE DE LA PRODUCTION D'IL-4 MURINE DANS LE SYSTEME D'EXPRESSION DU BACULOVIRUS p.E-41

1. CLONAGE ET CONSTRUCTION DU PLASMIDE DE TRANSFERT p.E-42

2. TRANSFECTION DANS LES CELLULES D'INSECTES p.E-46
2.1. Les cellules d'insectes
2.2. Transfection des cellules d'insectes

3. SELECTION DES VIRUS RECOMBINANTS p.E-47
3.1. Sélection par dilution limite
3.2. Sélection par la technique de plaque assay
3.3. Autres techniques de sélection des virus recombinants

3.3.1. Hybridation d'empreintes
3.3.2. Par PCR

4. PREPARATION DES STOCKS VIRAUX.....p.E-54
4.1. Préparation N°1 (P1)
4.1. Préparation N°2 (P2)
4.3. Préparation N°3 (P3)
4.4. Détermination du titre viral

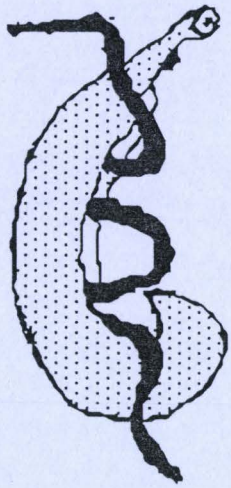
5. CARACTERISATION DE LA PROTEINE p.E-55
5.1. Caractérisation biochimique
5.1.1. ELISA
5.1.2. Western blot
5.1.3. Marquage métabolique et immunoprécipitation
5.1.4. Etude de la glycosylation
5.2. Caractérisation de l'activité biologique
5.3. Analyse de l'expression d'IL-4 par immunofluorescence
5.4. Caractérisation structurale de la cellule d'insecte transfecté

6. ARTICLE p.E-64

7. CONCLUSION p.E-65

8. BIBLIOGRAPHIE.....p.E-66

Annexe technique



La Schistosomiase en tant que modèle d'étude de la réponse immune à médiation cellulaire

PLAN

1. LA SCHISTOSOMIASE : RAPPELS DE PARASITOLOGIE p.3

2. LES PRINCIPAUX MECANISMES CELLULAIRES
A *Schistosoma mansoni* p.4

3. IMMUNOREGULATION DU GRANULOME p.5

4. ETUDE DES CYTOKINES DANS LE GRANULOME
ET NECESSITE DE LA MISE AU POINT DE NOUVEAUX
OUTILS TECHNOLOGIQUES p.7

5. ANNEXE p.14

6. BIBLIOGRAPHIE p.18

La schistosomiase en tant que modèle d'étude de la réponse immune à médiation cellulaire

Le but de ce chapitre n'est pas de faire une description exhaustive des mécanismes immunitaires dirigés contre la schistosomiase mais d'ouvrir le débat concernant l'importance de la mise en œuvre d'outils technologiques qui seraient à même d'aider à la compréhension de l'implication des cytokines dans cette pathologie.

1. LA SCHISTOSOMIASE : RAPPELS DE PARASITOLOGIE

Les schistosomes sont des organismes eucaryotes appartenant à la classe des vers plats à sexe séparé (Trématodes). Le genre Schistosoma comprend plusieurs espèces dont les plus pathogènes sont chez l'homme *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma japonicum.* Ils développent leurs cycles entre un mollusque aquatique et un mammifère. La forme larvaire émise par le mollusque pénètre la peau par digestion des tissus où elle se transforme en quelques heures en un organisme morphologiquement et antigéniquement différent : le schistosomule. Après quelques jours, ces larves quittent la peau par les veinules et se développent en 4 à 5 semaines en un ver adulte. Au cours de ce cycle de maturation, le schistosomule passe tout d'abord par le cœur droit puis dans les poumons où il reste 3 à 4 jours, puis via le cœur gauche, il gagne les organes périphériques. Il s'établit enfin dans les rameaux de la veine porte où il vit plusieurs années. Dès la 5ème semaine les adultes se reproduisent, et la femelle pond des œufs qui digèrent la paroi intestinale, passent dans l'intestin et sont éliminés dans les fèces, contribuant ainsi à la propagation du parasite : les œufs au contact de l'eau éclosent et libèrent une larve qui à son tour infeste le mollusque vecteur. Une partie de la ponte est toutefois entraînée par le courant sanguin vers les sinusoïdes hépatiques où les œufs restent bloqués et initient une réaction inflammatoire à médiation cellulaire. Comme l'œuf ne peut être détruit rapidement, l'infiltrat inflammatoire s'organise en un granulome dont un des rôles est d'empêcher la diffusion des substances antigéniques toxiques de l'œuf, mais qui a également pour résultat la destruction locale du tissu hépatique. Cette étape destructive est suivie par une phase de réparation durant laquelle les tissus endommagés sont remplacés par des tissus fibreux. Les infestations élevées sont associées à une hépatite chronique suivie par un dépôt massif de collagène autour des rameaux de la veine porte. D'un point de vue macroscopique, les rameaux portes dont les parois sont épaissies par les tissus fibreux prennent l'aspect de tuyaux de pipe caractéristiques de cette fibrose que Symmers fut un des premiers à décrire. D'un point de vue clinique, l'hépatite évolue en cirrhose dont les conséquences et les complications sont une hypertension portale, le développement de varices œsophagiennes, des saignements, l'accéleration de la nécrose du tissu hépatique, une ascite et la mort par hémorragie et cachexie. On voit donc que l'essentiel de la pathologie de la bilharziose à *Schistosoma mansoni* est liée au dépot des œufs et à la formation de granulomes dans le foie.

2. LES PRINCIPAUX MECANISMES CELLULAIRES SPECIFIQUES A *Schistosoma mansoni*

La schistosomiase, comme toutes les parasitoses, est une maladie chronique, du fait de l'adaptation du parasite à son hôte. Il en résulte un équilibre complexe sans cesse en porte à faux, avantageant l'un ou l'autre des acteurs de la maladie. La résultante concrète de cet équilibre vital est un mécanisme multifactoriel où se mêlent intimement réponse inflammatoire et réponse humorale, le rôle de chacun étant à la fois bénéfique et délétère selon le moment de l'infestation. Une des composantes de cet équilibre passe par la mise en œuvre de mécanismes d'échappement ou de modulation de la réponse immune de l'hôte par le schistosome (Capron, 1992).

Après une répétition de stimulations antigéniques spécifiques des différents stades du développement parasitaire : larvaire, adulte et œuf, les défenses immunes de l'hôte vont pouvoir agir à deux niveaux : une résistance à la réinfestation appelée immunité concomitante (Smithers et coll., 1969). Cette réponse immune est un bel exemple d'équilibre entre le parasite et son hôte. En effet, elle n'agit pas sur le ver adulte, lui permettant de se maintenir dans son hôte tout en limitant la surinfestation par une action sur les larves infestantes. Un deuxième type de réponse, dirigé contre les œufs du parasite, induit quant à lui la formation des granulomes hépato-intestinaux qui sont responsables des phénomènes pathologiques observés au cours de la schistosomiase (Stenger et coll., 1967).

3. IMMUNOREGULATION DU GRANULOME

La réponse immune faisant suite à l'arrivée des œufs dans le foie est largement étudiée car elle est responsable de la pathologie fibreuse et parce que sur un plan purement fondamental elle représente un modèle très complexe de réponse immune associant une réponse de type inflammatoire à un phénomène d'immunomodulation.

L'arrivée des œufs dans le foie provoque une réaction inflammatoire à médiation cellulaire ou HyperSensiblité Retardée responsable de la formation du granulome (Warren et coll., 1967) (Boros et coll., 1970). Ce phénomène est induit par les sécrétions antigéniques du miracidium au travers des micropores de la coquille de l'œuf (Stenger et coll., 1967). Les populations cellulaires recrutées dans la formation du granulome sont les éosinophiles, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et des cellules géantes multinuclées (Moore et coll., 1976). Ces cellules sont ensuite remplacées par des fibroblastes qui vont alors constituer le nodule fibreux responsable de la fibrose cicatricielle (Czaja et coll., 1989) et de l'hépatomégalie. La chronologie de la formation et de l'évolution des granulomes au cours de l'infestation par *Schistosoma mansoni* dans le modèle murin sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Pathologie et immunité cellulaire dans le modèle murin de la Schistosomiase après la ponte des œufs

Chronologie	Pathologie	immunité cellulaire
phase aigüe		
à 6 semaines	•Ponte des œufs. SEA (antigène d'œuf) dans le système veineux portal mésentérique	•Sensibilisation du système immunitaire par activation des cellules SEA spécifiques dans les organes lymphoïdes périphériques
de 6 à 9 semaines	•Embolie des œufs dans le foie et formation des granulomes	•Recrutement et activation des cellules T autour de l'œuf. Ces cellules sécrètent des lymphokines dont l'IL-4 et l'IFN-γ qui participent à la formation du granulome
phase chronique		
de 12 à 20 semaines	•L'immunomodulation se caractérise par la réduction de la taille des nouveaux granulomes formés La fibrose continue entraînant une hypertension portale et une hémorragie conduisant à la mort	•Diminition globale de toutes les réponses cellulaires en terme de sécrétion de cytokines.

L'immunorégulation du granulome représente un ensemble de mécanismes complexes. Les initiateurs de cette réaction granulomateuse sont les cellules T $CD4^+$ (Mathew et coll., 1986). En effet, cette pathologie est considérablement réduite dans les souris traitées avec des anticorps anti-

CD4; de même, le granulome peut-être induit dans un modèle de souris athymiques tranférées avec une population de cellules T $CD4^+$(Cheever et coll., 1989). Ces cellules T activées vont recruter différentes populations cellulaires autour de l'œuf. C'est l'interaction entre ces composants cellulaires qui aboutira à la maturation puis à la modulation des granulomes et aux phénomènes de fibrose. Au cœur de ces interactions cellulaires, les cytokines jouent un rôle majeur dans les circuits de communication entre les cellules. Ces cytokines sont impliquées à différents niveaux de la régulation du granulome. Si l'intervention de ces facteurs pléïotropiques est clairement démontrée, il reste à définir de nombreux paramètres comme la source cellulaire et l'importance relative de chacun d'entre-eux.

4. ETUDE DES CYTOKINES DANS LE GRANULOME ET NECESSITE DE LA MISE AU POINT DE NOUVEAUX OUTILS TECHNOLOGIQUES

Deux sous-populations de lymphocytes T helpers ont été caractérisées par leur dichotomie fonctionnelle suivant le profil de lymphokines sécrétées (Mosmann et coll., 1986). Les Th1 sont communément impliquées dans les phénomènes d'hypersensibilité retardée et se caractérisent par la sécrétion d'IFN-γ, d'IL-2 et d'IL-12. Les Th2 induisent la croissance et la différentiation des lymphocytes B par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13. Le rôle de ces différentes cytokines est rappelé dans les tableaux situés en annexe de ce chapitre.

Le rôle antagoniste de ces sous-populations "helpers" a été clairement établi dans certaines pathologies. En général, si les vecteurs sont des pathogènes intra-cellulaires, la protection est modulée par une réponse de type Th1, notamment par la sécrétion d'IFN-γ (Heinzel et coll., 1991; Yamamura et coll., 1991). Par contre, dans certaines pathologies à nématodes, comme *Nippostrongylus brasiliensis* c'est la réponse de type Th2 qui régule la protection contre ce parasite par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 (Urban et coll., 1991). Des profils de sécrétions antagonistes ont donc été identifiés dans ces pathologies avec un rôle tantôt protecteur ou tantôt exacerbateur suivant le pathogène considéré.

La mise en évidence de ces deux profils sécrétoires distincts peut conduire à une simplification des phénomènes immunitaires observés au cours de ces pathologies où seules les cellules $CD4^+$ de type Th1 ou Th2 seraient concernées dans cette dichotomie fonctionnelle.

Cette complexité se retrouve au niveau du granulome induit par les œufs de *Schistosoma mansoni*. A ce propos, il est intéressant de comparer deux études du granulome définissant le rôle respectif de l'IL-4 et de l'IFN-γ. Ces travaux étudient l'intervention des cytokines à différents niveaux de la formation du granulome : au niveau de l'induction de l'hypersensibilité retardée (Chensue et coll., 1992) et au niveau de la modulation (Stadecker, 1992). Ces travaux permettent d'apporter de nouveaux éléments importants dans la compréhension des mécanismes complexes de l'immunorégulation du granulome.

Les travaux de Chensue et coll. d'ailleurs appuyés par ceux de Henderson et coll. (Henderson et coll., 1992) confirment le rôle de l'IL-4 dans l'induction de l'hypersensibilité retardée. En effet, l'injection d'anticorps anti-IL-4 au moment de la ponte réduit considérablement la taille du granulome (Chensue et coll., 1992) . Dans ce système, l'IL-4 jouerait un rôle au début de la formation du granulome dans le recrutement cellulaire et l'IFN-γ quant à lui aurait un rôle plus en aval et serait responsable de l'activation et de la maturation cellulaire. Ce rôle de l'IL-4 est tout à fait nouveau car il est classique de considérer que la réaction inflammatoire est due en grande partie à une réponse de type Th1, en présence d'IFN-γ notamment, et que l'IL-4 produite

par les Th2 aurait un effet négatif sur l'induction d'IFN-γ et induirait une diminution de la réponse inflammatoire.

Les travaux de Stadecker et coll. étudient plus particulièrement l'étape d'immunomodulation. (Stadecker, 1992). Au cours de la 16ème semaine d'infestation par *Schistosoma mansoni* dans le modèle murin, la production importante d'IL-10 dans le granulome conduirait à l'inhibition de la présentation de l'antigène par les macrophages. En effet, des études *in vitro* ont montré que des macrophages issus de granulomes hépatiques en phase chronique étaient incapables de restimuler des clones Th1 (Flores Villanueva et coll., 1992). Cette immunomodulation est un phénomène actif qui conduit à une prédominance tout à fait relative de la réponse de type Th2 due à la baisse de l'activation de la population Th1. Cette immunomodulation spécifique des cellules Th1 par l'IL-10 permet à Stadecker de formuler l'hypothèse selon laquelle cette population cellulaire de type Th1 aurait un rôle prédominant dans le formation du granulome, ce qui est confirmé par les travaux de Chikungowo et coll. En effet, l'addition d'anticorps anti-IL-2 (une cytokine produite par les Th1) est capable d'inhiber la formation des granulomes et l'injection d'un clone Th1 module la formation du granulome *in vivo* (Chikunguwo et coll., 1991).

En conclusion, on constate qu'il y a deux théories :

•d'une part, selon Chensue et coll., ce serait l'IL-4, une cytokine de type Th2 qui serait responsable de la formation du granulome.

•alors qu'à l'inverse selon Stadecker et coll., cette inflammation cellulaire serait régulée par une cytokine produite par les cellules Th1 : l' IFN-γ.

Ce système un peu déroutant nous oblige à reformuler nos hypothèses concernant le rôle antagoniste des lymphokines attribuées classiquement aux sous-populations helpers Th1 et Th2.

En effet, dans ce modèle très complexe où les réponses cellulaires et humorales sont étroitement imbriquées, il faut également inclure le rôle des autres populations cellulaires T (CD8, NK, $\gamma\delta^+$) ainsi que d'autres populations dont le rôle accessoire peut intervenir au niveau de la sécrétion de cytokines, de la présentation des antigènes ou de la cytotoxicité (macrophages, éosinophiles, mastocytes, plaquettes). Ces différentes populations peuvent orienter la réponse immune par leur restriction génétique, notamment par les molécules de classe II, par les molécules accessoires qui contribuent aux différents niveaux de réponse de la cellule T (molécule B7), et par la sécrétion de cytokines.

On comprend donc la nécessité de définir le rôle respectif des différentes populations recrutées autour de l'œuf dans la formation du granulome. Ce rôle est bien entendu contrôlé par les cytokines, et la question de savoir quelles sont les populations cellulaires qui sont à l'origine des mécanismes de protection et des mécanismes immunopathologiques n'est pas clairement définie.

Les discussions organisées autour de ce débat prennent leur fondement sur des expérimentations qui ne permettent pas de répondre complètement à la question posée. En effet, les moyens mis en œuvre dans cette démarche sont calqués sur des techniques bien établies mais qui ne donnent pas de réponse claire et précise. L'importance de la création de nouveaux outils est à considérer car la complexité de ce modèle soulève des questions trop pointues qui ne sont pas compatibles avec les moyens techniques mis à notre disposition. L'ambiguïté de l'intervention des sous-populations Th1 ou Th2 *in vivo* face à d'autres populations nous amène à nous interroger sur la façon d'apprécier la source d'une cytokine donnée; il existe une technique très sophistiquée et très séduisante qui pourrait être adaptée au système du granulome (Kamogawa et coll., 1993). On réalise des souris transgéniques où le gène de la thymidine kinase, mis en aval du promoteur du gène de la cytokine d'intérêt est introduit par transgénose. Au moment désiré, l'injection de genciclovir (la concentration doit être déterminée au préalable) va permettre d'éliminer les cellules qui synthétisent la thymidine kinase et donc celles synthétisant cette cytokine. Les cellules sont ensuite phénotypées avec celles de souris non traitées. On pourra avoir 3 cas de figure :

•toutes les cellules $CD4^+$ sont délétées : population Th0

•toutes les cellules $CD4^+$ sont présentes : la cytokine est sécrétée par d'autres populations cellulaires comme les mastocytes ou les basophiles (Williams et coll., 1993)

•Seule une partie des cellules $CD4^+$a disparu : la cytokine pourrait être produite par une population $CD4^+$de type Th2.

Une autre technique pourrait permettre de connaître l'implication des lymphokines dans ce système. Cette technique est déjà utilisée à l'heure actuelle, c'est la technique des souris "knock-out" où le gène de la protéine étudié est délété du génome de la souris. Si dans ce modèle on peut-être sur de l'absence de la protéine d'intérêt, cette délétion étant faite au niveau germinal, le système immunitaire peut au cours de l'ontogénie compenser cette perte. Une approche plus performante serait d'enlever le gène d'intérêt au moment choisi. Pour cette technique on pourrait utiliser le système de la recombinase bactérienne CRE. Cette enzyme reconnait des séquences nucléotidiques nommé *lox* et délète les gènes situés entre ces sites de reconnaissance. Il faut donc produire des souris dans lesquelles ont remplace le gène d'intérêt par le même gène entouré des séquences *lox*. En parallèle on introduit par transgénose le gène CRE en aval d'un promoteur inductible. La délétion du gène sera induite par activation de la transcription de l'enzyme CRE qui pourra déléter le gène au moment choisi. Une autre technique plus simple mais moins performante utilise une séquence anti-sens de la protéine étudiée en aval d'un promoteur inductible. L'activation de ce promoteur permettra la transcription d'ARNs anti-sens qui inhiberont la traduction des ARNm de la protéine étudiée.

Un autre niveau de complexité repose sur la détection des cytokines au sein du granulome. La comparaison des techniques utilisées et des résultats obtenus dans ce domaine par différentes équipes illustrera plus facilement notre propos. En effet, certaines équipes étudient le granulome hépatique et d'autres le granulome pulmonaire, qui est un modèle expérimental artificiel. D'autre part, pour accéder à la détection des cytokines les moyens techniques sont également différents. Certains étudient les transcrits et d'autres les protéines. Nous avons choisi de situer la comparaison au niveau des deux différents modèles de granulomes, limitant ainsi l'intervention des facteurs tissulaires. Ces approches seront discutées dans la conclusion qui suit l'étude comparative.

Etude des cytokines dans le granulome hépatique

	(Grzych et coll., 1991)	(Henderson et coll., 1992)	(Cook et coll., 1993)	
Technique utilisée				
préparation des granulomes	•Purification des granulomes entre 8 et 9 semaines	•La moitié du lobe supérieur du foie est broyée après congélation dans l'azote	•Purification des granulomes par traitement à la collagénase sur des foies de souris infestées de 6 à 8 semaines •Purification des cellules sur laine de nylon : 45% de cellules T, 50% d'éosinophiles	
méthode d'analyse	•Cultures de 25 à 50 granulomes/ml avec 10 µg/ml de SEA •Surnageants prélevés à 24 h pour doser l'IL-2 et l'IL-4 et à 72 h pour l'IL-5 et l'IFN-γ •Dosage par **ELISA**	•Les ARNs sont préparés par RNAzol. Les ARNm sont purifiés sur cellulose oligo-dT •**Northern blot** révélés par des oligonucléotides marqués au ^{32}P •analyse par densitométrie	•Les ARNs sont préparés par RNAzol avec ou sans préculture pendant 4 heures •Dosage par **RT-PCR**	•Cellules cultivées à $2x10^6$/ml + 5µg/ml de SEA. •Surnageants dosés à 24 h •Dosage par **ELISA**
Résultats				
cytokines	**Protéines**	**ARNm**	**Protéines**	**ARNm**
IL-2	-	-	+/-	-
IL-4	+	+	+	+
IL-5	+	NT	+	+
IL-10	NT	NT	+	+
IFNγ	-	+	+	-

NT : non testé

Etude des cytokines dans le granulome pulmonaire

	(Wynn et coll., 1993)	(Chensue et coll., 1992)
technique utilisée		
induction des granulomes	•5000 œufs matures en intra-veineuse dans des souris saines	•2500 œufs en intra-veineuse dans des souris infestées par *Schistosoma mansoni* en phase aigüe ou en phase chronique ou dans des souris saines 1 jour après un transfert passif de $50x10^6$ cellules spléniques ou ganglionnaires de souris infestées.
méthode d'analyse	•Récupération de 2 lobes droits du poumon entre J1 et J20 •Extraction des ARNs par RNAzol •**PCR semi-quantitative**	•Préparation des granulomes à J1, 2, 4, 8 et 16 •Purification des granulomes et incubation de 700 granulomes avec du SEA *in vitro*. •Récupération des surnageants à 24 et 48 heures •Mesure par **ELISA**
Résultats		
cytokines	**ARNm**	**Protéines**
IL-2	+	**NT**
IL-4	+	+
IL-5	+	**NT**
IL-10	+	**NT**
IFNγ	+	+

NT : non testé

Si on compare les résultats obtenus entre les modèles de granulomes hépatiques et pulmonaires lors de l'implantation des œufs, on constate une différence :

• au niveau de la présence d'IL-2 : on n'observe pas de transcrit ni de protéine dans le foie, alors que dans le poumon on retrouve à la fois les messagers et la protéine.

• au niveau de la traduction de l'IFN-γ : on observe la présence de transcrits mais peu ou pas de protéines dans le foie, alors que dans le poumon on observe à la fois la présence de transcrits et de protéines.

La régulation des granulomes semble différente entre ces deux modèles. Ceci pourrait être dû en partie aux différences dans la nature des cellules recrutées ou dans le micro-environnement cellulaire. En effet, dans le granulome hépatique on observe une désynchronisation de l'apparition des granulomes due au processus continu de la ponte des oeufs, ainsi qu'une immunomodulation due à la diminution de la réponse immune dans la phase chronique de la maladie. Par contre, le micro-environnement cellulaire est différent dans le granulome pulmonaire qui est reproduit artificiellement et de façon synchrone dans le poumon de souris, par injection d'œufs de Schistosomes par voie intraveineuse. Ce modèle en s'éloignant des conditions physiopathologiques de la maladie néglige certaines particularités des mécanismes de régulation comme l'immunomodulation par exemple. Un deuxième point concerne le statut immunologique des cellules recrutées; en effet, dans certains cas, les cellules intervenant dans les mécanismes inflammatoires observés n'ont jamais été sensibilisées par les antigènes du parasite.C'est le cas notamment du modèle d'étude expérimental de Wynn et al. (Wynn et coll., 1993) où les œufs sont injectés dans des souris saines, les cellules n'ont donc pas été préalablement sensibilisées aux antigènes de l'œuf. Les cellules $CD4^+$ recrutées au niveau du granulome sont donc des cellules naïves et *à priori* d'un phénotype Th_p ou Th0 (Les cellules précurseurs des cellules Th1 ou Th2). Ces cellules ont un profil de sécrétion de lymphokines assez large : IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ. Par contre, dans le travail de Chensue et al. (Chensue et coll., 1992),, les souris sont d'abord infestées par *Schistosoma mansoni* ou transférées avec des cellules préalablement activées par du SEA ou provenant de souris infestées en phase aigüe avant l'injection des œufs. Le recrutement cellulaire autour des œufs dans le poumon se fait donc à partir de cellules déjà sensibilisées à ces antigènes (cellules mémoires).

Les différences observées au niveau de la synthèse d'IL-2 ou d'IFN-γ peuvent également être attribuées aux approches techniques utilisées. Dans le cas de l'activation des cellules *in vitro,* les facteurs sériques nécessaires à leur croissance peuvent dans certains cas induire la sécrétion de cytokines suppressives comme l'IL-10 ou le TGFβ. De plus, d'autres cytokines, comme l'IL-2, sont utilisées comme facteurs de croissance des cellules T et pourraient sembler absentes des surnageants de culture par épuisement. Enfin, les techniques de dosage par ELISA ont une sensibilité de l'ordre du picogramme, alors que ces molécules sont biologiquement actives à des doses de l'ordre du fentogramme. Ainsi l'absence de détection d'une cytokine dans un surnageant de culture doit être interprétée avec prudence.

D'autre part, on note une activité transcriptionnelle importante d'IFN-γ, mais on ne détecte pas de sécrétion de protéines par les cellules activées *in vitro*. Dans le cas des cytokines, la régulation post-transcriptionnelle se fait le plus souvent par l'activation d'une protéine capable de se fixer dans une zone consensus située en partie 3' des ARNm et riche en nucléotides A et U (AUUUA X 3 motifs). Lors d'infestations parasitaires, la survie du parasite dépendant essentiellement de sa capacité à contrôler les activités néfastes de son hôte, un mécanisme d'inhibition de la traduction des ARNm comme moyen d'échappement serait tout à fait envisageable. Ceci permettrait d'expliquer les différences observées entre le dosage de l'IFN-γ dans les surnageants de cellules activées *in vitro* et la présence de son ARNm au cours de la formation granulomateuse dans le foie de souris infestées depuis 8 semaines. L'inhibition de la synthèse d'IFN-γ *in vitro* pourrait également être expliquée par la synthèse d'IL-10, cette cytokine étant capable d'inhiber la capacité des macrophages à présenter l'antigène.

Au vu de cette discussion, on note l'importance de posséder une technique de détection sensible des cytokines. Actuellement, la méthodologie qui permet de répondre à ces questions est la RT-PCR (réaction de polymérisation en chaîne précédée d'une étape de rétro-transcription des ARNs messagers) avec standard interne exogène. Ce standard permet de contrôler les variations dues à l'activité des enzymes intervenant dans la réaction d'amplification. La maîtrise de cet outil permettrait de répondre à des questions importantes qui pour l'instant n'ont pu être approfondies faute de moyens technologiques appropriés. Même si l'activité transcriptionnelle n'est pas toujours corrélée à la présence de la protéine, c'est pour l'instant cette approche qui permet d'évaluer avec la meilleure acuité l'activité des gènes codant pour les cytokines. Etant donné que la production de celles-ci est induite et non constitutive, on peut considérer que l'activation d'un gène conduisant à sa transcription entraînera dans ce cas la synthèse et la sécrétion de la protéine correspondante ou une régulation post-transcriptionnelle. La mise au point de cette technique fait l'objet d'une partie de ce mémoire.

Une autre ambition serait l'analyse *in vivo* des protéines secrétées par les cellules du granulome afin de corréler cette production à la transcription des ARNms correspondants. On pourrait tenter de dégager certaines voies d'approches qui pourraient s'inspirer de celle-ci:

•Sur des coupes de tissus ou de granulomes, on pourrait utiliser un anticorps spécifique branché avec un fragment d'ADN. Ce dernier peut alors être amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques biotinylées et révélées par un système avidine peroxydase. Ce système s'inspire à la fois de la PCR *in situ* et de la technique d'ELISA/PCR. (Sano et coll., 1992)

5. ANNEXE

Les tableaux ci-dessous font état des données actuelles sur le rôle des cytokines d'un point de vue général mais aussi plus particulièrement dans la régulation du granulome de *Schistosoma mansoni*.

Les cytokines dans le granulome				
		Cellule cible		
	Sources	Lymphocyte T	Lymphocyte B	Autres cellules
Cytokines caractéristiques des Th1				
IFN-γ	CD4+ CD8+ NK	↑molécules d'adhésion	↑prolifération ↑différenciation IgG2a, IgG2b	activation des macrophages ↑production NO ↑activité LAK ↓croissance cellulaire
Rôle dans le granulome	Il diminue la fibrose (1) et induit la formation de cellules géantes. L'injection d'IFN-γ recombinant diminue la taille des granulomes. Effet inverse de l'injection d'anticorps anti-IFN-γ (2). Des études contradictoires (3,4) montrent que les anticorps anti-IFN-γ n'ont aucun effet sur la taille des granulomes L'IFN-γ aurait un rôle dans la différenciation et l'activation cellulaire dans la phase tardive du granulome (3)			
IL-2	CD4+ CD8+ Cellules B	↑prolifération ↑production de cytokines ↑cytotoxicité	↑activation ↑prolifération ↑différenciation	↑activité NK ↑activité LAK
Rôle dans le granulome	L'injection d'IL-2 recombinante augmente la taille du granulome en phase chronique (5). L'injection d'anticorps anti-IL-2 réduit la taille du granulome et la fibrose hépatique en phase aigüe (2,6,7) et inhibe la sécrétion d'IL-5 et le recrutement des éosinophiles. L'IL-2 augmente la prolifération cellulaire et la production de collagène, elle induit la stimulation des précurseurs des Th2 (7,8,9).			
IL-12	CD4+ Th1 Cellules B Monocytes	↑prolifération ↑cytotoxicité		↑production IFN-γ ↑activité NK ↑cellules LAK(avec IL-2)

Les cytokines dans le granulome				
		Cellule cible		
	Sources	Lymphocyte T	Lymphocyte B	Autres cellules
Cytokines associées aux Th_2				
IL-4	CD4+Th2 Mastocytes Basophiles	↑activation ↑prolifération ↑cytotoxicité	↑activation ↑prolifération ↑différenciation IgE et IgG1	↑présentation de l'antigène ↑activation des cellules souches ↑prolifération des mastocytes ↑sécrétion IL-5 ↓des cytokines inflammatoires par les monocytes
Rôle dans le granulome	L'injection d'IL-4 recombinante en phase aigüe de la maladie augmente la taille des granulomes et la prolifération des Th2(10). L'injection d'anticorps anti-IL-4 réduit la taille des granulomes hépatiques et pulmonaires(2,3,4,6,9). Elle bloque la synthèse d'IgE sans altérer la résistance à l'infection (11).			
IL-5	CD4+ CD8+ Eosinophiles	↑cytotoxicité (avec IL-2)	↑activation ↑différenciation IgA	↑différenciation, la prolifération et l'activation des éosinophiles
Rôle dans le granulome	Permet le recrutement des éosinophiles. L'injection d'anticorps anti-IL-5 neutralise le recrutement des éosinophiles sans altérer la taille des granulomes (10)			
IL-6		↑prolifération ↑différenciation	↑production d'anti-corps ↑prolifération des hybridomes	↑différenciation des cellules souches
IL-10	CD4+Th0,Th 2 Cellules B Ly1+ Mastocytes Macrophages	↑prolifération (avec IL-2,-4,-7) ↓production de cyto-kines	↑prolifération ↑différenciation	↑activité des APCs ↑production IFN-γ ↓Expression MHC_{II} ↑prolifération des mastocytes ↓production de cytokines
Rôle dans le granulome	Contribue à la suppression de la réponse Th1 (6) Joue un rôle dans l'anergie induite par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) par une régulation négative de la molécule B7 (11,12) Réduit l'activité microbicide des macrophages par la suppresion de NO (12) Bloque la synthèse de TNFα (13) L'injection d'anticorps anti-IL-10 réverse l'immunodéficience des cellules T au cours de la phase chronique (14)			

Les cytokines dans le granulome				
		Cellule cible		
	Sources	Lymphocyte T	Lymphocyte B	Autres cellules
Autres cytokines				
TNFα	Monocytes, Macrophages	↑prolifération ↑cytotoxicité	↑prolifération	↓granulopoïèse ↓érythropoïèse ↑génération des monocytes et des cellules dendri-tiques ↑activité des CPAs ↑production de cytokines ↑activité des granulocytes
Rôle dans le granulome	-Le TNFα est détecté dès la 8ème semaine d'infestation, et est plus élevé dans la phase aigüe que dans la phase chronique. -Les anticorps anti-TNFα diminuent la taille du granulome (15) et bloquent la mort des Schistosomules et la production de NO par les macrophages activés par l'IFN-γ (15) -Le TNFα recombinant augmente la taille des granulomes (15) -Il restaure la capacité à former les granulomes chez les souris SCID (16) -Il augmente la fécondité des vers *in vitro* ((Amiri et coll., 1992) -Le TNFα augmente la perméabilité vasculaire. -Quand on diminue ensemble le TNFα, l'IFNγ, l'IL-2 et l'IL-4 on observe une diminution de la réaction granulomateuse (15)			
TGFβ	Lymphocytes Macrophages	↓prolifération	↓prolifération ↑synthèse d'IgA	↓prolifération des cellules endothéliales et épithéliales ↑prolifération fibroblastes ↑synthèse de la matrice extracellulaire
Rôle dans le granulome	-Inducteur de la fibrose (17). -Inhibition des cytokines produites par les macrophages et les NK -Les anticorps anti-TGFβ augmentent la résistance de l'hôte à la maladie (13).			
FsF-1	$CD4^+$du granulome			↑croissance des fibroblastes
Rôle dans le granulome	-Stimule la croissance des fibroblastes (18)			

1)(Czaja et coll., 1989), 2.(Luckas et coll., 1993), 3.(Chensue et coll., 1992), 4.(Chikunguwo et coll., 1991), 5.(Mathew et coll., 1990), 6.(Wynn et coll., 1993), 7.(Cheever et coll., 1992), 8.(Vella et coll., 1992), 9.(Yamashita et coll., 1992), 10.(Sher et coll., 1990), 11 (Stadecker, 1992), 12.(Flores Villanueva et coll., 1992), 13.(Sher et coll., 1992), 14.(Kullberg et coll., 1992), 15. (Joseph et coll., 1993), 16. (Amiri et coll., 1992), 17. (Wyler, 1992), 18.(Chatila et coll., 1992)

6. BIBLIOGRAPHIE

Amiri, P., R. M. Locksley, T. G. Parslow, M. Sadick, E. Rector, D. Ritter, and J. H. McKerrow. Tumor necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. (1992)*Nature* **356** : 604.

Boros, D. L. and K. S. Warren. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. (1970)*J.Exp. Med.* **132** : 488.

Capron, A. Immunity to schistosomes. (1992)*Current Opinion Immnunol.* **4** : 419.

Cheever, A. W., F. D. Finkelman, P. Caspar, S. Heiny, J. G. Macedonia, and A. Sher. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. (1992)*J. Immunol.* **148** : 3244.

Chensue, S. W., P. D. Terebuh, K. S. Warmington, S. D. Hershey, H. L. Evanoff, K. S.L., and G. I. Higashi. Role of IL-4 and IFNγ in *Shistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution and relationship to macrophage function. (1992)*J. Immunol.* **148** : 900.

Chikunguwo, S. M., T. Kanazawa, Y. Dayal, and M. J. Stadecker. The cell-mediated response to shistosomal antigens at the clonal level. *In vivo* funtions of cloned murine egg antigen specific $CD4^+$ T helper type 1 lymphocytes. (1991)*J. Immunol.* **147** : 3921.

Cook, G. A., A. Metwali, A. Blum, R. Mathew, and J. V. Weinstock. Lymphokine expression in granulomas of Schistosoma-infected mice. (1993)*Cell. Immunol.* **152** : 49.

Czaja, M. J., F. R. Weiner, S. Takahashi, M. A. Gambrone, P. H. Van der Meide, H. Schellekens, L. Biempica, and M. A. Zern. γ-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. (1989)*Hepatology* **10** : 795.

Flores Villanueva, P. O., S. M. Chinkunguwo, T. S. Harris, and M. J. Stadecker. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. (1992)*J. Immunol.* **151** : 3192.

Grzych, J.-M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Heiny, F. Lewis, and A. Sher. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistomiasis mansoni. (1991)*J. Immunol.* **146** : 1322.

Henderson, G. H., J. T. Conary, M. Summar, T. L. McCurley, and D. G. Colley. In vivo molecular analysis of lymphocytes involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. I IL-4 mRNA, not IL-2 mRNA is abundant in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens of infected mice. (1991)*J. Immunol.* **147** : 992.

Henderson, G. S., X. Lu, T. L. McCurley, and D. G. Colley. *In vivo* molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. II. Quantitation of IL-4 mRNA, IFN-γ mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation. (1992)*J. Immunol.* **148** : 2261.

Joseph, A. L. and D. L. Boros. Tumor necrosis factor plays a role in Schistosoma mansoni Egg-induced granulomatous inflammation. (1993)*J. Immunol.* **151** : 5461.

Luckas, N. W. and D. L. Boros. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis *mansoni*. (1993)*Clin. Immunol. Immunopathol.* **68** : 57.

Mathew, R. C. and D. L. Boros. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma response and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. (1986)*Infect. Immun.* **54** : 820.

Mathew, R. C., S. Ragheb, and D. L. Boros. Recombinant interleukin-2 therapy reverses diminished granulomatous response in anti-L3T4 treated *S. mansoni* infected mice. (1990)*J. Immunol.* **144** : 4356.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Geidein, and R. L. Coffman. Two types of murine helper T cell clone. (1986)*J. Immunol.* **136** : 2348.

Sano, T., C. L. Smith, and C. R. Cantor. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody DNA conjugates. (1992)*Science* **258** : 120.

Sher, A., R. L. Coffman, S. Hieny, P. Scott, and A. W. Cheever. Interleukin-5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. (1990)*Proc. Natl. acad. Sci. USA* **87** : 61.

Sher, A., R. Gazzinelli, I. Oswald, M. Clerici, M. Kullberg, E. J. Pearce, J. A. Berzofsky, T. R. Mosmann, S. L. James, H. C. Morse III, and G. M. Shearer. Role of T cell derived cytokines in the downregulation of immune response in parasitic and retroviral infection. (1992)*Immunol. Rev.* **127** : 183.

Smithers, S. R. and R. J. Terry. The immunity of schistosomiasis. (1969)*Adv. Parasit.* **7** : 41.

Sprent, J., E. K. Gao, and S. Webb. T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance. (1990)*Science* **248** : 1357.

Stadecker, M. J., J. K. Kamisato, and S. M. Chikunguwo. Induction of T helper cell unresponsiveness to antigen by macrophages from schistosomal egg granulomas. A basis for immunomodulation in schistosomiasis? (1990)*J. Immunol.* **145** : 2697.

Vella, A. and E. J. Pearce. $CD4^+$ Th2 response induced by *Shistosoma mansoni* eggs developes rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. (1992)*J. Immunol.* **148** : 2283.

Warren, K. S., E. O. Domingo, and R. T. B. Cowan. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. (1967)*Am. J. Pathol.* **51** : 735.

Wyler, D. J. Why does liver fibrosis occur in Schistosomiasis? (1992)*Parasitol. Today* **8** : 277.

Wynn, T. A., I. Eltoum, A. W. Cheever, F. A. Lewis, W. C. Gause, and A. Sher. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Shistosoma mansoni*. (1993)*J. Immunol.* **151** : 1430.

Yamashita, T. and D. L. Boros. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine *Schistosomiasis mansoni*. (1992)*J. Immunol.* **149** : 3659.

PCR comparative

Ce troisième chapitre est une application de la RT-PCR à l'étude des différentes sous-familles des chaînes Vβ du récepteur T. Cette étude a été entreprise pour pallier le manque de sensibilité de la cytométrie de flux. Le problème alors posé était de mesurer au sein du répertoire T une diminution spécifique d'une sous-population suite à l'activation par des superantigènes. Ceci afin d'évaluer une différence de réponse entre les cellules de sujets sains et celles de sujets infectés par le VIH. La RT-PCR associée à un analyseur automatique d'ADN nous a permis d'objectiver ces modifications mais également d'introduire une notion supplémentaire avec la visualisation des différentes longueurs des régions CDR3 des chaînes Vβ. Ce travail a fait l'objet d'une publication technique dans Journal of Immunological. Methods.

PLAN

A. GENERALITES TECHNIQUES CONCERNANT LA DETECTION DES ARNm p.1

1. PURIFICATION DES ARNS p.3
1.1. Purification des ARNs totaux:
1.1.1. Préparation des ARNs par leurs propriétés physiques: le gradient de densité.
1.1.2. Préparation des ARNs par séparation chimique
1.2.Purification des ARN Poly A+

2. LES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DES ARNS MESSAGERS p.6
2.1. Principe
2.2. Le concept de sonde
2.3. Le Northern blot
2.4. La RNAse protection
2.5. L'hybridation "*in situ*"
2.6 La PCR *in situ (Polymerase Chain Reaction)*

3. PRINCIPE ET GENERALITES SUR LA TECHNIQUE DE PCR p.13
3.1. Matériel et réactifs
3.1.1 Matériel
3.1.2. Réactifs
3.1.3. Validation de la PCR.
3.2. La détection des produits d'amplification
3.2.1. Gel d'agarose
3.2.2. Le Southern blot
3.2.3. Incorporation d'un nucléotide radiomarqué
3.2.4. Marquage des amorces
3.2.5. Séparation par HPLC
3.3. Les précautions à prendre lors d'une analyse par PCR
3.4. La RT-PCR

B. PRINCIPE DE LA RT-PCR COMPARATIVE p.25

1.APPLICATION DE LA RT-PCR POUR LA DÉTECTION DES TRANSCRITS CODANT POUR LES CYTOKINES p.26
1.1. Avantages et inconvénients de la RT-PCR

2. LA "QUANTIFICATION" PAR RT-PCR p.28
2.1. Les standards internes endogènes
2.2. Le standard interne exogène
2.2.1. Standard avec mutation ou délétion d'un ADN connu.
2.2.2. Les standards internes synthétiques

C. RESULTATS p.38

1. CHOIX DU STANDARD p.39
1.1. Données du problème
1.2. Choix du standard

2. CHOIX DES AMORCES p.42

3 CHOIX DE LA TECHNIQUE DE DETECTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION p.45

4. CONSTRUCTION DU STANDARD p.47
4.1. Principe
4.2 Contrôle du standard polyspécifique
4.3 Modification du standard polyspécifique en vue de son utilisation sur un analyseur automatique d'ADN
4.4 Transcription *in vitro* de l'ARN compémentaire du standard

5. ETUDE DE L'EFFICACITE ENZYMATIQUE DU STANDARD INTERNE EXOGENE POLYSPECIFIQUE MCA1 ..... p.57
5.1 La méthode utilisée pour la validation

6. ARTICLE p.58
6.1. Conclusions

7. EXEMPLES D'UTILISATIONS DU STANDARD INTERNE PAR L'ETUDE DES CYTOKINES *IN VIVO* p.59
7.1. Utilisation des amorces spécifiques avec un standard interne endogène standard interne endogène
7.2 Utilisation d'un standard interne exogène
7.2.1. Evaluation de la quantité de β-actine
7.2.2 Mesure de la quantité d'ADNc de manière comparative
7.2.3 Analyse des résultats
7.3 Discussion sur l'intérêt d'utiliser la molécule d'ADN standard dès l'étape de transcription inverse

8. CONCLUSIONS p.67

9. DIRECTIONS FUTURES p.68
9.1. Amélioration de la technique de préparation des ARNs
9.2 Simplification de l'étape de quantification des produits d'amplification

10. BIBLIOGRAPHIE p.71

Cette partie aborde l'étude de l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour les cytokines. Après de nombreux essais infructueux dans l'étude des ARNm codant pour l'IL-4 murine, il a fallu reconsidérer l'approche expérimentale. Les travaux de Mac Knight sur l'IL-4 de rat m'ont amenée à introduire la technique de PCR (polymerase chain reaction) dans l'analyse des transcrits. Une première étude *in vivo* des ARNm codant pour les cytokines chez le rat dans le cadre d'une immunisation m'a permis de comprendre la nécessité de standardiser et de contrôler cette technique. L'extrême sensibilité de la technique de PCR repose sur l'amplification exponentielle des matrices initiales. Tout serait simple si cette amplification suivait un calcul mathématique tout au long de la réaction, qui permettrait de déterminer la quantité de produit initial en fonction de la quantité finale. Or cette amplification subit un écrasement à un moment donné, difficile à maîtriser, qui est fonction de la baisse de l'activité enzymatique et de la qualité des nombreux composants intervenant dans cette réaction. D'où la nécessité de standardiser cette technique par l'introduction de contrôles internes à chaque échantillon au début de l'amplification. C'est ainsi que sont nées les constructions MCA1 et MCA2 qui sont des contrôles internes exogènes pour l'étude des cytokines murines. Ce chapitre est constitué dans sa première partie d'une description des différentes techniques adaptées à l'étude de l'activité transcriptionnelle des gènes, puis dans sa deuxième partie, de l'étude de la RT-PCR (PCR précédée d'une étape de transcription inverse) et des différents contrôles utilisés pour sa standardisation. La troisième partie concerne les résultats et le travail de mise en place et de l'application de cette technologie dans le laboratoire. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Nucleic Acids Research. Enfin, la conclusion mettra l'accent sur les améliorations à apporter à ce système de façon à le simplifier.

A. GENERALITES TECHNIQUES CONCERNANT LA DETECTION DES ARNm

Les gènes codant pour les cytokines ne sont pas exprimés de façon constitutive; leur expression fait suite à des processus complexes intervenant en particulier au cours de l'activation du système immunitaire; l'équilibre de ce dernier nécessite une expression importante pendant des temps relativement courts. C'est ainsi que la plupart des ARNs messagers codant pour les cytokines ont une demi-vie très courte, qui est en partie due à une zone d'instabilité dans la partie non codante de l'ARN (riche en AU) (Caput et coll., 1986); (Shaw et coll., 1986) . Quand le signal d'activation de ces gènes disparaît, les ARNs sont rapidement dégradés. Ce type de contrôle permet donc de limiter ou d'annuler la production des cytokines, assurant ainsi une très grande flexibilité au système.

Cependant, ces processus sont autant de limitations à l'étude de la régulation des cytokines; en effet, elles sont le plus souvent produites par un petit nombre de cellules et de manière très localisée. ((Poo et coll., 1988)). C'est pour ces différentes raisons que ce type d'étude a nécessité d'importantes innovations techniques .

Citons par exemple l'hybridation *in situ* couplée à l'immunocytochimie, la RT-PCR, et la PCR *in situ.*

<u>Le choix de la technique sera orienté par plusieurs critères:</u>

- Le niveau d' expression des ARNs messagers
- La quantité de matériel cellulaire ou tissulaire
- La possible identification des cellules et leur localisation
- La quantification des ARNs messagers

1. PURIFICATION DES ARNS:

La manipulation des ARNs exige des précautions d'emploi assez strictes de façon à éliminer tout contact éventuel avec les RNAses présentes de façon ubiquitaire dans le milieu ambiant, sur les mains et dans les réactifs et les tampons non traités.

Tout le matériel et les réactifs devant servir à la purification des ARNs seront traités par la chaleur (au moins 2 fois 20 minutes à l'autoclave) ou par des inhibiteurs de RNAses tels que le DEPC (diethylpyrocarbonate).

Le matériel qui ne peut être autoclavé est lavé par de l'acide iodoacétique à 10 mM et rincé à l'eau distillée autoclavée.

Le port de gants est obligatoire et ces derniers doivent être changés régulièrement.

Enfin, les réactifs doivent être rebouchés très rapidement après la manipulation.

1.1. Purification des ARNs totaux:

L'isolation d'acides ribonucléiques intacts nécessite trois étapes importantes:

-L'inhibition des ribonucléases; il est nécessaire de lyser très rapidement les cellules ou les tissus tout en inactivant les RNAses; les sels de guanidium sont les agents dénaturants les plus performants.

-La dénaturation des acides nucléiques et la dissociation des protéines pouvant s'y fixer.

-La séparation physique des ARNs des autres composants de l'homogénat

1.1.1. Préparation des ARNs par leurs propriétés physiques: le gradient de densité.

C'est une méthode de choix pour des préparations d'ARNs délicates. C'est le cas notamment des préparations contenant du glycogène, des mucopolysaccharides ou des glycosaminoglycanes (ligaments).. mais aussi pour une récupération optimale d'ARNs très dilués.

La technique consiste dans un premier temps à lyser très rapidement les cellules ou les tissus avec des réactifs chimiques qui dénaturent les protéines et les acides nucléiques. Ce tampon est fait de guanidium, le plus souvent thiocyanate (d'autres sels de guanidium existent mais sont moins efficaces pour inhiber les RNAses). On ajoute également un détergent comme le SDS ou le sarkosylate pour une bonne dénaturation des acides nucléiques et des protéines dont les ponts disulfures sont réduits par du β mercapto-éthanol ou du dithiotréitol. Lors de la

préparation d'ARNs de tissus, il est recommandé d'utiliser un homogéneisateur comme le "tissumizer" ou le "polytron". Les tissus congelés à l'azote liquide sont d'abord pulvérisés très rapidement à 4°C, puis dissous dans le tampon guanidium.

L'étape suivante consiste donc à séparer les ARNs des autres contaminants du lysat cellulaire par ultracentrifugation (Chirgwin et coll., 1979). Cette méthode est basée sur le fait que la densité des ARNs est supérieure à celle de l' ADN. L'extrait cellulaire est centrifugé sur un coussin de chlorure de césium 5,7M entre 30000 et 50000 g pendant une vingtaine d'heures. Du fait de sa haute densité, seul l' ARN est capable de traverser un tel coussin; il est récupéré dans le fond du tube après centrifugation sous forme d'un cristal très pur. L'ARN est ensuite lavé par de l'acétate de sodium 3M pH 5 et précipité à l'éthanol.

1.1.2. Préparation des ARNs par séparation chimique

Cette technique est basée sur la solubilité différentielle des ARNs par rapport aux autres constituants cellulaires dans les solvants.

Une technique de préparation des ARNs totaux a été mise au point plus récemment (Chomczynski et coll., 1987) et permet le traitement de nombreux échantillons en parallèle. L'ADN ayant une plus grande affinité pour la phase organique, les protéines restent à l'interface et les ARNs sont récupérés dans la phase aqueuse acide. Ce tampon est actuellement commercialisé par Cinna Biotecx sous l'appellation RNAzol. Il est constitué d'un tampon guanidium HCl avec du phénol et du SDS à un pH acide (inférieur à 5).

C'est une technique rapide, permettant l'extraction simultanée de dizaines d'échantillons, mais qui nécessite une quantité minimale de matériel départ (de l'ordre de 10^7 cellules en G0).

1.2.Purification des ARN Poly A+

La très grande majorité des ARNs messagers eucaryotes possède une extrémité 3' composée d'une longue séquence polyadénylique qui peut dépasser cent adénosines consécutives. Cette propriété est utilisée pour les séparer par affinité sur colonne d'oligo-dT ou dU couplés à la sépharose ou à des billes magnétiques. Ils sont ensuite séparés par centrifugation ou aimant magnétique; puis après plusieurs lavages, les ARNs messagers sont décrochés par abaissement de la force ionique. La technique utilisant des billes magnétiques est intéressante car outre la rapidité d'exécution, elle permet de travailler directement sur un lysat cellulaire, réduisant la quantité de matériel de départ, mais aussi les pertes de matériel et les contaminations par les RNAses (un nombre trop important de manipulations augmente les risques de contaminations).

La purification des ARNs Poly A+ est exigée pour la construction de banques d'ADN complémentaires, de traductions *in vitro*, mais aussi pour augmenter la sensibilité de certaines techniques de détection d'acides ribonucléiques, en enrichissant en ARNs spécifiques.

Deux grands principes sont utilisés pour la détection des ARNm :

- l'hybridation moléculaire
- la technique d'amplification des ARNm via leur ADN complémentaire (ADNc) par la technique de PCR

2. LES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DES ARNS MESSAGERS

2.1. Principe

L'hybridation moléculaire repose sur la propriété qu'ont les nucléotides Adénine et Thymine d'une part, Guanine et Cytosine d'autre part, d'établir des liaisons hydrogènes spécifiques: deux séquences nucléotidiques dites complémentaires peuvent donc s'associer.

Trois types d'associations peuvent être formées;

- 1) ADN-ADN
- 2) ADN-ARN
- 3) ARN-ARN

La stabilité de ces duplex va par ordre croissant, la stabilité la plus importante étant bien entendu celle qui met en jeu des acides nucléiques simples brins.

Certains paramètres régissent l'hybridation, mais celle-ci reste avant tout une méthode empirique dont les paramètres doivent être optimisés avec chaque condition expérimentale. En effet, des hybridations faiblement stringentes favorisent des appariements non spécifiques alors qu'au contraire, des hybridations trop drastiques donneront un signal qui aura perdu de son intensité.

La stringence désigne les forces de liaisons qui lient la sonde à sa cible. La stringence d'une hybridation dépend de deux facteurs clefs :

- la température
- la concentration en sels du tampon d'hybridation.

La stringence est proportionnelle à la température et inversement proportionnelle à la concentration en sels. La température est définie par la Tm (melting temperature ou température de fusion). La Tm est la température à laquelle 50% des brins d'ADN appariés se séparent. Cette Tm est dépendante de la concentration en bases G et C dans le brin d'ADN et de la concentration en ions sodium du milieu. La température d'hybridation optimale se situe entre 20 et 25% en dessous de la Tm. Elle peut être artificiellement abaissée par l'addition de formamide. En effet, 1% de formamide abaisse la Tm de 0,65°C. Il est donc possible d'hybrider aux alentours de 40°C au lieu de 60 à 70°C. Dans le cas de l'hybridation *in situ*, l'abaissement de la température est garante de la bonne conservation des structures cellulaires.

Dans le cas de l'utilisation de sondes oligonucléotidiques, on fixe généralement la température d'hybridation de 5 à 10°C en dessous de la Tm pour réduire les risques d'associations non spécifiques.

2.2. Le concept de sonde

Il suffit d'une copie fidèle et pure du gène, ou d'un fragment du gène, pour pouvoir repérer toute séquence identique

une sonde est SPECIFIQUE

•en tant que copie du gène, elle ne peut s'hybrider qu'avec le gène dont elle est la copie

Une sonde permet une détection SENSIBLE des acides nucléiques

•en tant que molécule marquée, elle est facile à repérer avec un seuil de détection très faible.

Généralement, pour marquer la sonde avec des éléments radioactifs, on utilise la technique dite du "random priming" ou marquage par extension d'amorces aléatoires. Le principe est le suivant :

•Après séparation des deux brins de la sonde par chauffage puis refroidissement brutal dans la glace, on ajoute un cocktail synthétique d'héxa ou de nonanucléotides où chaque combinaison est statistiquement représentée (4096 combinaisons différentes pour les héxanucléotides). Il s'en trouvera donc obligatoirement quelques uns qui s'hybrideront avec la sonde. Ils servent d'amorces pour le fragment de Kleenow de la polymérase I qui reconstitue le second brin à l'aide de déoxyribonucléotides triphosphates dont un ou plusieurs sont radiomarqués ou marqués par la fluoresceïne, la biotine ou tout autre traceur adapté. Les nucléotides non incorporés sont éliminés par chromatographie.

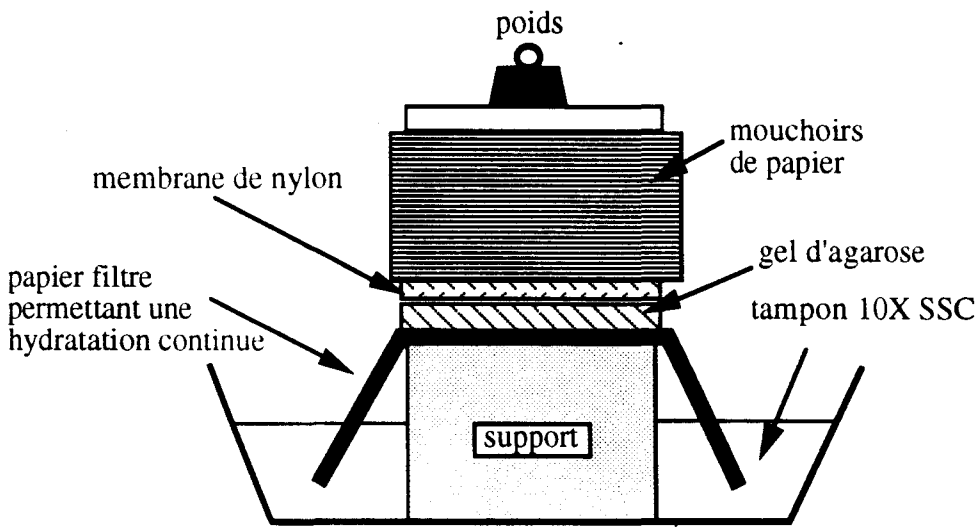
En utilisant des sondes radiomarquées, on obtient des activités spécifiques de l'ordre de $5x10^6$ à $4x10^8$ cpm/µg d'ADN. Elle est cinq fois plus importante que par la méthode dite de "nick translation" ou coupures aléatoires.

Le marquage des ribosondes (sondes ARN) se fait pendant la synthèse d'un brin ARN complémentaire de l'ADN. Cet ADN est cloné dans un plasmide qui possède les sites de fixation des ARN polymérases en amont et en aval de celui-ci. La RNA polymérase (T3, T7 ou SP6 Pol.) synthétise un ARN complémentaire à l'aide de ribonucléotides dont un ou plusieurs sont marqués (^{32}P, biotine etc...)

2.3. Le Northern blot

Le principe du Northern blot est de séparer les différents ARNs par une électrophorèse sur gel d'agarose, puis de transférer les acides nucléiques sur un support solide et enfin d'utiliser une sonde pour détecter la présence de l'ARN recherché sur le support solide

Les ARNs totaux (environ 10 à 20 µg) ou les ARNs poly-A^{+}(1 à 2 µg) sont soumis à une éléctrophorèse en gel d'agarose afin d'obtenir une séparation en fonction de la masse moléculaire. Les structures secondaires des ARNs doivent être modifiées afin qu'elles n'interfèrent pas dans la mobilité des acides nucléiques. Pour cela, l'electrophorèse est réalisée en tampon dénaturant, glyoxal ou formaldéhyde. L'electrophorèse en formaldéhyde est plus rapide et donne une meilleure résolution. Cette dénaturation va également permettre dans un deuxième temps de transférer efficacement les ARNs sur un support solide qui peut-être de la nitrocellulose ou du nylon. Ce dernier permet une manipulation plus aisée de la membrane car il est beaucoup moins fragile que la nitrocellulose. Le transfert est assuré par capillarité.



Transfert d'ARN par capillarité.

Le gel est déposé sur du papier Whatman qui assure son hydratation continue, puis il est recouvert de la membrane de transfert. On dépose sur l'ensemble un épais paquet de papier hydrophile pour créer un courant liquide ascendant qui entraîne les ARNs. Ceux-ci sont piégés sur la membrane de transfert par un mécanisme physique.

La membrane doit ensuite être chauffée au four à 80°C pour la nitrocellulose ou exposée aux rayons ultra-violets pendant 3 mn pour le nylon afin de fixer de façon irréversible les acides nucléiques. Dans le cas du nylon, la liaison se fait de façon covalente.

On réalise ensuite l'hybridation. Une étape de préhybridation permet de saturer les sites de fixation libres de la membrane de transfert. Dans le cas contraire, la sonde radioactive se fixerait

de façon non spécifique sur la membrane et rendrait l'analyse impossible. Cette saturation est réalisée avec de l'ADN de sperme de saumon, de l'albumine bovine, du lait écrémé ou tout autre agent saturant. Le qualité du bruit de fond final dépend en grande partie de cette étape.

L'hybridation proprement dite est effectuée pendant 15 heures à la température déterminée par la Tm comme précédemment. Pour les sondes radioactives, on utilise environ $1x10^6$ cpm de sonde par millilitre de tampon d'hybridation. La membrane est ensuite lavée pour éliminer les appariements non spécifiques. On réalise des bains successifs pour les étapes de lavage : des solutions dont la teneur en sels diminuent progressivement et où les températures s'élèvent graduellement permettent une déstabilisation des hybrides non stables. Il faudra trouver les conditions optimales de lavages en modifiant la stringence des tampons de façon à obtenir le meilleur rapport signal/bruit de fond. Une sonde très spécifique permet d'utiliser un tampon de lavage constitué de 0,1 SSC/0,1 SDS à une température de 60°C. Dans le cas de l'utilisation de sondes radioactives, la membrane est alors soumise à une autoradiographie. Dans le cas de l'utilisation de sondes "froides", on procède à une étape de révélation enzymatique.

Pour déterminer la taille des ARNs messagers spécifiques, on peut utiliser des standards de poids moléculaires commercialisés mais on se sert souvent des ARNs ribosomaux comme marqueurs. Le 28S rRNA de souris fait 4712 nucléotides, le 18S rRNA fait 1869 nucléotides.

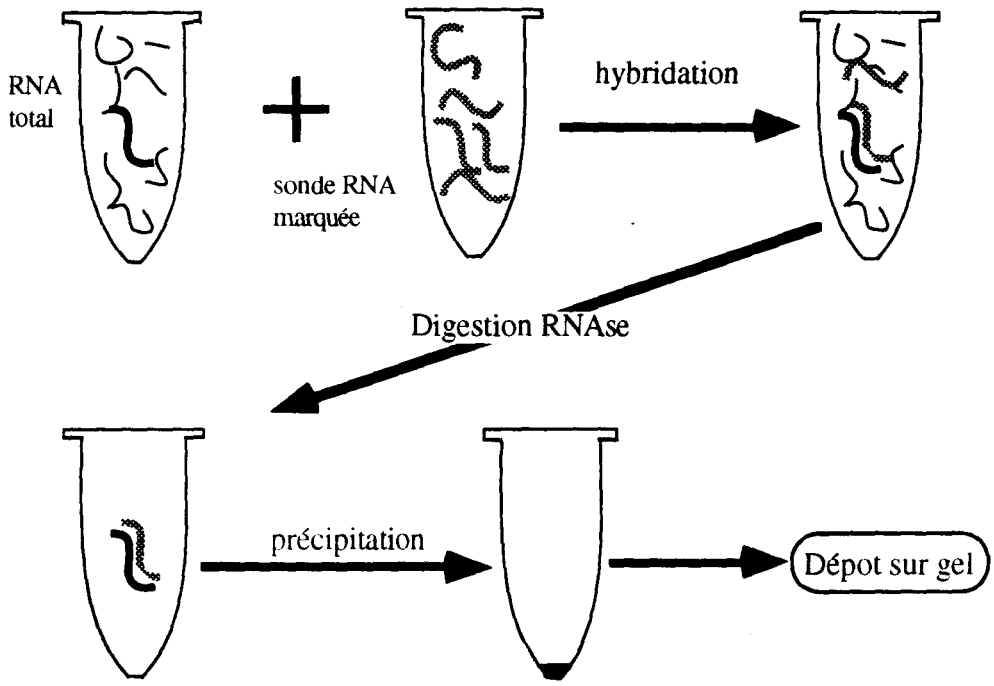
La sensibilité de détection de cette technique est de l'ordre de 10^7molécules avec une sonde ADN radioactive et de $5x10^6$ à 10^6 molécules avec une ribosonde.

La technique de Northern blot peut permettre une appréciation semi-quantitative de l'activité transcriptionnelle des gènes grâce à l'hybridation subséquente de la membrane de transfert avec une sonde homologue à un ARN produit de façon constitutive par la cellule comme la β-actine. Cette expression constitutive est supposée refléter la quantité totale d'ARNs. La comparaison de différents échantillons se fera au moyen d'un rapport entre les ARNs étudiés et l'expression de la β-actine.

2.4. La RNAse protection

Le principe de cette technique est une hybridation en phase liquide entre deux ARNs (Calzone et coll., 1987).

La sonde est donc une molécule d'ARN synthétisée *in vitro* en présence d'un ribonucléotide radiomarqué. Pour obtenir une meilleure sensibilité il faut produire une sonde ayant une bonne activité spécifique. Un à dix pg de l'ARN à étudier sont précipités avec $5x10^4$ cpm (env. 500 pg) de sonde. Après précipitation, l'hybridation est conduite pendant 2 à 18 heures dans un tampon d'hybridation dont les composants sont déterminés de la même façon que pour le Northern blot. On procède ensuite à la digestion spécifique des parties d'ARN non hybridées à l'aide de ribonucléases spécifiques des monobrins d'ARN. La RNAse A clive l'extrémité 3' des cytosines et des uridines tandis que la RNAse T1 coupe l'extrémité 3' des guanosines. Après précipitation, les hybrides sont déposés sur un gel d'acrylamide dénaturant contenant de l'urée 8 M.



Cette technique possède une sensibilité plus élevée que le Northern blot, environ 10^5 molécules (de 400 bp) mais elle est également plus difficile à réaliser. La comparaison entre divers échantillons s'effectue également par rapport à un ARN synthétisé de manière constitutive.

2.5. L'hybridation "*in situ*"

L'hybridation *in situ* (HIS) se distingue d'une hybridation conventionnelle car il s'agit d'une hybridation directe sur les acides nucléiques présents dans la cellule.

Les cellules, ou les tissus sont déposés sur des lames, puis fixés (la plupart du temps au paraformaldéhyde). La fixation a pour but de consolider les édifices cellulaires en créant de nouvelles liaisons intermoléculaires. Le bon déroulement de cette étape est essentiel au succès de l'hybridation. Une fois fixés, les échantillons doivent subir des traitements permettant d'une part de perméabiliser les structures cellulaires par un traitement à la protéinase K, ce qui augmente l'accessibilité des tissus à la sonde; et d'autre part, évite la fixation non spécifique de la sonde par une étape de préhybridation.

On procède alors à l'hybridation proprement dite. La sonde utilisée est une ribosonde préparée de la même façon que dans la technique de RNAse protection puis purifiée par chromatographie. L'utilisation de sondes froides manque encore de sensibilité et ne permet pas de quantifier les ARNm. La concentration moyenne de sonde est de 1 à 2 ng/µl. La température d'hybridation doit également être optimisée pour permettre à la sonde d'accéder aux structures intracellulaires. Après l'étape d'autoradiographie, on procède à la coloration des cellules avec du Giemsa pour les structures intracellulaires ou avec du Hœscht pour les noyaux. L'analyse se fait au microscope optique sous immersion.

Une hybridation *in situ* idéale devra combiner une bonne préservation des tissus et une sensibilité élevée, laquelle dépend de l'efficacité de l'hybridation, de la détection et du niveau du bruit de fond. Elle devra être précise, c'est à dire permettre une analyse qualitative, simple et rapide.

Cette technique permet de localiser de façon précise les ARNm au sein des cellules. Couplée à l'immunohistochimie, elle permet également l'identification phénotypique des cellules productrices des ARNs étudiés.

Une grande expérience technique est nécessaire à la bonne réalisation de cette technique.

2.6 La PCR *in situ (Polymerase Chain Reaction)*

La technique de PCR *in situ* associe les avantages et les inconvénients de l'hybridation *in situ* et de la PCR; l'ADN ou l'ADNc sont amplifiés directement dans la cellule qui peut être au sein d'un tissu ou isolée à partir de cultures *in vitro*. La difficulté est de trouver un bon rapport signal - bruit de fond. La sensibilité de cette technique est de l'ordre de 1 copie par cellule. Cette technologie est assez récente et les améliorations techniques actuelles se sont orientées vers la création de nouveaux appareils , comme un automate de PCR spécialement conçu pour contenir les lames d'hybridation ainsi que la mise au point d'un système mécanique permettant de sceller la lame de façon à éviter l'évaporation des réactifs et permettre une bonne répartition du mélange réactionnel sur la lame.(Roche, Molecular Systems Alabema, USA)

Par contre, l'évolution technique liée à la mise au point des conditions optimales de l'hybridation proprement dite en est encore à ses balbutiements et nécessite une recherche plus approfondie, notamment dans le cas de l'hybridation sur tissus.

3. PRINCIPE ET GÉNÉRALITÉS SUR LA TECHNIQUE DE PCR

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est une méthode très sensible qui permet d'amplifier un fragment d'ADN en plusieurs millions d'exemplaires. Elle permet de détecter la présence d'un gène ou les produits de son expression.

Le principe de cette technique repose sur l'utilisation de deux oligonucléotides de synthèse qui délimitent la séquence d'ADN à amplifier et qui s'apparient à la matrice simple brin après dénaturation.

Le premier oligonucléotide s'hybride sur le brin d'ADN non codant; sa séquence est donc la copie exacte du brin codant. C'est la raison pour laquelle on l'appelle sens ou 5'.(extrémité 5' phosphate de l'ADN)

Le deuxième oligonucléotide s'hybride sur le brin d'ADN codant. Sa séquence est donc complémentaire de ce dernier. On l'appelle anti-sens ou 3'. (extrémité 3' OH de l'ADN)

Pour que l'hybridation des amorces soit possible, l'ADN doit auparavant être dénaturé par la chaleur pour se présenter sous forme "simples brins". Après ces étapes de dénaturation et d'hybridation, une ADN polymérase thermorésistante va permettre l'élongation du brin complémentaire à la matrice à partir de chaque amorce dans le sens 5'⇒3'. Cette première étape donne naissance à deux molécules d'ADN identiques entre les deux amorces.

La deuxième étape donnera naissance à quatre amorces, en effet chaque nouvelle molécule d'ADN synthétisée sert ensuite de matrice pour initier l'étape de polymérisation du cycle suivant. La répétition (n fois) des trois étapes successives de dénaturation, d'hybridation et de polymérisation aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible de 2^n molécules. Cette expérience a été décrite pour la première fois par Saiki et al. (Saiki et coll., 1985) en utilisant le fragment de Kleenow comme ADN polymérase. Cependant, après chaque étape de dénaturation, il était nécessaire d'ajouter de l'enzyme. C'est en 1987 que Mullis et al. (Mullis et coll., 1987) ont utilisé une ADN polymérase thermorésistante isolée à partir de *Thermus aquaticus* , une bactérie se développant à haute température.

Si on estime le rendement de l'amplification à 100%, une molécule d'ADN donnera après 20 cycles 10^6 copies et 10^9 après 30 cycles. Cependant le rendement de l'élongation est rarement aussi élevé. On le calcule avec la formule suivante :

$$Xn = Xo\,(1+e)^n$$

nombre de cycles

nombre de copies finales

nombre de copies initiales

rendement d'amplification

3.1. Matériel et réactifs

3.1.1. Matériel

On utilise maintenant des automates qui permettent dans un même bloc thermostaté, une montée et une descente en température très rapide : environ 1°C par seconde pour la montée et 1,5°C par seconde pour la descente. Une augmentation du temps de montée ou de descente en température diminue l'activité de la *Taq* Polymérase. Un travail récent a permis de constater une hétérogénéité entre les puits qui peut aller jusqu'à 30% dans un même appareil (Resendez-Perez et coll., 1990) .

3.1.2. Réactifs

L'enzyme

La *Taq* Polymérase se sert d'une molécule d'ADN comme matrice. Elle est active entre 20 et 85°C et de façon plus optimale à 72°C où elle effectue une élongation de 35 à 100 bases par seconde.

La polymérase commercialisée sous le nom r*Tth* par la société Perkin Elmer Cetus possède à la fois une activité transcriptase inverse en présence de MnCl2 et une activité polymérase après chélation des ions Mn++ avec de l'EGTA, et addition d'ions Mg++. Cet avantage permet de réaliser la transcription inverse à une température plus élevée de façon à travailler sur des ARNs bien linéarisés.

L'association Taq polymérase et r*Tth* polymérase permet d'amplifier des fragments d'ADN jusque 45 kilobases, ce qui est considérable. Ceci permet d'ouvrir un nouveau champ d'activités comme le clonage et le séquençage de longs fragments d'ADN dont le profil de restriction n'est pas adéquate au séquençage. Ceci permet également de séquencer des ADNs clonés en phages (Roche).

Une autre polymérase a été optimisée récemment par la société Roche (*UIT*ma DNA polymérase) et permet de réparer les erreurs de mauvaises associations notamment dans la partie 3' de l'amorce.

Le tampon

composition :

20 mM Tris Hcl pH 8.3	le pH varie avec la température jusqu'à un pH=6.8
1,5 mM $MgCl_2$	de 0,5 à 10 mM permet d'augmenter la spécificité et le rendement de l'amplification.
20 mM KCl	facilite l'hybridation de l'amorce. Sa quantité varie suivant l'enzyme utilisée.
0;05% Tween 20	améliore le rendement enzymatique
100 µg/ml gélatine	Stabilise l'enzyme.
50 µM dNTP	

Des améliorations dans les composants des tampons ont été créées comme l'utilisation de tampon tricine associé à un pH élevé.

Les dNTPs

Ils sont aliquotés à 10 mM et stockés à -20°C. On les utilise entre 20 et 200 µM. 100 µl de dNTPs à 20 µM suffisent pour synthétiser 2,6 µg d'ADN. Après 50 cycles, il ne reste que 50% de produits intacts.

Choix des amorces

Pour qu'une amorce soit spécifique, il faut qu'elle ait plus de 17 bases (de 18 à 30 bases en général).

Détermination de la séquence des amorces.

Les amorces sont choisies de façon à encadrer un fragment d'ADN de 200 à 400 paires de bases si l'on analyse les fragments amplifiés sur gel d'agarose et de 150 à 400 paires de bases pour une séparation sur un gel de polyacrylamide/urée. La longueur des fragments amplifiés est souvent comprise entre 150 et 500 paires de bases.

•Le rapport G/C doit être entre 50 et 60%

•La température de fusion (Tm) doit être d'environ la même pour les deux amorces. La température de la Tm se calcule d'après la formule suivante :

2°C x (A+T) + 4°C x (G+C).

La température d'hybridation dans la réaction de PCR est généralement inférieure à la température de fusion de 2 à 4°C.

•Il faut éviter les appariements des amorces entre-elles par complémentarité de séquences et notamment dans leur partie 3' (en particulier il faut éviter les terminaisons en palindrome). Cette éventuelle complémentarité donne naissance au phénomène de "primer dimer" (amplimères). C'est une amplification de l'ADN formé par l'association des deux amorces. Cette amplification entre en compétition avec l'amplification du gène ou du cDNA à étudier. De même, l'extrémité 3' doit comporter des acides nucléiques qui se traduisent par des acides aminés assez conservés, et non pas des acides aminés dégénérés comme la methionine ou le tryptophane de façon à éviter les non-appariements lors de mutations silencieuses.

Quand la matrice est un ADNc....

•Les amorces doivent se situer près de la queue poly A dans la partie codante de l'ARN messager si on utilise une amorce oligo dT pour la transcription inverse

•Il faudra tenir compte dans l'interprétation des résultats d'une éventuelle contamination en ADN génomique (lors de la préparation des ARNs.). Ceci peut-être particulièrement gênant quand l'ARN est sous représenté et nécessite donc un nombre de cycles important pour être détecté. On peut éviter ces amplifications non souhaitées :

Une première méthode consiste à choisir les deux amorces de façon à ce qu'elles encadrent un intron, permettant ainsi de distinguer l'ADN amplifié par sa plus grande taille. Cependant cette technique ne permet pas toujours d'éviter cette amplification qui peut donc entrer en compétition avec celle de l'ADNc à amplifier.

La deuxième méthode consiste à choisir une ou deux amorces à cheval sur deux exons différents. Ceci permet d'amplifier uniquement l'ADN complémentaire. En effet, dans ce cas, la stringence de la réaction étant calculée de façon à ce que l'hybridation des oligonucléotides se fasse sur au moins 20 bases, l'oligonucléotide ne pourra s'hybrider sur la zone exon/intron de l'ADN génomique.

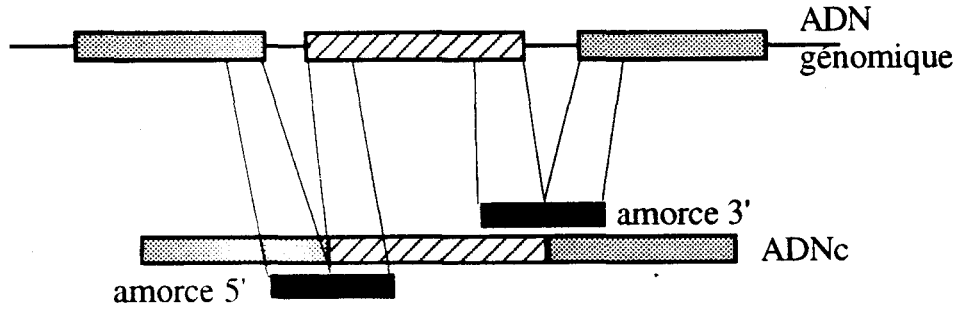


Schéma représentant la création d'amorces spécifiques del'ADNc

Validation et séquences oligonucléotidiques des amorces..

Malgré les précautions prises pour le choix des amorces à partir de ces données qui restent théoriques, il faut souvent tester plus d'un couple d'amorces afin de trouver celui qui donne une amplification optimale. Il existe aujourd'hui des programmes sur ordinateur qui permettent d'identifier ces séquences optimales, notamment dans la recherche de structures secondaires d'ARNs qui peuvent gêner l'étape de transcription inverse (Pallansch et coll., 1990).

La matrice

C'est une matrice ADN simple ou double brin.

Il faut environ $3X10^5$ cibles pour une bonne amplification. Mais il est possible de diminuer ce nombre en augmentant le nombre de cycles, et en adaptant les concentrations d'amorces et de $MgCl_2$.

Nombre de cibles	Nombres de cycles
50	40/50
10^3	35/40
$1,5x10^4$	30/35
$3x10^5$	25/30

3.1.3. Validation de la PCR

Après amplification, les fragments d'ADN sont analysés afin de vérifier si la taille et la séquence du fragment d'ADN amplifié correspondent à celles recherchées.

Analyse par la taille:

Une première approche consiste à analyser les échantillons amplifiés par électrophorèse horizontale, avec une échelle de poids moléculaires, ceci afin de vérifier la taille du fragment d'ADN amplifié.

L'electrophorèse horizontale des fragments d'amplification est conduite au moyen d'un gel d'agarose qui permet une séparation des fragments en fonction de la taille :

2% d'agarose	400 à 150 pb
1,5% d'agarose	800 à 400 pb
1% d'agarose	2000 à 1000 pb

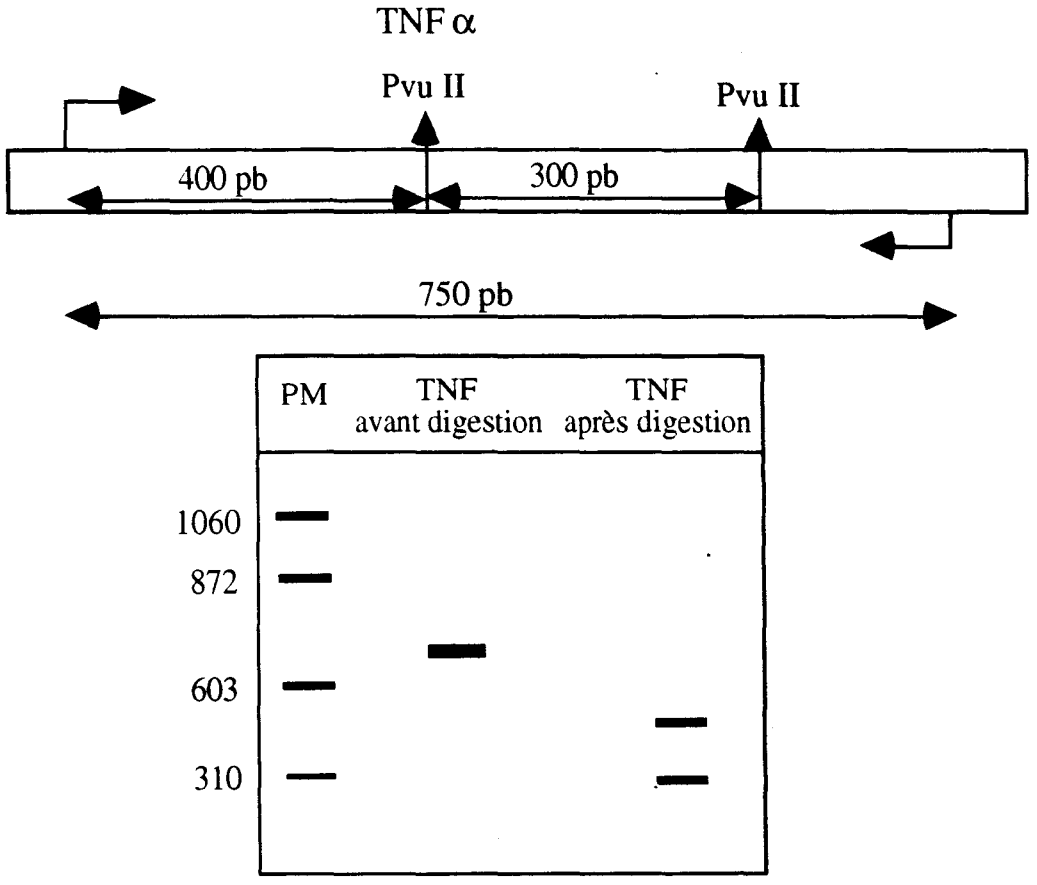
La coloration du gel se fait par incorporation de bromure d'éthidium (une molécule qui s'intercale entre les bases nucléotidiques et donne une fluorescence rouge après excitation aux UV).

Analyse par Southern Blot:

Le transfert des fragments d'ADN amplifiés sur un support de nylon après électrophorèse sur un gel d'agarose permet la validation de la séquence amplifiée grâce à l'utilisation d'une sonde spécifique. Les lavages se font en conditions très stringentes.

Analyse par carte de restriction:

Une autre technique de vérification consiste à digérer le fragment d'ADN amplifié par une ou deux enzymes de restriction dont les sites de coupure sont identifiés et qui donnent des fragments analysables sur un gel d'agarose (de 100 à 500 paires de bases).



Exemple d'enzymes de restriction	
enzyme	*cDNA*
SacI	IL2
EcoR I	IL3 / IL4
Nde I	IFNγ
Pvu II	IL7 / TNFα
Xba I	IL6
Pst I / Sac I	β-Actine

-Une autre technique consiste à séquencer les produits d'amplification après les avoir clonés dans un plasmide approprié.

3.2. La détection des produits d'amplification

3.2.1. Gel d'agarose

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'électrophorèse horizontale permet une séparation des fragments d'ADN suivant leur taille.

C'est une technique très simple et rapide (Reiner et coll., 1993) (Brenner et coll., 1989), (Rappolee et coll., 1988), (Fung et coll., 1992; McKnight et coll., 1991). Cependant, la sensibilité d'analyse sur gel d'agarose étant de l'ordre du ng, il est parfois nécessaire de recourir à des techniques de détection plus sensibles.

3.2.2. Le Southern blot

Il permet d'augmenter la sensibilité de détection du bromure d'éthidium d'un facteur 1000 (Ceci dépend de l'activité spécifique de la sonde utilisée) (Saiki et coll., 1985) (Ballagi-Pordany et coll., 1991) (Chelly et coll., 1990). L'analyse peut se faire de façon plus quantitative par densitométrie après autoradiographie de la membrane de nylon (Carding et coll., 1992) (Yamamura et coll., 1991), (Maraskovsky et coll., 1991) (Singer-Sam et coll., 1990), (Troutt et coll., 1992). C'est une technique d'analyse des fragments d'amplification qui donne également un renseignement sur la spécificité des ces derniers.

3.2.3. Incorporation d'un nucléotide radiomarqué

De la même façon, l'incorporation d'un nucléotide marqué par un radioisotope (on utilise en général du ^{32}P) pendant l'étape d'amplification, permet d'augmenter la sensibilité du BET.(Gilliland et coll., 1990), (Frye et coll., 1989), (Robinson et coll., 1991), (Melby et coll., 1993), (Kramnik et coll., 1993) (Wiesner, 1992).

Cependant, l'usage de radioisotopes étant assez dangereuse pour l'utilisateur et son environnement, cette technique est peu utilisée.

3.2.4. Marquage des amorces

Le marquage des amorces peut se faire par des isotopes radioactifs, dans ce cas, la détection suit les mêmes principes généraux que ceux décrits précedemment. Cette technique ne présente pas beaucoup plus d'avantages. (Owczarek et coll., 1992), (Buck et coll., 1991), (Hoof et coll., 1991).

Par contre, le couplage de marqueurs "froids" aux amorces se révèle d'un intérêt croissant dans la détection des fragments d'amplification. De nombreux protocoles ont été décrits.

Couplage des amorces à la fluorescéïne

Ce marquage est réalisé par l'addition d'un fluorochrome lors de la synthèse des oligonucléotides (Porcher et coll., 1992). Les oligonucléotides marqués sont ensuite purifiés par HPLC. L'analyse des fragments de PCR se fait sur un analyseur automatique d'ADN. La sensibilité est la même que pour un Southern blot : entre 1 et 10 pg. L'analyse de la fluorescence a l'avantage d'être linéaire sur une zone beaucoup plus étendue que lors d'une analyse par densitométrie des Southern blots (Porcher et coll., 1992), (Pannetier et coll., 1993). De plus, l'analyse et la quantification se font en parallèle.

Couplage des amorces à la biotine

Le marquage est réalisé de la même façon que pour la fluorescéïne (Landgraf et coll., 1991). L'analyse des fragments d'ADNs amplifiés se fait après transfert sur une membrane de nylon. La révélation des biotines se fait par addition d'avidine marquée à la péroxidase (récepteur de la biotine avec une constante de dissociation de 10^{-15}), puis la révélation se fait par une réaction colorimétrique enzyme/substrat, ou par une réaction de chémoluminescence.

La sensibilité est la même que celle du marquage avec la fluorescéïne.

3.2.5. Séparation par HPLC

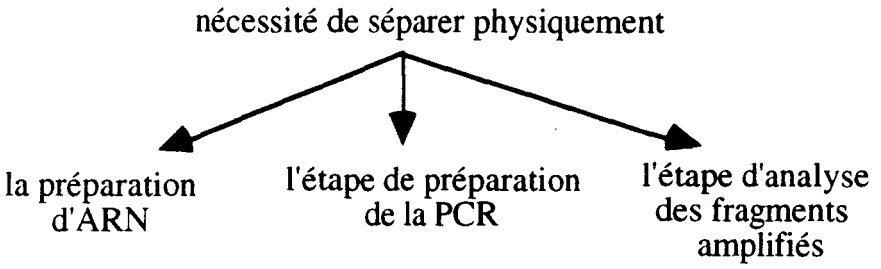
L'utilisation de colonnes d'échange d'ions permet une résolution dans la séparation au moins équivalente aux résolutions obtenues par électrophorèse sur gel d'acrylamide. La quantification se fait par intégration numérique des pics de densités optiques à 260 nm en sortie de colonne. Ce système présente une bonne linéarité sur plusieurs ordre de grandeur. La sensibilité est de l'ordre de 100 pg. Cette méthode peut facilement être automatisable et permet éventuellement la récupération des fragments après séparation.

3.2. Les précautions à prendre lors d'une analyse par PCR

La PCR possède les inconvénients liés à ses avantages. La synthèse *in vitro* de millions de copies d'un même fragment d'ADN se révèle être un problème crucial pour l'utilisation de cette technique en routine.

L'ADN étant très volatile, la simple ouverture d'un microtube contenant des millions de fragments d'ADN identiques va permettre la transmission par voie aérienne de ces produits amplifiés. Les problèmes de contamination ne sont pas rencontrés lors de la première PCR mais lors des réactions suivantes. L'ADN libéré dans le milieu ambiant va "contaminer" les structures physiques ainsi que les réactifs et les pipettes qui auraient été manipulés dans le même temps.

Les structures physiques comprennent les locaux, les paillasses et le matériel (pipettes...). Le manipulateur dont les mains et les vêtements peuvent être imprégnés, est souvent le principal vecteur de contaminants. Des contraintes strictes dans la séparation des locaux et du matériel sont donc nécessaires.



Pour chaque étape, l'utilisateur devra utiliser des gants à usage unique, une blouse différente, des pipettes différentes, des cônes et des tubes stériles et bien entendu une pièce différente. L'étape d'analyse des fragments doit être la plus isolée car c'est celle-ci qui cause le plus grand risque de dissémination des produits amplifiés par aérosol.

Afin d'éliminer tous les fragments d'ADN contaminants avant l'étape d'amplification, il sera nécessaire de :

- nettoyer les surfaces de travail à l'eau savonneuse et à l'eau de javel avant toute manipulation.
- passer ces surfaces et les pipettes aux rayons UV pendant au moins 15 mn avant la manipulation
- aliquoter les réactifs en de nombreux échantillons (stocker à -20°C) et les changer à chaque manipulation.
- Si des échantillons précieux sont contaminés, il est toujours possible de les traiter à la DNAse I et de les bouillir ensuite pendant 5 mn pour inactiver l'enzyme.

3.3. La RT-PCR

Cette technique de PCR permet d'amplifier des molécules d'ARN par le biais de leur inverse complémentaire sous forme d'ADN monobrin appelé ADNc pour ADN complémentaire. Cette transformation est réalisée par une enzyme : la transcriptase inverse isolée à partir de rétrovirus.

Les plus utlisées sont :

- l'AMV : isolée de l'Avian Myoblastosis Virus
- la M-MLV : isolée du Moloney Murine Leukemia Virus.

Pour synthétiser le brin ADNc, cette enzyme prend appui sur une séquence double brin constituée par l'hybridation de l'amorce oligonucléotidique associée à son inverse complémentaire sur l'ARN. On utilise différents types d'amorces qui peuvent être :

- une amorce spécifique de la séquence du gène étudié.
- une amorce oligo-dT (15 à 20 thymines)
- des amorces aléatoires (combinaison aléatoire de 6 nucléotides à partir des 4 bases nucléotidiques).

	amorce spécifique	amorce oligo-dT	amorces aléatoires
Principe	AAAA amorce 3' amorce 5'	AAAA TTTT amorce 5' amorce 3'	AAAA amorce 5' amorce 3'
Avantages	•Seul le RNA d'intérêt est transcrit en un brin ADNc	•Cette technique permet de synthétiser un ADNc à partir de tous les ARNm qui possèdent une queue poly-A. •L'avantage majeur est qu'avec une seule étape de reverse transcription, on peut analyser différents ARNm. •Moins d'amplifications non spécifiques qu'avec la technique des amorces aléatoires	•Permet la synthèse d'un ADN complémentaire très long
Inconvénients	Si le RNA est peu représenté, la réaction est peu efficace	La transcriptase inverse synthétise rarement des brins d'ADNc de plus de 3 kb, il faut donc que les amorces soient choisies proches de la queue poly-A	•Bruit de fond important dans l'étape de PCR car tous les ARNs sont rétrotranscrits y compris les ARNs ribosomaux
Efficacité	•Faible	•Bonne	•Bonne
Conclusion	•Cette technique est peu utilisée car elle limite l'étude à un seul couple d'amorce	•La méthode la plus utilisée pour l'analyse des ARNm codant pour les cytokines	Technique universelle donnant de bons résultats.

Ces étapes de synthèse de l'ADNc nécessitent une bonne dénaturation de l'ARN pour éliminer les structures secondaires de façon à permettre une élongation la plus longue possible. Le choix des amorces de PCR devra tenir compte de la technique choisie pour la synthèse de l'ADNc. En effet, on choisira par exemple les amorces de PCR près de la queue poly-A si on utilise la technique de transcription inverse avec une amorce oligo-dT.

Calcul de l'efficacité de la RT:

Elle devrait être contrôlée pour chaque lot d'enzyme. Un aliquot de la réaction est analysé après incorporation d'un nucléotide marqué au ^{32}P. On effectue ensuite une précipitation au TCA (acide trichloracétique)

. Le calcul de l'efficacité est le suivant :

$$\text{ng cDNA} = \left[\frac{\text{cpm incorporés}}{\text{cpm totaux}}\right] \times \left[\begin{matrix}\text{nombre de}\\ \text{nmoles dNTP}\end{matrix}\right] \times [\ 4\ ] \times [\ 330\ ]$$

nombre de dNTPs

PM moyen des dNTPs ng/nmôle

Conclusion

La technique de RT-PCR permet l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons à partir de peu de cellules, puisque 1 µg d'ARN total suffit pour réaliser 25 réactions de PCR. Avec la technique d'extraction de l'ARN par le RNAzol, on estime que la quantité d'ARN récupérée à partir de 10^6 cellules est de 1 à 10 µg.(dans le cas de cellules issues d'organes lymphoïdes) La variation du taux d'ARNs dépend de l'état d'activation des cellules.

La sensibilité apportée par la technique de PCR permet une plus grande pertinence dans les recherches. Toute détection ou toute modification d'acides nucléiques est maintenant envisageable par cette méthode. On peut alors envisager par exemple l'analyse de la production de cytokines *in vivo*, afin de comprendre plus précisement leur mode d'action dans leur micro-environnement, sans le biais jusqu'alors incontournable, de la restimulation des cellules *in vitro*.

B. PRINCIPE DE LA RT-PCR COMPARATIVE

1.APPLICATION DE LA RT-PCR POUR LA DÉTECTION DES TRANSCRITS CODANT POUR LES CYTOKINES

La puissance de cette technique repose sur sa grande sensibilité et sur le fait qu'elle permet l'étude rapide et simultanée de plusieurs transcrits.

1.1. Avantages et inconvénients de la RT-PCR

La simple amplification des ADNc par la technique de RT-PCR ne peut absolument pas rendre compte de la quantité initiale des différents ARNs analysés. En effet, cette technique requiert deux étapes enzymatiques, le première est l'étape de transcription inverse et la deuxième celle de l'amplification.

L'étape de transcription inverse est dépendante de la qualité des ARNs et de l'efficacité de la transcriptase inverse. L'étape de PCR est exponentielle et donc nécessite un contrôle plus important. En effet, de faibles variations dans l'efficacité d'amplification conduira à une variation importante dans le taux de produits amplifiés. La préparation des tubes réactionnels avant l'étape de PCR proprement dite est en grande partie responsable de ces variations On limitera celles-ci par la préparation de solutions mères de réactifs préalablement aliquotés et conservés à -20°C, ainsi que par la préparation d'un grand mélange réactionnel pour tous les échantillons, qu'on répartira dans les tubes de PCR avant d'ajouter la matrice.

Vérification des étapes de la RT-PCR	
Etapes de la RT-PCR	*Vérification*
Analyse de l'intégrité de ARNs	Gel d'électrophorèse
Analyse de l'efficacité de synthèse d'ADNc	Incorporation de ^{32}P et précipitation au TCA
Analyse de l'efficacité de PCR	Prélèvement d'échantillons tous les cinq cycles de PCR et calcul de la droite de régression linéaire en fonction du nombre de copies. $y=ax+b$ où x est l'efficacité de PCR $\text{Log } Y = \text{Log}X + n\text{Log}(1+e)$
Mesure des produits d'amplification	Utilisation d'un contrôle interne

Après un certain nombre de cycles, le produit d'amplification atteint environ 10^{-8}M, puis pendant la phase de plateau les produits d'amplification s'accumulent jusqu'à 10^{-7}M. En règle générale, la phase de plateau est atteinte quand après 5 cycles d'amplification l'augmentation du taux d'amplification est inférieure à 2.

Il est nécessaire de procéder à une éventuelle élimination des contaminations de produits amplifiés par les techniques décrites précédemment.

Dès lors que les bases de travail sont bien établies, il sera possible d'envisager la quantification ou plutôt la comparaison entre les échantillons d'ARNs après l'étape d'amplification.

2. LA "QUANTIFICATION" PAR RT-PCR

Du fait même de son caractère exponentiel, la réaction de PCR est difficilement maîtrisable, et la détermination de la quantité de matrice de départ à partir du taux d'ADN amplifié est une entreprise délicate. En effet, une faible variation dans l'efficacité de PCR conduira à des variations importantes dans le taux de produit final.

Ces variations sont dues à différents facteurs qui sont d'une part les réactifs utilisés : on essaiera dans la mesure du possible d'uniformiser les réactions en préparant de grands stocks de réactifs qui seront répartis et conservés dans de bonnes conditions. Cette précaution permettra de limiter les différences de reproductibilité entre plusieurs réactions. De même, on préparera un mélange réactionnel unique de façon à limiter les variations entre les différents échantillons au cours d'une même manipulation.

Les autres facteurs intervenant dans l'efficacité enzymatique au sein d'une même réaction peuvent être par exemple les contaminants extérieurs introduits avec la matrice. Il peut s'agir de produits chélatant les ions Mg++ comme l'EDTA , des traces de phénol, d'hémoglobine, des impuretés contenues dans certains produits chimiques à la base des tampons (nous avons déjà rencontré ce type de problème pour le tampon de reverse transcription) ou encore une mauvaise adéquation des réactifs chimiques à la base du tampon dont la composition varie d'une Taq polymérase à l'autre ainsi que le pH qui varie en fonction de la température de la réaction.

Les amorces peuvent également interférer dans l'efficacité enzymatique. D'un couple d'amorces à l'autre, il peut y avoir des différences pouvant aller jusque mille dans le rendement final.

Le principe de quantification des ADNc introduits avant amplification, repose sur les bases mathématiques suivantes;

Si X_0 et Y_0 représentent le nombre de molécules d'ADN de départ,

Si X_n et Y_n représentent le nombre de molécules après n cycles d'amplification,

Si e est l'efficacité de la PCR

on aura la formule suivante: $X_0 (1+e)^n = X_n$ et $Y_0 (1+e)^n = Y_n$

Si on considère que l'efficacité est la même dans tous les tubes ou tout au moins dans le même tube, on aura:

$$\frac{X_0}{Y_0} = \frac{X_n}{Y_n}$$

Ce rapport reste constant au cours de l'amplification, il suffit donc de connaître la quantité X_0 pour calculer Y_0.

En fait, la quantification est basée sur le contrôle strict de l'efficacité de la réaction de PCR. En règle génerale, l'efficacité d'amplification reste la même pendant la phase exponentielle de la réaction et devra faire l'objet d'une étude approfondie quelque soit la technique de quantification utilisée de façon à connaître les limites de cette technique.

La "quantification" après RT-PCR se fait suivant différentes méthodes. Celles-ci sont toutes basées sur l'utilisation d'un standard, le plus souvent interne.

Les standards dits **"externes"** sont des ARNs ou des ADNs identiques à l'ARN étudié, mais dont la quantité est connue. Ce type de standard est couramment utilisé malgré les variations dues aux différences d'efficacités enzymatiques. Comme il n'y a pas de contrôle interne au tube réactionnel, en général les échantillons analysés sont doublés ou triplés, avec tous les problèmes liés cette fois aux grandes séries. Ce type de standard n'est donc pas très fiable, et l'interprétation des résultats peut être ambigüe.

Les standards dits **"internes"** sont des ARNs ou des ADNs présents en quantité connue dans tous les tubes réactionnels, On distingue deux types de standards internes : endogènes et exogènes.

2.1. Les standards internes endogènes

Un standard interne endogène est un ARN considéré comme présent en quantité constante dans les cellules analysées. Il peut s'agir :

- de la β-actine ((Maraskovsky et coll., 1991), (McKnight et coll., 1991), (Yamamura et coll., 1991))
- de la glucose 6-phosphate deshydrogénase (GADPH)
- de la HPRT ((Murphy et coll., 1993))
- d' une chaîne du CD3 lors de l'analyse des lymphokines dans les cellules T ((Kramnik et coll., 1993))
- de la partie Cα des gènes du récepteur T lors de l'analyse des chaînes Vβ ((Choi et coll., 1989)).
- plus rarement de l'aldolase A et de la L pyruvate kinase.

La réaction est conduite dans deux tubes réactionnels différents. Le problème lié à l'utilisation de ce type de standard réside principalement dans le fait que son expression peut varier suivant l'état d'activation de la cellule (β-actine). De plus, cette technique nécessite l'utilisation de deux couples d'amorces différents, l'un pour le standard, et l'autre pour l'ADNc d'intérêt. Or, l'efficacité d'amplification enzymatique peut varier d'un facteur mille d'un couple d'amorces oligonucléotidiques à l'autre ((Wang et coll., 1989)).La comparaison entre les

différents échantillons se fera donc nécessairement dans la phase exponentielle de l'amplification.

Actuellement, de nombreuses équipes de recherche utilisent cette technique d'analyse ((Maraskovsky et coll., 1991), (McKnight et coll., 1991),(Kramnik et coll., 1993; Murphy et coll., 1993; Yamamura et coll., 1991)) car elle ne nécessite pas de constructions synthétiques souvent compliquées à réaliser et dont l'usage demande une mise au point assez délicate.

Ce type de standard peut rendre compte d'une étude qualitative des ARNs étudiés, et plus rarement d'une étude comparative.

2.2. Le standard interne exogène

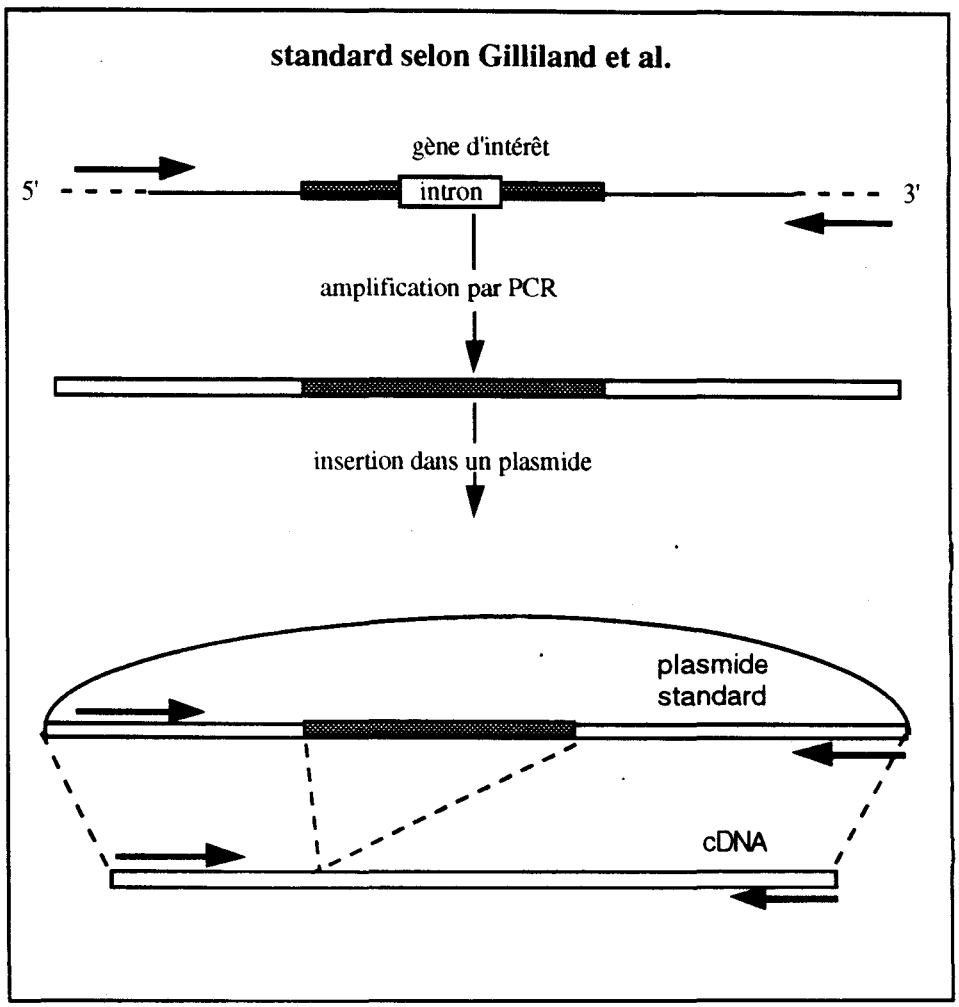
Le standard interne exogène est un ARN ou un ADN synthétisé *in vitro*. et qui est amplifié avec les mêmes amorces que l'ADNc On peut alors introduire une quantité connue de standard dans chaque tube réactionnel et permettre ainsi une compétition entre l'ADNc et le standard de manière dose dépendante. Cet ARN ou ADN est le produit d'un gène "synthétique". Afin de distinguer le standard de l'ADNc, on construit le standard de telle sorte qu'il ait une taille différente de l'ADNc amplifié; cette différence de taille varie suivant la sensibilité du système de détection employé et peut aller de 4 à 100 paires de bases.

Plusieurs types de standards internes exogènes ont été décrits .Le système le plus performant étant un standard dont la taille et la séquence sont très proches de l'ADNc. La matrice de base qui va servir à la fabrication d'un standard interne endogène est souvent l'ADN du gène étudié (génomique ou ADNc).

2.2.1. Standard avec mutation ou délétion d'un ADN connu.

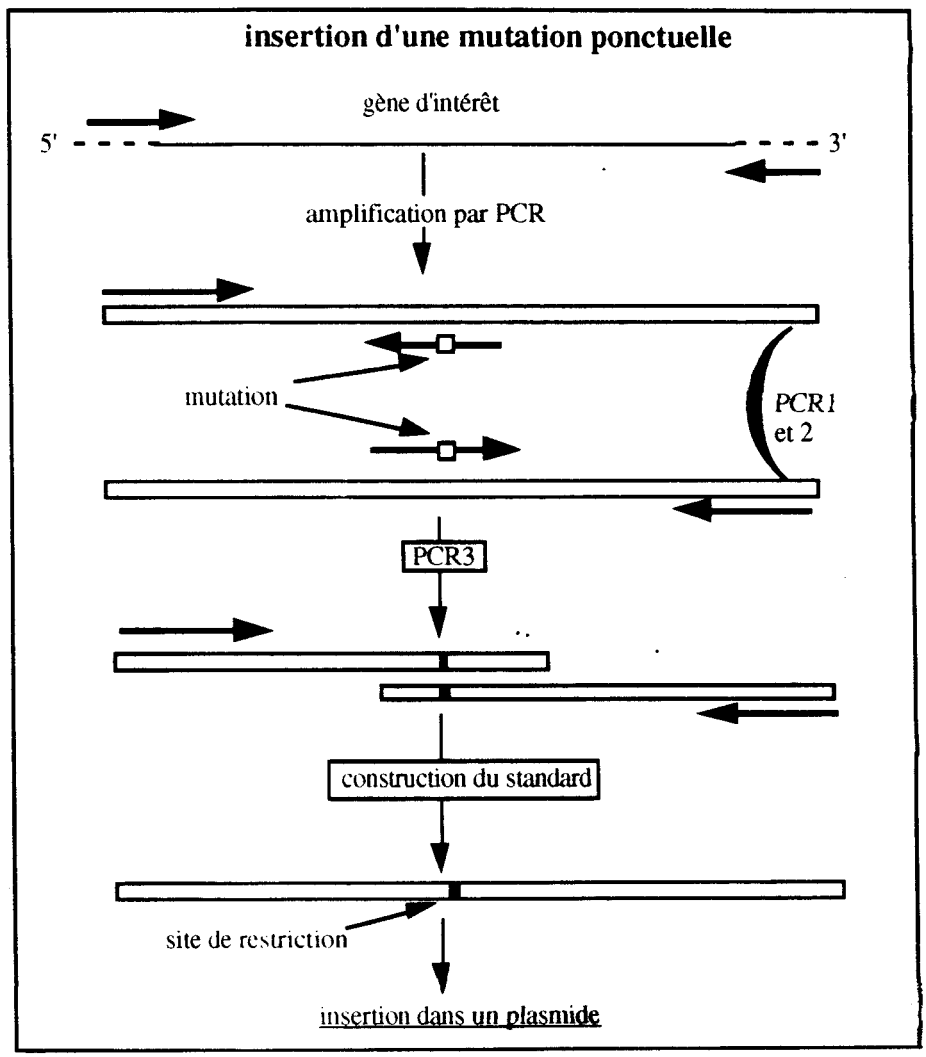
•Technique décrite par Gilliland et al.

Cette technique utilise l'ADN génomique comme standard interne (Gilliland et coll., 1990). ceci n'est possible que si la partie du gène encadré par les deux amorces contient un intron dont la longueur n'excède pas environ 200 bp, ceci afin de ne pas s'éloigner de la séquence de l'ADNc, ce qui aurait pour effet de modifier l'efficacité de l'amplification.



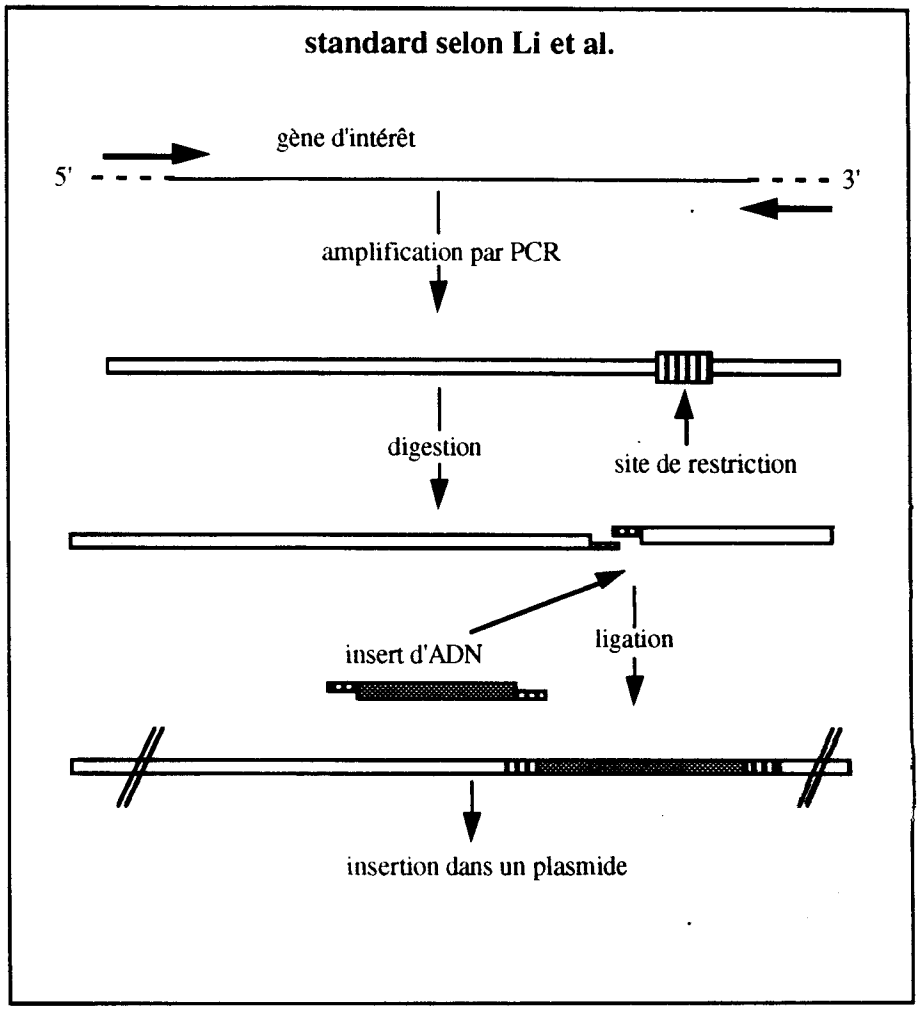
•Technique décrite par Becker-André

Cette technique (Becker-André et coll., 1989) est basée sur la présence d'un site de restriction inséré par mutagénèse dans l'ADNc, créant ainsi une molécule d'ADN standard dont la séquence est identique à celle de l'ADNc étudié exceptée une base.La molécule d'ADN standard est identique en taille et en séquence au cDNA étudié; l'efficacité d'amplification par PCR est donc exactement la même pour les deux fragments, la compétition est parfaite. ((Becker-André et coll., 1989)).



•La technique décrite par Li et al.

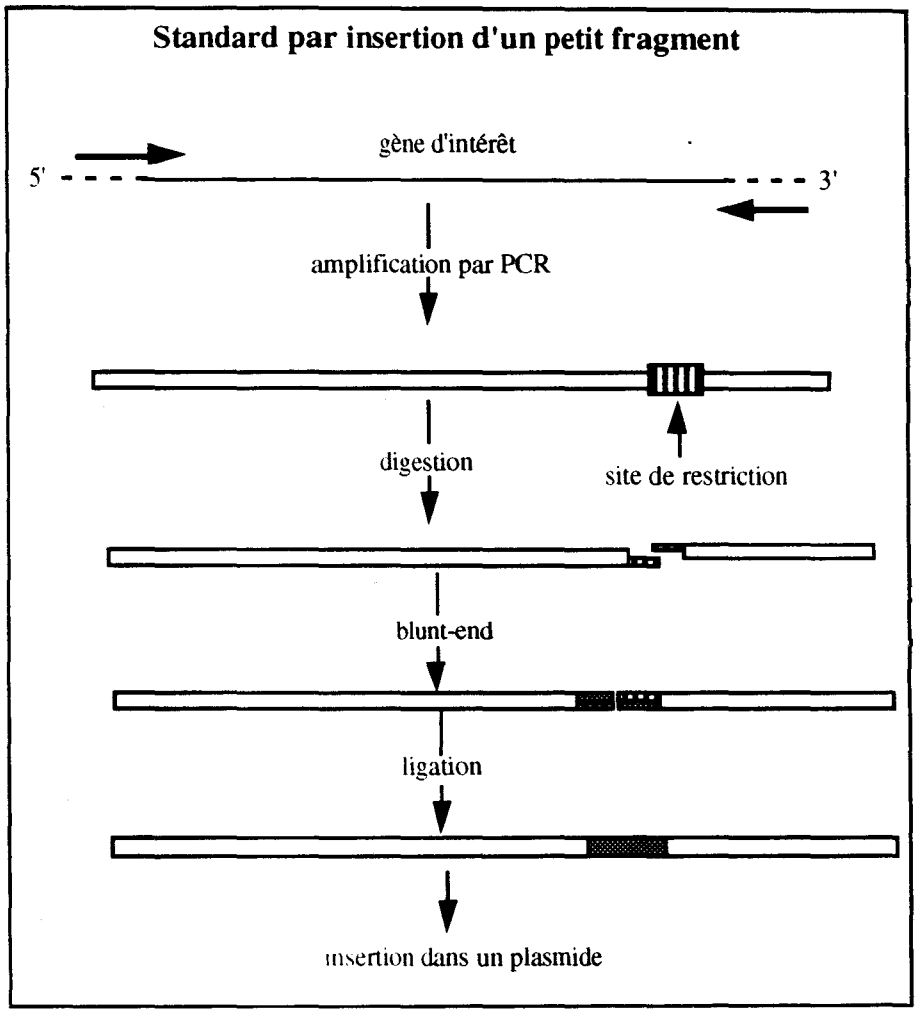
La création de ce standard se fait à partir du cDNA du gène étudié ((Li et coll., 1991)). Au sein d'un site de restriction on insère un fragment de quelques paires de bases, permettant ainsi de séparer les fragments amplifiés sur gel d'agarose.



•Technique de délétion/insertion d'un petit fragment d'ADN.

.La haute résolution de l'analyseur automatique d'ADN en parallèle avec des amorces fluorescentes permet l'utilisation d'un standard très peu différent de l'ADNc. (environ 4 paires de bases). (Porcher et coll., 1992)

La première méthode consiste à insérer un fragment d'ADN. Cette insertion fait suite à la réparation de bout cohésifs créés par la coupure par une enzyme de restriction créant des extrémité protubéantes 3'.



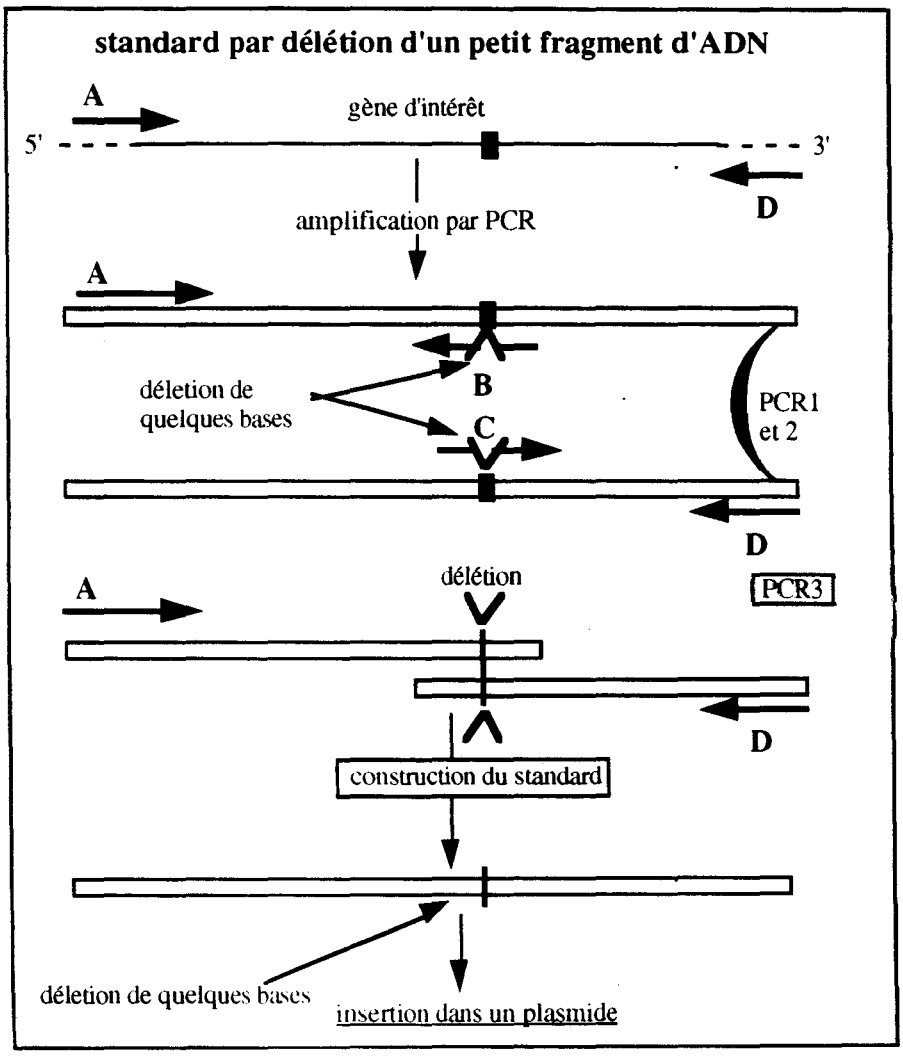
La deuxième méthode consiste à déléter un fragment d'ADN par la technique de PCR.

On utilise pour cela deux couples d'amorces

-le premier couple comprend l'amorce 5' (A) (hybride l'ADNc en 5') et l'amorce 3' (B) qui s'hybride sur la partie du gène dont on veut modifier la séquence par délétion de 4 bases. Cet oligonucléotide B possède la délétion dans son milieu.

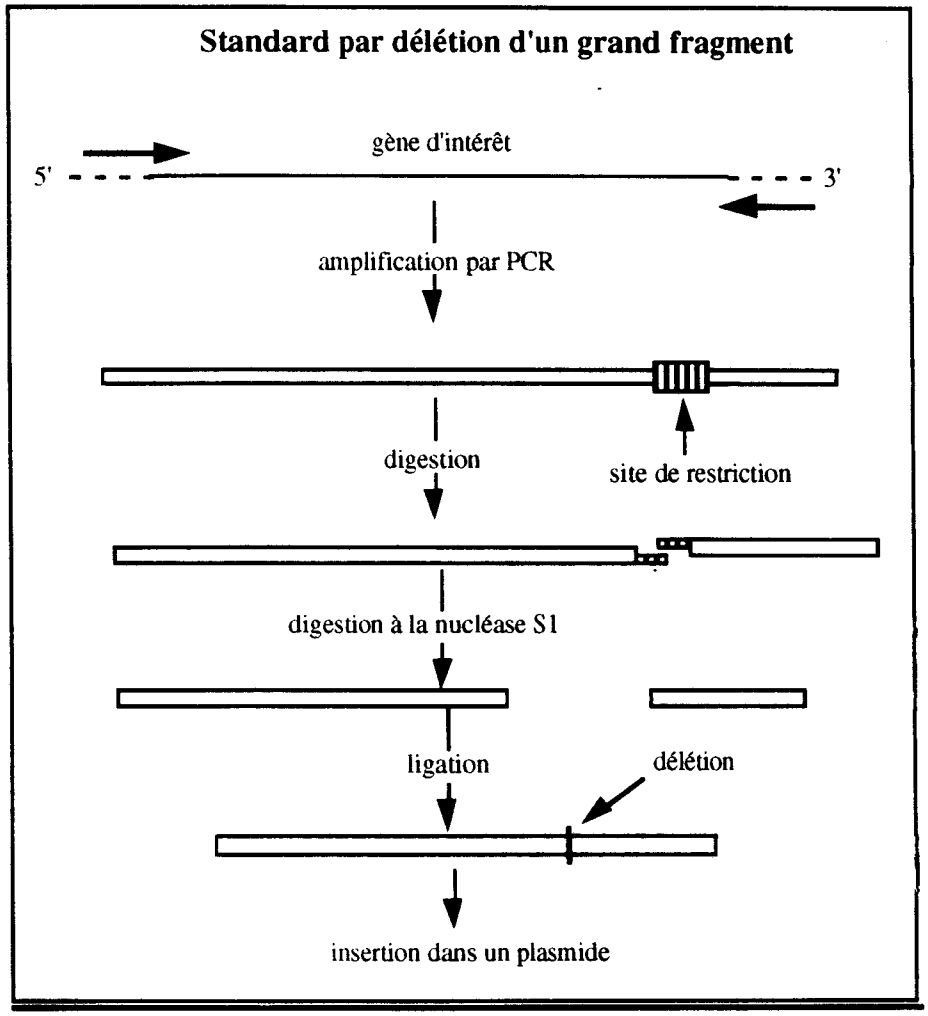
-la deuxième PCR est conduite en parallèle avec la première à l'aide du deuxième couple d'amorces. L'amorce 5' (C) est complémentaire de l'amorce B et possède également la délétion en son milieu. La deuxième amorce 3' (D) hybride le cDNA dans sa partie 3'.

Les deux fragments amplifiés sont alors purifiés, mélangés en parties égales et une troisième réaction de PCR est réalisée avec les amorces A et D. Le standard ainsi obtenu est délété de 4 bp.



•Technique de délétion d'un grand fragment d'ADN.

On utilise pour cela un site de restriction au milieu du cDNA à amplifier. Après coupure enzymatique, on fait agir la nucléase S1 de façon à déléter une partie du gène. La réaction est arrêtée quand la délétion souhaitée est effectuée.



2.2.2. Les standards internes synthétiques

Ce type de standard très ingénieux décrit initialement par Wang et al. (Wang et coll., 1989) consiste à associer consécutivement toutes les amorces 5' et toutes les amorces 3' des gènes à étudier. La création de cette molécule synthétique est réalisée par une technique de PCR décrite par Ho et coll. (Ho et coll., 1989): l'overlap extension" ou extention par homologie de séquences.

C. RESULTATS

1. CHOIX DU STANDARD

1.1. Données du problème

-Le but fixé était d'analyser la présence de différentes cytokines présentes dans les organes lymphoïdes *in vivo.*

-Afin de vérifier, dans un premier temps l'existence d'une éventuelle dichotomie *in vivo* entre les Th1 et les Th2 nous avons choisi de tester quelques unes des cytokines qui les caractérisent, à savoir :

- l'IL-2
- l'IFNγ
- l'IL-4
- l'IL-5
- l'IL-6
- l'IL-10
- la β-actine, exprimée constitutivement est utilisée comme contrôle.

Il fallait donc construire une molécule d'ADN standard pour chacune de ces six cytokines ainsi que pour la β-actine.

D'autre part, pour contrôler l'efficacité de l'étape de transcription inverse, il était souhaitable de disposer d'un ARN complémentaire du standard.

A cette molécule d'ADN standard, il fallait ajouter une queue poly-A en 3' afin de permettre une transcription inverse à partir d'une amorce oligo-dT et pour faciliter l'étape de purification (la technique de purification des ARNs poly-A^+ avec des billes magnétiques recouvertes d'oligo-dT semble actuellement être la plus fiable et la plus rapide).

1.2. Choix du standard

Etant donné le nombre important de cytokines à étudier, la réalisation d'une molécule d'ADN standard pour chacune d'entre-elles était une entreprise assez lourde dans sa réalisation comme dans la gestion des réactifs.

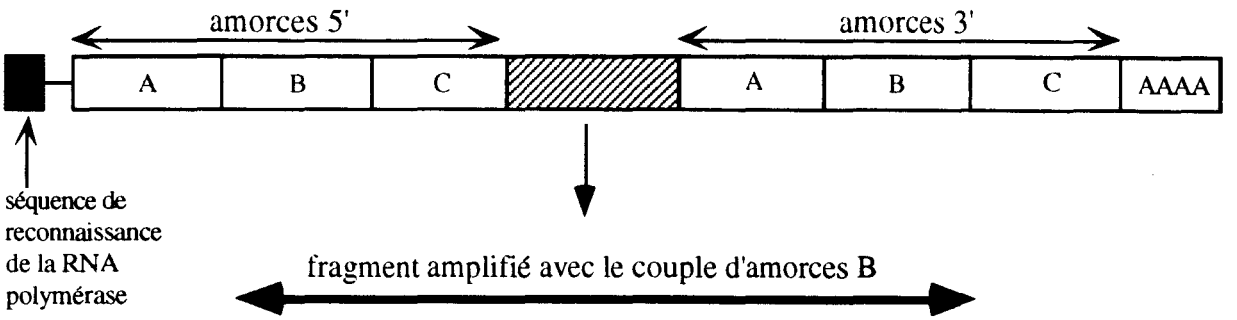
Pour chaque molécule d'ADN standard il faut :

Gestion des stocks de standards de PCR	
Manipulations	**Gestion**
réaliser la construction du standard	Constructions
la cloner dans un plasmide bactérien	Bactéries
réaliser une préparation de plasmide	Plasmides
faire une transcription in vitro	ARN standard
faire un ADNc	ADNc standard
faire des dilutions de 10 en 10 de l'ADNc du pur à 10^{-12} en vue de l'étape de PCR puis des dilutions de 2 en 2 comprises entre 10^{-4} et 10^{-10}	Toutes les dilutions de l'ADNc à conserver environ 50 tubes pour chaque molécule standard

On comprend dès lors l'intérêt d'avoir une construction unique pour l'analyse de ces différentes cytokines.

Le seul type de standard pouvant intégrer toutes les séquences des amorces étudiées est celui décrit par A. Wang et al. (Wang et coll., 1989)

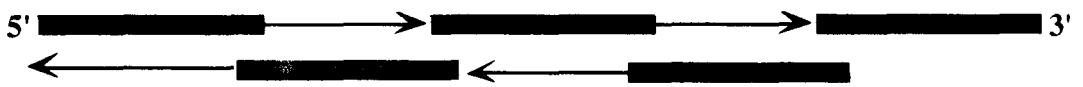
Le principe est simple, et permet d'insérer un fragment pouvant aller jusqu'à 30 paires de bases en 5' et en 3' de l'ADN à chaque PCR. Les amorces sont constituées dans la partie 5' du fragment à insérer et dans la partie 3' de 15 paires de bases complémentaires de l'extrémité 5' ou 3' de la matrice d'ADN. La succession des étapes d'insertion des fragments de 25 paires de bases permet la synthèse d'un ADN synthétique pouvant servir de standard. L'ADN standard polyspécifique a l'énorme avantage de permettre une étude simultanée de plusieurs ADNc (en moyenne 10 couples d'amorces forment une molécule synthétique) avec une seule molécule d'ADN standard. L'argument majeur des détracteurs de cette technique est que la séquence entre les deux amorces est complètement différente de celle du cDNA. On peut néanmoins conserver une taille de standard très proche de celle du cDNA.



Cette technique est le modèle de choix pour l'étude des cytokines et a fait l'objet de nombreuses publications (Fung et coll., 1992), (Kanangat et coll., 1992) (Bouaboula et coll., 1992), (Platzer et coll., 1992).

D'autres méthodes sont actuellement utilisées pour simplifier la réalisation de ces standards polyspécifiques et permettent une réalisation en une seule étape.

Par exemple, les amorces peuvent être choisies de façon à ce qu'elles se chevauchent toutes :



Après ligation, les parties monobrins sont complétées par l'action de la *Taq* polymérase et le fragment néoformé est amplifié par PCR en vue de son clonage et de son séquençage.(ref gene)

Afin de pouvoir servir de standard dans une étape de transcription inverse, cet ADN peut-être complété par une queue poly-A qui permettra de purifier les ARNs transcrits *in vitro* (le plasmide de clonage aura des sites de reconnaissance des RNA polymérases T7, T3 ou SP6 pour permettre l'étape de transcription d'ARNc). Cette queue poly-A permettra une purification du standard par de la cellulose ou des billes magnétiques couplées à un oligo-dT, elle servira également de base à l'hybridation de l'amorce oligo-dT au cours de l'étape de transription inverse. Enfin, on peut ajouter des sites de restriction en amont et en aval de cet ADN standard mais également au sein des cassettes des oligonucléotides 3' et 5' de façon à pouvoir insérer un autre fragment au besoin.

2. CHOIX DES AMORCES

Pour l'IL2 et l'IL4, les amorces ont été choisies d'après les séquences publiées par Mc Knight et al. (McKnight et coll., 1991). Quant aux autres cytokines, nous avons déterminé les séquences des amorces en respectant les règles décrites précédemment dans la mesure du possible.

DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES AMORCES SOURIS

Cytokines	*Sens*	*Séquences 5'/3'*	*ADNc*	*Taille bp*	*Conc en PCR*	*Tm*	*% homologies*
IL2	5' 3'	CATGTACAGCATGCAGCTCGCATCC CCACCACAGTTGCTGGCTCATCATC	48-73 474-499	451	0,5µM	60°C	rat/souris: 100 % souris/hum: 72%/5' 80%/3'
IL4	5'* 3'	TGATGGGTCTCAG/ACCCCCAC/GCTT/AG CTTTCAGTGTTGTGAGCGTGGACTC	29-54 381-406	378	0,5µM	58°C	rat/ souris: 88%/5' 68%/3'
IL5	5' 3'	AGGATGCTTCTGCACTTGAGTGTTC GCCTTCCATTGCCCACTCTGTACTC	49-74 418-433	394	0,05µM	60°C	souris/hum: 88%/5' 68%/3'
IL6	5' 3'	ATGAGAAAAGAGTTGTGCAATGGCA GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGGTGAC	257-282 613-638	381	0,05µM	60°C	rat/souris 100% souris/hum: 72%/5' 60%/3'
IL10	5' 3'	GGCTCAGCACTGCTATGCTGCCTGC GAAATCGATGACAGCGCCTCAGCCG	82-107 438-463	381	0,05µM	60°C	souris/hum: 88%/5' 88%/3'
IFNγ	5'* 3'*	GTCTGAAG/TAACTATTTTAACTCAAG GTGGGTTGTTC/GACCTCG/TAACTTGGC	164-189 417-442	278	0,5µM	60°C	rat/souris: 96%/5' 66%/3' souris/hum: 30%/5' 24%/3'
ßActin	5' 3'	1) GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 2)GCTGCTCACCGAGGCCCCCCTGAAC CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	183-202 388-413 698-722	1) 539 2) 334	0,5µM	60°C	100%

*C/G = C ou G à cette position

-Ces amorces ont été validées par l'analyse de la taille du fragment amplifié par hybridation avec une sonde homologue clonée et séquencée.(sauf pour l'IL10)

-Les amorces ont été choisies dans des parties homologues rat/souris de façon à amplifier les cytokines des deux espèces avec les mêmes couples d'amorces.

-Par contre, les amorces de l'IL4 et de l'IFNγ ont du subir une dégénérescence sur quelques bases de façon à amplifier respectivement les cytokines souris et rat.

-Comme on peut le constater dans le tableau, les homologies entre cytokines de rongeurs et les cytokines humaines sont peu conservées (tout au moins dans les parties qui hybrident les amorces). Cest surtout le cas de l'IFNγ dans cette partie de l'ADNc.

En ce qui concerne les problèmes liés à l'amplification éventuelle d'ADN génomique contaminant il faut savoir que :

-les amorces IL-2 encadrent un intron de 2 kb

-les amorces IL-4 encadrent deux introns de 5,3 kb

-l'amorce 5' de l'IL-5 est à cheval sur deux exons

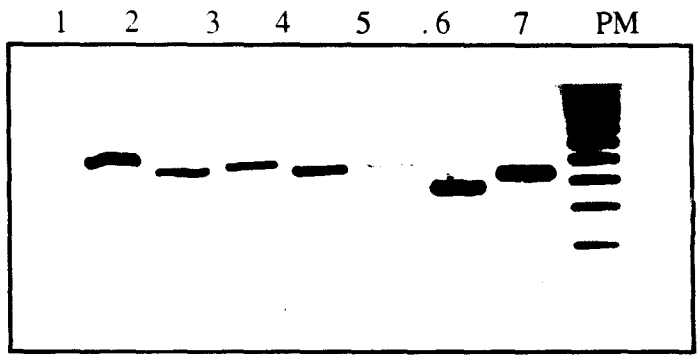
-l'amorce 5' de l'IL-6 est à cheval sur deux exons

-l'amorce 3' de l'IL-10 est à cheval sur deux exons

-les amorces IFN-γ sont à cheval sur deux exons

-les amorces β-actine peuvent amplifier de l'ADN génomique (1,5 kb)

Validation de l'utilisation de ces différentes amorces en utilisant de l'ADNc de souris comme matrice.



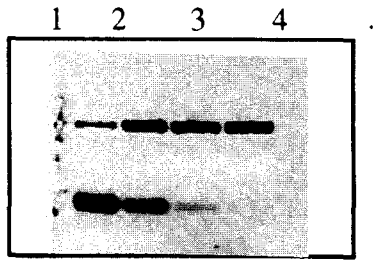
Analyse d'un ADNc de cellules de souris activées *in vitro* avec les différentes amorces.
1. IL-2; **2**. IL-4; **3**. IL-5; **4**.IL-6; **5**.IL-10, **6**. IFNγ; **7**. β-Actine

Les problèmes d'associations non spécifiques d'amorces se sont posés lors des réactions réalisées avec les amorces spécifiques de l'IL-5, l'IL-6 et de l'IL-10. Pourtant il n'existe aucune complémentarité entre les amorces dans leur partie 3'. Différents essais d'amplification ont été réalisés en modifiant les paramètres internes de la réaction de PCR.

-les variations de la concentration en $MgCl_2$ n'a pas amélioré ce problème

-la diminution des concentrations des amorces a permis une diminution des associations non spécifiques au bénéfice de l'amplification de l'ADNc d'intérêt.

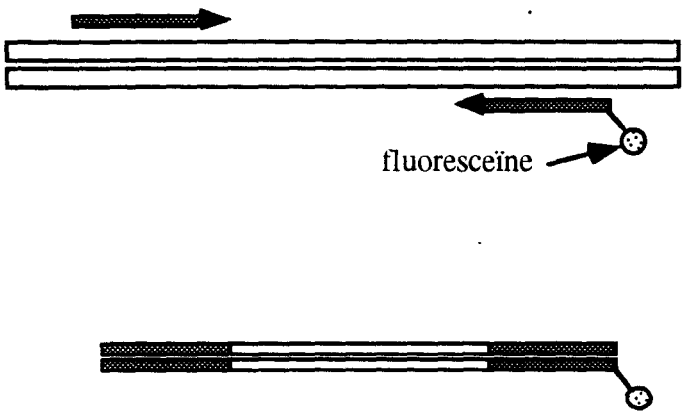
La figure ci-dessous, présente les résultats obtenus après amplification d'un ADNc de cellules spléniques de souris saines avec différentes dilutions d'amorces spécifiques de l'IL-5.



1. 0,5 µM, **2**. 0,25 µM, **3**. 0,125 µM. **4**. 0,05 µM

3 CHOIX DE LA TECHNIQUE DE DÉTECTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION

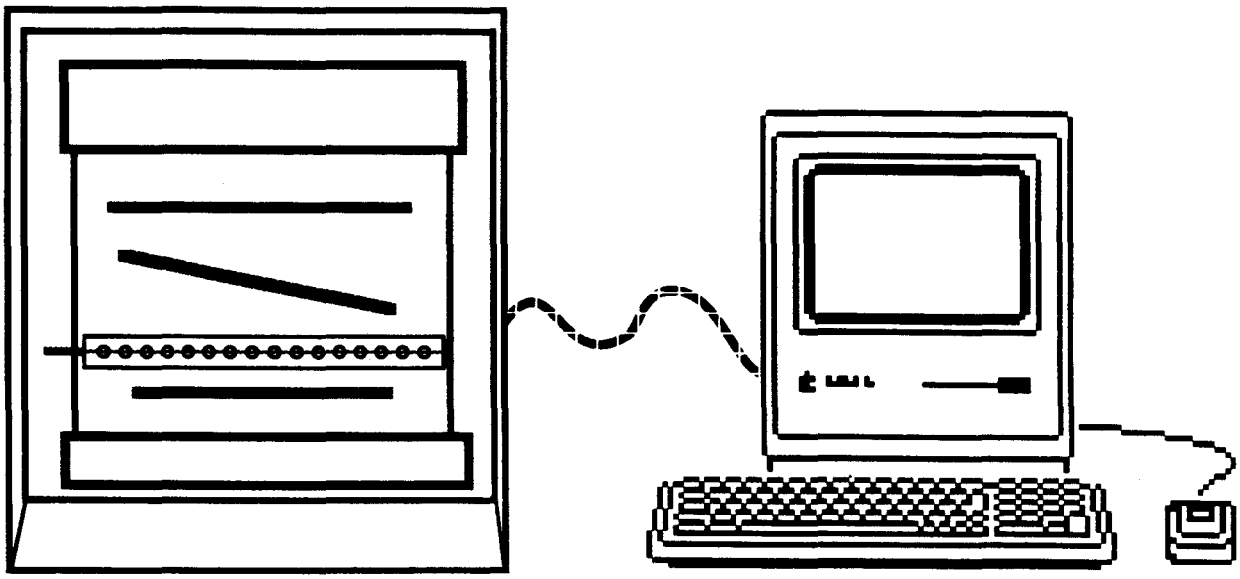
L'étude a été réalisée sur des ADNc amplifiés par PCR à l'aide d'amorces fluorescentes, ceci afin d'augmenter la sensibilité de détection (de l'ordre du pg) sans passer par des techniques d'hybridation à l'aide de sondes radioactives.



En effet, l'association d'un analyseur automatique d'ADN à la PCR permet de descendre le seuil de sensibilité. Il permet également l'intégration des données: un logiciel de calcul (Fragment Manager de Pharmacia) analyse la surface des pics correspondant à l'intensité de fluorescence des produits d'amplification en fonction de la taille de ces derniers.

Le fonctionnement de cet appareil est le suivant:

Les fragments d'amplification fluorescents sont analysés sur un gel d'acrylamide dénaturant à 6% . Les plaques sont installées dans l'appareil de façon à ce que le faisceau laser traverse perpendiculairement le gel à environ 10 cm du bas. A cette hauteur des photo-diodes permettent d'analyser la fluorescence émise par la fluoresceine des amorces excitée par le laser. Le tout est transmis à un ordinateur qui intègre les données sous forme de pics en fonction de la taille des fragments et de l'intensité de fluorescence.



Les problèmes liés à l'utilisation de cet appareil sont assez nombreux, et uniquement d'ordre technique:

Par exemple, le faisceau laser passe à travers le gel par une petite lamelle carrée très fragile qui bouge au cours de la migration avec la chaleur, diffractant ainsi la faisceau; il en résulte que ce dernier ne passe plus devant les diodes rendant l'analyse impossible.

L'urée pose également le même type de problème car en diffusant elle forme des aggrégats à la sortie de la lamelle; le résultat étant également une diffraction du faisceau.

Un autre problème est lié à la conception même de l'appareil, est qu'il n'est pas possible de comparer deux pistes, l'intensité du faisceau variant d'une piste à l'autre.

4. CONSTRUCTION DU STANDARD

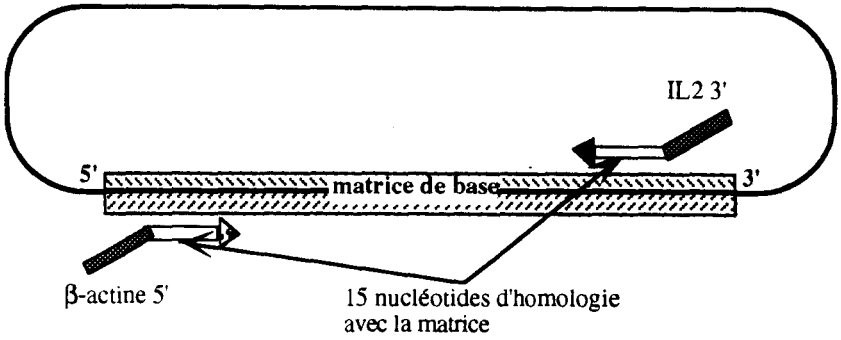
4.1. Principe

La création de ce standard a été réalisée en 1991. Les données techniques étaient alors loin d'être aussi nombreuses qu'actuellement. Le choix du procédé était basé sur l'article de Ho et al. (Ho et coll., 1989). Cette étude étant très générale, il a fallu inventer un procédé plus personnalisé pour atteindre le but que nous nous étions fixé. La solution la plus simple que nous ayions trouvée était de prendre un ADN de base à partir duquel l'élongation en 5' et en 3' serait possible .Nous avons choisi un site de clonage multiple (MCS) car ce fragment d'ADN est la plupart du temps présent dans un plasmide dont la séquence est connue et dont nous disposons en quantité importante et sous forme purifiée; d'autre part, cela pouvait nous permettre dans un deuxième temps de couper spécifiquement cet ADN de façon à séparer les deux blocs d'amorces; ceci afin d'intégrer éventuellement de nouvelles amorces

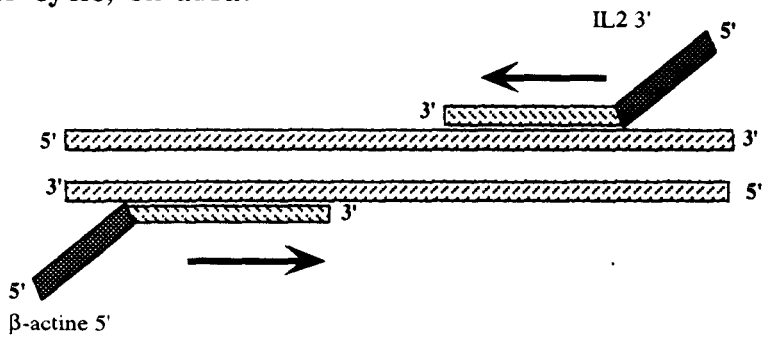
Le principe de la PCR par extension d'amorces est le suivant:

•Chaque amorce est constituée dans sa partie 5' de la séquence nucléotidique de l'amorce de la cytokine à incorporer (environ 25 paires de bases) et dans sa partie 3' de la séqence nucléotidique complémentaire de la matrice ADN (environ 15 paires de bases)

•A chaque étape de PCR il faudra 3 cycles pour obtenir la nouvelle molécule d'ADN contenant les séquences nucléotidiques supplémentaires sous forme d'un double brin d'ADN.

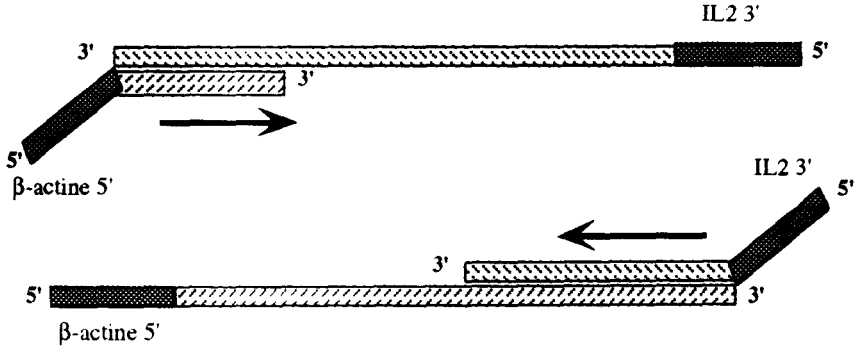


Au premier cycle, on aura:



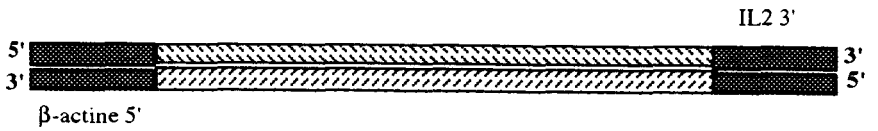
Après dénaturation de la matrice de départ et hybridation des amorces dans la partie homologue, ,la Taq polymérase va synthétiser le brin complémentaire en 3' de l'amorce dans le sens 5'/3'.

Au deuxième cycle, on aura



Les nouveaux brins d'ADN formés comportant dans leurs extrémités 5' la séquence à intégrer va servir de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire après hybridation avec la deuxième amorce; le nouveau brin d'ADN formé comportera l'une des deux amorces en 5' ou en 3' sous forme d'ADN double brin.

au troisième cycle, on aura



Au deuxième cycle, on a obtenu une matrice ADN simple brin complète. Le troisième cycle servira à la réalisation du brin d'ADN complémentaire. La matrice ADN obtenue est identique au schéma représenté ci-dessus et s'est donc allongée de 25 paires de bases en 5' et en 3'.

Les conditions d'élongation sont :

-1 mn à 94°C: dénaturation

-1 mn à 60°C: hybridation

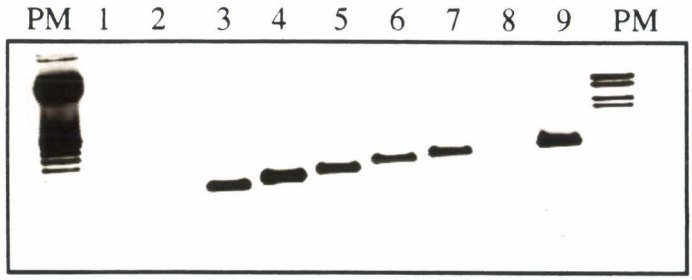
-1 mn à 72°C: élongation

Le produit de PCR est analysé sur un gel d'agarose 2% en TAE (Tris, Acetate, EDTA), le fragment est prélevé et centrifugé dans un microtube de 0,65 ml percé d'un trou d'aiguille, lui-même placé dans un microtube de 1,5 ml ; ceci après une étape de congélation à -20°C pendant 30 mn (centrifugation à 1500 trs/mn pendant 5 mn).

Un microlitre du surnageant est prélevé, et réamplifié de la même façon avec le deuxième couple d'amorces contenant respectivement les amorces IFNγ 5' et IL4 3' dans ce cas précis.

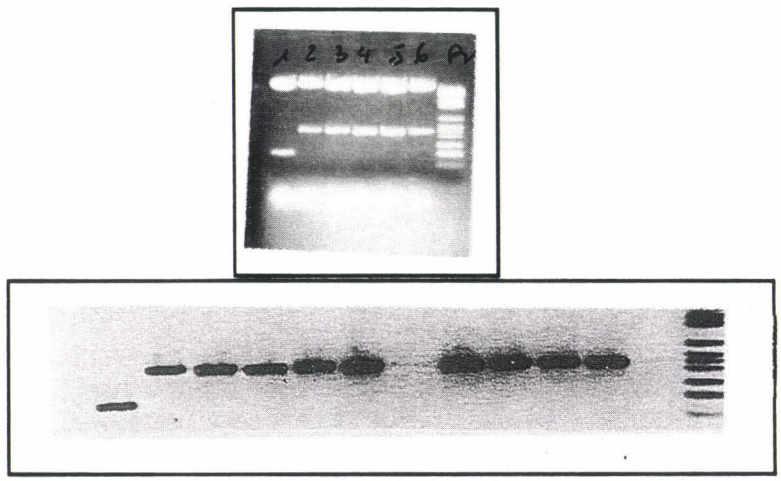
Après l'introduction du dernier couple d'amorces, l'ADN standard est terminé dans sa première phase. Il faut maintenant ajouter une queue poly-A. Cette étape est réalisée grâce à la terminal transférase, une enzyme qui catalyse l'addition de désoxynucléotides à l'extrémité 3'OH d'un brin ADN Dans ce cas précis, on ajoutera au mélange réactionnel des adénines qui formeront une queue polyA.

L'étape suivante,consistera à conserver la queue poly A en 3' de la molécule standard et à éliminer celle qui s'est formée en amont du standard. L'amorce finale 3' contiendra une séquence oligo dT pour l'hybridation sur la séquence polyA auquel viendra s'ajouter un site de restriction BamHI. L'amorce 5' du standard contiendra quant à elle la séquence complémentaire de l'amorce 5' pour l'IL2 ainsi qu'un site de restriction EcoRI.



Les différentes étapes de la construction du standard MCA1. Le premier gel montre les différents fragments d'amplification obtenus après chaque insertion d'un nouveau couple d'amorce.

Cet ADN est alors linéarisé par les enzymes BamHI et EcoRI, puis cloné dans un plasmide :Bluescript II KS+ qui possède en amont et en aval du site de clonage,un promoteur pour la RNA polymérase (T3 et T7)



Analyse soit par carte de restriction des plasmides (gel du haut) soit par la technique de PCR en utilisant les amorces spécifiques IL-2 5' et β-Actine 3' (gel du bas) des bactéries transformées avec le plasmide contenant la construction MCA1

Cet ADN a alors été séquencé de façon à confirmer la séquence théorique.

promoteur T7 →
5' TTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG

SacI NotI XbaI SpeI BamHI SmaI PstI EcoRI
AGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTC

IL2 5' / IL4 5'
ATCATGTACAGCATGCAGCTCGCATCC TGATGGGTCTCAGCCCCCACCTTGC AGGATG

IL5 5' / IL6 5' / IL10 5'
CTTCTGCACTTGAGTGTTC ATGAGAAAAGAGGTTGTGCAATGGCA GTCTGAAGAACTA

IFNγ5' / Actin 5'
TTTTAACTCAAG GGCTCAGCACTGCTATGCTGCCTGC GTGGGGCGCCCCAGGCACCA

Amorces 5'

SacI Not I Xba I Spe I BamH I Sma I
GCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGCTG

MCS

IL2 3' / IL4 3'
GATGATGAGCCAGCAACTGTGGTGG GAGTCCACGCTCACAACACTGAAAG GAGTACA

IL5 3' / IL6 3' / IL10 3'
GAGTGGGCAATGGAAGGC GTCACAGAAGGAGTGGCTAAGGACC GCCAAGTTCGAGGTCA

IFNγ 3' / Actin 3'
ACCAACCCAC CGGCTGAGGCGCTGTCATCGATTTC GAAATCGTGCGTGACATTAAGGAG

Amorces 3'

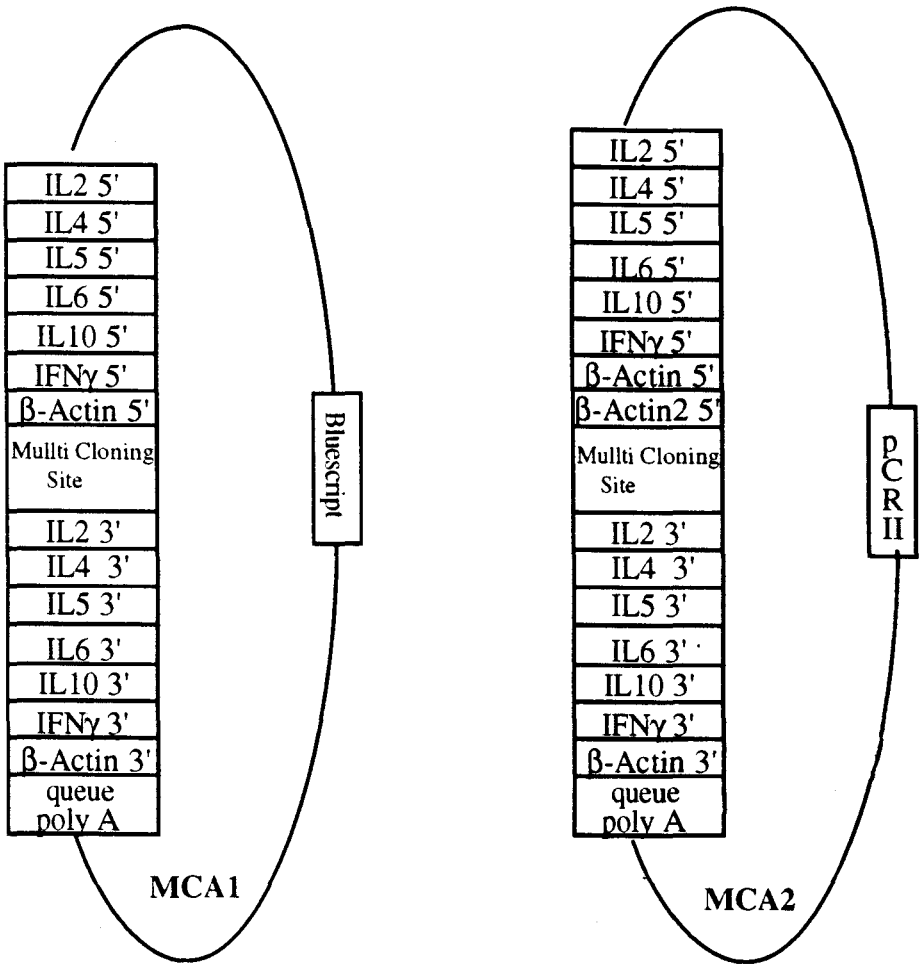
poly-A
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA/GC

Poly A

Hind III Xho I Kpn I ← promoteur T3
AAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGA

GGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC 3'

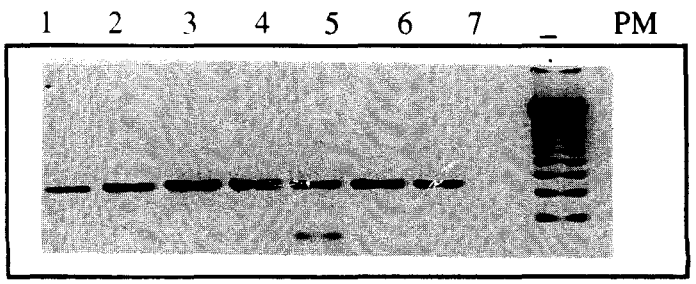
Ces différentes étapes de construction ont abouti à la synthèse des deux molécules standard suivantes :



4.2 Contrôle du standard polyspécifique

La molécule d'ADN standard terminée, nous avons procédé à sa vérification par PCR avec les différentes amorces spécifiques des cytokines.

Dans un premier temps, nous avons utilisé une matrice ADN standard.



Gel d'agarose 2% représentant les produits d'amplification du standard avec les différents couples d'amorces.
Lignes 1 à 7 : IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IFNγ, β actine
Ligne 8 : Poids moléculaires

4.3 Modification du standard polyspécifique en vue de son utilisation sur un analyseur automatique d'ADN

De par sa structure, le gel d'acrylamide ne peut séparer des fragments d'ADN de plus de 450 paires de bases; au delà, la concentration d'acrylamide doit être de 4%.La maille étant alors plus lâche, l'urée contenue dans le gel sort plus facilement par la lamelle sur le côté, l'analyse est alors faussée. De plus, l'analyse des fragments de plus de 450 paires de bases sur gel d'acrylamide de 4 à 6% n'est pas quantitative. Nous avons donc modifier la taille du produit d'amplification de la β actine qui était alors de 580pb. Cette modification a été réalisée en choisissant une nouvelle séquence de l'amorce 5' de la β actine. Dans notre système, l'amorce 3' étant fluorescente, il était plus judicieux de modifier lataille du fragment d'amplification en ne changeant que l'amorce 5'.

Le nouveau couple d'amorces encadre un fragment de 334 pb (voir tableau précédent pour la séquence)

La stratégie que nous avons choisie pour insérer l'amorce 5' pour la β actine est la suivante:

-Enlever le bloc des amorces 5' par coupure enzymatique; ajouter la nouvelle amorce 5' de la β actine par PCR en aval de la première amorce β actine et réintégrer le nouveau bloc 5' dans le plasmide.

Pour réaliser cette stratégie, il nous a fallu recloner la construction standard, car les sites de restriction à l'intérieur de la constuction étaient également représentés dans le site de clonage du plasmide Bluescript KS+ .

Le fragment Hind III-EcoRI de la construction a donc été clonée dans le plasmide PCRII de telle sorte que les sites de restriction présents entre les blocs 5' et 3' deviennent des sites uniques. Ce qui permettait de sortir le bloc 5' du reste du plasmide.

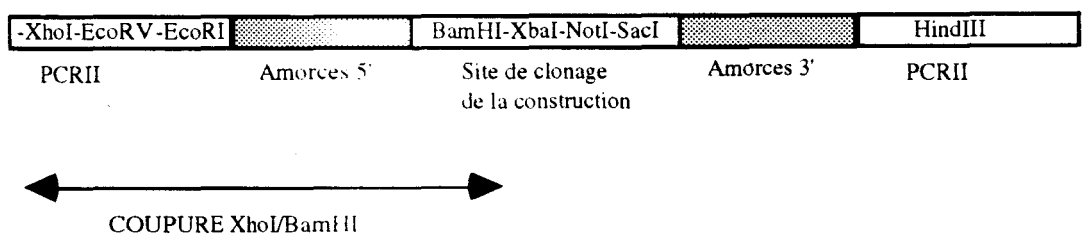
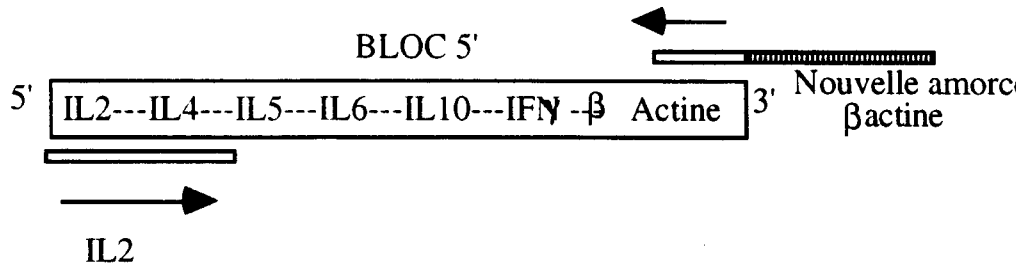


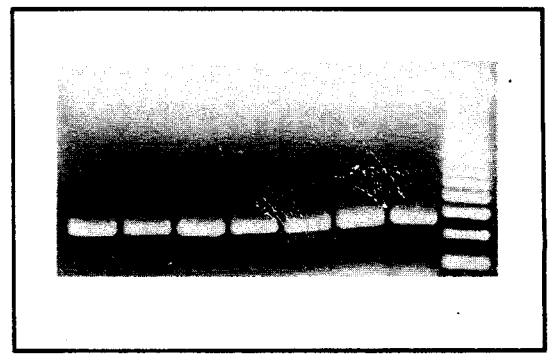
Schéma de la construction intermédiaire de la première construction standard dans le plasmide PCRII en EcoRI - HindIII

Le plasmide PCRII digéré par les enzymes XhoI et BamHI perd la partie des amorces 5'.

Il servira sous cette forme pour l'intégration du nouveau bloc 5' qui sera construit de la façon suivante:

La molécule d'ADN standard est amplifiée par deux amorces: l'amorce 5' est constituée de la séquence complémentaire de l'IL2 en amont du bloc 5; l'amorce 3' est constituée de 15 nucléotides complémentaires de la premiére séquence de la β actine additionnés des 25 nucléotides du complémentaire de la nouvelle séquence de la β actine.





Analyse des plasmides PCRII contenant le fragment amplifié décrit ci-dessus après une digestion avec l'enzyme EcoRI

Le fragment obtenu est inséré dans le plasmide PCRII du kit TA cloning (Invitrogen) grâce aux homologies A/T que possèdent certains produits d'amplification (dépendant de la Taq polymérase), puis digéré par XhoI et BamHI pour réintégrer le premier plasmide PCRII avec le bloc des amorces 3'. Le produit final est le suivant:

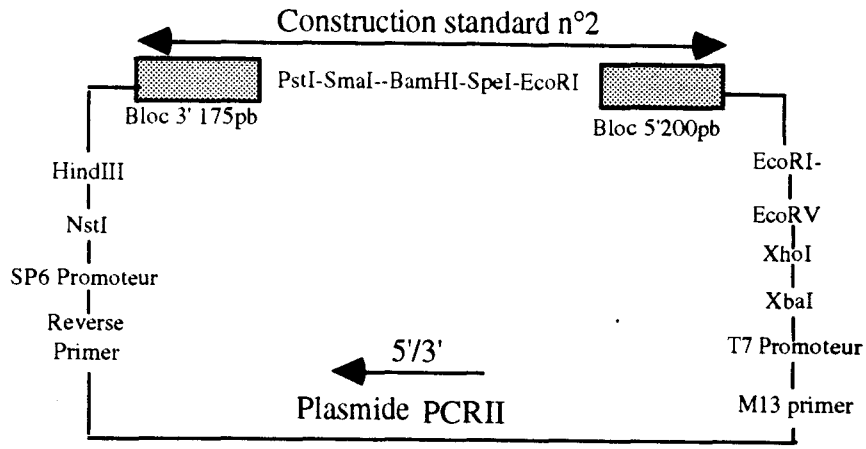


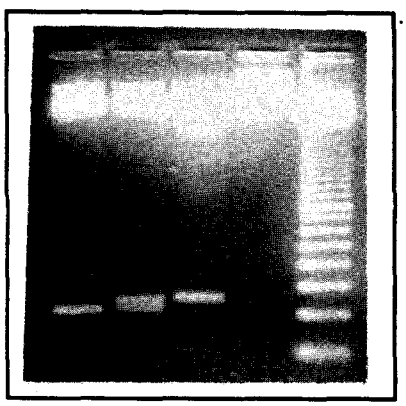
Schéma de la nouvelle contruction standard avec la nouvelle amorce β actine 5' dans PCRII

La vérification de ce clonage a été effectuée par un profil de restriction:

Coupure par EcoRI: -Bloc 5' de 200pb + plasmide

Coupure par EcoRI et HindIII: -Bloc 5' de 200pb + 225pb correspondant au bloc 3' associé au site de clonage+ plasmide

Coupure par BamHI et EcoRV:- -Bloc 5' + 45 pb de plasmide=245pb+ plasmide

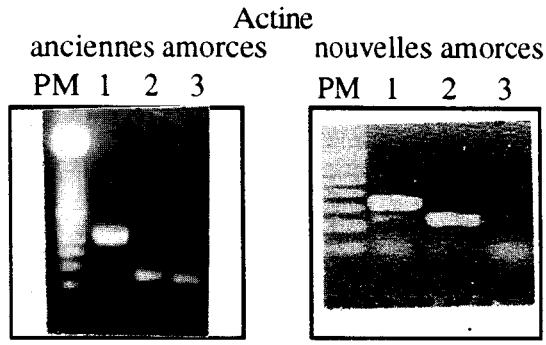


Gel d'agarose 2% représentant l'analyse des fragments d'ADN résultant de la digestion enzymatique du plasmide PCRII avec la construction standard n°2.

De gauche à droite, digestion avec l'enzyme EcoRI (bloc 5'), avec les enzymes EcoRI et HindIII (blocs 5' et 3'), avec les enzyme BamH1 et EcoRV (bloc 5'), avec l'enzyme HindIII (linéarisation)

La deuxième vérification a été réalisée en amplifiant la nouvelle construction avec tous les couples d'amorces.

La taille des fragments amplifiés est de 275pb pour l'ensemble des amorces spécifiques des cytokines et de 250pb pour le nouveau couple d'amorces β–actine.



Les deux construction MCA1 et MCA2 ont été comparées en utilisant les anciennes (utilisées dans la construction MCA1) et les nouvelles (utilisées dans la construction MCA2) amorces spécifiques de la β-Actine et les différentes matrices suivantes.
1. ARN de souris; **2**. MCA1; **3**. MCA2

4.4 Transcription *in vitro* de l'ARN compémentaire du standard

Nous avons effectué une transcription *in vitro* de la molécule standard de façon à obtenir un ARNc .

L'étape de reverse transcription est réalisée après linéarisation du plasmide contenant le standard par l'enzyme KpnI pour $pMCA_1$ et Hind III pour $pMCA_2$. Les RNA polymérases utilisées sont respectivement la T3 pol. et la T7 pol. (La technique est décrite dans l'index à la fin de ce chapitre)

L'ARN obtenu est alors purifié dans un premier temps par chromatographie (Quick spin column G50 de Boehringer RNase free); puis sur billes magnétiques oligo dT. (kit Dynal)

On réalise la transcription inverse sur 2 ng de RNA de standard

5. ETUDE DE L'EFFICACITE ENZYMATIQUE DU STANDARD INTERNE EXOGÈNE POLYSPÉCIFIQUE MCA1:

Récemment, certaines restrictions ont été formulées quant à l'utilisation de ce type de molécule d'ADN standard . (REF Kourilsky). ces données sont assez divergentes (ref bouaboula), et soulèvent le débat suivant:

La molécule standard polyspécifique contenant d'une part les amorces 5' et d'autre part les amorces 3' est-elle amplifiée de la même façon que les ADNc des cytokines dont elle diffère par la séquence et le nombre de nucléotides; notamment dans la phase de plateau de l'amplification?

Afin de donner une réponse à cette question fondamentale, nous avons voulu départager ces différentes études (en fait, nous n'avons pas trouvé d'article qui apportait la preuve que ce standard polyspécifique était amplifié différemment; par contre les travaux de Bouaboula apportaient des faits concrets sur la validité de l'utilisation de cette molécule, malgré un manque de sensibilité dans la quantification des ADNs avant amplification)

5.1 La méthode utilisée pour la validation

Dans ces conditions de détection assez sensibles, nous avons donc pu valider le standard de la façon suivante:

Les ADNc des standards et ARNs poly-A de cellules spléniques de souris sont respectivement rétro-transcrits, puis amplifiés avec deux couples d'amorces différents.

Le premier (IFNγ) donne un fragment de taille équivalente au standard (250 pb pour le standard et 280 pb pour l'IFNγ); dans ce cas on évalue l'efficacité enzymatique entre deux molécules qui ne diffèrent que par leur séquence nucléotidique.

Le deuxième couple d'amorces (IL10) fait varier à la fois les paramètres séquences et tailles (l'IL10 donne un fragment de 380 pb)

Ces produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose, puis purifiés par chromatographie sur des billes de silice (kit Biorad). La quantité respective de ces fragments est calculée après analyse sur un gel d'acrylamide couplé à l'analyseur automatique d'ADN.

Ces différents fragments sont ensuite dilués et le standard est mélangé à l'ADNc dans différents rapports :

1/1; 1/3 ; 3/1 ; 1/10 ; 10/1

Ces ADNs sont réamplifiés par PCR et les produits d'amplification sont prélevés à différents cycles.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans l'article publié dans Nuclear Acids Research.

6. ARTICLE

6.1. Conclusions

Les conclusions que nous apportons confirment celles de Bouaboula et al. (Bouaboula et coll., 1992)c'est à dire:

Dans nos conditions expérimentales, la molécule standard est amplifiée de la même façon que les ADNc étudiés jusqu'en phase de plateau, quelque soit la séquence nucléotidique et la taille (jusque 150 pb de différence, et des rapports de quantité n'excédant pas 10).

La validation de l'utilisation de ce type de standard exogène multispécifique étant faite, nous l'avons utilisé pour doser les cytokines présentes dans les organes lymphoïdes de rats ou de souris suite à l'injection d'une protéine.

Quantitative PCR : validation of the use of a multispecific internal control.

by Françoise Cottrez*, Claude Auriault and Hervé Groux

from Unite CNRS-URA 1854, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Pr. A. Calmette, 59019 Lille FRANCE.

*to whom correspondance should be addressed

FAX : 20 87 78 88

Although RT-PCR has many advantages over RNA blotting methods, it can be difficult to obtain quantitative information, due to the enzymatic nature of the PCR amplification, where small variations in amplification conditions result in drastic changes in product yield. In addition, due to the consumption of the reaction components and generation of inhibitors, the amount of products generated plateaus during later stages of the reaction. These problems can be overcome by the use of internal controls in the PCR. In competitive PCR, a DNA fragment containing the same primer template sequences as the target is used to compete for primers annealing and amplification. PCR products are then distinguished by size, restriction sites or Southern blot analysis. Competitive PCR methods require that the target gene and competitive fragment amplify with equal efficiency; this is the case when the internal standard is as similar as possible to the sequence of interest. It had been postulated that the length or primary sequence differences between the two templates could have an effect on relative amplification efficiency. However, results obtained by different laboratories using a multispecific internal control template show that this is not the case, at least in the exponential phase of the amplification (1,2). In those reports, the analysis was limited to cycles 4 to 5 of the late exponential phase, hence further analysis to define relative amplification, at other stages of the reaction, efficiency are necessary. This is the major drawback to a routine application of the original Wang et al. technique (1).

In our report we have examined whether measurements using a multispecific internal control can also be performed beyond the exponential phase of reaction, with the aim of rendering the technique independent of the number of cycles used. This possibility has already been suggested for methods employing an internal standard with the same sequence as the cellular template, apart from the presence of either a

small intron (3), a small deletion (4) or a mutated restriction site (5). To address this question, we have used for our multispecific internal control two templates both different in size and nucleotides composition from the cellular template. One pair of primers, specific for mouse IFNγ cDNA and multispecific internal control, was used to amplify a 280 bp and a 250 bp fragment, respectively, and the second pair of primers, specific for mouse IL10, to amplify two fragments of 400 and 250 bp, respectively.

For quantitative analysis, fluorescent labeled primers were used for the PCR and individual products were separated on sequencing gels and quantified using a fluorescent automated DNA analyzer (4, 6). In order to determine the quantity of products before PCR, we have taken advantage of this labeling and purified fluorescent amplified PCR products. Standard and cellular specific PCR products were mixed at different ratios (1/1 and 1/10 approximatively for IL10 and IFNγ) and then analyzed with the automated DNA analyzer to calculate the real ratio obtained (stars on right panels). Mixes were then diluted up to 10^6 or 10^7 times and reamplified with the same primers for different cycles numbers. Subsequently, the fluorescent intensity obtained was quantified by computer analysis and then plotted on a log scale against the number of cycles. As Fig 1 clearly shows the amplification proceeded with the same efficiency for both templates, not only during the exponential phase, but also during the non-exponential phase just up to the plateau. Moreover, the ratios obtained over the entire amplification period, up to the plateau phase, were always identical to the initial ratios (stars on right panels). This showed that despite a difference in primary sequence, a difference in size of 150 bp for IL10 and a difference in initial quantities (up to 12 times), the two templates were amplified in an identical manner for up to 40 cycles. Thus, the amount of a specific cDNA, in the total cDNA, could be calculated by comparison with the internal standard at any cycle number.

Our results support the validity of a multispecific internal control, coupled to the quantification of PCR products with fluorescent primers, for the quantification of a variety of mRNA molecules.

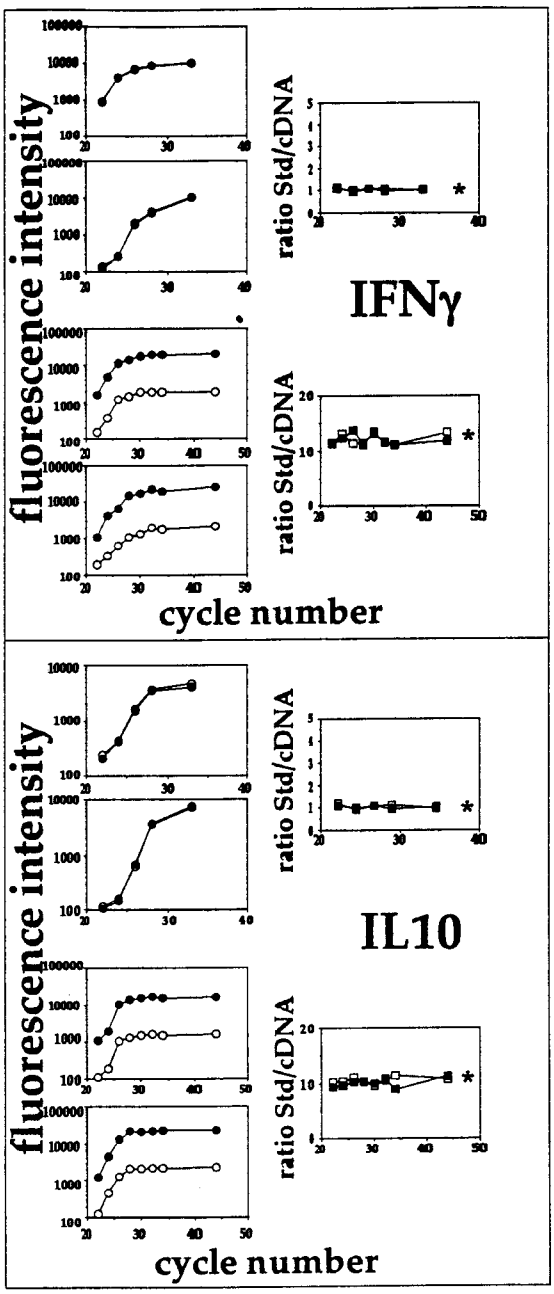
Acknowledgements : We thank S. Gianini for reviewing the manuscript.

Figure 1 : Simultaneous amplification of IFNγ or IL10 from cellular cDNA or multispecific standard cDNA : kinetic and ratios analysis.

cDNA from mouse lymphocytes and from the multispecific standard were amplified separately in the presence of fluorescently labeled primers specific for either IFNγ or IL10, and combined at different ratios. An aliquot from each sample was analyzed using a DNA analyzer and the ratio of the two products was determined (the star on the right panels). Two dilutions (10^{-6} and 10^{-7}, respectively for upper and lower panel for each ratio) from each sample were re-amplified. The relative fluorescent intensity for each PCR product (open circle for cellular cDNA, close circle for standard cDNA) was determined with the fragment manager software™ (Pharmacia) and the values were plotted on a log scale against the number of amplification cycles (left panels). Ratios of standard/cDNA (open square for 10^{-6} dilution, close square for 10^{-7} dilution) were also determined and plotted against the number of amplification cycles and compared with initial ratios (stars) (right panels).

References :

1. Wang, A.M., Doyle, M.V., and Mark, D.F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86,** 9717-9721.
2. Funk, C.D. and FitzGerald, G.A. (1989) *J. Biol. Chem.* **266,** 12508-12513.
3. Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., and Bunn, H.F. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87,** 2725-2729.
4. Porcher, C., Malinge, M.C., Picat C., and Grandchamp, B. (1992) *BioTechniques* **13,** 106-113.
5. Becker-Andre, M., and Hahlbrock, K. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17,** 9437-9446.
6. Cottrez, F., Auriault, C., Capron, A., and Groux, H. *J. Immunol. Methods* (in press)


fluorescence intensity
ratio Std/cDNA
IFNγ
cycle number
fluorescence intensity
ratio Std/cDNA
IL10
cycle number

7. VALIDATION DE L'UTILISATION DU STANDARD INTERNE PAR L'ÉTUDE DES CYTOKINES *IN VIVO*

Pour cette étude, nous avons utilisé

deux types de standard:

-le standard interne endogène: la β actine

-le standard interne exogène polyspécifique: MCA1

et deux modèles animaux:

-le rat Lou.M

-la souris Balb c

Les animaux ont été immunisés avec la molécule recombinante Sm28Gst (P28, Gluthathion S-transferase de *Schistosoma mansoni*) (Balloul)

Les techniques d'immunisation utilisées sont les suivantes :

	RAT	SOURIS
Dose de P28	50 µg réponse primaire 25 µg réponse secondaire	50 µg réponse primaire 25 µg réponse secondaire
Adjuvant	Alun	Adjuvant complet de Freund
Voie d'immunisation	Intra Péritonéale	Sous Cutanée
Cinétique de prélevement d'organes	J0, 1, 2, 3, 4, 5 J'1, 2, 3, 4, 5	J0, 1, 2, 3, 4, 5 J'1, 2, 3, 4, 5
Organes étudiés	Rate Ganglions mésentériques Plaques de Peyer	Rate Ganglions périphériques

Les cellules sont récupérées par centrifugation après dilacération des organes et lyse des globules rouges. Le culot cellulaire est repris par 1 ml de RNAzol et congelé jusquà extraction des ARNs totaux. (voir annexe technique)

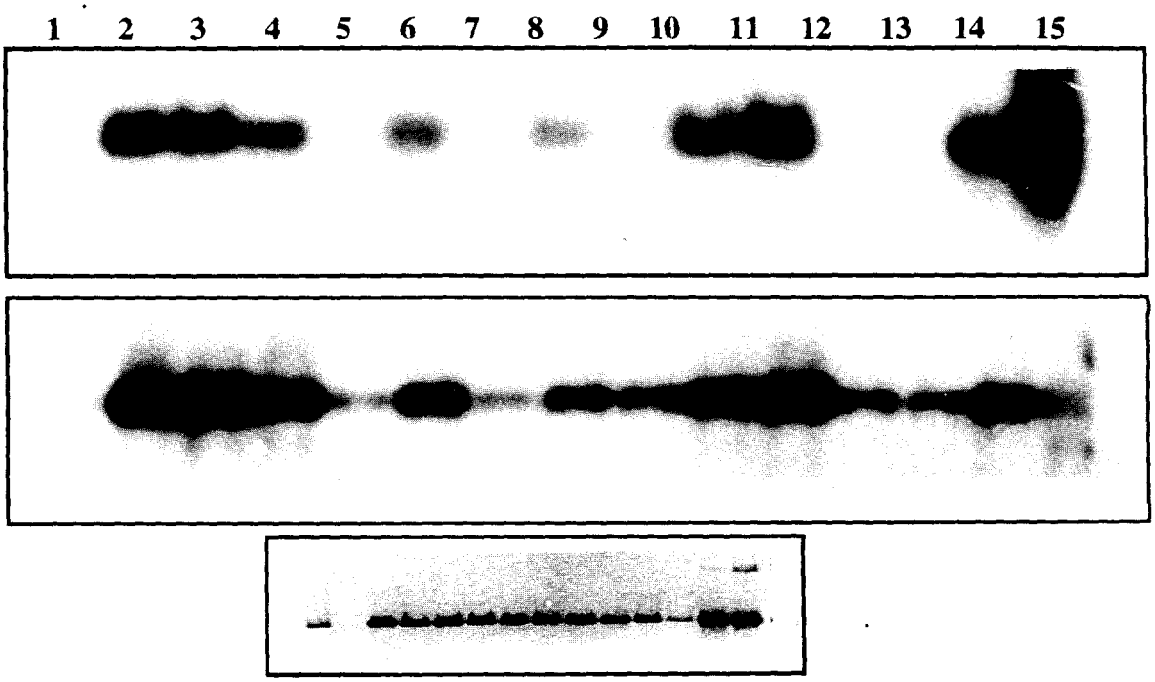
Ce protocole d'immunisation chez la souris est très classique et a déjà donné lieu à une étude sur l'immunogénicité de la protéine P28 après activation spécifique *in vitro* des cellules lymphoïdes. Le profil de sécrétion de lymphokines a également été étudié et pourra par conséquent nous fournir des indications pour aborder la discussion concernant l'activité sécrétrice des lymphokines *in vivo* suivant le même protocole d'immunisation. Cependant, l'utilisation d'adjuvant complet de Freund pouvait laisser présager une intense réponse non spécifique due à la présence des Mycobactéries. Ce type d'adjuvant induit en général une réponse de type Th1 suite à une importante synthèse d'IL-1 par les macrophages. On pouvait donc penser que la réponse induite par l'adjuvant risquait de masquer une réponse spécifique induite par l'antigène.

La validation de l'utilisation des amorces spécifiques des cytokines a été réalisée en première étude chez le rat. Au cours de cette étude nous avions simplement utilisé le standard

interne endogène β actine. Une étude plus complète utilisant les constructions MCA1 et MCA2 a été entreprise chez la souris et nous présentons ici les résultats préliminaires permettant de valider cette approche.

7.1. Utilisation des amorces spécifiques avec un standard interne endogène

Cette étude a donc été réalisée chez le rat immunisé avec la molécule recombinante P28. Dans un premier temps, on amplifie les ADNc de la β-actine dans chaque échantillon.



Analyse sur gel d'agarose puis southern blot des fragments de PCR obtenus après amplification de cellules spléniques de rat pendant 25 cycles avec les amorces spécifiques de **l'IL-2** (gel exposé pendant 3 jours), de **l'IL-4** (gel exposé pendant 3 heures) et de **la β-actine** (gel coloré au bromure d'éthidium).
1.Témoin0.PCR, **2**.TemJ1, **3**.P28.J2, **6**.TemJ3, **7**.P28.J3, **8**.TemJ4, **9**.P28.J4,.**10**.Tem J5, **11**.P28J.5, **12**.Tem J8, **13**.P28.J8, **14**.Tem J0, **15**.Stimulation Con A 24 H

Les différent échantillons sont ensuite analysés avec les amorces spécifiques de l'IL-2 ou de l'IL-4. Pour apprécier certaines variations, il faut travailler dans la phase exponentielle de la PCR, avant d'atteindre la phase de plateau. La PCR a donc été conduite pendant 25 cycles. La détection des produits amplifiés a été réalisée par la technique du Southern blot après migration sur un gel d'agarose. Cette technique de détection nous permet également de valider les amorces utilisées car l'hybridation est effectuée avec une sonde spécifique obtenue à partir del'ADNc

Cette première expérience nous a permis de valider les amorces spécifiques des cytokines de rat, mais aussi d'apprécier les limites de l'utilisation de la RT-PCR en l'absence d'un

standard interne exogène. En effet, même si on note des variations entre les différents échantillons il n'est pas possible dans ces conditions d'évaluer l'amplitude de ces différences et donc de savoir si elle sont significatives. Il fallait donc impérativement utiliser un standard interne exogène que nous avons construit comme décrit précédemment.

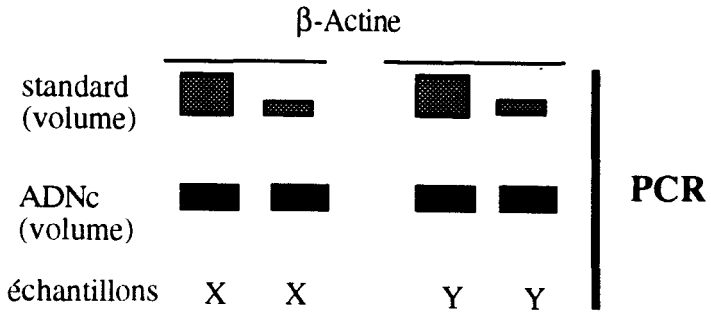
7.2. Utilisation d'un standard interne exogène

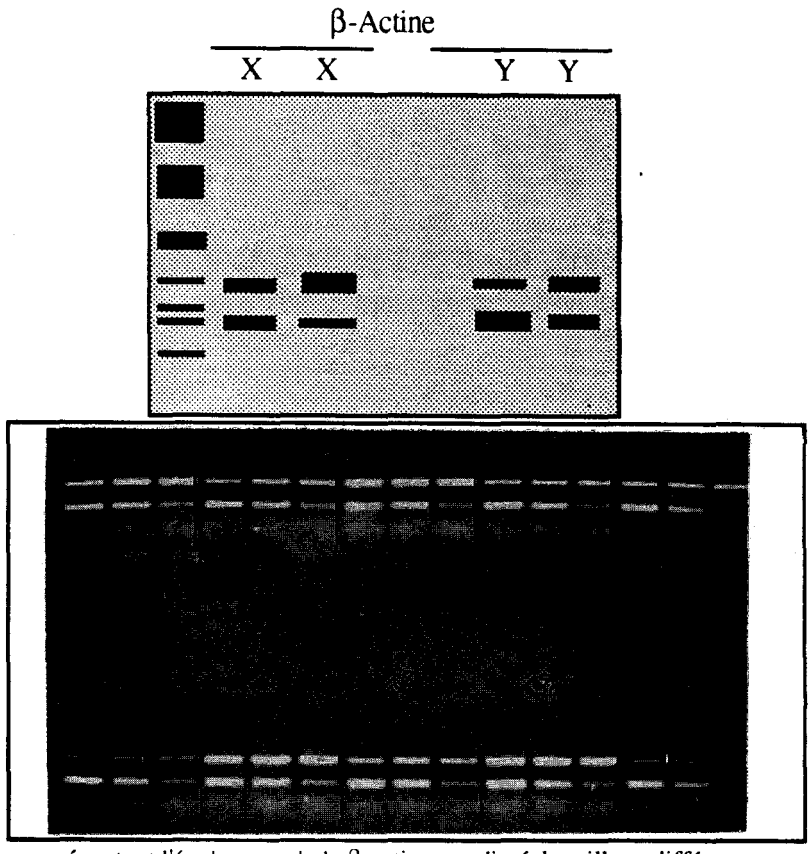
Les expériences utilisant les standards MCA1 et MCA2 ont été effectuées sur des souris immunisées avec de la P28 comme décrit précédemment.

7.2.1. Evaluation de la quantité de β-actine

En premier lieu, on apprécie la quantité relative de β-Actine présente dans chaque échantillon en introduisant deux ou trois dilutions du standard avec une quantité constante d'ADNc. Les produits d'amplification sont alors analysés et on calcule un rapport β-actine/standard pour tous les tubes. En effet, si le standard permet d'apprécier la quantité d'un ADNc spécifique par le calcul du rapport des deux quantités autour du point d'équivalence (rapports étudiés autour de 1 et pouvant s'échelonner de 5 à 0,5), on ne tient pas compte de la quantité d'ARNs messagers présents dans l'échantillon. L'amplification des ADNc avec les amorces spécifiques de la β-actine permet alors de rapporter tous les échantillons à une quantité équivalente, et par là même permet une comparaison. (le taux de β actine reflète par défaut le taux global d'ARNs messagers). Là encore, on doit tenir compte du fait que le taux de transcription de la β actine peut être augmenté dans certains cas. Cette étape nous permet aussi d'apprécier le niveau d'efficacité de la transcription inverse, qui dépend entre autre de l'intégrité des ARNs totaux

Principe de l'évaluation de la quantité de β-actine



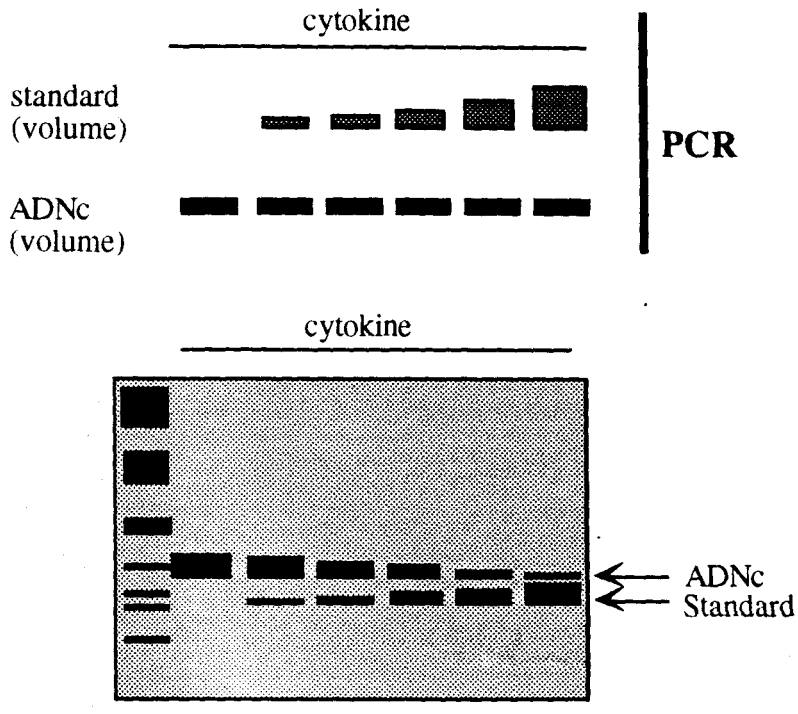


Gel d'agarose représentant l'évaluation de la β-actine sur dix échantillons différents en utilisant des dilutions au 1/500, 1/2000 et 1/10000 du standard pour un microlitre d'ADNc. La réaction de PCR est conduite pendant 25 cycles.

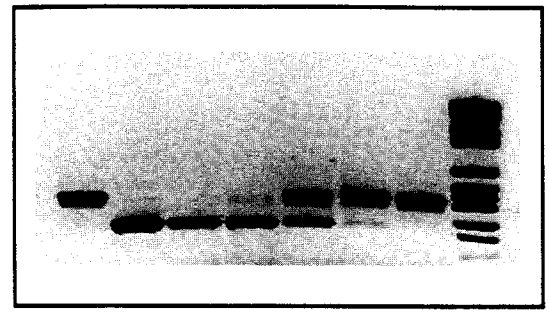
7.1.2 Mesure de la quantité d'ADNc de manière comparative

Classiquement, on réalise au moins cinq dilutions différentes de standard qui sont mélangées avec une quantité constante d'ADNc. Après PCR, on analyse les fragments obtenus et on constate un phénomène de compétition où les plus fortes concentrations de standard empêchent l'amplification des ADNc et *vice versa*. Le point d'équivalence est apprécié lorsque les deux fragments amplifiés ont la même intensité.

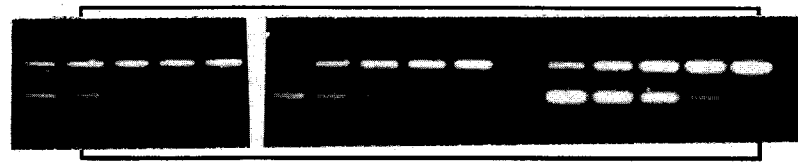
Principe de la PCR compétitive



Les ADNc sont testés avec les amorces des cytokines d'intérêt en présence de quantités croissantes de standard. La recherche du point d'équivalence se fait de deux façons différentes. Dans le cas où les concentrations d'ARNs spécifiques sont très différentes (plus de 5 log d'amplitude) on réalise des dilutions sérielles de 10 en 10 du standard pour apprécier la zone d'équivalence, (il est possible d'analyser des écarts couvrant une amplitude de 10 puisque nous avons validé l'utilisation de notre standard dans cette zone de dilutions). Dans le cas où les concentrations d'ARNs spécifiques sont sensiblement équivalentes, il est possible de réaliser des dilutions sérielles de 2 en 2 pour une meilleure précision, toujours dans l'optique d'obtenir une zone d'équivalence la plus proche possible de 1.



PCR compétitive avec les amorces spécifiques de l'IL-2 en utilisant le standard MCA1 en dilutions sérielles de 10 en 10. La PCR est conduite pendant 30 cycles



PCR compétitive avec les amorces spécifiques de l'IL-2 sur trois échantillons différents en utilisant le standard MCA1 en dilutions sérielles de 2 en 2. La PCR est conduite pendant 30 cycles

Les fragments d'amplification sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide, l'intensité de fluorescence est mesurée grâce à l'analyseur d'ADN. Les pics de fluorescence sont ensuite intégrés grâce au programme Fragment manager (Pharmacia). La figure suivante montre les résultats obtenus après une amplification par des amorces spécifiques de la β-Actine et de l'IL-2 sur des cellules spléniques de souris immunisées avec la molécule recombinante P28, collectées à J0, J2 et J5. Des cellules spléniques de souris stimulées par la ConA *in vitro* sont utilisées comme témoin positif.

La figure jointe montre les résultalts obtenus sur l'analyseur automatomatique d'ADN et l' intégration des pics représentant l'intensité de fluorescence des différents échantillons après 35 cycles de PCR.

7.2.3. Analyse des résultats.

Pour comparer les différents échantillons entre-eux, on utilise cette formule :

$$\textbf{Valeur} = \frac{\text{Ie cDNA}}{\text{Ie standard}} \times \frac{\text{Dil.e}}{\text{Dil.m}} \times \frac{\text{Ie cDNA } \beta\text{-actine}}{\text{Ie standard } \beta\text{-actine}}$$

Ie : intensité de fluorescence à l'équivalence (rapport de 5 à 0,5)

Dil.e : dilution à l'équivalence

Dil.m : dilution maximale

Exemple :

	Ie cDNA β-actine / Ie standard β-actine	Ie cDNA / Ie standard	Dil.e / Dil.m	valeur
J0	0,6	1,67	1	**1**
J2	0,75	1,92	100	**144**
J5	0,9	0,99	10	**8,9**
Cellules activées	0,8	18,49	100	**1479**

Au vu de ces résultats on remarque que l'expression d'IL2 est 1479 fois plus importante après activation avec la ConA (à 2 heures), 144 fois plus importante à J2 qu'à J0, et seulement 9 fois plus importante à J5.

A ce stade de l'analyse, nous avons réalisé une comparaison entre échantillons. Si on veut quantifier le nombre de molécules d'ADNc de départ, il faudra connaître avec précision la quantité de standard introduite dans chaque tube. Dans ce cas le rapport des intensités de fluorescence de la cytokine étudiée par rapport au standard sera remultipliée par la quantité de standard introduite dans le tube et par le facteur de correction de la β-Actine.

Pour ce faire, il faudra préparer une quantité importante d'ARN complémentaire à partir du plasmide standard linéarisé. Cet ARN sera dosé par spectrophotométrie à 260 nm, aliquoté par 4 ng et conservé à -80°C. A chaque étape de rétro-transcription, on utilisera comme témoin, 2 ng d'ARN standard en parallèle avec les autres échantillons. Cet ADNc du standard sera alors dilué et coamplifié avec les ADNc des échantillons.

7.3. Discussion sur l'intérêt d'utiliser la molécule d'ADN standard dès l'étape de transcription inverse

Dans la technique d'origine, l'ARN standard est introduit à différentes concentrations dans les tubes comportant chacun 1µg de l'ARN à tester avant l'étape de transcription inverse. Or, les variations de concentrations de certaines cytokines d'un échantillon à l'autre sont parfois très importantes et nécessitent donc de couvrir une zone de dilutions assez grande lors de l'étape de PCR. Par exemple, en ce qui concerne la synthèse d'IL-2, il existe des cellules T qui n'en expriment pas (anergie, cellules T quiescentes etc...), mais aussi des cellules T qui en cours d'activation vont en exprimer de l'ordre du pg par microgramme d'ARN total. Ce qui correspond à environ 10^{12} molécules d'ADN pour 1µg d'ARN total de cellules T activées contre environ 10^2 molécules d'IL-2 pour des cellules dans des conditions physiologiques de faible activité.

Si on veut un rapport de 1 à 10 entre le standard et l'ADNc de l'IL2, il faut travailler avec une équivalence de molécules d'ADN standard et donc couvrir une gamme de 12 dilutions de 10

en 10 avec le standard, ceci pour chaque tube de 1µg d'ARN à étudier; ce qui fait 12 µg d'ARN total. On en arrive à la conclusion suivante :

Afin de quantifier les ARNs codant pour l'IL-2 avec une technique qui permet au départ d'utiliser peu d'ARNs, on est tenu de préparer un minimum de 12 µg d'ARN total, soit plus que pour la technique de RNase protection ou de Northern blot.

Il est donc clair que cette approche technique qui voudrait introduire un standard interne dès l'étape de transcription inverse, est loin d'être aussi performante qu'en théorie.

D'autre part, l'utilisation du standard interne dans l'étape de transcription inverse n'est pas nécessaire. En effet, cette étape enzymatique peut apporter plus de variations entre chaque manipulation qu'entre les différents tubes d'une même réaction (conservation de l'enzyme, différences d'efficacités suivant les lots etc...).

Par ailleurs, contrairement à l'étape de PCR, cette réaction enzymatique n'est pas une amplification exponentielle; si X est le nombre de molécules d'ARNs messagers de départ, Y, le nombre de molécules d'ADNs complémentaires à la fin de la réaction, et "e" l'efficacité enzymatique (inférieure à 1); on aura cette équation:

$Y = e\ (X)$

En théorie, si dans un tube réactionnel, l'activité enzymatique varie de 0,9 à 0,98, la quantité finale variera d'un facteur 0,08 en plus ou en moins; l'erreur pouvant être corrigée par l'étude de l'expression d'un gène constitutif comme la β-Actine.

C'est pourquoi on ne réalise les mélanges entre le standard et les échantillons qu'à l'étape de PCR.

8. CONCLUSION

Le manque de sensibilité des technologies appliquées à l'évaluation de l'activité transcriptionelle et traductionelle des cytokines posait le problème de l'étude de la réponse immune *in vivo* que ce soit dans le cadre d'une pathologie ou après vaccination.

Les études précedentes permettaient au mieux d'envisager la détection de protéines dans les surnageants de culture de cellules ou d'étudier les ARNm fortement exprimés. L'analyse de l'activité transcriptionelle des gènes codant les cytokines ne pouvait être étudiée que par la technique de Northern blot ; de même, l'étude des protéines exprimées *in vitro* après stimulation des cellules lymphoïdes ne donne pas une image fidèle de l'activité des gènes *in vivo*. En effet, les conditions artificielles de restimulation des cellules *in vitro* récréent un micro-environnement totalement différent des conditions physiologiques. Le réseau complexe d'interactions entre les cytokines et la nécessité d'ajouter des facteurs de croissance exogènes comme le sérum de veau fœtal, modifient considérablement la réponse cellulaire (Araneo et coll., 1991; Wynn et coll., 1993). Le besoin d'une plus grande sensibilité de détection se faisait assez pressant et ce n'est vraiment qu'après la découverte de la technique de PCR que fut donné le second souffle de la détection des ARNm.

L'énorme avantage de la RT-PCR est bien entendu l'extrême sensibilité de ce système. On peut dès lors envisager la détection de quelques copies d'ARNm. Cependant cette sensibilité est liée à une augmentation exponentielle du nombre de copies d'ADN, posant alors le problème de la quantification des produits initiaux. Afin de contrôler ces paramètres, de nombreux standards ont été créés. Ils ont en commun des sites de reconnaissance des amorces oligonucléotidiques identiques à celles des cibles cellulaires, ainsi qu'une taille d'amplification différente des ADNc issus des ARNs cellulaires de façon à pouvoir identifier les deux produits après séparation électrophorétique.

Contrairement aux standards internes endogènes (β-Actine par exemple), qui sont amplifiés dans des réactions séparées avec des amorces différentes, les standards internes exogènes ont l'avantage d'être coamplifiés avec les ADNc à l'aide des mêmes amorces au sein du même tube. Cependant, ces standards doivent être amplifiés avec une efficacité identique à l'ADNc de façon à établir une comparaison entre ces deux matrices et calculer le taux d'ADNc initial introduit dans le tube réactionnel. Une différence de tailles et de séquences nucléotidiques pourraient selon certains travaux être à l'origine d'une différence d'efficacité d'amplification. On peut sans conteste supposer que deux molécules identiques en séquences et qui ne diffèrent que de quelques paires de bases, seront amplifiées avec la même efficacité. Cependant, dans nos conditions expérimentales, deux molécules différentes en séquences et en tailles, jusque 150 paires de bases, sont amplifiées avec la même efficacité jusqu'à un rapport de quantités de

l'un dans l'autre équivalent à 10. D'autre part, l'absence de résultats contradictoires vient conforter l'idée d'une démarche hypothétique qui reste à confirmer.

Si l'étude de l'activité transcriptionelle se limite à un petit nombre d'ARNm, il est alors envisageable d'utiliser un standard par ARN. L'étude des cytokines nous amène à étudier 10 à 20 transcrits différents; l'utilisation d'un standard polyspécifique permet alors de limiter le nombre de contrôles. Dans un deuxième temps, il limite aussi considérablement les causes d'erreurs liées au grandes séries, de même que l'importance des manipulations.

9. DIRECTIONS FUTURES

Dans le but de simplifier cette approche, nous avons envisagé l'optimisation de l'analyse des transcrits par la technique de RT-PCR dans deux directions. La première amélioration concerne la purification d'ARNs à partir d'un petit nombre de cellules. La deuxième amélioration concerne l'analyse des produits d'amplification. En effet, notre système de détection (analyseur automatique d'ADN) est très performant dans l'analyse, mais assez lourd à manipuler. De plus, l'adaptation possible de cette technique au projet ESPOIR, (étude épidémiologique de la schistosomiase au Sénégal) nécessite la simplification de cette étape.

9.1 Amélioration de la technique de préparation des ARNs:

Les techniques de purification des ARNs sont basées sur leur séparation physique ou chimique et demandent une quantité relativement importante de cellules. En effet, l'étape de précipitation des ARNs nécessite une quantité d'acides nucléiques minimale; l'utilisation d'un entraîneur comme l'ARN de transfert peut pallier ce probléme de quantité, mais le dosage ultérieur des ARNs cellulaires est alors incertain. De plus, cette étape apporte également un facteur supplémentaire de contamination par des RNases. La technique de précipitation sur coussin de chlorure de césium est limitante dans le nombre d'échantillons analysables, et nécessite l'utilisation d'une ultra-centrifugeuse. Cette technique n'est donc pas envisageable dans le cas qui nous intéresse. La technique de purification des ARNs par RNAzol permet d'éviter ces inconvénients, mais nécessite au minimum dix millions de cellules lymphoïdes non purifiées. Les fréquences d'erreurs et de reproductibilités de cette technique sont inversement proportionelles à la quantité de matériel de départ. Ces techniques de purification des ARNs ne sont donc pas fiables si on diminue le nombre de cellules de départ.

Un domaine technique en plein développement concerne l'utilisation de billes magnétiques pour la séparation positive ou négative de cellules ou d'acides nucléiques. En ce qui concerne les ARNs messagers, la purification se fait à l'aide d'une amorce oligo dT qui se fixe sur la

queue polyA des transcrits matures, cette amorce étant elle-même fixée sur les billes magnétiques. Un champ magnétique permet la séparation des billes fixées ou non aux ARNs polyA+, puis l'abaissement de la force ionique permet de récupérer les acides nucléiques fixés. Jusqu'à présent, cette technique était utilisée à partir d'ARNs totaux purifiés; l'amélioration proposée consiste à adapter ce système à la purification des ARNs polyA+ à partir d'extraits cellulaires totaux, permettant ainsi d'éliminer une étape de purification et également de réduire le temps de manipulation. De nombreux essais ont été effectués. Le problème majeur concerne l'inhibition rapide des RNAses; en effet, la lyse cellulaire est classiquement effectuée dans un tampon TRIS en présence de NP40, un détergent non ionique. Dans ce cas, il faut trouver la concentration idéale de détergent à introduire, de façon à éliminer le problème des RNAses sans lyser la membrane nucléaire. Aucun protocole utilisant ce type de tampon isotonique ne s'est révélé efficace. Dès lors, nous avons essayé un tampon TRIS à base de protéinase K associée au dodécyl sulfate de lithium, ce dernier étant très actif contre les RNAses. Les résultats n'ont pas été plus concluants et aboutissent comme précédemment à des fluctuations dans la qualité des ARNs obtenus. Ce problème serait dû essentiellement à l'utilisation de cellules spléniques très riches en RNAses; en effet, l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules provenant d'une source tissulaire différente, comme les ganglions mésentériques, permettent une récupération correcte des ARNs polyA+.

-La technique qui nous a donné les meilleurs résultats est donc une adaptation de la technique précédente :

- après centrifugation d'une plaque de 96 puits à fonds ronds contenant 10^6 cellules par puits, celles-ci sont lysées avec 50 µl de tampon de lyse (100mM de Tris HCl pH 8, 50mM KCl, 0,02% LiDS, 5mM DTT, 400 µg/ml de protéinase K), puis incubées 30 minutes à 56°C. On ajoute alors 150 µl de tampon de fixation (Tampon 2X: 20mM Tris HCl pH 7.5, 1M LiCl, 2mM EDTA, 0,02% LiDS) et 10 µl de billes. On incube cette solution pendant 10mn à température ambiante. On place l'aimant sous la plaque puis on enlève le surnageant et on lave les billes six fois avec le tampon de lavage (10mM de Tris HCl pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1mM EDTA, 0,02% LiDS), le dernier lavage est effectué avec le même tampon sans LiDS. Les billes sont enfin resuspendues dans 10 µl de tampon d'élution (2mM EDTA, Ph 7.5) et incubées à 65°C pendant 2 mn. Enfin, on récupère le surnageant contenant les ARNm

Cette technique performante (environ 60 minutes de manipulation pour l'obtention d'ARNs poly A^+) demande encore quelques petites améliorations pour être utilisée en routine, notamment pour éliminer les problèmes liés à la présence d'ADN après addition du tampon de lyse et pour son utilisation sur des cellules spléniques.

9.2 Simplification de l'étape de quantification des produits d'amplification

La technique d'ELISA est une technique de base pour le dosage de nombreuses molécules protéiques. Depuis peu, cette technique est appliquée à la détection des molécules d'ADN. Nous avons donc essayé d'appliquer ce principe à la quantification des produits d'amplification. Partant du fait que les amorces 3' étaient fluorescentes nous avons établi le protocole suivant:

Des microplaques Maxisorp sont recouvertes d'anticorps anti-fluoresceïne (0.1 µg/ puits en tampon carbonate pH 9.6). Après saturation des sites libres avec de la sérum albumine bovine (BSA) à 30mg/ml, les produits d'amplification fluorescents sont ajoutés. La technique est réalisée dans deux plaques différentes de façon à détecter d'une part les produits d'amplification du standard, et d'autre part les produits d'amplification des ADNc étudiés. Après lavages des plaques, l'ADN est dénaturé en ajoutant une solution à 0.25 M de soude, puis après une autre étape de lavages, les sondes spécifiques du standard ou de l'ADNc (oligonucléotides biotinylés spécifiques des parties centrales des produits d'amplification) sont ajoutées dans les puits à raison de 0,2 pmol par puits en tampon SSPE (sodium chloride sodium phosphate EDTA) pendant 2 heures à 42°C. Après lavages des plaques, on révèle l'hybridation par une avidine couplée à la phosphatase alkaline, puis on ajoute le substrat (paranitrophenyl en tampon diethanolamine 1M). La densité optique est mesurée à 405 nm.

Nos premiers essais ont été encourageants mais manquent encore de sensibilité. Ceci est dû notamment à la trop faible biotinylation des sondes oligonucléotidiques.

10. BIBLIOGRAPHIE

Araneo, B. A., T. Dowell, T. Terui, M. Diegel, and R. A. Daynes.: Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of IL-4, IL-5, and IFN-γ, but not IL-2 by activated murine cells. (1991) *Blood* **78** : 688.

Ballagi-Pordany, A. and K. Funa.: Quantitative determination of mRNA phenotypes by the polymerase chain reaction. (1991) *Anal. Biochem* **193** : 231.

Becker-André, M. and K. Hahlbrock.: Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). (1989) *Nucleic Acids Research* **17** : 9437.

Bouaboula, M., P. Legoux, B. Pességué, B. Delpech, X. Dumont, M. Piechaczyk, P. Casellas, and D. Shire.: Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** : 21830.

Brenner, C. A., A. W. Tam, P. A. Nelson, E. G. Englemen, N. Suzuki, K. E. Fry, and J. W. Larrick.: Message amplification phenotyping (MAPPing) : a technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small numbers of cells. (1989) *BioTechniques* **7** : 1096.

Buck, G. J., R. Adron Harris, and J. M. Sikema.: A general method for quantitative PCR analysis of mRNA for members of gene families : application to $GABA_A$ receptor subunits. (1991) *BioTechniques* **77** : 636.

Calzone, F. J., R. S. Britten, and E. H. Davidson.: Mapping of gene transcripts by nuclease protection assays and cDNA primer extension. (1987) *Methods enzym.* **152** : 611.

Caput, D., B. Beutler, K. Hartog, R. Thayer, S. Brown-Shimer, and A. Cerami.: Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslate of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. (1986) *Cell* **83** : 1670.

Carding, S. R., D. Lu, and K. Bottomly.: A polymerase chain reaction assay for the detection and quantification of cytokine gene expression in small numbers of cells. (1992) *J. Immunol. Methods* **151** : 277.

Chelly, J., M. D., C. Pinset, Y. Berwald-Netter, J. C. Kaplan, and A. Khan.: Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. (1990) *Eur. J. Biochem.* **187** : 691.

Chirgwin, J. M., A. E. Przbyla, M. R., and W. J. Rutter.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. (1979) *Biochemistry* **18** : 5294.

Choi, Y., B. Kotzin, L. Herron, J. Callahan, P. Marrack, and J. Kappler.: Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigen" with human T cells. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 8941.

Chomczynski, P. and N. Sacchi.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. (1987) *Analytical Biochem.* **162** : 156.

Frye, R. A., C. C. Benz, and E. Liu.: Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. (1989) *Oncogene* **4** : 1153.

Fung, M. C., N. K. Mak, K. N. Leung, and A. J. Hapel.: Distinguishing between mouse IL3 and IL3 receptor-like (IL5/GM-CSF receptor converter) mRNAs using the polymerase chain reaction method. (1992) *J. Immunol. Methods* **149** : 97.

Gilliland, G., S. Perrin, K. Blanchard, and H. F. Bunn.: Analysis of cytokine mRNA and DNA : detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 2725.

Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.: Site directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. (1989) *Gene* **77** : 51.

Hoof, T., J. R. Riordan, and B. Tummler.: Quantitation of mRNA by the kinetic polymerase chain reaction assay : a tool for monitoring P-glycoprotein gene expression. (1991) *Analytical Biochem.* **196** : 161.

Kanangat, S., A. Solomon, and B. T. Rouse.: Use of quantitative polymerase chain reaction to quantitate cytokine messenger RNA molecules. (1992) *Molecular Immunol.* **29** : 1229.

Kramnik, I., E. Skamene, and D. Radzioch.: Assesment of lymphokine profiles in activated lymphocytes by semiquantitative PCR. (1993) *J. Immunol. Methods* **162** : 143.

Landgraf, A., B. Reckman, and A. Pingoud.: Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. (1991) *Anal. Biochem.* **193** : 231.

Li, B., P. K. Sehajpal, A. Khanna, H. Vlassara, A. Cerami, H. Stenzel, and M. Suthanthiran.: Differential regulation of transforming growth factor β and interleukin 2 genes in human T cells : Demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. (1991) *J. Exp. Med.* **174** : 1259.

Maraskovsky, E., A. B. Troutt, and A. Kelso.: Co-engagement of CD3 with LFA-1 or ICAM-1 adhesion molecules enhances the frequency of activation of single murine $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and induces synthesis of IL3 and IFNγ but not IL4 or IL6. (1991) *Int. Immunol.* **4** : 475.

McKnight, A. J., A. N. Barclay, and D. W. Mason.: Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire subsets of $CD4^+$ T cells. (1991) *Eur. J. Immunol.* **21** : 1187.

Melby, P. C., B. J. Darnell, and V. V. Tryon.: Quantitative measurement of human cytokine gene expression by polymerase chain reaction. (1993) *J. Immunol. Methods* **159** : 235.

Mullis, K. B. and F. A. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Academic Press ed., Vol. 155. Methods in Enzymology, San Diego: Wu, R., 1987.

Murphy, E., S. Hieny, A. Sher, and A. O'Garra.: Detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice. (1993) *J. Immunol. Methods* **162** : 211.

Owczarek, C. M., P. Enriquez-Harris, and N. J. Proudfoot.: The primary transcription unit of the human α2 globin gene defined by quantitative RT/PCR. (1992) *Nucleic Acids Research* **20** : 851.

Pallansch, L., H. Beswick, J. Talian, and P. Zelenka.: Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by the polymerase chain reaction. (1990) *Anal. Biochem.* **185** : 57.

Pannetier, C., M. Cochet, S. Darche, A. Casrouge, M. Zöller, and P. Kourilsky.: The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T cell receptor β chains as vary as a function of the recombined germ-line segments. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 4319.

Platzer, C., G. Richter, K. Uberla, W. Müller, H. Blöcker, T. Diamanstein, and T. Blankenstein.: Analysis of cytokine mRNA levels in interleukin-4-transgenic mice by quantitative polymerase chain reaction. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22** : 1179.

Poo, W. J., L. Conrad, and C. A. Janeway.: Receptor directed focusing of lymphokine release by helper T cells. (1988) *Nature* **332** : 378.

Porcher, C., M. C. Malinge, C. Picat, and G. B.: A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. (1992) *BioTechniques* **13** : 106.

Rappolee, D. A., D. Mark, M. J. Banda, and Z. Werb.: Wound macrophages express TGF-α and other growth factors *in vivo* : analysis by mRNA phenotyping. (1988) *Science* **243** : 708.

Reiner, S. L., S. Zheng, D. B. Corry, and R. M. Locksley.: Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR. (1993) *J. Immunol. Methods* **165** : 37.

Resendez-Perez, D. and H. A. Barrera-Saldana.: Thermocycler temperature variation invalidates PCR results. (1990) *BioTechniques* **9** : 286.

Robinson, M. O. and M. I. Simon.: Determining transcript number using the polymerase chain reaction : Pgk-2, mP2, and PGK-2 transgene mRNA levels during spermatogenesis. (1991) *Nucleic acids Research* **19** : 1557.

Saiki, R. K., S. Scharft, F. Faloona, M. K.B., G. T. Horn, E. H.A., and N. Arnheim.: Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of slckle cell anemia. (1985) *Science* **230** : 1350.

Shaw, G. and R. Kamen.: region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. (1986) *Cell* **46** : 659.

Singer-Sam, J., M. O. Robinson, A. R. Bellvé, M. I. Simon, and A. D. Riggs.: Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermogenesis. (1990) *Nucleic Acids Research* **18** : 1255.

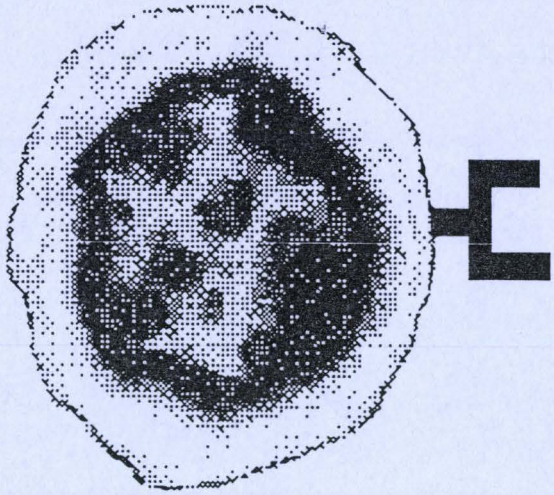
Troutt, A. B. and A. Kelso.: Enumeration of lymphokine mRNA-containing cells *in vivo* in a murine graft-versus-host reaction using the PCR. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **89** : 5276.

Wang, A., M. V. Doyle, and D. F. Mark.: Quantification of mRNA by the polymerase chain reaction. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** : 9717.

Wiesner, R. J.: Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay. (1992) *Nucleic Acids Research* **20** : 5863.

Wynn, T. A., I. Eltoum, A. W. Cheever, F. A. Lewis, W. C. Gause, and A. Sher.: Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Shistosoma mansoni*. (1993) *J. Immunol.* **151** : 1430.

Yamamura, M., K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom, and R. L. Modlin.: Defining protective responses to pathogens : cytokine profiles in leprosy lesions. (1991) *Science* **254** : 277.



Analyse des chaînes Vβ du récepteur T

Ce troisième chapitre est une application de la RT-PCR à l'étude des différentes sous-familles des chaînes Vβ du récepteur T. Cette étude a été entreprise pour pallier le manque de sensibilité de la cytométrie de flux. Le problème alors posé était de mesurer au sein du répertoire T une diminution spécifique d'une sous-population suite à l'activation par des superantigènes. Ceci afin d'évaluer une différence de réponse entre les cellules de sujets sains et celles de sujets infectés par le VIH. La RT-PCR associée à un analyseur automatique d'ADN nous a permis d'objectiver ces modifications mais également d'introduire une notion supplémentaire avec la visualisation des différentes longueurs des régions CDR3 des chaînes Vβ. Ce travail a fait l'objet d'une publication technique dans Journal of Immunological. Methods.

PLAN

1. LES GENES DU RECEPTEUR T.....p.1

1.1. Introduction
1.2. Les gènes du récepteur T
1.2.1. La chaîne α
1.2.2. La chaîne β
1.3. Le répertoire des régions V du récepteur T
1.4. Le répertoire des cellules T
1.5. Le rôle des superantigènes dans la sélection thymique
1.6. Les superantigènes.
1.7. Importance de l'analyse du répertoire T

2. LES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES.....p.8

2.1. Analyse à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des chaînes V
2.2. RNASE protection
2.3. Analyse par PCR
2.3.1. Les amorces spécifiques des chaînes variables
2.3.2. la PCR ancrée
2.3.3. Primers consensus.
2.3.4. la PCR inverse
2.3.4. La PCR quantitative

3. ANALYSE DE LA SPECIFICITE V DE L'ACTIVATION PAR LES SUPERANTIGENES AVEC UNE MÉTHODE UTILISANT LA RT-PCR ET UN ANALYSEUR AUTOMATIQUE D'ADN.....p.13

4. ARTICLE.....p.14

5. DISCUSSION.....p.15

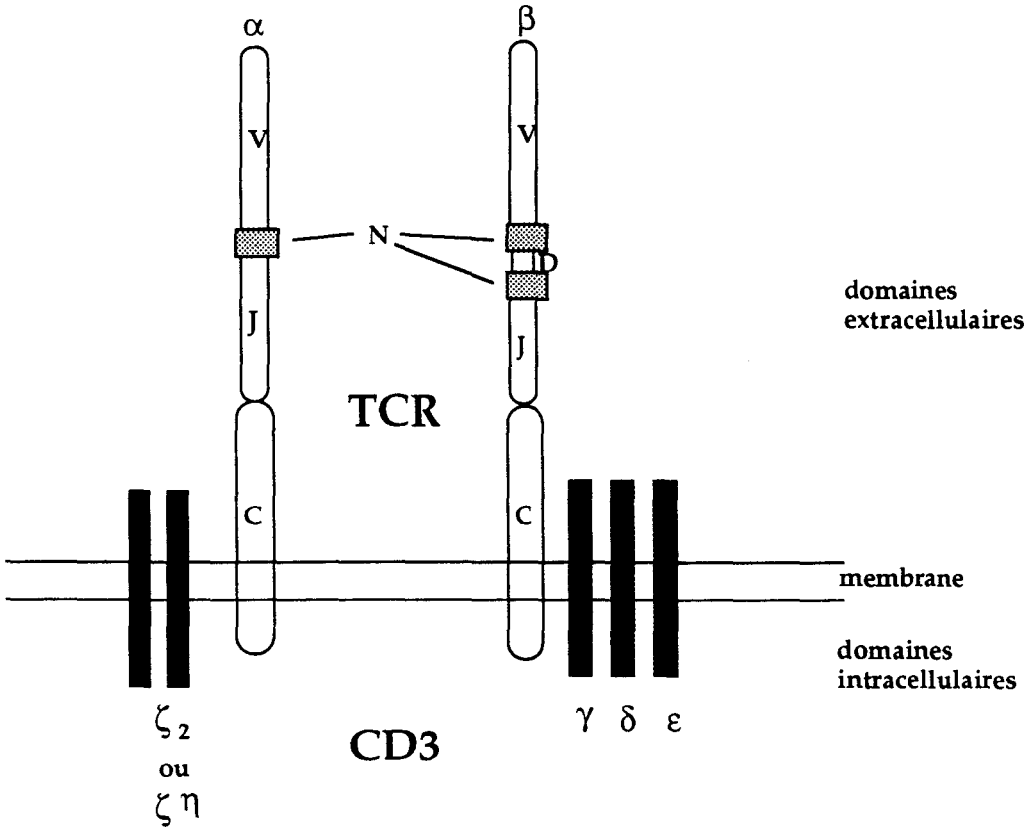
6. BIBLIOGRAPHIE.....p.16

1. LES GÈNES DU RÉCEPTEUR T

1.1. Introduction

La reconnaissance de l'antigène au sein de l'organisme se produit lors de la fixation de cette molécule sur les récepteurs présents à la surface des lymphocytes T ou B et appelés respectivement récepteur pour l'antigène des cellules T (TCR) et immunoglobulines. Si ces deux molécules présentent de grandes homologies dans leurs structures protéiques et dans l'organisation de leurs gènes, elles diffèrent dans leur modalité de reconnaissance de l'antigène. Les immunoglobulines sont capables de se fixer directement sur l'antigène, alors que ce dernier pour être reconnu par le récepteur des cellules T, doit être découpé en fragments peptidiques et associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce phénomène est connu sous le nom de restriction allogénique.

Le récepteur T est une protéine hétérodimérique formée d'une chaîne acide (α) et d'une chaîne basique (β), toutes deux glycosylées. Les comparaisons de structure des différents récepteurs T montrent que ces molécules sont formées d'un domaine distal très variable, qui est le site de fixation de l'antigène, et d'un domaine constant ancré dans la membrane cellulaire. En fait ces molécules présentent une structure similaire à celle des immunoglobulines avec des régions variables (V), de diversité (D), joignantes (J) et constantes (C). Comme les immunoglobulines, ces récepteurs sont présents de façon clonale à la surface des cellules, ainsi un lymphocyte T n'exprime qu'un seul type de récepteur T à sa surface.

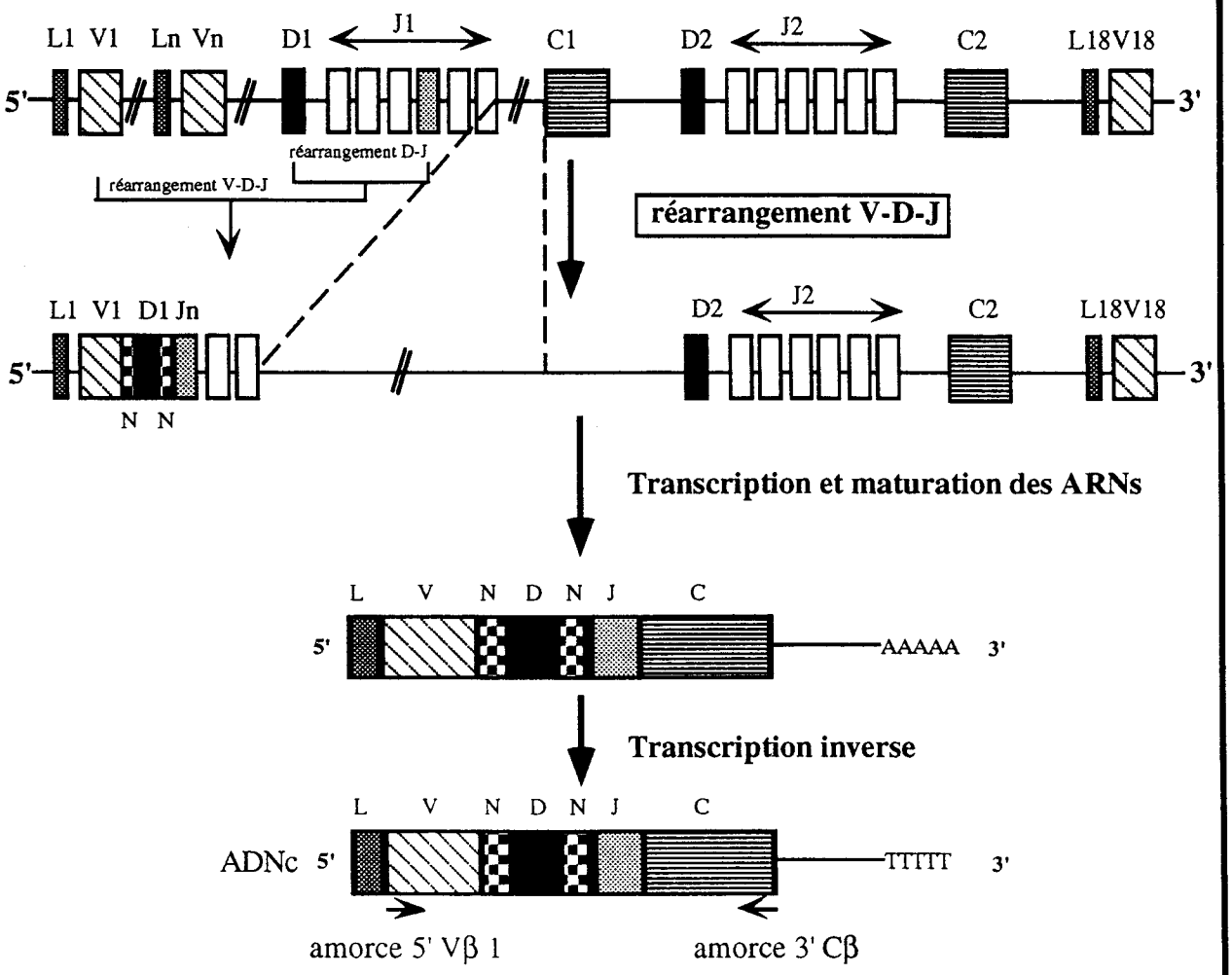


Représentation schématique des chaînes polypeptidiques du récepteur des cellules T montrant la contribution relative des différents segments géniques V (variable), D (diversity), J (jonction), et C (constant). N représente les zones d'addition ou de délétion de multiples de 3 paires de bases permettant d'augmenter la diversité.

1.2. Les gènes du récepteur T

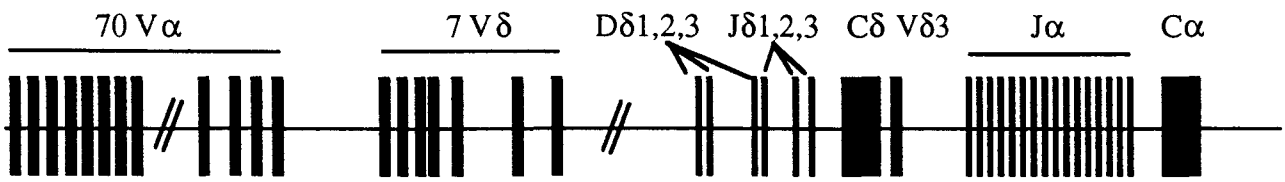
Les récepteurs T, comme les immunoglobulines, doivent être capables de reconnaître de très nombreux antigènes différents et présentent donc une partie constante, support de l'activité biologique commune et une partie très variable capable d'interagir avec l'antigène. La solution adoptée par le système immunitaire pour générer cette diversité à partir d'un nombre forcément limité de gènes, est d'utiliser une combinatoire de différents petits fragments de gènes. Ainsi, les gènes du récepteur T, comme ceux des immunoglobulines, sont disposés dans l'ADN germinal sous la forme de nombreux segments géniques différents comprenant les segments V, D, J, et C. Ces segments géniques se recombinent lors de la maturation de la cellule T de façon apparemment aléatoire pour former un exon V(D)J contigu. Cet exon est ensuite acollé à la région C lors de la maturation de l'ARN messager. C'est la combinatoire obtenue à partir d'un grand nombre de segments géniques différents qui permet d'obtenir une grande diversité parmi les récepteurs T. Cette diversité est accrue par l'insertion ou la délétion d'un multiple de 3 paires de bases (afin de conserver un cadre ouvert de lecture) qui se produit à la jonction des fragments V(D)J lors de leur réarrangement (région N).

Représentation schématique de l'organisation, du réarrangement et de la transcription des chaînes βV du TCR



1.2.1. La chaîne α

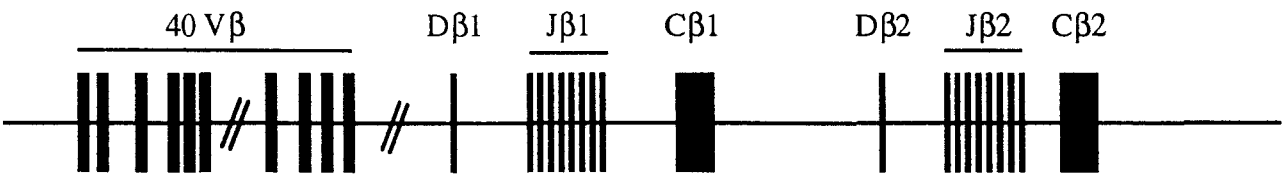
Le gène de la chaîne α est situé sur le chromosome 14 et contient approximativement 50 Vα et 70 Jα qui sont dispersés sur plus de 100 kb. Le dernier segment Jα est situé 4 kb en amont de l'unique segment Cα.



Représentation schématique des gènes α et δ du TCR sur le chromosome 14. Le locus du TCR δ se situe entre les parties Vα et Jα. On note que le Vδ3 est en position 3' par rapport au Cδ est qu'il est en orientation inverse.

1.2.2. La chaîne β

Le gène de la chaîne β mesure 600 kb sur le chromosome 7 et contient 59 segments Vβ. Il existe deux segments Cβ séparés par 8 kb et chacun de ces segments Cβ possède un groupe de fragments Jβ et un seul fragment Dβ. C'est la recombinaison d'un fragment Vβ avec un fragment Jβ qui détermine l'utilisation du segment Cβ associé au fragment Jβ choisi. En fait les deux segments Cβ sont très homologues, ils ne diffèrent que de quatre acides aminés, et on pense qu'ils ont exactement les mêmes fonctions.



Le complexe du TCR β. La région comprenant les parties D, J et C mesure 16 kb

1.3. Le répertoire des régions V du récepteur T

Le grand nombre de segments Vα ou Vβ a été obtenu par duplication de gènes. Ainsi l'alignement des différents segments V séquencés a permis de retrouver des homologies entre ces différents segments. On a ainsi regroupé en familles les segments qui présentaient plus de 75% d'homologie en partant du principe qu'à ce stade d'homologie il existait des hybridations croisées. On a ainsi pu définir vingt familles de Vα qui contiennent de un à sept membres et vingt-quatre familles de Vβ qui contiennent de un à neuf membres. La nomenclature adoptée fut Vβ 1.1 pour désigner le premier segment Vβ de la famille 1 (Vβ1).

1.4. Le répertoire des cellules T

Le réarrangement des segments géniques qui donne naissance aux différents récepteurs T est un phénomène apparemment aléatoire fournissant des molécules très diverses et pas forcément appropriées au rôle qui leur est dévolu. Un système de sélection de ces récepteurs T a été mis en place lors de l'ontologie des cellules T au sein du thymus. En effet moins de 5% des cellules qui pénètrent dans le thymus sont sélectionnées pour coloniser les organes lymphoides périphériques. L'étude de ce phénomène de sélection thymique est très complexe et a donné, et donne encore lieu à de très larges polémiques et hypothèses diverses. Le consensus actuel (Nossal, 1994), (von Boehmer, 1994) veut que cette sélection se déroule en deux étapes, une première étape de sélection positive qui conserve les lymphocytes dont le récepteur est capable d'interagir avec les molécules de CMH de l'individu pour permettre la restriction allogénique propre aux lymphocytes T, suivie d'une étape de sélection négative qui élimine les cellules dont le récepteur interagit avec des molécules du soi, ceci afin d'éviter évidemment des manifestations d'autoimmunité. Le stade exact de maturation des thymocytes où se situe ces différentes sélections ainsi que les modalités de reconnaissance des cellules à éliminer ou à conserver étant toujours le sujet de polémiques nous ne rentrerons pas dans le détail de ces phénomènes de sélections.

1.5. Le rôle des superantigènes dans la sélection thymique

L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de certaines chaînes Vβ du récepteur T ainsi que des études sur l'expression des gènes codant pour ces chaînes Vβ ont montré que, chez la souris tout au moins, les récepteurs T porteurs de certaines chaînes Vβ étaient complètement éliminés du thymus. Les gènes responsables de ces délétions Vβ spécifiques ont été situés sur le locus Mls (Janeway, 1991b). Les produits de ce locus sont capables d'induire une réaction lymphocytaire mixte (MLR) lorsque des cellules de souris possédant les même molécules du CMH sont mises en présence. Cette prolifération se fait de façon Vβ spécifique. En fait les produits de ces loci Mls sont des produits de rétrovirus intégrés dans le génome, les MMTV (Mouse Mammary Tumor Viruses). Des expériences de cartographie génique et des souris transgéniques pour ces gènes de MMTV ont confirmé que ces produits étaient bien responsables des délétions Vβ spécifiques observées chez certaines souches de souris. Ces molécules ont été définies comme des superantigènes endogènes (Janeway, 1991a) ,(Chatila et coll., 1992).

1.6. Les superantigènes.

Les superantigènes sont des molécules capables de se fixer sur les molécules de CMH de classe II et ensuite de stimuler certains lymphocytes T en interagissant avec certaines chaînes Vβ. Il existe deux catégories de superantigènes : les superantigènes endogènes qui sont des produits de rétrovirus intégrés dans le génome des souris (aucun superantigène endogène n'a été décrit chez d'autres espèces) et les superantigènes exogènes qui sont le plus souvent des toxines d'origine bactérienne. On connaissait depuis longtemps le pouvoir mitogène de certaines toxines bactériennes. Le développement des techniques permettant d'analyser le répertoire des lymphocytes T a permis de montrer que ces toxines étaient différentes des mitogènes classiques en ce sens qu'elles n'induisent la prolifération que de certaines cellules T porteuses de chaînes Vβ particulières (Chatila et coll., 1992), (Marrack et coll., 1990).

1.7. Importance de l'analyse du répertoire T

L'analyse du répertoire des lymphocytes T a déjà permis de mettre en évidence une corrélation entre l'expression spécifique de certaines chaines Vβ ou Vα et une sensibilité plus ou moins grande à développer certaines maladies auto-immunes. Ces démonstrations ont été faites chez la souris (Acha-Orbea et coll., 1988); (Banerjee et coll., 1988); (Urban et coll., 1988) et chez l'humain (Hafler et coll., 1988); (Oksenberg et coll., 1990). Ce type d'analyse a permis également de montrer une délétion spécifique de certaines chaines Vβ lors de la maturation des lymphocytes T induite par les superantigènes tant chez la souris (White et coll., 1989); (Sprent et coll., 1990); (Blackman et coll., 1990) que chez l'homme (Baccalà et coll., 1991); (Waller et coll., 1991). D'autre part certaines évidences montrent que des superantigènes pourraient jouer un rôle non négligeable dans certaines pathologies comme le SIDA (Imberti et coll., 1991); (Laurence et coll., 1992), les maladies auto-immunes (Paliard et coll., 1991); (Howell et coll., 1991) et le choc toxinique (Choi et coll., 1990). Il était donc important de développer des techniques permettant d'analyser les modifications de ce répertoire des lymphocytes T.

2. LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES UTILISÉES.

2.1. Analyse à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des chaînes V

L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques des différentes chaînes Vβ ou Vα reste une méthode de choix pour l'analyse du répertoire des lymphocytes T. C'est une technique facile et reproductible et c'est en outre la seule qui permette de mesurer l'expression réelle des récepteurs à la surface de la cellule (Posnett et coll., 1993). (Dalgleish et coll., 1992), (Kappler et coll., 1989). Elle souffre pourtant de certaines limitations, et notamment le faible nombre d'anticorps monoclonaux spécifiques (8 pour les Vβs [3, 5.1, 5.2, 6.7, 8, 12, 13.3, 17] et 2 pour les Vαs [2.3, 12.1] chez l'homme), la relativement grande quantité de cellules nécessaires pour une étude fiable et enfin le problème de l'internalisation des récepteurs lors de l'activation des cellules ou le masquage de l'épitope par des superantigènes par exemple.

2.2. RNASE protection

La technique de RNAse protection a été expliquée plus haut. En bref, il s'agit d'utiliser une sonde ARN marquée qui s'hybride avec les ARNm recherchés. L'action d'un cocktail de RNAses permet d'éliminer tous les fragments d'ARNs qui ne se sont pas hybridés. Les homoduplex restant sont alors analysés sur un gel de séparation puis autoradiographiés.

Cette technique a essentiellement été utilisée par l'équipe de A. Theophilopoulos ((Baccalà et coll., 1991; Baccalà et coll., 1993) pour l'analyse des récepteurs T. Pour analyser l'ensemble du répertoire T il faut préparer une ribosonde pour chaque famille V étudiée. Ce qui fait 24 pour les Vβs et environ 20 également pour les Vαs. Les différentes sondes sont préparées par la technique de PCR avec des oligonucléotides spécifiques des différentes chaînes V et les fragments d'amplification sont clonés dans un plasmide permettant une transcription des ARNs *in vitro*. Les sondes sont radiomarquées lors de la transcription des ARNs par incorporation d'Uridine ^{32}P. Pour simplifier les manipulations, les sondes sont regoupées par lot, et l'hybridation est réalisée pendant une nuit à 56°C. Après digestion par les RNAses, les homoduplex sont analysés sur un gel de polyacrylamide, autoradiographiés, et l'intensité des bandes obtenues est calculée à l'aide d'un scanner.

L'avantage de cette technique est qu'elle est plus sensible que le Northern blot, tout en évitant les problèmes de quantification inhérants à la technique de PCR. Les inconvénients sont la lourdeur de la préparation de différentes sondes, la reproductibilité relative des marquages radioactifs, les sondes étant marquées dans des réactions séparées, la comparaison entre-elles n'est pas toujours facile. Enfin les sondes étant de différentes tailles, il faut introduire, lors de l'analyse, un facteur de correction qu'il n'est pas toujours facile d'établir. Enfin cette technique n'est pas très sensible et de

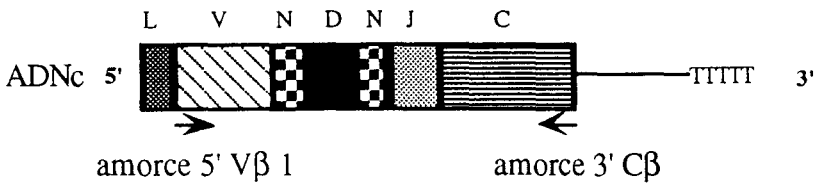
faibles variations ou des transcrits exprimés en faible quantité ne seront pas détectés. De plus, pour les mêmes raisons, il est nécessaire de travailler à partir de grandes quantités d'ARN.

2.3. Analyse par PCR

La PCR permet l'amplification d'une séquence d'ADN cible. L'utilisation de cette technique a permis de grands progrès dans l'étude du répertoire T, notamment par la caractérisation des récepteurs exprimés par certains clones issus soit du sang périphérique soit des sites lésionnels lors de maladies autoimmunes par exemple. Cependant la grande diversité des récepteurs T et notamment le grand nombre de segments Vβ différents a rendu difficile le choix d'un couple d'amorces qui permettrait l'amplification de tous les réarrangements V(D)J possibles. De nombreuses méthodes ont été utilisées pour répondre à ces problèmes ainsi qu'à celui de la quantification des produits de PCR obtenus.

2.3.1. Les amorces spécifiques des chaînes variables

L'une des approches les plus faciles lors du choix des amorces est d'utiliser un amorce spécifique de chaque famille V connue. Couplée avec une amorce spécifique de la région constante, ces amorces V spécifiques permettent d'amplifier la famille choisie au sein d'un échantillon en utilisant l'ADNc simple brin issu de l'ARN messager des cellules T



Cette technique a été utilisée pour la première fois par Choi et al. (Choi et coll., 1989) pour étudier l'expression des récepteurs T sur des cellules stimulées par différents superantigènes exogènes. Il a ainsi pu montrer quelles étaient les différentes chaînes Vβ reconnues par ces superantigènes. Cette technique a ensuite été reprise par Oksenberg et coll., (Oksenberg et coll., 1990) qui en utilisant différentes amorces spécifiques des chaînes Vα ont étudié l'expression de ces chaînes dans les cellules T qui infiltrent les lésions du cerveau de patients souffrant de sclérose en plaque. C'est la grande puissance de la technique de PCR qui a permis l'analyse de petits échantillons de tissus.

L'utilisation de ces amorces spécifiques des différentes chaînes V permet une analyse rapide de l'expression du répertoire. De plus, les transcrits intéressants peuvent ensuite être séquencés afin d'analyser la diversité existant au niveau des régions de jonction entre les différents segments géniques. Cependant, malgré la facilité d'utilisation de ce système et la grande spécificité des

résultats obtenus, il présente certains inconvénients. Le plus évident est l'impossibilité d'analyser les transcrits utilisant une famille de segment V non encore connue. De plus pour analyser l'ensemble du répertoire V d'un échantillon il faut utiliser un couple d'amorces pour chaque famille V ce qui représente à l'heure actuelle plus de 40 réactions de PCR différentes pour analyser un seul échantillon. Ce grand nombre d'analyses augmente évidemment le risque d'erreur de pipetage et de contamination. Enfin, l'utilisation d'un aussi grand nombre d'amorces représente un investissement financier assez important.

2.3.2. la PCR ancrée

Cette technique, utilisée pour la première fois par Loh et coll., (Loh et coll., 1989) n'utilise qu'une seule amorce 3' spécifique. Après synthèse du cDNA, une queue poly-G est ajoutée à l'extrémité 3' des simples brins d'ADNc en utilisant la terminal déoxynucléotidyl transferase (TdT). Ensuite, en utilisant une amorce spécifique des régions C ou J associée à une amorce oligo-dC, il est possible d'amplifier toutes les transcrits V-C ou V-J. Cette technique permet d'éviter le problème de la variabilité des chaînes V car la partie 5' de tous les transcrits possède une partie commune modifiée. L'utilisation des différents segments V est ensuite analysée par des techniques de clonage, de séquençage ou d'hybridation avec des sondes V spécifiques.

L'avantage de la PCR ancrée est qu'une seule réaction de PCR permet d'amplifier tous les transcrits des récepteurs T, y compris ceux de familles encore inconnues, ce qui permet une étude de l'ensemble du répertoire. Ce système présente également certains inconvénients. D'une part les modifications enzymatiques du cDNA peuvent entraîner des artéfacts lors de la PCR et compliquent la procédure expérimentale entraînant alors des risques de contaminations. Enfin, la détection et l'analyse des différents transcrits est beaucoup plus complexe car elle nécessite soit le clonage et le séquençage de tous les transcrits obtenus, soit le clonage et l'hybridation des transcrits avec des sondes spécifiques de chaque V ce qui ramène au mêmes inconvénients que la PCR avec des amorces spécifiques des chaînes V.

2.3.3. Primers consensus.

L'idée d'utiliser des amorces dégénérées consensus pour l'étude du répertoire T a fait suite aux études sur le réarrangement de la chaîne κ des immunoglobulines (Schlissel et coll., 1989). Ces amorces consensus dégénérées sont synthétisées de telle sorte qu'une seule amorce est capable de se fixer sur toutes les chaînes V contenues dans l'échantillon. Ces amorces appelées dégénérées sont un mélange d'amorces représentant toutes les combinaisons de nucléotides possibles parmi les différentes séquences.

Cette technique n'est pas encore aussi répandue (Broeren et coll., 1991), (Howell et coll., 1991) que celle utilisant des amorces spécifiques ou que la PCR ancrée. Si, a priori, cette technique permet d'amplifier toutes les familles V dans une seule réaction de PCR, comme la PCR ancrée, il est possible qu'en fait toutes les familles connues ou inconnues ne soient pas amplifiées. D'autre part ces amorces dégénérées peuvent avoir une affinité plus grande pour certaines familles et amplifient donc préférentiellement celles-ci au dépend des autres. Ceci peut poser un problème lorsque l'on veut analyser un répertoire à partir d'échantillons possédant une population très polyclonale car les transcrits les moins fréquemment représentés, ainsi que ceux présentant le moins d'homologie avec l'amorce consensus ne seront pas amplifiés. D'autre part, les risques de réactivités croisées et d'amplifications de transcrits non spécifiques sont plus importants surtout lorsque l'on fait l'analyse de tissus complexes comme le cerveau, le pancréas etc... Enfin, comme la PCR ancrée, cette technique nécessite un clonage puis un séquençage des produits de PCR ce qui élimine la possibilité d'une analyse rapide d'un répertoire.

2.3.4. la PCR inverse

Cette technique a été utilisée par Uematsu et al. (Uematsu, 1991a), (Uematsu et coll., 1991b). Pour cette technique, les amorces sont choisies dans une région centrale connue qui borde des régions inconnues. L'orientation des amorces est telle que l'amplification se fait dans des directions opposées et non pas entre deux amorces comme dans une réaction de PCR classique. Le cDNA, synthétisé à partir du RNA des cellules T est circularisé en utilisant la T4 DNA ligase. On utilise ensuite des amorces spécifiques de la région C orientées de telle sorte que l'amplification se fasse autour du cercle ainsi crée. Ceci permet d'amplifier toutes les régions V, D, et J. Les transcrits sont ensuite clonés et séquencés pour identifier les différentes familles. Ce système présente l'avantage de n'utiliser qu'un seul couple d'amorces spécifiques pour amplifier tous les transcrits présents sans problème de variabilité. Les inconvénients de ce système sont les mêmes que ceux rencontrés avec la technique de PCR ancrée et notamment les problèmes dus aux manipulations enzymatiques. D'autre part, l'efficacité de circularisation peut affecter l'efficacité de la transcription finale. Enfin, le clonage et le séquençage ou l'hybridation avec des sondes spécifiques sont là encore nécessaires.

2.3.4. La PCR quantitative

Pour étudier l'augmentation ou la fréquence relative des membres d'une famille du récepteur T tant *in vitro* qu'*in vivo* il est nécessaire de quantifier les produits amplifiés Vα et Vβ. Malheureusement, avec la technique de PCR il est difficile de déduire à partir de la quantité de produits amplifiés obtenus, la quantité initiale de matrice ou même la fréquence relative entre différents produits. Cette difficulté provient en fait de la nature même de la technique de PCR (Erlich et coll., 1991). Comme l'augmentation de la quantité de produit amplifiés se fait de façon exponentielle à chaque cycle, de faibles différences dans la quantité des réactifs ou dans les conditions de réaction peuvent changer l'efficacité de l'amplification et donc la quantité de produits amplifiés obtenus. Il existe des différences assez importantes dans l'efficacité d'amplification relative de différentes paires d'amorces ; ceci est d'autant plus important que l'on utilise de nombreux couples d'amorces différentes. Enfin la quantité de produit obtenu est proportionnelle à la quantité de départ uniquement au cours de la phase exponentielle de l'amplification. Il faut donc établir avec exactitude le nombre de cycles nécessaires pour rester en phase exponentielle d'amplification et ne pas atteindre la phase de plateau. Malgré tous ces problèmes, le besoin d'un système de comparaison entre les quantités relatives des différents transcrits du TCR a incité différentes équipes à proposer de nombreuses techniques pour pallier, au moins en partie ces difficultés.

Dans la plupart de ces techniques, on utilise un contrôle interne qui est coamplifié avec le produit analysé. Ce contrôle interne est présent en quantité égale et constante dans tous les échantillons analysés ce qui permet d'apprécier une quantité relative de produit. Cette matrice de reférence qui pourrait être utilisée dans le cas de l'analyse du répertoire T est difficile à choisir. En effet à cause de la grande variabilité entre les différentes familles V, il est difficile de transcrire tous les segments V présents dans un échantillon et ensuite de comparer chacun de ces produits amplifiés à un contrôle qui doit être transcrit de la même façon.

C'est Choi et coll. (Choi et coll., 1989) qui ont utilisé les premiers un contrôle interne dans l'étude du répertoire T. Avec la technique des amorces Vβ spécifiques, ils ont ajouté dans chaque tubes deux amorces spécifiques de la partie constante Cα. Ils postulaient alors que la quantité de transcrits codant pour la chaîne Cα reflétait la quantité des différents transcrits codant pour les chaines Vβ. Ainsi ce segment Cα pouvait servir de matrice de référence puisque les transcrits Cα-Cα sont soumis au mêmes conditions de PCR que le transcrit Vβ-Cβ étudié.

3. Analyse de la spécificité Vβ de l'activation par les superantigènes avec une méthode utilisant la RT-PCR et un analyseur automatique d'ADN

Lorsque nous avons décidé de rechercher les modifications du répertoire T suite à l'activation par des superantigènes ou même par des antigènes traditionnels, nous avons recherché une méthode qui pourrait nous fournir des informations quantitatives et qui ne nécessite pas l'utilisation d'éléments radioactifs. Nous avons donc choisi d'analyser le répertoire T en utilisant la technique de PCR décrite par Choi et coll. (Choi et coll., 1989) qui utilise, comme décrit précédemment, différentes amorces spécifiques de différentes chaînes Vβ en association avec une amorce constante spécifique de la chaine Cβ. Afin de quantifier les produits de PCR obtenus, deux amorces spécifiques de la chaine Cα sont placées dans chaque tube réactionnel; le produit amplifié Cα sert alors de standard interne. Cette coamplification est réalisée durant la phase exponentielle de la PCR du transcrit le plus représenté, ici le Cα. Ceci permet après quantification du produit amplifié de faire un rapport V/C qui nous donne une indication sur la quantité de chaque transcrit entre différents échantillons d'un même individu. Nous reviendrons plus loin sur les modifications que nous avons dû apporter à la méthode décrite initialement par Choi et coll. (Choi et coll., 1989) et notamment la modification de la quantité respective des amorces spécifiques des chaînes α et β afin d'augmenter l'amplification des chaines Vβ qui sont sous représentées comparativement aux chaînes Cα (cf article).

La quantification des différents produits de PCR a été réalisée, comme pour les interleukines, en utilisant des amorces fluorescentes qui permettent une analyse des fragments d'ADN issus de la PCR sur un analyseur automatique d'ADN. Cette quantification des transcrits utilise les mêmes techniques et les mêmes principes que la quantification des transcrits spécifiques des interleukines décrite plus haut. De plus, l'utilisation de gels de séquence pour l'analyse des transcrits Vβ permet, du fait de leur bonne résolution, de montrer que ces différents transcrits sont en fait un mélange de six à onze fragments d'ADN différents séparés par trois paires de bases. Ils représentent toutes les longueurs possibles, issues des différents mécanismes de réarrangement des chaînes variables du récepteur T dans la région CDR3 de la chaîne Vβ. (cf article)

4. ARTICLE

ELSEVIER

Journal of Immunological Methods 00 (1994) JIM07054 T

JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS

Analysis of the Vβ specificity of superantigen activation with a rapid and sensitive method using RT PCR and an automatic DNA analyser

Françoise Cottrez *, Claude Auriault, André Capron, Hervé Groux

Unité mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. A. Calmette, 59019 Lille Cedex, France

(Received 19 July 1993; revised received 6 December 1993, accepted 9 February 1994)

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) by the specific amplification of a DNA target sequence has been shown to permit analysis of T cell receptor usage. The complete repertoire is amplified using oligonucleotide primers specific for each of the known Vα or Vβ regions of the T cell receptor. One of the methods currently used to appreciate the relative quantity of different V chains of the TCR is by coamplifying in the same reaction tube the variable region of one chain together with the constant region of the other chain. We have optimised PCR conditions and analysed PCR products on an automatic DNA analyser facilitating the quantification of the amplified products, avoiding the use of radioisotopes, and allowing the determination of the sizes of CDR3 regions, thus giving new information on the modification of the T cell repertoire. This method was used to analyse the precise Vβ specificity of the T cell activation with the superantigen SEB.

Key words: Polymerase chain reaction; T cell receptor; Automatic DNA analyzer

1. Introduction

Recognition of antigen by T cells is mediated by the T cell receptor (TCR), a heterodimer molecule made up of two chains: α and β. As for immunoglobulins (Lai et al., 1989), the strategy used by the immune system with a limited number of genes to encode the large number of TCR required for the binding of so many different antigens is to use combinations of distinct genomic segments (called Vα-variable, Jα-joining, and Vβ, Dβ-diversity, Jβ), with rearrange with a constant region (C) during T cells ontogeny in the thymus (Davis 1985; Davis and Bjorkman, 1988; Kronenberg et al., 1986; Marrack and Kappler, 1987; Strominger, 1989; Toyonaga and Mak, 1987; Wilson et al., 1988).

Recently, polymerase chain reaction (PCR) has become a powerful research tool in the field of TCR repertoire analysis. Many PCR analytic methods of the TCR repertoire have been re-

* Corresponding author. Tel.: 20 87 78 82; Fax: 20 87 78 88.
Abbreviations: SEB, staphylococcal enterotoxin B; TCR, T cell receptor; PCR, polymerase chain reaction; RT PCR, reverse transcript PCR.

0022-1759/94/$07.00 © 1994 Elsevier Science B.V. All rights reserved
SSDI 0022-1759(94)00054-Z

ported including 'quantitative' PCR (Choi et al., 1989; Imberti et al., 1991; Tomai et al., 1989), anchored PCR (Loh et al., 1989; Smith et al., 1991; De Libero et al., 1991), inverse PCR (Uematsu, 1991), the use of consensus primers (Schlissen et al., 1989; Broeren et al., 1991) and sequence analysis within the VDJ region of the PCR products (Uematsu et al., 1991). The ingenious system described by Choi et al. (1989) is very attractive, because it uses an internal standard which allows the estimation of different V chains of the TCR used in the T cell repertoire. TCR α and β chains from T cell cDNAs are coamplified in the same reaction tube: amplification of the Cα transcript (using two primers directed at the C region of the α chain), used as an internal standard, with an amplification of Vβ transcript (using different 5′ primers specific for each different Vβ gene and a common 3′ directed at the C region of the β chain). This coamplification is driven along the exponential phase of the cDNA that is over-represented: the C region. This allows the determination of the ratio V/C which can give information about the relative quantity of each V family from the same donor after a change in his immunological status such as immunisation, disease, or in vitro T cells activation or deletion, tested among different samples.

Usually, PCR fragments are loaded on an agarose gel, blotted on to a nylon membrane, hybridised with C-region specific ^{32}P-labelled probes, autoradiographed and analysed by scanning or by counting the radioactivity of nylon membrane fragments.

To bypass the need for radioisotopes, and to facilitate the quantification of the PCR products, we have developed a technique using fluorescent primers which allows the separation on a sequencing gel and quantification using a fluorescent automated DNA analyser. This relatively simple technique allowed the analyse of a large number of samples in the same experiment, excluding problems of reproducibility. Moreover, the use of sequencing gels for the separation and analysis of amplified products led us to resolve different sizes of Vβ transcripts corresponding to the different CDR3 lengths occurring during rearrangement.

2. Materials and methods

2.1. Cell preparation and activation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque (Pharmacia) density centrifugation. Cells were seeded at 2.5×10^5 cells/ml in RPMI 1640 containing 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 2 mM sodium pyruvate and 10% foetal calf serum. Where indicated, cells were activated with the 'superantigen' staphylococcal enterotoxin B (SEB) at 100 ng/ml or with CD3 mAb (OKT3) at 10 μg/ml.

2.2. Immunofluorescence analysis

Cells were stained with saturating amounts of FITC-conjugated mAb specific for each Vβ: Vβ5.2-3 (1C1), Vβ8 (16G8) and Vβ12 (S511) (Amersham, France) and analysed by using a cytofluorometer (Epics, Becton Dickinson).

2.3. RNA preparation and reverse transcription

Total RNA was purified by the RNAzol technique according to the manufacturer's instructions (Cinna/Biotecx, Friendswood, TX). Briefly, pelleted PBL were lysed with 1 ml RNAzol and 0.2 ml chloroform; the aqueous phase was then precipitated with isopropanol (v/v) and resuspended in 10 μl of RNAse free water.

The reverse transcription was optimised as described (Rappolee, 1990): 2 mg of total RNA in a final volume of 10 μl were mixed with 1 μl oligo-dT primer (0.5 μg), heated 5 min to 65°C, and 5 μl buffer (5 × RT buffer: 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 300 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 5 μl 10 mM dNTP (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden), 1 μl 1 mM dithiotreitol, 0.1 μl RNAsin (4 U) (Promega, Madison, WI), and 1 μl Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (100 U) (Gibco-BRL/Life Technologies, Cergy Pontoise, France) were added, giving a final volume of 25 μl. Samples were incubated to 42°C for 60 min, heated at 95°C for 3 min, flash cooled at 4°C, and 50 U of MMLV-RT in 2 ml was added for a second cycle of incubation for 60

min at 42°C; samples were then heated 5 min at 95°C and stored at −20°C.

2.4. PCR amplification of cDNAs

For PCR analysis of the T cell receptor Vβ repertoire, 21Vβ, 2 Cα and 1 Cβ specific oligonucleotides were prepared using a DNA synthesizer (Cyclone Plus, Millipore, France). These sequences were previously published (Choi et al., 1989) except for the 5′ Cα (Table 1). The 3′ Cα and Cβ primers were 5′ fluorescein labelled (Fluoreprime) and HPLC purified (Genset, France).

Aliquots of cDNAs were used as templates for each PCR reaction in a 25 μl reaction mixture consisting of 200 μM of each of four dNTPs, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.001% (w/v) gelatin, 0.6 U Ampli Taq polymerase (Perkin Elmer, Saint Quentin, France), and 0.5 μM 5′ TCR Vβ primers and 3′Cβ fluorescent primer with/without 0.16 μM fluorescent Cα primers. Reactions were carried out with a denaturation step at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 mn, and extension at 72°C for 1 min using a Perkin Elmer DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Saint Quentin, France). The expected sizes of PCR products were 129 bp for Cα products and 170–220 bp for Vβ products.

2.5. Analysis of PCR products

2 μl of the aqueous phase was diluted in a sample buffer containing 80% formamide and blue dextran, heated at 95°C for 2 min, loaded on a 6% denaturing PAA gel (Pharmacia Ready MIX gel) and submitted to electrophoresis using the ALF DNA sequencer (Pharmacia LKB, France). At the end of the electrophoresis, the areas of the peaks were calculated using DNA Fragment Manager (Pharmacia LKB, France).

Table 1
Specific oligonucleotide primers used for PCR amplification of TCR cDNA

Primers	5′ → 3′	Specificity
Vβ1	GCACAACAGTTCCCTGACTTGCAC	1.1–2
Vβ2	TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT	2.1–3
Vβ3	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC	3.1–2
Vβ4	ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT	4.1–3
Vβ5.1	ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC	5.1
Vβ5.2–3	TTCCCTTAACTATAGCTCTGAGCTG	5.2–3
Vβ6.1–3	AGGCCTGAGGGATCCGTCTC	6.1–3
Vβ7	CCTGAATGCCCCAACAGCTCTC	7.1–2
Vβ8	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG	8.1–4
Vβ9	CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC	9.1
Vβ10	CTCCAAAAACTCATCCTGTACCTT	10.1–2
Vβ11	TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG	11.1–2
Vβ12	AAAGGAGAGTCTCAGAT	12.1–2
Vβ13.1	CAAGGAGAAGTCCCCAAT	13.1
Vβ14	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT	14.1
Vβ15	AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT	15.1
Vβ16	AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC	16.1
Vβ17	CAGATAGTAAATGACTTTCAG	17.1
Vβ18	GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA	18.1
Vβ19	CAATGCCCCAAGAACGCACCCTGC	19.1
Vβ20	AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC	20.1
3′Cβ	TTCTGATGGCTCAAACAC	
5′Cα	GAACCCTGACCCTGCCGTGTACC	
3′Cα	TAAGACAGCCTGTGCTCCCTC	

3. Results

3.1. Determination of PCR coamplification conditions

To ensure that the amount of amplified products is proportional to the amount of starting template and to verify the reverse transcription step, it was important to monitor the number of cycles. This was done by sampling PCR every two cycles to determine when the amplification plateau was achieved (not shown). The number of cycles performed during the analysis of Vβ chains expression was two cycles less than the number required to reach the plateau for each samples and was always approximately around 25 cycles.

The PCR technique, used to analyse amplified Vβ families, has been previously described and successfully used for the analysis of T cell repertoire modifications (Choi et al., 1989; Palliard et al., 1991; Tomai et al., 1991; Imberti et al., 1991; Chen et al., 1993). Since the initial description of this method (Choi et al., 1989), some improvements have been introduced by different authors. The length of the Cα amplified product was changed (Imberti et al., 1991) to have an internal standard with a size more closely related to the size of the analysed Vβ product to facilitate the analysis on gel. We have also changed the 5′ Cα specific primer which together with the previously described 3′ primer (Choi et al., 1989) amplified an 129 bp band and spanned an intron thus avoiding amplification of contaminating genomic DNA. DNA contamination was also checked by introduction of non-RT PCR control (not shown). In coamplification experiments using two different pairs of primers, the efficiency of Vβ amplification was highest when the two cDNAs were amplified in separate reactions (not shown). To improve the PCR conditions, as previously described by others (Bettinardi et al. 1992; Tomai et al. 1991; Chen et al. 1993), we chose to decrease the amount of Cα primers, while retaining the same quantity of Vβ primers (Fig. 1).

To further validate this PCR approach for analysis of TCR V gene transcripts, we tested whether the relative incorporation of fluorescent primers in the PCR reaction was proportional to the number of cells expressing a particular Vβ element. On T cells obtained from four different normal donors and analysed before or after activation during 10 days with either CD3 mAb or SEB in the presence of rIL2 (Fig. 2) we determined the actual percentage of T cell expressing (a) Vβ 5.2/3 (b), Vβ 8, or (c) Vβ 12 TCR chains using fluorescent labelled anti-Vβ monoclonal

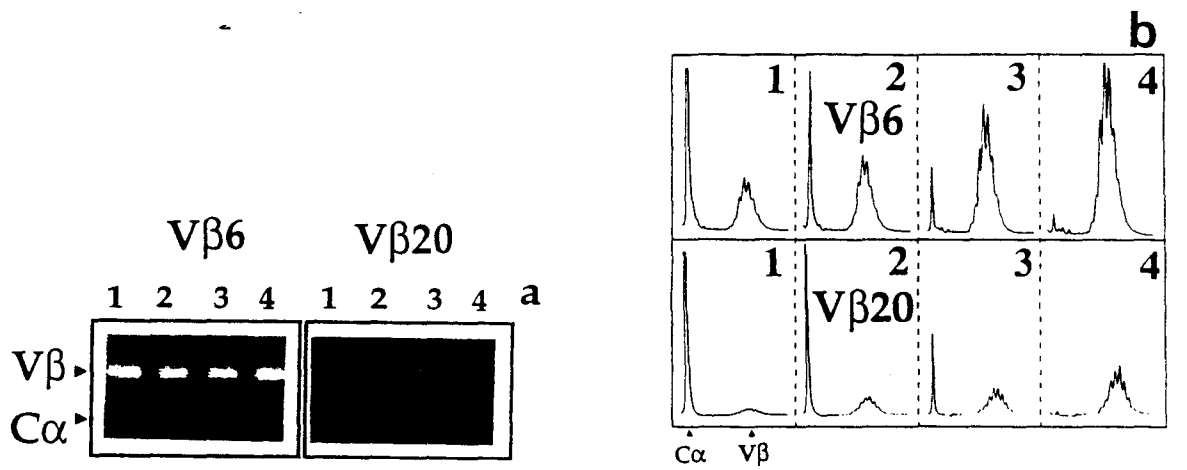


Fig. 1. Cα, Vβ6, and Vβ20 specific amplified products obtained by coamplification using different amounts of Cα primers. Vβ6 or Vβ20 products were coamplified with Cα products using constant amounts of Vβ specific primers (0.5 μM) and different amounts of Cα primers, respectively: 0.2 μM (1), 0.16 μM (2), 0.1 μM (3), 0.05 μM (4). PCR fragments were visualised on agarose gels (*a*) or analysed with the automatic DNA analyser after separation on an acrylamide gel (*b*).

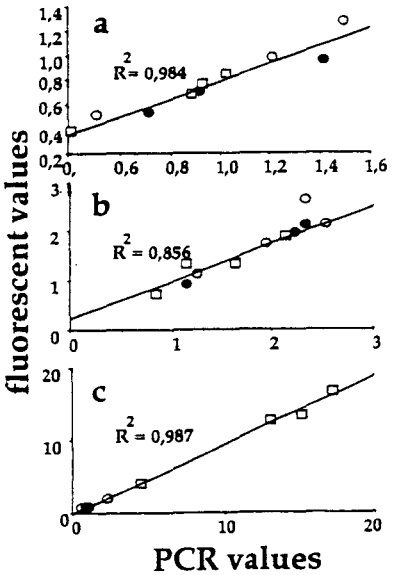


Fig. 2. Correlation of PCR values to the percentage of T cells bearing particular Vβs. Aliquots of resting (open circles), CD3-activated (close circles) or SEB-activated (open squares) T cells were analysed by flow cytometry using specific anti-Vβ monoclonal antibodies (anti-Vβ5.2 (a), anti-Vβ8 (b), and anti-Vβ12 (c)). PCR values, obtained as described above, and percentage of T cells bearing each Vβ were plotted on a graph. The standard curves were determined by the computer.

antibodies prior to preparation of the mRNAs. PCR values for these different Vβ transcripts were evaluated according to our method and results were plotted (Fig. 2) against the percentage of Vβ obtained by staining with fluorescent antibodies. A strong correlation and a linear relationship was obtained for the three different Vβ chains analysed showing the reliability of our PCR analysis (Fig. 2) (Choi et al., 1989). This correlation between the surface expression and the quantification of transcripts after PCR led us to analyse the modifications induced by activation in the expression of a particular Vβ chain in two different samples. However, due to the difference in the amplification efficiency between two different couple of primers, our technique cannot be used to analyse Vβ frequencies.

3.2. Analysis of TCR Vβ transcript.

The reliability of using an automatic DNA analyser in order to separate and analyse PCR products has already been described (Porcher et al., 1992; Pannetier et al., 1993). One can easily separate on a 6× denaturating PAA gel PCR products in the range of 100–400 bases that differ from each other by 1–2 bases provided they are labelled during the PCR by introduction of a fluorescent primer. The fixed laser beam of the ALF DNA analyser excites the fluorescent dye of amplified products simultaneously in all the lanes by penetrating the gel perpendicular to band migration. The emitted light is detected by 40 separate photodiodes. Signals are automatically collected, digitised and sent to the computer for storage and analysis. Areas of peaks are calculated using the integration software Fragment Manager which allowed the analyses, comparison and calculation of 40 different samples at the same time.

The sequencing gels we used allow a single base pair separation of the PCR products generated. With the DNA Fragment Manager software which gives us either an electrophoresis profile (Fig. 1) or a representation of the different DNA fragments migrating through the gel (Figs. 3*b* and 3*c*) we can see that the Vβ specific products are separated into discrete bands spaced by 3 base pairs that represent all various sizes of the CDR3 region. The Vβ specific bands cross the laser beam between 170 and 250 mn (Fig. 3) whereas the single band which represents Cα products appears at 115 mn. This discrimination between CDR3 sizes of the different Vβ allowed us to analyse more precisely into a particular Vβ family the modifications of T cell receptor expression (see below).

3.3. Analysis of the specificity of SEB activation

We wondered whether superantigens activate equally well all cells bearing a specific Vβ chain or if only some clones proliferated. Indeed, analysis of electrophoresis profiles allowed us to determine if among cells bearing a particular Vβ, the expansion is restricted to a small proportion of cells or affected all cells bearing the analysed Vβ chain. We tested the entire Vβ repertoire of one representative out of six healthy individuals by the 21 different Vβ primers that have been previ-

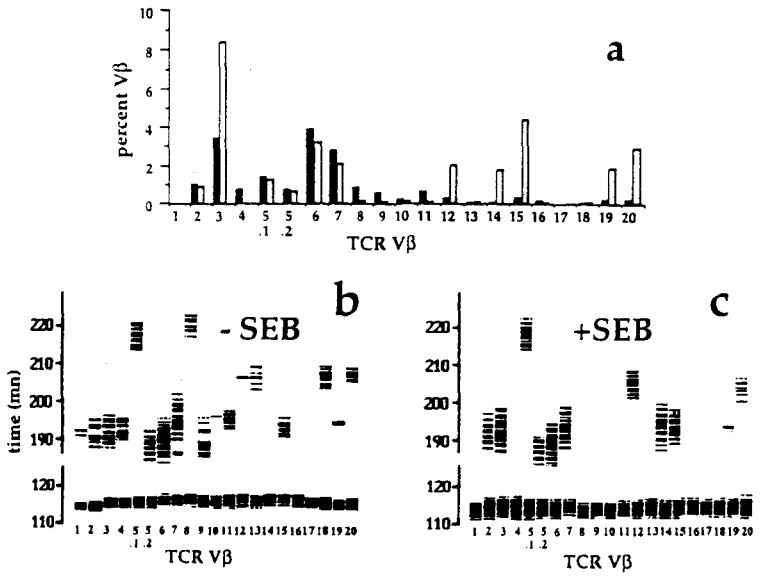


Fig. 3. Modification in Vβ expression of T cells of a normal control after activation with SEB *a*: histogram represent normalised PCR values of the 21 different Vβ used to analyse the T cell Vβ expression of a healthy donor before (black pattern) and after (grey pattern) activation during 10 days with SEB (100 ng/ml). *b* and *c*: results obtained for the healthy control with (*c*) or without (*b*) activation with SEB were analysed with the DNA Fragment Manager™ program which gives a representation of the different DNA fragments migrating through the gel. The single band which represents Cα products appears at 115 mn whereas the Vβ specific bands, which are spaced by 3 bases pairs, cross the laser beam between 170 and 250 mn.

ously reported to match known Vβ segments, before and after activation during 10 days with SEB plus IL-2. Fig. 3*a* shows the results of this study in which the PCR values have been normalised with respect to Cα. SEB activation selectively induced the proliferation of T cell bearing Vβ 3, 12, 14, 15, 19 and 20 as previously described using two different techniques (Choi et al., 1989; Baccalà et al., 1993). The analysis of electrophoretic profiles (Fig. 4) of PCR products specific for Vβ 3, 12, 14, 15, 19 and 20 shows that before and after SEB activation the profiles are

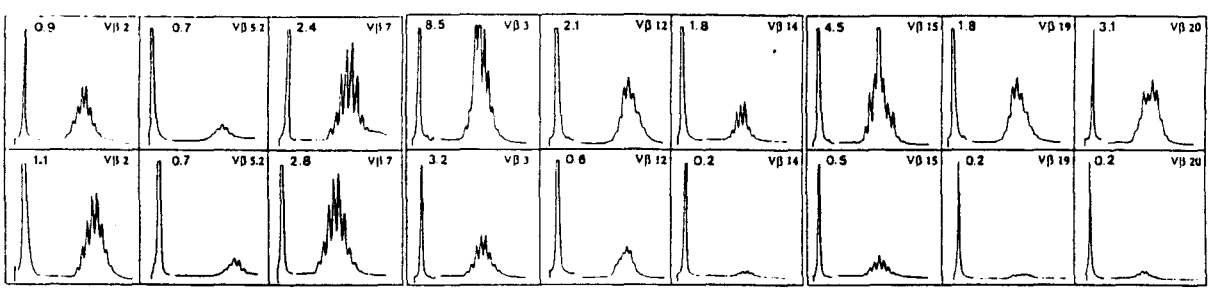


Fig. 4. Electrophoretic profiles of fluorescent PCR products specific for TCR-Vβ chains from T cells of a healthy control before and after activation with SEB. Fluorescent profiles of PCR products specific for indicated Vβ chains before (dashed line) or after (solid line) SEB activation. To provide a clearer view the profile obtained after SEB-activation (solid line) was placed slightly to the left of the profile obtained before any activation (dashed line). Results correspond to those displayed in Fig. 3.

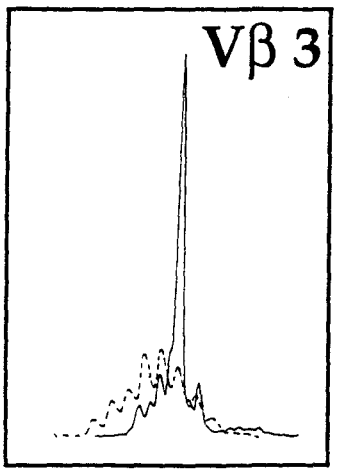


Fig. 5. Analysis of the CDR3-like region sizes of TCR-Vβ3 chain from a healthy control T cells after activation with SEB. Fluorescent electrophoresis profiles of Vβ3 specific PCR products obtained from cDNA of a healthy control before and after activation with SEB as described above. Arrow shows the detection of an emerging subpopulation.

exactly the same, thus superantigens binds to all T cells bearing a particular Vβ chain (3, 12, 14, 15, 19 and 20 for SEB) and induced the proliferation of all these cells regardless of their CDR3 length. However, in some cases as shown in Fig. 5 for Vβ3-positive T cells, from another healthy individual, SEB can induce a higher proliferative response of a subpopulation into these Vβ3-positive T cells as shown in Fig. 5. This subpopulation may represent a single in vivo preactivated clone.

4. Discussion

The analysis of the T cell repertoire offers the opportunity to better understand the cellular and molecular laws that govern the immune response in both physiological and pathological conditions. For example the analysis of the T cell repertoire has already revealed a correlation between the expression of specific Vα or Vβ genes with sensitivity to autoimmune diseases in both animals (Acha-Orbea et al., 1988; Banerjee et al., 1988; Urban et al., 1988) and humans (Hafler et al., 1988; Oksenberg et al., 1990). This type of analysis has also shown superantigen-induced clonal deletion in developing T cells both in murine (White et al., 1989; Sprent et al., 1990; Blackman et al., 1990) and humans (Baccalà et al., 1991; Waller et al., 1991). In view of the mounting evidence that microbial superantigens may play a role in the pathogenesis of several human disorders including AIDS (Imberti et al., 1991; Laurence et al., 1992), autoimmune diseases (Paliard et al., 1991; Howell et al., 1991) and toxic shock syndrome (Choi et al., 1990), the interest of developing a simple method, which did not use radiolabelled compounds, in assessing the modification in the Vβ expression is evident.

Numerous methods for the evaluation of the Vβ expression of human or mouse T cells have already been used (Choi et al., 1989; De Libero et al., 1991; Uematsu et al., 1991; Tomai et al., 1991). One of these methods using a coamplification of the variable region of one chain, by using a 5′ primer specific for a given V genes and a common 3′ primer in the constant region, together with the constant region of the other chain, using two constant region primers of Cα gene. We have used this approach with some modifications: (i) the ratio of Cα primers versus Vβ was optimised in order to enhance the amplification of Vβs that are under represented as compared with Cα transcript, (ii) radioactive labelling was replaced by fluorescent labelling, (iii) PCR products were loaded on a sequencing acrylamide gel, iii) the use of an automatic DNA analyser allowed the separation and the quantification of individual PCR products at the same time.

Our method presents several advantages over other previously described. It is faster since we can analyse 40 different samples in less than 4 h and as many as 80 individual samples in 1 day since we can make at least two loading on one gel. The reliability of the labelling is evident since the fluorescein introduced is stable for more than 1 year when kept at −20°C and since labelled primers, which were purified by HPLC, display one fluorescent molecule on each primer. Direct detection of the emitted fluorescence is linear over a much wider range than scanning of autoradiograms and easier than counting the radioactivity of gel fragments. In addition, as the polyacrylamide gel used allows a good separation of PCR

products, we can observe that Vβ specific elongation products are separated into 6–11 discrete peaks which are spaced by 3 base pairs representing all various sizes of the CDR3 region. This led us to show that Vβ transcripts are derived from an in-frame genetic rearrangement and that the size distributions are always very regular in healthy normal controls (Pannetier et al., 1993).

This method was then used to analyse the specificity of superantigens activation in vitro. It has been previously described, by using two different methods for the estimation of the modifications of Vβ expression (Choi et al., 1989; Baccalà et al., 1993), that superantigens specifically activate T cell bearing a particular Vβ chain. However, as the size of the CDR3-like regions of the β chain could not previously be studied systematically, one cannot know whether all cells bearing this particular Vβ chain or only some clones were activated. We analysed Vβ expression in T cells from healthy donors before and after proliferation in response to SEB activation and found a specific activation of T cell bearing Vβ 3, 12, 14, 15, 19 and 20. However, the electrophoretic profile, which displayed the different sizes of CDR3-like regions are quite the same before and after SEB activation for any given Vβ chain analysed. This result shows that superantigens bind and induce cell proliferation of all cells bearing a specific Vβ chain regardless of the J and D elements used during the rearrangement process. Thus, usually after SEB activation, there is no clonal expansion of a subpopulation into a particular Vβ family; however, sometimes, as shown in Fig. 5, after proliferation in response to SEB, one can observed the emergence of a particular T cell population with a given CDR3-like length which might represent an in vivo preactivated group of cells (most probably a single clone). This result shows that our method can be used as a first step in a sequencing strategy. Indeed the detection of emerging dominant rearrangement into a particular V chain will focus on important modifications, thus avoiding the somehow very hard work of sequencing a lot of different Vβ families specific products.

The simple analysis of the different sizes of the hypervariable CDR3-like region of the T cell receptor V chains allows us to identify groups (clones) of specifically activated T cells from a few cells due the PCR methodology. This can be used to follow, at the clonal level, the specific T cell response in vivo after immunisation with a protein antigen in both human or murine models (by changing specific primers). After the recognition of dominant rearrengements, determined both by the V chain used and the size of the CDR3 region, one can look at the qualitative and quantitative T cell response in the course of the immunisation in various organs (Cochet et al., 1993). This can also gives information about the importance of MHC restriction after peptides immunisation of mice with different genetic backgrounds by the simple analysis of the different T cell repertoire modifications induced by immunisation.

We have shown that superantigens induced an enhancement (or a deletion) of all possible rearrengements into a particular V family whereas modifications of only few possible rearrengements might be due to the action of a conventional antigen. It has been previously described in different pathologies the recruitment of T cell bearing particular V chains in the lesions (Wang et al., 1993; Paliard et al., 1991). The used of our technique can be used as a first step to discriminate between the pathogenic action of a superantigen or a conventional antigen. Such a discrimination can be important to understand the pathophysiological mechanism of the disease and to the delineating of therapeutic strategies.

5. Acknowledgements

The authors thanks R. Lafyatis and J. Khalife for reviewing the manuscript, Pharmacia LKB, France for providing the DNA Fragment Manager™ program, and J.P. Kusnierz for synthesizing oligonucleotides.

6. References

Abe, J., Kotzin, B.L., Jujo, K., Melish, M.E., Glode, M.P., Kohsaka, T. and Leung, D.Y.M. (1992) Selective expansion of T cells expressing T cell receptor variable regions

Vβ2 and Vβ8 in Kawasaki disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4066.

Acha-Orbea, H., Mitchell, D.J., Timmerman, L., Wraith, D.C., Tausch, G.S., Waldor, M.K., Zamvil, S.S., McDevitt, H.O. and Steinman, L. (1988) Limited heterogeneity of T cell receptor from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. Cell 54, 263.

Baccalà, R., Kono, D.H., Walker, S., Balderas, R.S. and Theofilopoulos, A.N. (1991) Genomically imposed and somatically modified human thymocyte Vβ gene repertoire. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 2908.

Baccalà, R., Vandekerckhove, B.A.E., Jones, D., Kono, D.H., Roncarolo, M.-G. and Theophilopoulos, A.N. (1993) Bacterial superantigens mediate T cell deletions in the mouse severe combined immunodeficiencyhuman liver/thymus model. J. Exp. Med. 177, 1481.

Banerjee, S., Haqqi, T.M., Luthra, H.S., Stuart, J.M. and David, C.S. (1988) Possible role of Vβ T cell receptor genes in susceptibility to collageninduced arthritis in mice. J. Exp. Med. 167, 832.

Bettinardi, A., Imberti, L., Sottini, A. and Primi, D. (1992) Analysis of amplified T cell receptor Vβ transcripts by a non-isotopicimmunoassay. J. Immunol. Methods 146, 71.

Blackman, M., Kappler, J.W. and Marrack, P. (1990) The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. Science 248, 1335.

Broeren, C.P.M., Verjans, G.M.G.M., Van Eden, W., Kursters, J.G., Lenstra, J.A. and Logtenberg, T. (1991) Conserved nucleotides sequences at the 5′ end of the T cell receptor variable genes facilitate polymerase chain reaction amplification. Eur. J. Immunol. 21, 569.

Chen, Z.W., Kou, Z.C., Shen, L., Reimann, K.A. and Letvin, N.L. (1993) Conserved T-cell receptor repertoire in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. J. Immunol. 151, 2177.

Choi, Y., Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P. and Kappler, J. (1989) Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin 'superantigens' with human T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8941.

Choi, Y., Lafferty, J.A., Clements, J.R., Todd, J.K., Gelfand, E.W., Kappler, J., Marrack, P. and Kotzin, B.L. (1990) Selective expansion of T cell expressing Vβ2 in toxic shock syndrome. J. Exp. Med. 172, 981.

Cochet, M., Pannetier, C., Regnault, A., Darche, S., Leclerc, C. and Kourilski, P. (1992) Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen. Eur. J. Immunol. 22, 2639.

Davis, M.M. (1985) Molecular genetics of the T cell receptor β chain. Annul. Rev. Immunol. 3, 537.

Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) T cell antigen receptor genes and T cell recognition. Nature 334, 395.

De Libero, G., Casorati, G., Giachino, C., Carbonara, C., Migone, N., Matzinger, P. and Lanzavecchia, A. (1991) Selection by two powerfull antigens may account for the presence of the major population of human peripheral γ/δ T cells. J. Exp. Med. 173, 1311.

Hafler, D.A., Duby, A.D., Lee, S.J., Benjamin, D., Seidman, J.G. and Weiner, H.L. (1988) Oligoclonal T Lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. J. Exp. Med. 167, 1313.

Howell, M.D., Divelin, J.P., Lundeen, K.A., Esty, A., Winters, S.T., Carlo, D.J. and Brostoff, S.W. (1991) Limited T cell receptor β chain heterogeneity among interleukine 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 10921.

Imberti, L., Sottini, A., Bettinardi, A., Puoti, M. and Primi, D. (1991) Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor Vβ sequences. Science 254, 860.

Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D.N., Choi, Y. and Marrack, P. (1989) Vβ specific stimulation of human T cells by Staphyloccocal enterotoxins. Science 244, 811.

Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L., and Shastri, N. (1986) The molecular genetics of the T cell antigen receptor and T cell antigen recognition. Annu. Rev. Immunol. 4, 529.

Laurence, J., Hodtsev, A.S. and Posnett, D.N. (1992) Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cells on TCR Vβ expression. Nature 258, 255.

Loh, E.Y., Elliott, J.F., Cwirla, S., Lanier, L.L. and Davis, M.M. (1989) Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor delta chain. Science 243, 217.

Marrack, P. and Kappler, J. (1987) The T cell receptor. Science 238, 1073.

Oksenberg, J.R., Stuart, S., Begovich, A.B., Bell, R.B., Erlich, H.A., Steinman, L. and Bernard C.C. (1990) Limited heterogeneity of rearranged T cell receptor Vα transcripts in brains of multiple sclerosis patients. Nature 345, 344.

Paliard, X., West, S.G., Lafferty, J.A., Clements, J.R., Kappler, J.W., Marrack, P. and Kotzin, B.L. (1991) Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. Science 253, 325.

Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zöller, M. and Kourilsky, P. (1993) The sizes of the CDR3-like hypervariable regions of the murine T cell receptor b chains vary as a function of the recombined germ-line segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4319.

Panzara, M.A., Gussoni, E., Steinman, L. and Oksenberg, J.R. (1992) Analysis of the T cell repertoire using the polymerase chain reaction and specific oligonucleotide primers. Biotechniques 12, 728.

Porcher, C., Malinge, M.C., Picat, C. and Granchamp, B. (1992) A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. Biotechniques 13, 106.

Rappolee, D.A. (1990) Optimizing the sensitivity of RT-PCR. Amplifications 4.

Schlissel, M.S. and Baltimore, D. (1989) Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. Cell 58, 1001.

Volume? page?

Smith, L.R., Kono, D.H. and Theofilopoulos, A.N. (1991) Complexity and sequence identification of 24 rat Vβ genes. J. Immunol. 147, 375.

Sprent, J., Gao, E.K. and Webb, S. (1990) T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance. Science 248, 1357.

Strominger, J.L. (1989) Developmental biology of T cell receptors. Science 244, 943.

Tomai, M.A., Aelion, J.A., Dockter, M.E., Majumdar, G., Spinella, D.G. and Kotb, M. (1991) T cell receptor V gene usage by human T cells stimulated with the superantigen streptococcal M protein. J. Exp. Med. 174, 285.

Toyonage, B. and Mak, T.W. (1987) Genes of the T cell antigen receptor in normal and malignant T cells. Annu. Rev. Immunol. 5, 585.

Uematsu, Y. (1991) A novel and rapid cloning method for the T cell receptor variable region sequences. Immunogenetics 34, 174.

Uematsu, Y., Wege, H., Straus, A., Ott, M., Bannwarth, W., Lanchbury, J., Panayi, G. and Steinmetz, M. (1991) The T cell receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8534.

Urban, J.L., Kumar, V., Kono, D.H., Gomez, C., Horvath, S.J., Clayton, J., Ando, D., Sercarz, E.E. and Hood, L. (1988) Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. Cell 54, 577.

Utz, U., Biddison, W.E., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., Fierlage, M. and Martin, R. Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identivcal twins correlates with multiple sclerosis. Nature 364, 243.

Waller, E.K., Kamel, O.S., Cleary, M.L., Majumdar, A.S., Schick, M.R., Lieberman, M. and Weissman, I.L. (1991) Growth of primary T cell non-Hodgkin's lymphomata in SCID-hu mice: requirement for a human lymphoid microenvironnement. Blood 78, 2650.

Wang, X.H., Ohmen, J.D., Uyemura, K., Rea, T.H., Kronenberg, M. and Modlin, R.L. (1993) Selection of T lymphocytes bearing limited T-cell receptor β chains in the response to a human pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 188.

White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R.T., Kapler, J.W. and Marrack, P. (1989) The Vβ specific superantigen staphyloccocal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. Cell 56, 27.

Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K. and Hood, L.E. (1988) Structure, organization and polymorphism of murine and human T cell α and β receptor gene families. Immunol. Rev. 101, 149.

5. CONCLUSION

La technique décrite dans l'article précédent nous a permis d'analyser la spécificité de l'activation par les superantigènes *in vitro*. On savait déjà, en utilisant deux techniques différentes (Choi et coll., 1989) et (Baccalà et coll., 1993), que les superantigènes activaient des cellules T porteuses de certaines chaînes Vβ. Cependant, comme il n'était pas possible d'étudier systématiquement la taille des différentes régions CDR3 des chaînes Vβ, il n'était pas possible de savoir si toutes les cellules porteuses de ces chaînes Vβ étaient activées ou si cette activation ne touchait que certains clones. Nous avons donc analysé l'expression des chaines Vβ de lymphocytes T issus de donneurs normaux avant et après activation par le SEB *in vitro*. Nous avons trouvé une activation spécifique des cellules porteuses des Vβs : 3, 6, 12, 14, 15, 19 et 20. L'analyse des profils électrophorétiques, qui nous donnent la taille des différentes régions CDR3, montre que ceux-ci ne sont généralement pas modifiés suite à une activation par ce superantigène. Ce résultat suggère que les superantigènes se fixent et activent toutes les cellules porteuses de chaines Vβs particulières et ceci quelques soient les éléments D et J accolés à ces chaines Vβ. Ainsi, suite à une activation par des superantigènes, on n'observe pas d'expansion clonale d'une sous-population au sein d'une même famille Vβ. Cependant, parfois il est possible d'observer l'émergence d'une sous-population qui prolifère plus fortement suite à une activation par des superantigènes. Cette sous-population représente certainement un ou plusieurs clones voisins activés préalablement *in vivo*. Ce résultat montre que notre technique peut-être utilisée comme une première étape dans une stratégie de séquence des différentes chaines du récepteur T. En effet, elle nous permet de remarquer, au sein d'une même famille Vβ les réarrangements qui sont les plus utilisés lors d'une activation ; ce qui permet d'éviter de séquencer un grand nombre de clones différents pour apprécier cette émergence.

Nous avons donc pu montrer que les superantigènes induisaient une augmentation (ou une diminution) des cellules portant tous les réarrangements possibles au sein d'une même famille Vβ alors que la modification au sein de cette même famille, de seulement quelques réarrangements serait due à des antigènes conventionnels. On a déjà pu montrer dans différentes pathologies, le recrutement de cellules T porteuses de chaines V particulières dans les lésions (Paliard et coll., 1991). L'utilisation de notre technique pour l'analyse des chaines Vβ permettrait de discriminer l'action pathogénique d'un superantigène de celle d'un antigène conventionnel. Cette distinction permettrait de mieux comprendre le mécanisme pathologique et peut-être d'élaborer des stratégies thérapeutiques.

6. BIBLIOGRAPHIE

Acha-Orbea, H., D. J. Mitchell, L. Timmerman, D. C. Wraith, G. S. Tausch, M. K. Waldor, S. S. Zamvil, H. O. McDevitt, and L. Steinman.: Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. (1988) *Cell* **54** : 263.

Baccalà, R., D. H. Kono, S. Walker, R. S. Balderas, and A. N. Theophilopoulos.: Genomically imposed and somatically modified human thymocyte Vβ gene repertoire. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 2908.

Baccalà, R., B. A. E. Vandekerckhove, D. Jones, D. H. Kono, M.-G. Roncarolo, and A. N. Theophilopoulos.: Bacterial superantigens mediate T cell deletions in the mouse severe combined immunodeficiency-human liver/thymus model. (1993) *J. Exp. Med.* **177** :

Banerjee, S., T. M. Haqqi, H. S. Luthra, J. M. Stuart, and C. S. Davis.: Possible role of Vβ T cell receptor genes in susceptibility to collagen-induced arthritis in mice. (1988) *J. Exp. Med.* **167** : 832.

Blackman, M., J. W. Kappler, and P. Marrack.: The role of T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. (1990) *Science* **248** : 1335.

Broeren, C. P. M., G. M. Verjans, W. Van Eden, J. G. Kusters, J. A. Lenstra, and T. Logtenberg.: Conserved nucleotide sequences at the 5' end of T cell receptor variable genes facilitate polymerase chain reaction amplification. (1991) *Eur. J. Immunol.* **21** : 569.

Chatila, T. and R. S. Geha.: Superantigens. (1992) *Current Opinion Immunol.* **4** : 74.

Choi, Y., B. Kotzin, L. Herron, J. Callahan, P. Marrack, and J. Kappler.: Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigen" with human T cells. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 8941.

Choi, Y., J. A. Lafferty, J. R. Clements, J. K. Todd, E. W. Gelfand, J. Kappler, P. Marrack, and B. L. Kotzin.: Selective expansion of T cell expressing Vβ2 in toxic shock syndrom. (1990) *J. Exp. Med.* **172** : 981.

Dalgleish, A. D., S. Wilson, M. Compels, C. Ludlam, B. gazzard, A. M. Coates, and J. Habesham.: T cell receptor variable gene products and early HIV-1 infection. (1992) *Lancet* **339** : 824.

Erlich, H. A., D. Gelfand, and J. J. Sninsky.: Recent advances in the polymerase chain reaction. (1991) *Science* **252** : 1643.

Hafler, D. A., A. D. Duby, S. J. Lee, D. Benjamin, J. G. Seidman, and H. L. Weiner.: Oligoclonal T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. (1988) *J. Exp. Med.* **167** : 1313.

Howell, M. D., J. P. Divelin, K. A. Lundeen, A. Esty, S. T. Winters, D. J. Carlo, and S. W. Brostoff.: Limited T cell receptor β chain heterogeneity among interleukine 2 receptor positive synovial T cells suggest a role for superantigen in rhumatoid arthritis. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 10921.

Imberti, L., A. Sottini, A. Bettinardi, M. Puoti, and D. Primi.: Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor Vβ sequences. (1991) *Science* **254** : 860.

Janeway, C.: Mls, makes a little sense. (1991a) *Nature* **349** : 459.

Janeway, C. A.: Selective elements for the Vβ region of the T cell receptor: Mls and the bacterial toxin mitogens. (1991b) *Adv. Immunol.* **50** : 1.

Kappler, J., B. Kotzin, L. Herron, E. W. Gelfand, R. D. Bigler, A. Boylston, S. Carrel, D. N. Posnett, Y. Choi, and P. Marrack.: Vβ specific stimulation of human T cells by Staphyloccocal enterotoxins. (1989) *Science* **244** : 811.

Laurence, J., A. S. Hodtsev, and D. N. Posnett.: Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cell depend on TCR Vβ expression. (1992) *Nature* **258** : 255.

Loh, E. Y., J. F. Elliot, S. Cwirla, L. L. Lanier, and M. Davis.: Polymerase chain reaction with single-sided specificity; analysis of T cell receptor delta chain. (1989) *Science* **243** : 217.

Marrack, P. and J. Kappler.: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. (1990) *Science* **248** : 705.

Nossal, G. J. V.: Negative selection of lymphocytes. (1994) *Cell* **76** : 229.

Oksenberg, J. R., S. Stuart, A. B. Begovich, R. B. Bell, H. A. Erlich, L. Steinman, and C. C. Bernard.: Limited heterogeneity of rearranged T cell receptor Vq transcripts in brains of multiple sclerosis patients. (1990) *Nature* **345** : 344.

Paliard, X., S. G. West, J. A. Lafferty, J. R. Clements, J. W. Kappler, P. Marrack, and B. L. Kotzin.: Evidence for the effects of a superantigen in rhumatoid arthritis. (1991) *Science* **253** : 325.

Posnett, D. N., S. Kabak, A. S. Hodtsev, E. A. Goldberg, and A. Asch.: T cell antigen receptor Vβ subsets are not preferentially deleted in AIDS. (1993) *AIDS* **7** : 625.

Schlissel, M. S. and D. Baltimore.: Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. (1989) *Cell* **58** : 1001.

Sprent, J., E. K. Gao, and S. Webb.: T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance. (1990) *Science* **248** : 1357.

Uematsu, Y., H. Wege, A. Straus, M. Ott, W. Bannwarth, J. Lanchbury, G. Panayi, and M. Steinmetz.: The T cell receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rhumatoid arthritis is polyclonal. (1991b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 8534.

Urban, J. L., V. Kumar, D. H. Kono, C. Gomez, S. J. Horvath, J. Clayton, D. Ando, E. E. Sercarz, and L. Hood.: Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. (1988) *Cell* **54** : 577.

Von Boehmer, H.: Positive selection of lymphocytes. (1994) *Cell* **76** : 229.

Waller, E. K., O. S. Kamel, M. L. Cleary, A. S. Majumdar, M. R. Schick, M. Lieberman, and I. L. Weissman.: Growth of primary T cell non-Hodgin's lymphomata in SCID-hu mice: requirement for a human lymphoid microenvironnement. (1991) *Blood* **78** : 2650.

White, J., A. Herman, A. M. Pullen, R. T. Kubo, J. Kappler, and P. Marrack.: The Vβ specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. (1989) *Cell* **56** : 27.

Expression d'IL-4 en Baculovirus

Ce quatrième chapitre introduit quant à lui le problème de la production de protéines *in vitro* qui de façon idéale aboutirait à l'obtention d'une protéine pure et biologiquement active, en quantité importante, avec un coût relativement modéré. L'IL-4 était un candidat prioritaire pour les différentes applications de cette cytokine dans nos programmes de recherche. Suite à la lecture d'un article paru dans le journal Cell montrant l'expression de molécule du complexe majeur d'hiscompatibilité de classe II dans le système d'expression en baculovirus, je fus convaincue que cette démarche permettait de répondre aux restrictions sur la qualité de la protéine soulevées précédemment. Une collaboration avec le Dr.Yvan De Launoit, qui travaille dans le laboratoire du Pr. D. Stéhelin, m'a permis d'obtenir le matériel de base pour la mise en place de ce système au sein du campus de l'Institut Pasteur de Lille. Après une analyse du sujet, il était clair que la difficulté essentielle résidait dans le sélection des virus recombinants. Pour simplifier cette approche, les améliorations techniques vont d'ailleurs dans ce sens et utilisent en général divers marqueurs de sélection. Le système BlueBac élaboré par la société Invitrogen m'a séduite par son ingéniosité et par son efficacité et c'est ce dernier que j'ai choisi pour la mise en place de cette technologie. La première partie de ce chapitre m'a amenée à faire une synthèse sur les différents systèmes d'expression de protéines en terminant sur les avantages et les inconvénients de chacun d'entre-eux. Ceci afin de donner des éléments de choix à tout un chacun qui désirerait s'intéresser à l'expression de protéines *in vitro*. La deuxième partie expose les résultats obtenus après l'expression de l'IL-4 en baculovirus, c'est à dire l'approche technique et l'étude des propriétés biochimiques et biologiques de l'IL-4m synthétisée en baculovirus. Ce troisième travail s'est concrétisé par un article soumis à ce jour dans European Cytokine Network.

PLAN

A. INTRODUCTION p.1

1. JUSTIFICATION DU TRAVAIL p.2
   1.1. Données actuelles du sujet
   1.2. Les études déterminent les besoins

2. L'INTERLEUKINE 4 ..... p.4
   2.1. Introduction
   2.2. Biochimie et génétique de l'IL-4 murine
   2.3. Activité biologique

3. CONCLUSION p.7

B. LES SYSTEMES D'EXPRESSION DE PROTEINES p.8

1. LES VECTEURS p.10
   1.1. Les vecteurs d'expression chez la bactérie
   1.2. Les vecteurs d'expression chez la levure
      1.2.1. Les vecteurs épisomiques
      1.2.2. Les vecteurs intégratifs
      1.2.3. Le chromosome artificiel de levure:YAC
   1.3. Les vecteurs plasmidiques d'expression dans les cellules de mammifère
      1.3.1. Les promoteurs et séquences activatrices
      1.3.2. Signaux de polyadénylation
      1.3.3. Contrôle de la réplication
      1.3.4. Contrôle de la sélection des recombinants
   1.4. Les vecteurs viraux
      1.4.1. Les poxvirus
      1.4.2. Le virus SV40
      1.4.3. Les Adénovirus
      1.4.4. Les rétrovirus
      1.4.5. Les baculovirus

2. LES SYSTEMES DE TRANSFECTION p.24
   2.1. Le phosphate de calcium
   2.2. Le DEAE dextran
   2.3. La fusion de protoplasme
   2.4. Les liposomes
      2.4.1. Les liposomes non fusogènes
      2.4.2. Les liposomes fusogènes, virosomes et pH sensibles
      2.4.3. Les liposomes cationiques
   2.5. L'electroporation
   2.6. La micro-injection
   2.7. Conclusion

3. LES CELLULES HÔTES p.28
   3.1. Les bactéries
   3.2. Les levures
   3.3. Les cellules de mammifères
   3.4. Les cellules d'insectes

4. CONCLUSION GÉNÉRALE p.33

C. CHOIX DU SYSTEME D'EXPRESSION DE L'IL-4m p.35

1. INTRODUCTION p.36

2. LA BIOLOGIE DES BACULOVIRUS p.37

3. IDENTIFICATION ET PURIFICATION DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS p.39

D. ETUDE DE LA PRODUCTION D'IL-4 MURINE DANS LE SYSTEME D'EXPRESSION DU BACULOVIRUS p.41

1. CLONAGE ET CONSTRUCTION DU PLASMIDE DE TRANSFERT p.42

2. TRANSFECTION DANS LES CELLULES D'INSECTES p.46
   - 2.1. Les cellules d'insectes
   - 2.2. Transfection des cellules d'insectes

3. SELECTION DES VIRUS RECOMBINANTS p.47
   - 3.1. Sélection par dilution limite
   - 3.2. Sélection par la technique de plaque assay
   - 3.3. Autres techniques de sélection des virus recombinants
     - 3.3.1. Hybridation d'empreintes
     - 3.3.2. Par PCR

4. PREPARATION DES STOCKS VIRAUX p.54
   - 4.1. Préparation N°1 (P1)
   - 4.1. Préparation N°2 (P2)
   - 4.3. Préparation N°3 (P3)
   - 4.4. Détermination du titre viral

5. CARACTERISATION DE LA PROTEINE p.55
   - 5.1. Caractérisation biochimique
     - 5.1.1. ELISA
     - 5.1.2. Western blot
     - 5.1.3. Marquage métabolique et immunoprécipitation
     - 5.1.4. Etude de la glycosylation
   - 5.2. Caractérisation de l'activité biologique
   - 5.3. Analyse de l'expression d'IL-4 par immunofluorescence
   - 5.4. Caractérisation structurale de la cellule d'insecte transfecté

6. ARTICLE p.64

7. CONCLUSION p.65

8. BIBLIOGRAPHIE p.66

A. INTRODUCTION

1. JUSTIFICATION DU TRAVAIL

1.1. Données actuelles du sujet

Les cytokines sont des protéines produites par les cellules effectrices lors de la réponse immunitaire ou inflammatoire. Parmi celles-ci, un groupe particulier de protéines est sécrété par les lymphocytes T, on les appelle communément les lymphokines. En 1986, Coffman et Mosmann ont proposé un modèle de dichotomie fonctionnelle des lymphocytes T helpers suivant le type de lymphokines produites (Mosmann et coll., 1986). Après activation de différents clones de lymphocytes T $CD4^+$ murins *in vitro,* ils ont noté que certains clones sécrétaient de l'IL2 et de l'IFNγ alors que d'autres sécrétaient de l'IL-4 et de l'IL5. Ils ont respectivement appelé ces cellules, Th_1 et Th_2 (T Helpers 1 et 2). Cette théorie originale s'est compliquée dès lors qu'il a fallu replacer ce système dans son environnement afin de déterminer sa réalité physiologique. Ces sous-populations helpers vont, de par leur profil de lymphokines sécrétées, induire une réponse immunitaire différente : cellulaire ou humorale (Taylor-Robinson et coll., 1993), (Mohler et coll., 1990), (Henderson et coll., 1991).

Si on résume schématiquement les données actuelles, on peut dire que:

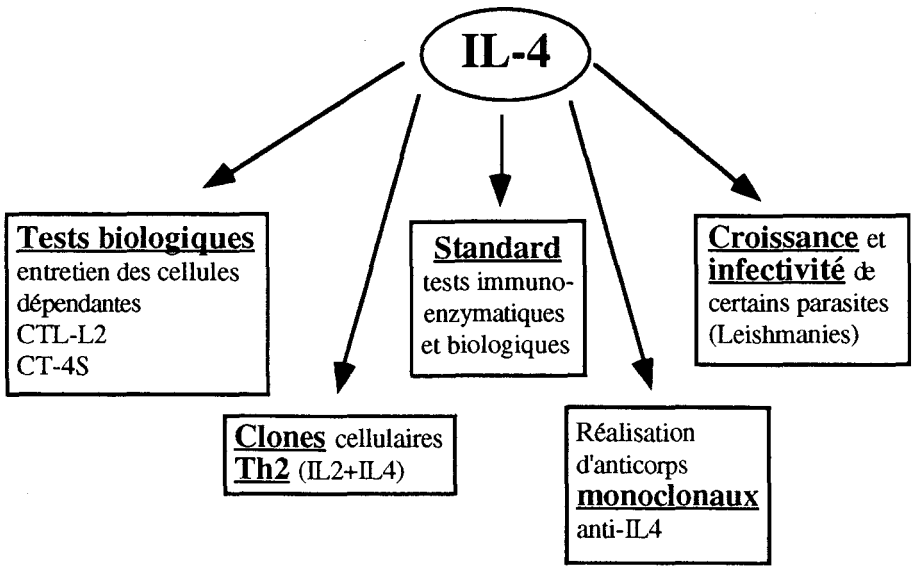
• la réponse cellulaire est médiée par la sous-population Th_1 qui induit la prolifération, la différenciation et l'activation d'autres sous-populations cellulaires (NK, LAK, CTL, macrophages...). Elle est en particulier responsable de la réaction inflammatoire.

• la réponse humorale sera orchestrée par les Th_2 qui, par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 induisent le la commutation isotypique des cellules B vers un profil IgG1 et IgE pour l'IL-4 et IgA pour l'IL-5.

On comprend dès lors l'importance de l'identification de ces sous-populations dont on restreint l'étude des profils sécrétoires à celui de l'IL-2 et de l'IFNγ pour les Th_1 et de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 pour les Th_2.

1.2. Les études déterminent les besoins

L'utilisation d'IL-4 murine se justifie à plusieurs titres dans nos programmes de recherche:



Des tests permettant de déterminer le profil de lymphokines produites par la mesure de leur activité biologique ont été développés *in vitro*.

Ces tests sont basés sur le principe de l'induction ou de l'inhibition de la prolifération cellulaire de souches spécifiques immortalisées.

Pour entretenir ces lignées cellulaires dépendantes de lymphokines, et conserver leur spécificité, il faut leur apporter les facteurs de croissance nécessaires à leur prolifération ((Hu-Li et coll., 1989)). Couramment, on peut utiliser des surnageants de cultures de cellules T activées par des mitogènes qui contiennent entre autres, le facteur de croissance recherché ; le problème est la dérive rapide de ces clones *in vitro* par émergence de populations spécifiques d'autres facteurs de croissance. Cette dérive clonale peut poser des problèmes de spécificité et de sensibilité.

La culture de ces lignées cellulaires avec un facteur de croissance recombinant purifié permet la sélection d'une population cellulaire homogène, et donc un dosage plus fiable des lymphokines.

L'entretien de la lignée CT4S strictement dépendante d'IL-4 murine nécessite à elle seule 15000F par an pour l'achat d'IL-4 recombinante.

C'est pour ces différentes raisons que nous avons choisi l'IL-4 murine pour la mise en place du système d'expression en baculovirus au sein de notre laboratoire.

2. L'INTERLEUKINE 4

2.1. Introduction

L'interleukine 4 (IL-4) fut décrite pour la première fois en 1982 par William E. Paul et collaborateurs dans les surnageants d'un thymome murin appelé EL4 (Paul et coll., 1987). Le surnageant de ces cellules était capable d'entretenir des cultures de lymphocytes B activés par des immunoglobulines. Plus précisément ce facteur permettait d'induire le passage en phase S des cellules B stimulées par des IgM. Pour cette raison, elle fut tout d'abord appelée BCGF (B Cell Growth Factor).

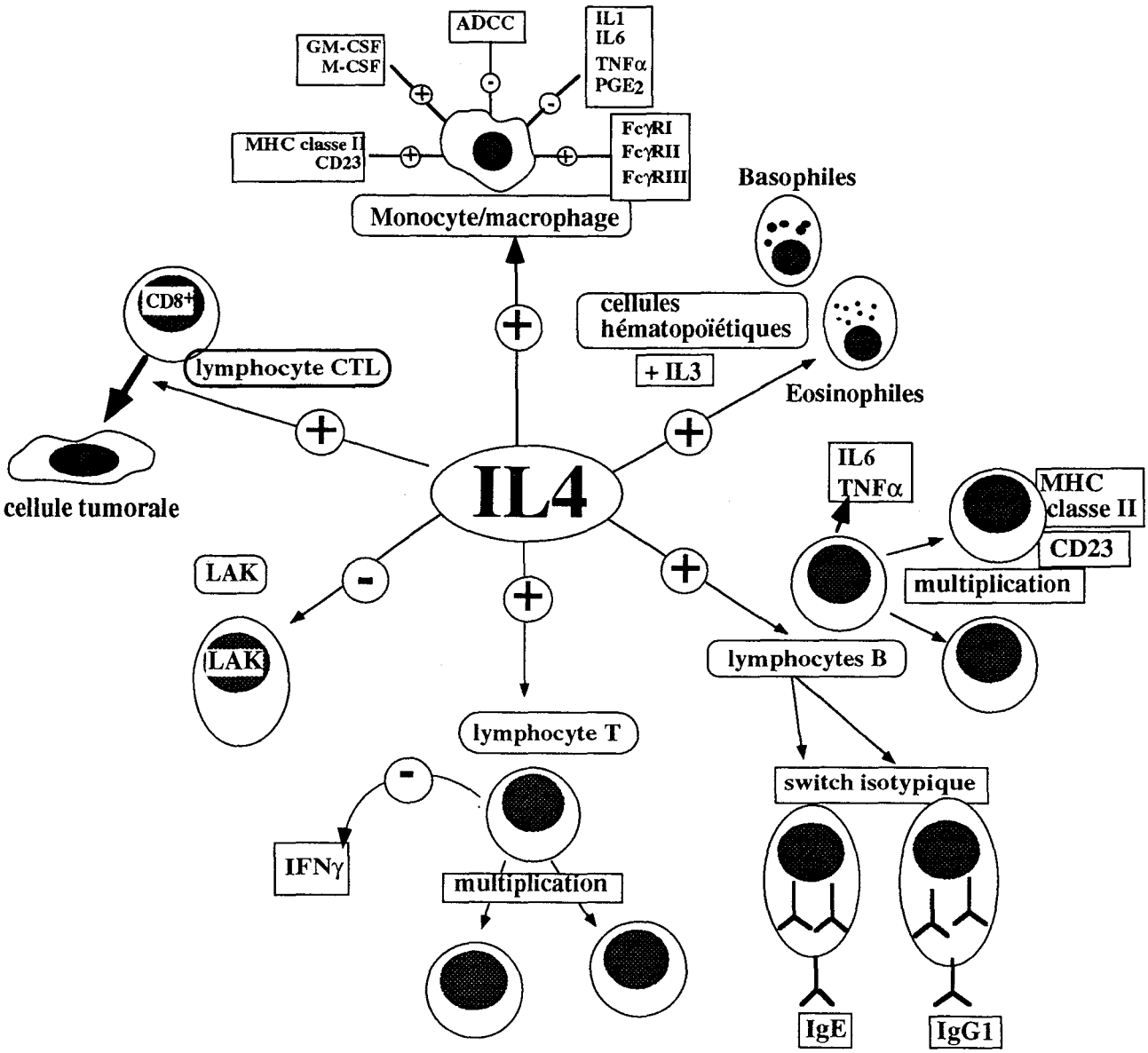
2.2. Biochimie et génétique de l'IL-4 murine

C'est une glycoprotéine dont le gène de 6,5 kb est localisé sur le chromosome 11 (Nona et coll., 1986). La protéine précurseur est constituée de 140 acides aminés dont les 20 premiers constituent le peptide signal hydrophobe de la protéine. La protéine excrétée possède donc 120 acides aminés avec un poids moléculaire de 15 kDa pour la molécule non glycosylée. Il y a 3 sites de N glycosylation (Asn/X/Thr ou Ser) qui lui donne une poids moléculaire apparent sur SDS-PAGE de 18 à 20 kDa. Cependant, l'activité biologique de la molécule est conservée après déglycosylation. Par contre la protéine réduite n'est plus du tout active ce qui montre l'importance fonctionnelle des ponts disulfures (Banchereau, 1993; Paul et coll., 1987)

2.3. Activité biologique

L'IL-4 joue un rôle central dans le contrôle et la régulation des systèmes immunitaires et inflammatoires. Plus spécifiquement, ces principales activités fonctionnelles sont (Banchereau, 1993; Paul et coll., 1987) :

- l'induction de la différentiation des thymocytes $CD4^+8^+$en thymocytes $CD4^+8^-$ ou $CD4^-8^+$.
- avec l'IL3, l'induction de la différentiation des granulocytes, des éosinophiles et des basophiles.
- l'activation des lymphocytes B et T.
- l'induction de l'activité cytotoxique antitumorale des cellules $CD8^+$.
- l'inhibition des cellules LAK
- l'induction de l'expression des molécules de classe II du CMH sur les lymphocytes B (CPA).
- l'induction de l'expression du CD23 (récepteur de faible affinité pour les IgE).
- l'inhibition de l'expression des FcγRI, II et III et donc l'inhibition de l'ADCC des macrophages.
- la diminution de la sécrétion par les macrophages d'IL1, IL6, TNFα, et de PGE2 et l'augmentation de la sécrétion de G-CSF et de M-CSF.
- la génération et la maintenance d'une réponse IgE et IgG1 par switch isotypique in vivo



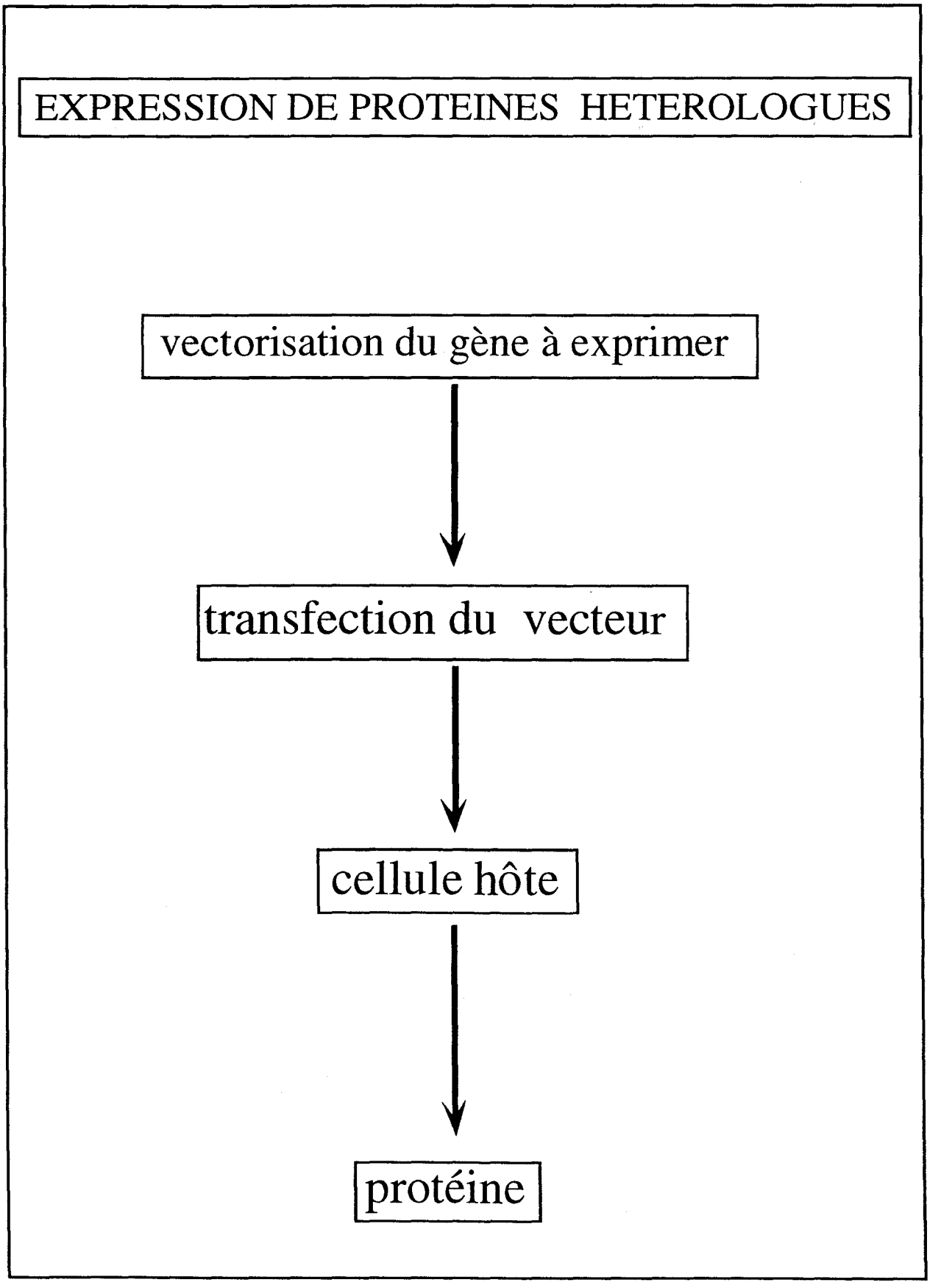
Activités biologiques de l'IL4 (d'après J. Banchereau)

3. CONCLUSION

L'IL-4, comme d'autres facteurs de croissance est nécessaire à l'élaboration de nombreuses techniques de cultures cellulaires et d'analyses de la régulation du système immunitaire.

C'est pourquoi nous avons mis au point un système d'expression simple, ubiquitaire, pas trop onéreux et qui permet d'obtenir facilement une protéine fonctionnelle. Dans un deuxième temps, on pouvait envisager l'expression d'autres molécules comme les chaînes du complexe majeur d'histocompatibilité (Stern et coll., 1993) , les chaînes des immunoglobulines ou plus généralement toute molécule dont l'étude nécessite qu'elle soit pure, biologiquement active et produite en grande quantité (Alcover et coll., 1993).

B. LES SYSTEMES D'EXPRESSION DE PROTEINES


EXPRESSION DE PROTEINES HETEROLOGUES
vectorisation du gène à exprimer
transfection du vecteur
cellule hôte
protéine

L'expression de protéines hétérologues fait suite à l'introduction d'un matériel génétique au sein d'une cellule hôte; il est constitué du gène d'intérêt intégré au sein d'un gène de transport et de complémentation du matériel cellulaire endogène pour une expression optimale. On appelle vecteur, le gène navette qui permet d'introduire le matériel hétérologue dans la cellule et qui a la faculté d'intégrer toutes les données de la cellule hôte pour une optimimisation des fonctions qui lui sont attribuées, dans ce cas précis, il s'agit de la synthèse protéique hétérologue.

On peut regrouper les utilisations de cette technologie sous deux axes principaux; l'étude de la fonction d'une protéine et la production d'une protéine à petite ou grande échelle. En terme de thérapie génique, de nombreuses molécules sont nées de cette technologie: ce sont essentiellement les médicaments, (Facteur VIII, Insuline etc...) et les vaccins. Elle permet en outre d'éviter la purification de protéines à partir de tissu animal, le risque de contamination étant évident.

Le chapitre suivant concerne la description des différents systèmes d'expression procaryotes et eucaryotes utilisés dans l'étude et la production de protéines étrangères par l'introduction de **vecteurs** comportant le matériel génétique hétérologue dans **la cellule hôte** .

1. LES VECTEURS:

Le gène d'intérêt, une fois isolé, sera cloné sous forme d'ADN complémentaire dans un vecteur de clonage (quelquefois sous forme génomique pour les transferts *in vivo*); on utilise généralement des plasmides qui sont des molécules d'ADN circulaire fermées, extra-chromosomiques ou épisomiques, c'est à dire à réplication indépendante du génome de la cellule hôte. Ils ont été isolés chez la bactérie qui est leur hôte naturel, et ont depuis, subi de nombreuses manipulations afin d'être utilisés comme vecteurs pour la purification et l'expression de nombreux gènes.

Le vecteur idéal serait stable, non toxique, facilement manipulable, sa purification serait aisée, il possèderait un ou plusieurs marqueurs de sélection, un site de clonage multiple, et une réplication intracellulaire élevée pour augmenter les chances d'expression; il permettrait le clonage de grands fragments d'ADN, possèderait un ou plusieurs promoteurs forts et régulables, permettrait la sécrétion du produit, et serait capable de se multiplier dans différents hôtes.

1.1. Les vecteurs d'expression chez la bactérie:

Ils sont constitués à la base d'un plasmide bactérien à reproduction rapide, auquel on ajoute un gène de résistance à un antibiotique et/ou un marqueur de sélection des recombinants. Les plus utilisés sont les gènes β lactamase (qui confèrent une résistance à l'ampicilline) et les gènes Lac (β galactosidase) et trp (operon tryptophane) qui permettent la sélection des recombinants. Des séquences qui améliorent le rendement de production peuvent également être ajoutées mais la nature précise de ces séquences est tenue secrète par chaque fabricant.

Par ailleurs, le choix est difficile entre un plasmide à grand ou faible nombre de copies. En effet, un plasmide à grand nombre de copies contrairement à un plasmide à faible nombre de copies permettra d'obtenir facilement les quantités d'ADN nécessaires au clonage et au séquençage; par contre, la surproduction de protéines entraîne la formation de corps d'inclusion, difficiles à dissocier. Pour maîtriser cette surproduction, le gène d'intérêt doit être sous le contrôle d'un élément permettant une induction à niveau variable.

Exemple de l'opéron lactose.

En l'absence d'inducteur des gènes permettant d'hydroliser le lactose, le represseur est normalement codé et se fixe sur l'opérateur; la β galactosidase n'est donc pas exprimée. En présence d'inducteur (IPTG), celui-ci se fixe sur le répresseur qui ne peut alors plus se fixer sur l'opérateut permettant ainsi à la β galactosidase d'être exprimée.

Si on place le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur de l'opéron lactose de façon à ce que l'expression de son répresseur *lacI* soit concomittante à celle du gène d'intérêt, il n'y a pas d'expression de la protéine d'intérêt. La modulation du taux d'expression de la protéine recombinante sera contrôlée par l'addition au milieu de culture de l'inducteur de l'operon lactose : l'IPTG qui inhibe de façon dose dépendante l'action du répresseur.

Un système d'expression très performant utilise la polymérase du bactériophage T7 pour transcrire le gène recombinant, sous le contrôle d'un promoteur T7, avec une vitesse d'élongation cinq fois supérieure à celle de la RNA polymérase d'E. coli (Studier et coll., 1986).

1.2. Les vecteurs d'expression chez la levure:

Il existe trois types de vecteurs (Fleer, 1992) :

1.2.1. Les vecteurs épisomiques

Ce sont des réplicons extra chromosomiques. Ce type de vecteur est assez stable, possède une bonne efficacité de transformation et un nombre de copies élevé (50 à 100 par cellule).

Les vecteurs les plus couramment utilisés sont dérivés du plasmide de levure 2µ, ils définissent la catégorie des yeast episomal plasmid (YEp).

Ils contiennent une origine de réplication, une recombinase site spécifique responsable du nombre de copies, des protéines de partition nécessaires à une bonne ségrégation du vecteur, et également des séquences plasmidiques bactériennes.

1.2.2. Les vecteurs intégratifs

Ils s'incorporent de façon stable dans le génome de la levure par recombinaison homologue. Ce sont les vecteurs YIp (yeast integrating plasmid)

Ils ne possèdent pas de réplicon de levure, la réplication ne pouvant s'effectuer que par recombinaison avec un chromosome de l'hôte.

L'avantage de ce type de vecteur est qu'il donne des transfectants assez stables

Son application reste néanmoins celle de l'étude de la génétique de la levure.

1.2.3. Le chromosome artificiel de levure YAC

C'est un vecteur linéaire possédant toutes les caractéristiques d'un chromosome avec une origine de réplication, un centromère, des marqueurs de sélection pour les bras droits et gauche du chromosome localisés de part et d'autre du centromère, des télomères du protozoaire *Tetrahymena* qui protègent les extrémités double brin de la dégradation par des exonucléases, et enfin un site de clonage.

Ce système permet de cloner de très grands fragments d'ADN : jusqu'à 700 kilobases. Il est en particulier employé par les chercheurs du programme du séquençage du génome humain.

1.3. Les vecteurs plasmidiques d'expression dans les cellules de mammifères:

Les vecteurs eucaryotes s'utilisent en première approche des études de régulation ou de l'expression d'un gène eucaryote dans un système homologue. Il s'agira de l'étude de promoteurs ou de séquences activatrices de gènes eucaryotes en amont d'un gène rapporteur (luciférine, CAT etc...), ou de l'étude de la fonction de la protéine. De nombreux vecteurs sont commercialisés, chacun d'eux étant adapté à une de ces utilisations.

Il existe chez les eucaryotes supérieurs, deux formes d'expression différentes: l'expression transitoire et l'expression stable.

L'expression transitoire n'est pas utilisée pour la production proprement dite mais pour étudier la fonction d'une protéine, analyser un promoteur ou cribler les ADN complémentaires d'une banque dans *E Coli* .

L'expression stable est obtenue dans deux cas : lorsque l'élément épisomique introduit à la capacité de se répliquer ou quand il y a intégration dans le génome

•Le développement épisomique peut être obtenu en utilisant des vecteurs dérivés de virus: SV40, polyome, adénovirus, EBV ...

•l'intégration dans le génome est un événement rare lorsque l'on utilise un vecteur classique mais par contre en utilisant des vecteurs rétroviraux, l'intégration est systématique, stable et très fréquente.

Le plus simple des vecteurs eucaryotes contiendra au minimum un promoteur afin de diriger la transcription du gène d'intérêt, et des séquences permettant une polyadénylation du transcrit. D'autres éléments peuvent être ajoutés comme des séquences activatrices ou des introns contenant un site de splicing. Il pourra également contenir des séquences de réplication bactérienne, des gènes dont l'expresion permettra la sélection des cellules transfectées; ces différents gènes sont détaillés ci-dessous:

1.3.1. Les promoteurs et séquences activatrices:

Contrairement aux signaux requis pour la maturation des ARNs, qui fonctionnent dans toutes les cellules, les éléments qui contrôlent la transcription varient considérablement d'une cellule à l'autre.Les promoteurs et séquences activatrices de la transcription sont de courtes séquences d'ADN qui interagissent avec des protéines cellulaires impliquées dans la transcription. La combinaison de ces différents éléments avec les différents facteurs de transcription spécifiques déterminent l'efficacité avec laquelle un gène donné est transcrit dans une cellule donnée.

Les promoteurs :

Les promoteurs eucaryotes contiennent deux types de séquences de reconnaissance

la TATA box

des séquences promotrices plus en amont :

La TATA box est située 25 à 30 paires de bases en amont du site de transcription et sert à diriger la RNA polymérase de type II au site correct de la transcription.

Les séquences promotrices en amont de la TATA box vont servir à contrôler la transcription.

Les séquences activatrices

Les séquences activatrices peuvent augmenter le taux de transcription d'un facteur 1000. Elles sont spécifiques de tissu ou des cellules et peuvent dans certains cas être inductibles par des protéines comme certaines hormones, ou certains ions metal (promoteur de la métallothionéine). Du fait de cette spécificité, le choix de ces séquences activatrices permettra de cibler l'expression dans le type de cellule où doit être exprimé le gène d'intérêt.

Pour obtenir des vecteurs à expression plus ubiquitaire, on utilise des séquences activatrices de virus qui possèdent un spectre d'activité beaucoup plus large.

Par exemple, la séquence activatrice du gène précoce de SV40 est active dans un nombre assez important de cellules de mammifères; des combinaisons séquences activatrices-promoteurs qui sont également très actives sont celles dérivées du LTR (Long Terminal Repeat) du génome du Rous sarcoma virus et du cytomégalovirus humain.

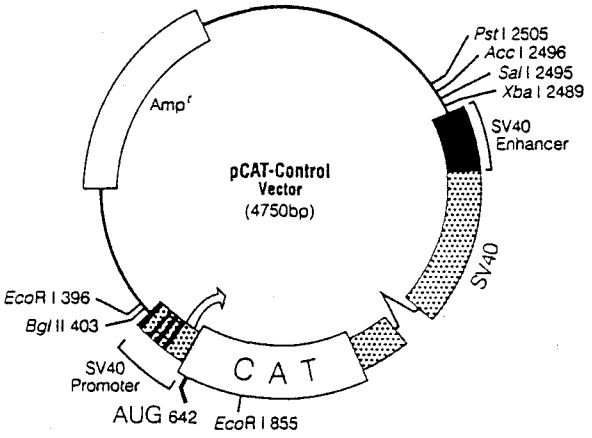
1.3.2. Signaux de polyadénylation:

Deux séquences nucléotidiques sont indispensables pour assurer une bonne polyadénylation: des séquences riches en GU ou U situées en aval du site de polyadénylation et une séquence de six nucléotides située 11 à 30 nucléotides en amont du site de polyadénylation; ces séquences sont aussi nécessaires mais pas suffisantes pour assurer un clivage post-transcriptionnel correct.

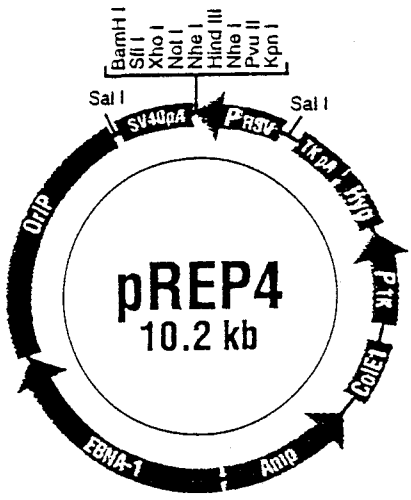
Des séquences riches en AU dans la partie 3' non codante du gène du GMCSF ont été décrites comme étant déstabilisantes pour la molécule d'ARN nouvellement synthétisée (Shaw et Kamen 1986). Il est donc préférable dans ce cas, de ne pas inclure les séquences en 3' du codon de terminaison du gène à cloner.

1.3.3. Contrôle de la réplication

Le contrôle de la réplication plasmidique est nécessaire dans le cas de vecteurs à réplication épisomique de façon à limiter le nombre de copies (un nombre de copies trop élevé est cytolytique), ce qui permet d'obtenir une lignée stable. Le contrôle se fera par le choix approprié du vecteur. La réplication est sous la dépendance de facteurs *trans*, codés à partir des séquences d'origine virale du plasmide ou constitutivement par la cellule hôte. Les réplicons du virus SV40 ou des papillomavirus donnent un nombre important de copies du vecteur, mais après 10000 copies par cellule synthétisant l'antigène T nécessaire à sa réplication, celle-ci est lysée. Ces systèmes sont utilisés pour des transfections provisoires; pour des réplications épisomales plus faibles, on utilise par exemple, les réplicons des papilloma virus ou du virus d'Epstein Barr qui donnent un nombre relativement faible de copies ; environ 100 par cellule et qui peuvent donc permettre des transfections stables.



Vecteur pour l'étude des promoteurs
et séquences activatrices eucaryotes
Gène de la chloramphénicol Acetyltransferase
sous le contrôle du promoteur SV40
Commercialisé par Promega



Vecteur à réplication épisomique
avec origine EBV, gène de sélection par
l'hygromycin
Commercialisé par Invitrogen

Exemples de plasmides couramment utilisés pour la transfection de cellules eucaryotes .

1.3.4. Contrôle de la sélection des recombinants:

La sélection des transfectants stables peut s'effectuer de deux façons différentes :

•soit en faisant co-exprimer au gène d'intérêt, un gène de résistance à une drogue

•ou un gène qui donne un avantage sélectif à la cellule transfectée par complémentation d'un facteur nécessaire à la croissance cellulaire, défectif dans les cellules non transfectées.

Marqueur de sélection	Action	Sélection
-gène de la Thymidine kinase du virus de l'herpes simplex HSV*tk*	-Sensibilité à des drogues anti-virales comme le ganciclovir	-ganciclovir (utilisé pour éliminer les recombinaisons aléatoires lors des recombinaisons homologues)
-gène de la Dihydrofolate réductase *dhfr*	-permet une double sélection: -la Dihydrofolate réductase (DHFR) permet la synthèse de tétrahydrofolate indispensable à la synthèse des bases -l'addition de methotrexate inhibe la DHFR. Un nombre élevé de copies de plasmides permettra une synthèse importante de DHFR qui pourra alors inhiber le methotrexate; c'est une manière élégante de sélectionner les recombinants à copies élevées de plasmides	-milieu défectif en purines et pyrimidines dans des cellules défectives en DHFR -Methotrexate; inhibiteur de la synthèse des purines
-gène de l' hygromycin B phosphotransférase: *hyg*	-confère à la cellule une résistance à l'hygromycin B	-Milieu + hygromycin
-gène de la Xanthine-guanidine phosphoribosyl-transférase: *gpt*	-permet la synthèse de xanthine-guanine phosphoribosyl-transférase qui permet de convertir la xanthine en XMP précurseur du GMP	-Milieu contenant de l'hypoxanthine, de la xanthine, et de l'acide mycophénolique qui inhibe la synthèse de purines
-gène de l'Aminoglycosyl-phosphotransférase	-phosphoryle le G418 qui est cytotoxique	-G418
-gène de l'Asparagine synthétase	-permet la synthèse d'asparagine à partir d'acide aspartique et de glutamine	-Albiziin (analogue de la glutamine) en l'absence d'asparagine dans des cellules Asparagine Synthétase$^-$
-gène de l'Hypoxanthine Phosphorybosyl Transferase *hprt*	-Enzyme de secours pour la synthèse de purines après blocage par l'aminopterin	-Milieu HAT : Hypoxanthine, Aminoptérin, Thymidine en présence de cellules HPRT$^-$

1.4. Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux permettent dans un deuxième temps d'utiliser la machinerie virale pour une meilleure efficacité de transfection mais aussi pour une infection *in vivo* permettant ainsi l'expression de la protéine d'intérêt en thérapie génique ou dans le cadre d'une vaccination. Les principaux virus utilisés sont les poxvirus, le SV40, les adénovirus, les rétrovirus et les baculovirus (pour les cellules d'insectes). Le but est d'obtenir des particules virales recombinantes et infectantes. Dans le cas des poxvirus et des baculovirus, le principe repose sur une recombinaison homologue entre le plasmide de transfert et le virus sauvage. Dans le cas des adénovirus et des rétrovirus, on construit un vecteur défectif pour des protéines essentielles à leur réplication qui contiendra le gène d'intérêt et qui sera complété en *trans* dans une cellule d'encapsidation. Les vecteurs viraux sont donc constitués en partie d'ADN bactérien pour une production élevée de plasmides dans la bactérie, cette étape étant nécessaire à la purification du vecteur pour la transfection, et sont également constitués d'ADN viral pour les raisons décrites plus haut.

1.4.1. Les poxvirus

Description

Le virus de la vaccine isolé chez les vaches est à l'origine du vaccin contre la variole chez l'homme. On utilise maintenant le virus de la vaccine en tant que vecteur dans une stratégie vaccinale mais plus rarement pour produire des protéines *in vitro* (Miner et coll., 1990). Ce sont des virus à ADN double brin à réplication intra-cytoplasmique, de 150 à 300 kb infectant de façon spécifique une grande variété de vertébrés et d'invertébrés.

Utilisation

L'expression de protéines vaccinantes par la vaccine induit une forte réponse humorale et cellulaire suivie d'une protection contre le pathogène. C'est un vecteur très résistant, peu coûteux et qui s'utilise en vaccination par scarification. Il représente donc un système de choix pour l'utilisation dans le tiers monde. Les problèmes liés à l'utilisation de la vaccine sont tout d'abord dus aux différences de protection obtenues entre individus et entre espèces, mais aussi aux complications post-vaccinales (atteintes neurologiques). La recherche s'oriente actuellement vers l'atténuation de ce modèle et a permis par exemple d'obtenir des souches atténuées du type *Copenhagen.* Le principe de la construction d'un vecteur poxviral est simple. Environ 25% du génome n'est pas essentiel pour maintenir le virus en culture. Ces gènes non vitaux peuvent être remplacés par un gène étranger sous le contrôle d'un promoteur de Poxvirus, promoteur contrôlant l'expression de protéines précoces (transcription/traduction) si on veut un meilleur pouvoir antigénique ou la génération de cellules $CD8^+$ CTL ; ou promoteur tardif (protéine de structure) si on préfère une production importante de protéines. On peut insérer jusqu'à 75 kb de gènes étrangers. L'obtention de virus recombinants se fait par recombinaison homologue entre un virus sauvage et le vecteur recombinant.

1.4.2. Le virus SV40

Description

C'est un petit virus oncogène du singe (Simian Virus 40) à ADN circulaire double brin de 5 kb. Il appartient à la famille des papovavirus et possède un fort pouvoir transformant chez son hôte, le singe rhésus. Ce pouvoir transformant résulte de l'action des protéines grand T. Cette dernière se comporte comme un facteur transactivateur et participe au déclenchement de la réplication du génome viral et de l'ADN cellulaire.

Utilisation

Les vecteurs dérivés de ce système ont un nombre de copies très élevé. Un système d'amplification non lytique a été mis au point dans les cellules CV-1 (lignée cellulaire de rein de singe) transformée de façon stable par un virus SV40 dont l'origine de réplication est défective (cellules cos : CV-1, Origin defective, SV40). Elle permettent l'expression de toute molécule possédant un promoteur de SV40 grâce à la protéine T qui est une séquence transactivatrice. C'est un modèle essentiellement utilisé pour l'expression transitoire de protéines. Il infecte également les cellules embryonnaires de rongeurs et les cellules fibroblastiques de souris 3T3.

Cependant, on utilise rarement le virus SV40 en entier; mais plus souvent les régions promotrices, les sites d'initiation de transcription, les signaux de polyadénylation, l'origine de réplication et les sites de fixation de grand T pour la construction de vecteurs d'expression dans les cellules de mammifères (McKnight et coll., 1986).

1.4.3. Les Adénovirus

Description

Ce sont des virus à ADN double brin linéaire de 36 kb qui infectent les cellules de mammifères. Comme le SV40, ils possèdent des gènes d'expression précoce et des gènes d'expression tardive. L'un des gènes les plus importants est le gène précoce E1a. C'est une protéine transactivatrice (un équivalent de la protéine grand T de SV40) qui possède également un pouvoir immortalisant. La protéine E1b possède elle, un pouvoir transformant sur des cellules déjà immortalisées (Graham, 1990).

Les Adénovirus pénètrent dans la cellule grâce à une protéine de capside qui se fixe sur des récepteurs cellulaires présents sur la quasi totalité des cellules. Ils infectent donc de nombreux types cellulaires qui ne se divisent pas ou peu avec un tropisme préférentiel dans les cellules hépatiques et les cellules du cerveau.

Utilisation

On les utilise *in vitro* pour transformer des tissus comme l'épithélium pulmonaire, le muscle squelettique et le muscle cardiaque. Les vecteurs adénoviraux sont des virus défectifs pour la réplication par délétion de la région E1. Ils permettent, de part leur organisation linéaire, la substitution de 10 kb d'ADN viral par des séquences étrangères. On insère le gène voulu dans la région E1 qui possède des promoteurs forts. Pour la réplication on travaille dans des cellules 293 qui possèdent la région E1 intégrée dans leur génome. L'adénovirus est utilisé principalement en thérapie génique (Rosenfeld, 1992),(Rosenfeld, 1991).

1.4.4. Les rétrovirus

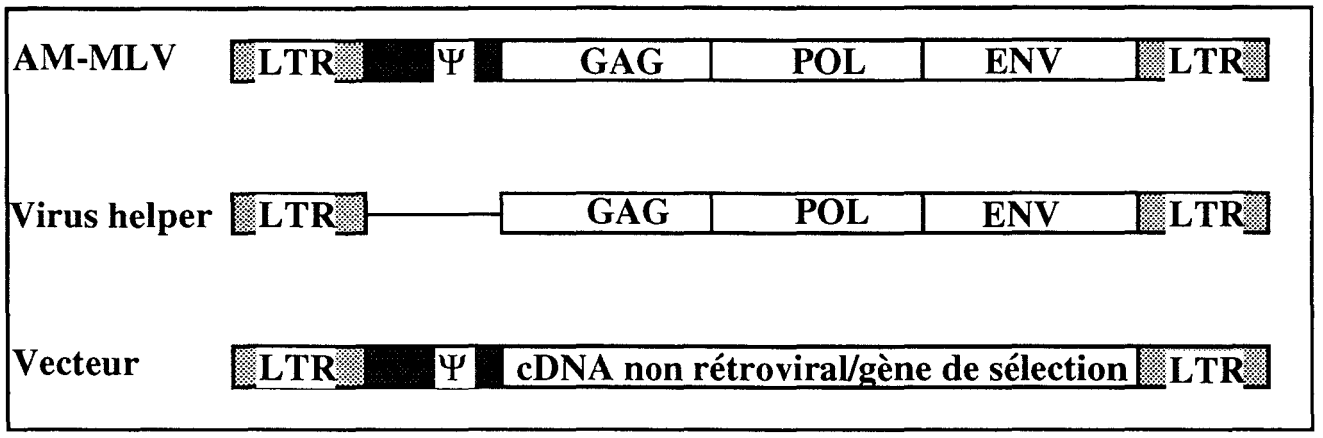
Description

Ce sont des virus enveloppés, infectant les vertébrés, dont l'information génétique est portée par une molécule d'ARN simple brin de 7 à 8 kb. Après transcription inverse, l'ADN néoformé s'intègre dans le génome. On utilise ces vecteurs pour introduire un gène étranger dans des cellules difficilement transfectables ou lorsque l'on désire une transfection stable à 100% (Naviaux et coll., 1992). On les utilise aussi beaucoup en thérapie génique. Afin d'éviter la recombinaison homologue avec un rétrovirus endogène chez l'homme, les vecteurs rétroviraux sont fabriqués à partir de virus murins.

Utilisation

Les virions n'ayant qu'une capacité de 8 kb, les gènes étrangers sont introduits à la place des gènes *gag*, *pol* et *env* qui codent respectivement pour les protéines de capside, pour la reverse transcriptase et pour les protéines d'enveloppe. Les vecteurs rétroviraux sont donc des virus défectifs sous forme d'un plasmide portant un gène de sélection, la séquence cis-régulatrice LTR, le signal d'encapsidation (Ψ) et le signal de réplication. Pour former des particules virales il doit être complémenté en *trans* par un virus helper dépourvu de séquence Ψ d'encapsidation, mais qui lui fournit les gènes *gag*, *pol* et *env* nécessaires à la formation des capsides. La forme provirale du virus helper est en général intégrée dans le génome d'une lignée cellulaire ou lignée d'empaquetage qui apporte au vecteur les fonctions qui lui font défaut. Le vecteur rétroviral est incapable de se multiplier en dehors des lignées d'empaquetage. Il s'intègre dans le génome cellulaire cible sans pouvoir s'y multiplier.

Néanmoins, il convient de conserver à l'esprit que leur utilisation est potentiellement dangereuse. Il est impératif de les manipuler dans des laboratoires spécifiques en respectant les règles de sécurité. Les inconvénients de ce système sont que l'intégration des rétrovirus nécessite un cycle de réplication de la cellule hôte. La seconde limite est la taille du gène transporté qui ne peut dépasser 6 kb (Gilboa et coll., 1986).



Création d'un vecteur rétroviral à caractère amphotrope : à partir du vitus écotrope (qui n'infecte que la souris) de Moloney (MoMLV) on remplace les gènes env et pol par les mêmes gènes issus d'un virus amphotrope (4070A) (qui infecte tous types de cellules). Le virus obtenu est appelé AM-MLV. Puis, on délète la région Ψ pour obtenir le virus helper qui servira à infecter la lignée d'encapsidation. Le vecteur contiendra quant à lui la région Ψ et les LTR qui servent à l'expression des protéines et à l'intégration dans le génome. Les régions GAG, POL, et ENV sont délétées et remplacées par l'ADNc codant pour le géne d'intérêt accompagné d'un gène de sélection.

1.4.5. Les baculovirus

Description

Ce sont des virus à ADN bicaténaire circulaire de grande taille et qui, en fin de cycle de multiplication sont inclus dans une matrice protéique caractéristique : les polyhèdres. Ils sont capables d'infecter une trentaine d'espèces d'insectes et certains crustacés (Devauchelle et coll., 1993).

Utilisation

On utilise ces virus pour produire des protéines en grande quantité dans des cellules d'insectes *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans certaines chenilles. La construction des virus recombinants s'effectue comme pour le virus de la vaccine par recombinaison homologue entre un plasmide de transfert (contenant le transgène) et le virus sauvage. La recombinaison homologue s'effectue par délétion d'une partie du gène de la polyhédrine, la protéine responsable de la formation des polyhèdres. Cette protéine n'est pas nécessaire à la réplication virale. Cette délétion permet d'utiliser les promoteurs forts de cette protéine et de sélectionner les virus recombinants par l'absence de ces polyhèdres caractéristiques. Ces systèmes sont de plus en plus utilisés pour la production de protéines en grande quantité. De plus les cellules d'insectes sont capables d'assurer les modifications post-traductionnelles caractéristiques des cellules d'eucaryotes. Seule la glycosylation est un peu différente. Nous reviendrons plus loin sur l'utilisation de ce modèle.

Ce tableau résume les différents vecteurs viraux communément utilisés:

Principaux vecteurs viraux				
Vecteur	**Hôte**	**Avantages**	**Inconvénients**	**Exemples d'utilisation**
Poxvirus (Vaccine)	-Nombreux vertébrés et invertébrés	-Vecteur résistant et peu coûteux pour la vaccination -Insertion de grands fragments d'ADN (75 kb)	-Problème de virulence résiduelle -Tue la cellule hôte *in vitro*	-Vaccination (variole, rage) -synthèse proteique (récepteur aux glucocorticoïdes et NGF)
SV40	-Macaque rhésus : cellules COS -cellules de souris 3T3 -cellules embryonnaires de rongeurs	-Système facile de production d'une protéine dans certaines cellules de mammifères	-Lyse des cellules infectées	-Expression transitoire de protéines
Adénovirus	-Cellules de mammifères (spécificité d'hôte)	-Infecte des cellules en phase de repos -Expression élevée et stable	-Risque de recombinaison homologue -Ne s'intègre pas dans le génome -Spécificité cellulaire (lymphocytes)	-Thérapie génique
Rétrovirus	-Nombreuses cellules de vertébrés	-Transfection facile et stable dans le génome -Large spectre d'hôte selon la lignée d'encapsidation	-Taille de l'insert <6 kb -Nécessité de réplication de la cellule	-Thérapie génique -Souris transgéniques -Transfection dans des lymphocytes normaux
Baculovirus	-insecte	-Taux d'expression élevé -non pathogène pour les mammifères -Modification post traductionnelles convenables	-Système lytique	-Production de protéines en grande quantité (RMN) -biopesticides

2. LES SYSTÈMES DE TRANSFECTION

Bien que certains travaux aient montré que de l'ADN exogène était capable de s'associer aux cellules de mammifères, la pénétration intracellulaire d'acides nucléiques de haute masse moléculaire et chargés négativement est un phénomène rare et qui ne conduit généralement pas à la transfection de la cellule (Bhargava 1971). L'ADN doit donc être associé à un transporteur dont les propriétés physico-chimiques lui permettront d'être véhiculé dans la cellule. Ce vecteur d'ADN doit s'associer aux cellules, pénétrer la membrane plasmique, échapper à la dégradation lysosomale et finalement permettre au gène d'être transcrit.

Le transfert de gènes est un des points faibles du génie génétique. Les rendements de transfection sont très variables d'un type cellulaire à l'autre et il a donc fallu développer de nombreuses techniques pour contrer ces inconvénients : coprécipitation de l'ADN par le phosphate de calcium, traitement des cellules par le DEAE dextran, électroporation, micro-injection dans le noyau, fusion de protoplasmes ou liposomes.

2.1. Le phosphate de calcium

Cette technique (Sambrook et coll., 1989), avec le DEAE dextran a très longtemps été utilisée. Le mécanisme par lequel l'ADN pénètre dans la cellule n'est pas bien compris. On pense qu'il s'agit d'une endocytose des précipités formés par les molécules d'ADN et le phosphate de calcium. C'est une technique qui sur certaines lignées cellulaires adhérentes présente une grande efficacité, jusqu'à 20% de transfection des cellules.

2.2. Le DEAE dextran

Le DEAE dextran a d'abord été utilisé comme facilitateur de l'infection virale. Là encore le mécanisme d'action est mal connu (Sambrook et coll., 1989). Le polymère pourrait agir soit en se fixant sur l'ADN empêchant ainsi sa dégradation par les nucléases et/ou se fixerait sur la membrane cellulaire et augmenterait l'endocytose de l'ADN. Cette technique présente certaines limitations. Elle est principalement utilisée pour des transfections transitoires, étant donné la cytotoxicité du polymère. Enfin elle ne fonctionne parfaitement que sur certains types cellulaires comme les cellules CV-1 et COS. Son avantage est qu'elle ne nécessite que très peu de molécules d'ADN environ 100 à 200 ng d'ADN pour 10^5 cellules de singe.

2.3. L'électroporation

Lorsqu'une cellule est exposée à l'action d'un champ électrique, les composants de sa membrane se polarisent jusqu'à l'instauration d'une différence de potentiel transmembranaire. Si la différence de potentiel ainsi produite atteint un certain seuil critique, variable suivant les cellules, la membrane sera désorganisée et la cellule deviendra perméable à différentes molécules exogènes. Cette perméabilité nouvellement acquise est réversible à condition que l'intensité ou la durée du champ n'excède pas une limite critique au-delà de laquelle la cellule sera irréversiblement endommagée. Cette technique d'électroporation est surtout utilisée pour transfecter des cellules assez résistantes, comme des lignées tumorales, qui se cultivent en suspension cellulaire.

2.4. La micro-injection

Cette technique est essentiellement utilisée pour réaliser des animaux transgéniques. Elle consiste à injecter un fragment d'ADN dans un des pronucléi de l'œuf fertilisé au stade unicellulaire. Elle est réalisée sous microscope inversé. Les œufs sont maintenus en place à l'extrémité d'une pipette de maintien en appliquant une légère aspiration, et sont injectés par l'intermédiaire d'une pipette d'injection chargée avec la solution contenant l'ADN. Ces deux pipettes sont controlées grâce à des micromanipulateurs. Dans les conditions optimales, 60 à 80% des œufs survivent à l'injection, et 10 à 30% d'entre-eux poursuivent leur développement dans la mère porteuse.

2.5. La fusion de protoplasmes

La préparation des plasmides avant leur incorporation dans les cellules de mammifères se fait toujours dans des bactéries. On a donc pensé à les utiliser comme vecteur pour l'introduction des molécules d'ADN (Schaffner, 1980). Le principe est d'enlever la paroi bactérienne en les traitant par du lysozyme et de réaliser la fusion des protoplasmes ainsi obtenus avec la membrane cellulaire en utilisant du polyéthylène glycol. Ce dernier est ensuite éliminé par lavage et les cellules sont cultivées en présence de kanamycine pour enlever les bactéries résiduelles. Cette méthode présente une très haute efficacité, jusqu'à 100% des cellules. Par contre elle demande beaucoup de manipulation et les co-transfections ne sont pas possibles.

2.6. Les liposomes

Trois approches différentes ont été utilisées pour administrer l'ADN à l'aide de liposomes (Bhargava et coll., 1971):

- les liposomes stables non fusogènes
- les liposomes calcium et pH sensibles, fusogènes
- les liposomes cationiques fusogènes

2.6.1. Les liposomes non fusogènes

Les liposomes composés de lipides non fusogènes pénètrent dans la cellule par endocytose et la grande majorité de l'ADN encapsulé est dégradé dans le compartiment lysosomal. De ce fait, les expériences de transfert de gènes par ce type de véhicule n'ont jamais donné de résultats satisfaisants tant sur le plan de l'efficacité de transfection que sur celui de la reproductibilité (Fraley et coll., 1981).

2.6.2. Les liposomes fusogènes, virosomes et pH sensibles

Afin de contourner le problème de dégradation dans les lysosomes, deux stratégies ont été étudiées. La première utilise des protéines virales insérées dans les bicouches des liposomes : les virosomes. La seconde, utilise des compositions de lipides sensibles aux pH; ceci afin de mimer les enveloppes virales. L'efficacité de ces techniques est de 5 à 10 fois plus importante avec les liposomes pH sensibles (la libération de l'ADN de la cellule se fait à partir d'un mécanisme pH dépendant dans le compartiment endosomal).

2.6.3. Les liposomes cationiques

Une nouvelle technique de transfection cellulaire appelée lipofection et utilisant des liposomes cationiques (Felgner et coll., 1987). a été récemment introduite. La première version de ces liposomes était composée d'un lipide synthétique, le DOTMA (Dioleyloxypropyl-triméthyl ammonium) et de DOPE (Dioléoylphosphatidyl éthanolamine) dans un rapport de 1/1. Le réactif ainsi constitué est appelé lipofectine. Les liposomes cationiques et l'ADN fusionnent spontanément par interaction de charges pour former un complexe de large taille, environ 500 nm, chargé positivement. Le rapport optimal ADN/lipofectine généralement utilisé pour la transfection est compris entre 1/5 à 1/10 (poids/poids). La supériorité d'efficacité de la lipofectine par rapport aux liposomes pH sensibles (de 3 à 150 fois) est due au fait que ce réactif délivre plus de plasmides aux cellules et qu'il conduit à une dégradation moins importante de l'ADN. C'est maintenant le système de transfection le plus utilisé sur les cellules adhérentes.

2.7. Conclusion

Les méthodes physiques liées à l'introduction de l'ADN dans la cellule (la membrane cellulaire est perforée par des agents chimiques ou physiques) sont des méthodes très drastiques pour la cellule. Il en résulte un mauvais rendement de transfection, souvent dû à une mortalité cellulaire élévée. Ces méthodes sont celles du phosphate de calcium, du DEAE dextran et de l'électroporation. Leur rendement est d'environ 20%. L'inconvénient dans les populations de cellules hétérogènes, est qu'une sélection naturelle s'opère au profit des cellules les plus résistantes aux agressions physiques. Actuellement les recherches dans ce domaine se tournent vers des méthodes beaucoup plus douces, plus physiologiques, faisant intervenir une fusion membranaire entre la membrane cytoplasmique et le véhicule utilisé de façon à délivrer l'ADN dans la cellule sans l'endommager. Beaucoup de ces recherches se sont inspirées des particules virales tant en ce qui concerne leur structure qu'en ce qui concerne leur processus de pénétration cellulaire. Pour l'instant, les liposomes cationiques sont les meilleurs vecteurs pour une transfection physiologique qui peut aller jusque 100% de rendement. L'inconvénient de ce système est qu'il n'est opérationnel que sur des cellules adhérentes.

3. LES CELLULES HÔTES

3.1. Les bactéries

La bactérie a été le premier système d'expression employé (l'hormone de croissance humaine est toujours synthétisée à partir d'*Escherichia coli* ce qui permet ainsi d'éviter aux patients la maladie de Creutzfeldt-Jakob dont l'agent pathogène est un prion contenu dans la préparation de cerveau humain qui était alors la source de cette hormone). Hormis ses facultés aisées d'exploitation, *E. coli* présente néanmoins certains inconvénients : de nombreuses protéines recombinantes exprimées chez *E. coli* sont malheureusement obtenues sous forme inactive, mal repliées et insolubles. La formation de ces aggrégats résulte d'une trop forte concentration locale de la protéine qui conduit à sa précipitation dans le cytoplasme des bactéries (corps d'inclusion qui contiennent en plus de la protéine recombinante, des protéines de la membrane externe, des ARN ribosomaux 16S et 23S et de l'ADN plasmidique linéaire). Ils sont facilement purifiables mais sont parfois difficiles à solubiliser; or, l'utilisation d'agents chaotropiques (urée ou guanidium) inhibe la conformation naturelle de la protéine. Cependant, un grand nombre de protéines ont été purifiées et renaturées avec succès à partir de ces aggrégats qui peuvent offrir une protection contre l'attaque des protéases cellulaires (Sarmientos et coll., 1989). On tente actuellement d'éviter ces modifications de repliements *in vitro*.. L'obtention de protéines solubles peut se faire par exemple en réduisant la température de croissance des bactéries à 23°C. On peut également réaliser la coexpression de la protéine avec une protéine chaperonne ce qui favorise la production et l'assemblage de protéines multimériques.

Un autre moyen de pallier à ces problèmes serait de parvenir à faire sécréter les protéines dans le périplasme ou le milieu de culture.

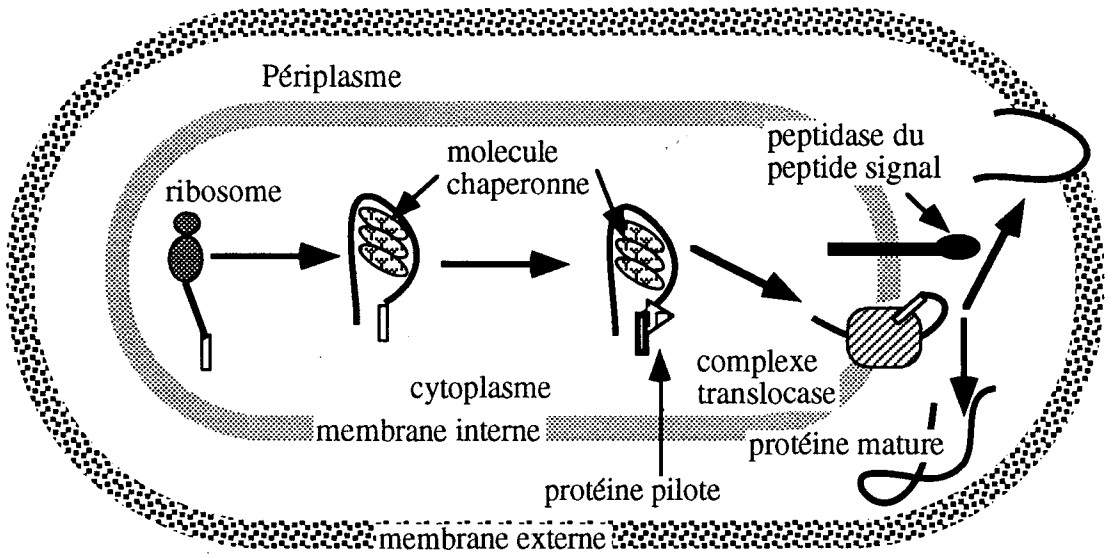


Schéma simplifié du mécanisme de sécrétion d'une protéine chez *E. coli*

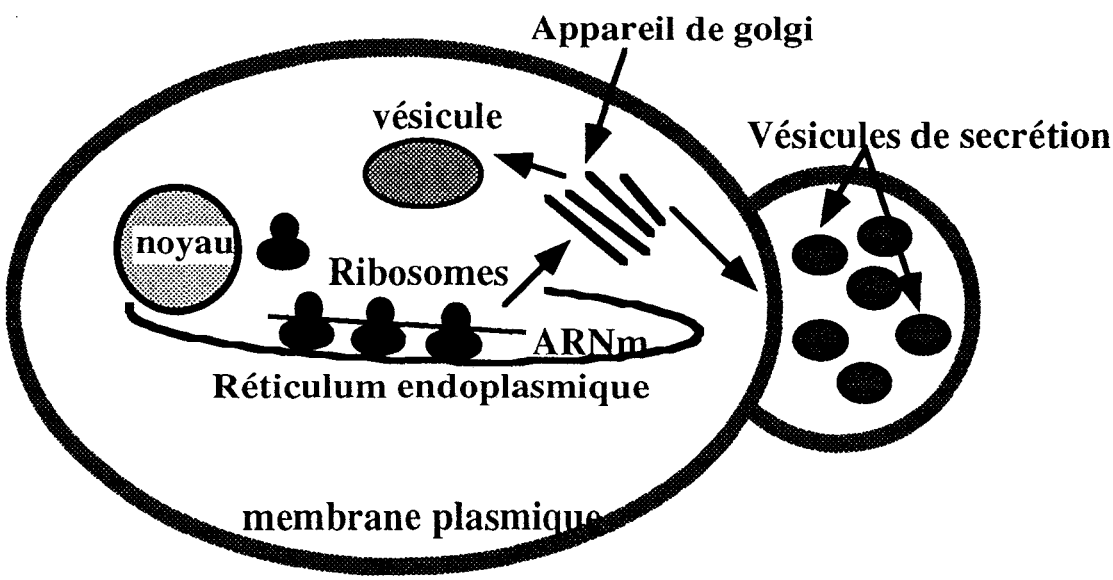
L'association d'un peptide signal bactérien en position N terminale de la protéine recombinante a déjà permis d'obtenir des protéines sécrétées (Klein, 1992). Les critères qui régissent l'exportation correcte de la protéine sont encore mal connus, cependant la composition en acides aminés de la région mature de la protéine joue un rôle déterminant dans la translocation de celle-ci. Une autre stratégie pour l'exportation des protéines consiste à fusionner la protéine recombinante avec une protéine porteuse qui apportera les signaux de transport permettant de diriger la protéine hybride vers le compartiment cellulaire désiré. Elle peut également jouer un rôle dans le repliement de la protéine recombinante en l'entraînant à la suite de son propre repliement. Le transporteur est également impliqué dans toutes les étapes de caractérisation et de purification de la protéine hybride (Smith et coll., 1988).

Le second inconvénient d'*E. coli* concerne les modifications post-traductionnelles de la protéine. Si une glycosylation est nécessaire, *E. coli* n'est pas capable de réaliser une telle réaction. La bactérie n'ayant pas un potentiel redox adéquat dans son cytoplasme, si la formation de ponts disulfure est indispensable au repliement correct de la protéine pour son activité biologique, il est préferable d'envisager une expression dans le périplasme ou dans le milieu de culture.

E. coli est couramment utilisée pour obtenir rapidement une grande quantité d'antigène même si la protéine n'est pas correctemment repliée. C'est un système peu onéreux et facile à utiliser. Cependant, d'autres modèles ont dû être développés pour pallier ces inconvénients : les systèmes d'expression eucaryotes. qui ont également l'avantage de ne pas contenir de pyrogènes (LPS) issus des bactéries pouvant gêner l'étude de l'antigénicité d'une protéine.

3.2. Les levures

La levure est un modèle réduit de la cellule eucaryote. De 1857, année où Pasteur découvrit le rôle des levures dans la fermentation alcoolique à 1975 où Davis et col. isolent le gène HIS3 de levure, cet organisme unicellulaire complexe n'a cessé de servir de modèle ou d'outil aux généticiens en particulier. Le génome des eucaryotes a une organisation très élaborée par rapport à celui des bactéries. Son système transcriptionnel et sa régulation le sont aussi; à titre d'exemple, là où les bactéries utilisent une ARN polymérase, il faut trois ARN polymérases spécialisées pour transcrire l'ensemble du génome nucléaire levurien. Ces polymérases nécessitent l'intervention de facteurs généraux de transcription (TBP, TFIIIC) ainsi que de protéines transactivatrices (Ga 14p). Les protéines sécrétoires sont synthétisées sur des ribosomes cytoplasmiques et adressées par leur peptide signal à la membrane du réticulum endoplasmique qu'elles traversent. Du reticulum, elles gagnent l'appareil de Golgi via de petites vésicules, puis elles sont dirigées soit vers la vacuole, soit vers des vesicules sécrétoires, puis vers la membrane plasmique où elles sont finalement excrétées. Durant ce trajet, les protéines subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. Environ cinquante gènes (*sec)* contrôlent les étapes de la voie sécrétoire chez la levure.



SCHEMA DE LA VOIE SECRETOIRE CHEZ LA LEVURE

La souche de levure la plus utilisée pour l'expression de protéines hétérologues est *Saccharomyces cerevisae*. Cependant comme elle ne possède pas de promoteur à la fois fort et régulable, qu'elle atteint difficilement de hautes densités en culture, et que les protéines sécrétées sont souvent hyperglycosylées, on emploie de plus en plus d'autres espèces comme *Pichia pastoris* ou *Kluyveromyces lactis.*

La levure présente plusieurs propriétés intéressantes comme cellule hôte.

• La levure possède un plasmide naturel qui permet la surexpression de protéines hèterologues.

• son absence de toxicité en fait un modèle de choix pour l'expression des protéines à visée thérapeutique (Antigène de surface de l'hépatite B, EGF humain...)

• la levure est capable d'exécuter un certain nombre de modifications post-traductionnelles.

Les inconvénients de ce modèle sont le faible taux de protéines produites, et l'hyperglycosylation de celles-ci.

Au sein du laboratoire, l'introduction de ce système nécessite des contraintes physiques pour éviter les contaminations lors de l'étude simultanée de bactéries, de cellules animales et de levures .

Son utilisation est souvent restreinte à l'étude de gènothèques ou pour les études de mutations.

3.3. Les cellules de mammifères

Afin de produire des protéines recombinantes possédant une structure similaire à la protéine naturelle, on utilise des cellules provenant d'organismes eucaryotes supérieurs. Malheureusement, l'utilisation de ces cellules n'est pas aussi simple que l'utilisation de bactéries ou de levures et leur emploi est aussi plus onéreux. On utilise des lignées cellulaires transformées pour une croissance plus élevée. Ceci pose deux problèmes : le premier est la perte de certaines activités enzymatiques nécessaires aux processus de modifications post-traductionnelles lors de la transformation de la cellule. Le second est un problème d'éthique médicale: si la transfection est envisagée en vue de la production de la protéine dans un but thérapeutique chez l'homme, il faut être sûr que la cellule utilisée ne présente aucun risque biologique. Des précédents existent, le vaccin contre la polyomélite qui était produit sur des cellules de rein de singe était contaminée par le virus SV40, fort heureusement inoffensif pour l'homme.

Dans le cas de transfections de cellules de mammifères pour l'étude de la fonction d'une protéine, on utilise le type cellulaire qui répond le mieux aux besoins, suivant la disponibilité et la facilité de transfection de certaines cellules.

3.4. Les cellules d'insectes

Un grand nombre de lignées de cellules d'insecte sont aujourd'hui disponibles pour étudier la multiplication des baculovirus recombinants. Dans le cas du baculovirus d'*Autographa californica* (AcNPV : *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*), ce sont essentiellement les cellules Sf9 ou Sf21, provenant de tissus ovarien, qui sont les plus utilisées. Il est possible également d'utiliser les lignées TN-368, dérivée de *Trichoplusia ni* ainsi que la lignée Mb dérivée de *Mamestra brassicae*. En ce qui concerne le baculovirus de *Bombix mori*, ce sont les cellules BmN qui sont utilisées (issues du vers à soie).

Les cellules d'insecte peuvent sécréter les protéines quand un peptide signal est présent. Les voies de sécrétion sont identiques à celles rencontrées chez les mammifères. Elles sont capables d'assurer les modifications post-transcriptionnelles des protéines eucaryotes. Néanmoins la glycosylation s'effectue moins bien que dans les systèmes homologues. Les résidus carbohydrates sont moins complexes et on note l'absence d'acide sialique (Grabenhorst et coll., 1993). Mais en général, les glycosylations apportées par les cellules d'insectes suffisent pour obtenir une molécule biologiquement active.

Les protéines actives peuvent être sécrétées en grande quantité dans le milieu de culture (de 1 à 50 µg/ml) alors qu'on obtient des taux de 12 ng/ml avec la levure. L'inconvénient majeur réside dans la difficulté de sélection des virus recombinants.

Le tableau ci-dessous résume brièvement les différentes utilisations des systèmes de transfection, leurs avantages et inconvénients.

Etude souhaitée	*In vitro*				
	Etude biochimique	**Etude et fonction d'une protéine eucaryote**	**Production**		
Cellule receveuse	-Bactérie	-cellule impliquée dans la fonction	-Bactérie	-Levure	-Cellule d'insecte
vecteur	-Vecteur d'expression bactérien	-vecteur d'expression eucaryote (plasmide ou virus)	-vecteur d'expression bactérien	-vecteur d'expression de la levure	-Baculovirus.
Avantages	-Facile -Peu coûteux	-Proteine identique à celle d'origine	-Bonne production -Peu coûteux	-modifications post-traductionnelle -permet le clonage de grands fragments	-Production importante -Bonnes modifications post-traductionnelles
Inconvénients	-Proteine non glycosylée non repliée	-Expression stable difficile	-problèmes de purification	-hyperglycosylation -nécéssité d'optimiser les conditions de culture	-Sélection des recombinants -Assez coûteux à l'échelle industrielle
Contraintes techniques	-P1	-P1 ou P3 suivant le vecteur	-P1	-P1 -éviter les contaminations d'autres cultures de cellules par les spores de levures	-P1

Etude souhaitée	*In vivo*			
	Transgène (1)	**Production d'anticorps**	**Vaccinologie (4)**	**Thérapie génique (5)**
Cellule receveuse	-cellule embryonnaire	animal (souvent hôte vertébré)		
vecteur	-ADN du gène à intégrer	-cellule transfectée (2) -Plasmide (3)	Vecteurs vivants atténués (4) : -virus : vaccine -bactéries : BCG, Salmonelles...	-Adénovirus -Rétrovirus
Avantages	-Etude *in vivo* d'une modification d'expression	-Facile -Bonne production d'anticorps et de CTL	-Orientation, augmentation et persistance de la réponse immune	-Modifications génétiques différentes
Inconvénients	-Mutations -Instabilité	cette technique étant récente, il est trop tôt pour juger des inconvénients.	-coût important -mise au point complexe	-Recombinaison homologue avec des virus pathogènes

1(Jallat, 1991)2) (De Boer et coll., 1992); 3) (Ada, 1993); 4) (Connell et coll., 1992) 5) (Dodet, 1992)

4. CONCLUSION GÉNÉRALE

Le choix du système d'expression se fera en fonction des réponses aux questions suivantes:

- La protéine doit-elle être biologiquement active? (modifications post--traductionnelles nécessaires?)
- La protéine a-t-elle besoin d'être sécrétée?
- Quelle est la quantité de protéines nécessaire?
- Qu'elle sera son utilisation?
- Le système d'expression est-il compatible avec les contraintes physiques du laboratoire?

1. INTRODUCTION

Si on se réfère au tableau précédent, le système de production le mieux adapté à nos besoins est sans conteste le système d'expression en baculovirus.

Les points importants de ce système sont :

- une expression stable
- un taux important de protéines produites
- les protéines produites sont immunologiquement, enzymatiquement et fonctionnellement similaires aux protéines naturelles.
- la compatibilité physique avec la culture d'autres types cellulaires

Ce système, très lourd à l'origine, a subi ces dernières années de nombreuses améliorations rendant le système d'expression plus simple et plus efficace.

Par exemple,

- L'utilisation de liposomes cationiques pour la transfection, a permis d'obtenir un rendement maximal,
- la linéarisation de l'ADN viral, a permis d'augmenter les chances de recombinaisons
- et enfin, l'introduction du gène de la β-galactosidase dans certains vecteurs à permis de faciliter la sélection des recombinants.

Ces avancées technologiques nous ont donc permis d'envisager la mise au point de l'expression de l'IL-4 murine en baculovirus avec plus de facilité.

La mise en place de ce système nous permettra dans un deuxième temps d'envisager l'expression d'autres protéines dont la fonction biologique pourrait dépendre des modifications post-traductionnelles (ce qui n'est pas le cas pour l'IL-4).

C) CHOIX DU SYSTEME D'EXPRESSION DE L'IL-4m

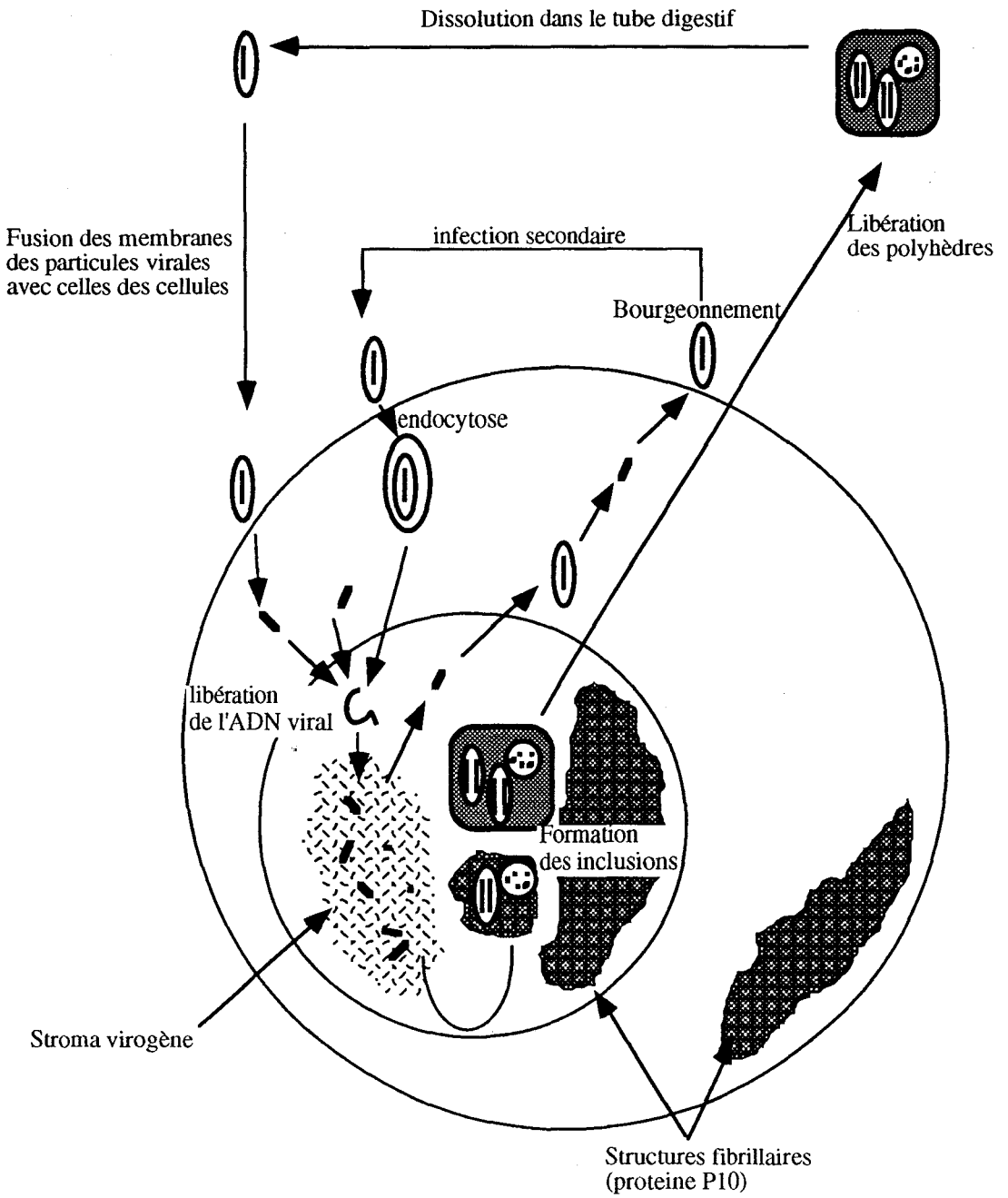


Schéma du cycle de réplication d'un baculovirus

(D'après Devauchelles et al.)

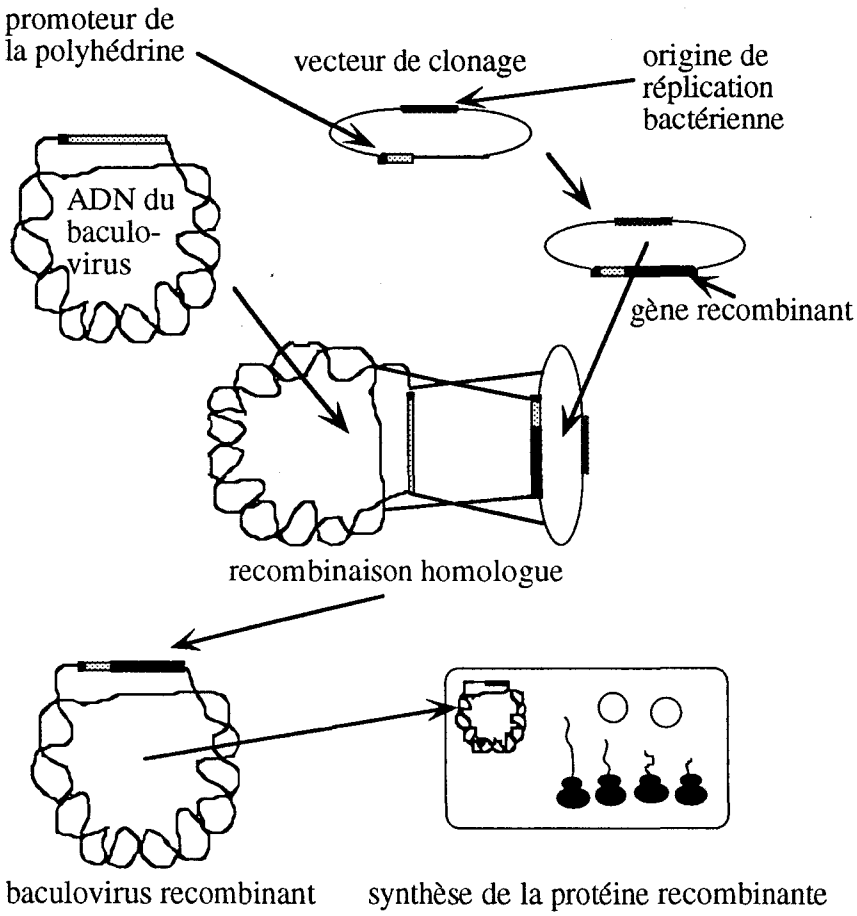
2. LA BIOLOGIE DES BACULOVIRUS

Les Baculovirus (du latin baculum : petit bâtonnet) sont des virus en forme de bâtonnets enveloppés, d'une longueur d'environ 350 nm et d'un diamètre de 50 nm. Leur génome est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire dont la taille varie de 88 à 153 Kb. Ces virus sont capables d'infecter plus de 600 espèces d'insectes différents et mêmes certains crustacés, mais ils ne sont pathogènes ni pour les vertébrés, ni pour les plantes.

Un des baculovirus les plus étudiés aujourd'hui est celui isolé des larves d'*Autographa californica.* Il est connu sous le nom de Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) et se multiplie dans le noyau des cellules infectées suivant un cycle assez complexe (Devauchelle et coll., 1993). Il existe deux formes différentes de virus produits : les particules virales extracellulaires qui bourgeonnent à la surface de la cellule et des particules virales incluses dans les polyhèdres. La polyhédrine est une protéine structurale codée par le virus, qui constitue la matrice protéique cristallisée à l'origine des corps d'inclusion. Ceux-ci protègent le virus des facteurs de l'environnement qui inactivent rapidement les particules libres extracellulaires. L'infection des larves d'insecte se fait donc par ingestion de polyhèdres, contenant les virus ainsi protégés, qui se dissolvent dans l'intestin. Les formes libres libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique ne servent qu'à l'infection secondaire des cellules de l'hôte. Après endocytose ou fusion membranaire, les nucléocapsides sont amenées au noyau et la réplication virale commence environ 7 heures après le début de l'infection. Les premières particules virales bourgeonnent à la surface cellulaire 10 heures après l'infection et les premiers corps d'inclusion sont visibles après 18 heures et restent dans les cellules jusqu'au moment de la lyse cellulaire. Les gènes de structure de la polyhédrine et du polypeptide P10 sont transcrits tardivement (après 18 heures et jusque 4 à 5 jours après infection). Contrairement à la polyhédrine, le rôle de la protéine P10 n'est pas encore clair. Cependant elle n'est pas indispensable au cycle viral in vitro (Devauchelle et coll., 1993)

3. IDENTIFICATION ET PURIFICATION DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS.

La construction des virus recombinants s'effectue en deux étapes (Summers et coll., 1988). La première consiste à insérer dans un plasmide, le gène d'intérêt en aval des promoteurs des gènes de la polyhédrine ou de P10. Le plasmide contient également des séquences de l'ADN du baculovirus pour la recombinaison homologue. Ce plasmide est appelé plasmide de transfert. La deuxième étape est la cotransfection dans des cellules d'insecte de l'ADN viral linéarisé et du plasmide de transfert. Il se produit alors une recombinaison entre les parties homologues de l'ADN viral et du plasmide donnant naissance à un virus recombinant ayant intégré le gène étranger.



Recombinaison homologue entre l'ADN viral du baculovirus et le vecteur de transfert du gène recombinant (D'après Devauchelle)

Les parties homologues sont toujours choisies dans des régions flanquant le gène de la poyhédrine et la recombinaison entraîne donc la disparition de ce gène dans le virus recombinant. Ceci présente plusieurs avantages. D'une part, comme la polyhédrine est une protéine très fortement exprimée au cours de l'infection par le baculovirus : de 50 à 75% de toutes les protéines cellulaires, il est intéressant de remplacer la production de cette protéine au profit de la protéine recombinante. D'autre part, la disparition de la polyhédrine permet de sélectionner les virus recombinants. L'inspection au microscope des plages de lyse permet de distinguer celles présentant des inclusions de polyhédrine, signant la présence d'un virus de type sauvage, de celles où on ne remarque pas la présence de ces corps cristallins et qui sont alors dues au virus recombinant. Ces plages de lyses intéressantes sont alors prélevées et sous-clonées plusieurs fois pour s'assurer de la pureté du recombinant. Mais cette technique d'inspection visuelle n'est pas facile et d'autres approches de sélection des virus recombinants ont été décrites.

Les différents procédés possibles et ceux que nous avons appliqués à la sélection de virus recombinants pour l'IL-4 seront développés dans le quatrième chapitre .

En fait, les améliorations techniques dans ce domaine vont dans deux directions, la simplification de la sélection des recombinants d'une part, et l'augmentation de la fréquence de recombinaison d'autre part. Dans cet ordre d'esprit, certains auteurs (Kitts et coll., 1993) ont délété une partie d'un gène essentiel du virus AcMNPV situé juste après le gène de la polyhédrine, les vecteurs de transfert possèdent quand à eux la séquence manquante en aval du site d'insertion. De cette façon la recombinaison entre un vecteur de transfert et l'ADN viral tronqué va restaurer l'intégrité du gène essentiel. La fréquence d'avoir des virus recombinants est proche de 100%, ce qui reduit considérablement l'étape de sélection.

D. ETUDE DE LA PRODUCTION D'IL-4 MURINE DANS LE SYSTEME D'EXPRESSION DU BACULOVIRUS

1. CLONAGE ET CONSTRUCTION DU PLASMIDE DE TRANSFERT

Nous avons choisi de cloner l'ADNc de l'IL-4 murine par la technique de PCR. D'une part parce que nous ne disposions pas dans le laboratoire du cDNA complet et d'autre part parce que la technique de PCR nous permettait d'ajouter des séquences reconnues par des enzymes de restrictions afin de faciliter le clonage dans le vecteur de transfert. A partir de la séquence publiée du cDNA de l'IL-4 murine (Nona et coll., 1986), (Lee et coll., 1986), nous avons choisi un couple d'amorces spécifiques.

•L'amorce 5' a été choisie du nucléotide +59 au nucléotide +84; le codon d'initiation de la transcription ATG se trouvant en position +62. Cette amorce contient également en amont la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme de restriction Nhe1.

•L'amorce 3' a été choisie du nucléotide +465 au nucléotide +485, juste après le codon stop +481. Il n'a été rajouté aucune séquence de polyadénylation. Elle contient également en aval la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme BamH1.

Amorce 5' : 5'--AGTCAC-GCTAGC-TTGATGGGTCTCAACCCCCAG--3'

séquence aléatoire de terminaison — site de restriction Nhe1 — séquence IL4 5'

Amorce 3' : 5'--TGAACG-GGATCC-ACTACGAGTAATCCATTTGC--3'

séquence aléatoire de terminaison — site de restriction BamH1 — séquence IL4 3'

Séquences nucléotidiques des deux amorces qui ont permis le clonage du cDNA codant pour l'IL4 murine

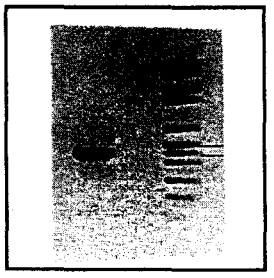
```
ATTTGTTAGCATCTCTTGATAAACTTAATTGTCTCTCGTCACTGACGGCACAGAGCTATTG
1
Met
ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GTT GTC ATC CTG CTC TTC TTT CTC GAA TGT ACC
62                                                  100

AGG AGC CAT ATC CAC GGA TGC GAC AAA AAT CAC TTG AGA GAG ATC ATC GGC ATT
                                                150
                                                        Met
TTG AAC GAG GTC ACA GGA GAA GGG ACG CCA TGC ACG GAG ATG GAT GTG CCA AAC
                                                200
                            Asn  Thr  Thr
GTC CTC ACA GCA ACG AAG AAC ACC ACA  GAG AGT GAG CTC GTC TGT AGG GCT TCC
                                250

AAG GTG CTT CGC ATA TTT TAT TTA AAA CAT GGG AAA ACT CCA TGC TTG AAG AAG
                                300
Asn  Ser  Ser            Met
AAC TCT AGT GTT CTC ATG GAG CTG CAG AGA CTC TTT CGG GCT TTT CGA TGC CTG GAT
                            350
                            Met Asn Glu  Ser
TCA TCG ATA AGC TGC ACC ATG AAT GAG TCC AAG TCC ACA TCA CTG AAA GAC TTC
                400
                                Met      Met              stop
CTG GAA AGC GTA AAG AGC ATC ATG CAA ATG GAT TAC TCG TAG TACTGAGCCACCATG
            450

CTTTAACTTATGAATTTTTAATGGTTTTATTTTTAATATTTATATATTTATAATTCATTAAAATA
500
AAATATTTGTATAATGT
```

Séquence nucléotidique du cDNA codant pour l'IL4 murine (Nona, 1986). Les sites de N-glycosylation sont soulignés et les 6 méthionines sont indiquées. Les amorces 5' et 3' sont encadrées.



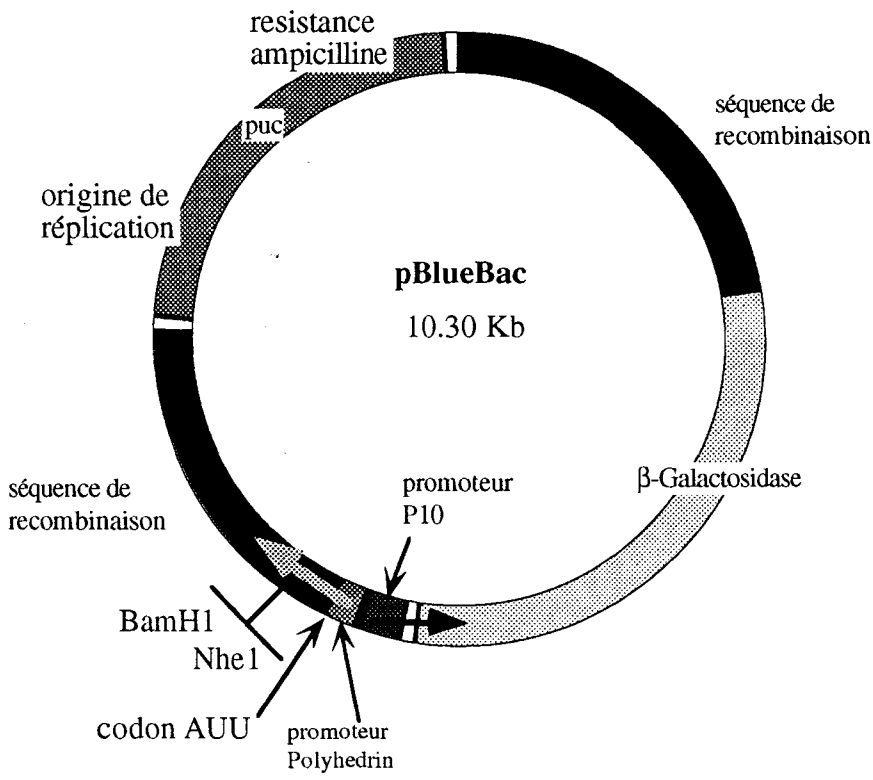
Fragment de PCR obtenu après amplification d'ADNc de cellules T de souris activées par la conA avec les amorces IL-4 sélectionnées.

Le fragment de PCR de 425 bp a été sous cloné dans le plasmide PCRII-TM selon la technique du TA cloning (Invitrogen). Il a été nécessaire de le "sous-cloner" car l'enzyme Nhe1 nécessite un grand fragment d'ADN de chaque côté de la zone de coupure pour être efficace. Cette

étape à permis également de le séquencer.Nous avons utilisé la technique de séquençage selon Maxam et Gilbert à l'aide d'une amorce fluorescente (Autoread sequencing kit; Pharmacia), la lecture se faisant sur un séquenceur automatique d'ADN (Automated Laser Fluorescent de Pharmacia).

Le TA cloning (In Vitrogen) permet de cloner directement des produits d'amplification en tenant compte de la particularité de certaines Taq polymérases qui rajoutent une adénine en 3' de tous les fragments amplifiés. Le vecteur de clonage linéarisé possède quant à lui une thymine en 5' du site de clonage qui permet la reconnaissance et la ligation des fragments de PCR.

L'ADNc de l'IL-4 murine est alors excisé par les enzymes de restriction Nhe1 et BamH1 puis recloné dans le vecteur pBLUEBAC II (Invitrogen). Celui-ci, comme tout vecteur de transfert possède une origine de réplication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique pour la sélection des recombinants. Pour les ligations nous avons utilisé les techniques décrites dans un manuel de référence (Sambrook et coll., 1989).



La sélection des colonies de bactéries recombinantes (XL1 blue; Stratagene) est faite par PCR. Brièvement, les bactéries issues d'une colonie, sont prélevées à l'aide d'un cône stérile et homogénéisées dans 10 µl de tampon de lyse contenant du Tris 50 mM, EDTA 1mM et 0.1% de TritonX100, pH : 8. Les tubes sont chauffés à 100°C pendant 5 mn, refroidis dans la glace et centrifugés à 13 000 tours pendant 2 mn.Un µl de chaque surnageant contenant entre autre l'ADN plasmidique est soumis à une amplification spécifique à l'aide des deux amorces décrites plus haut.

Les fragments amplifiés sont analysés en fonction de leur taille par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose ce qui permet de choisir le bon clone bactérien recombinant.

A partir de ce clone sélectionné on prépare une grande quantité de plasmide en vue de la transfection dans les cellules d'insectes que l'on purifie par chromatographie d'affinité (Qiagen).

2. TRANSFECTION DANS LES CELLULES D'INSECTES

2.1. Les cellules d'insectes

Pour cette étude nous avons utilisé la souche de cellules SF9 de tissu ovarien de *Spodoptera fugiperda* qui sont cultivées en monocouches adhérentes dans un milieu de base appelé Grace's (Grace, 1962) additionné d'hydrolysat de lactalbumine, de yeastolate, de 10% de sérum de veau fœtal et de gentalline. Ces cellules sont cultivées dans une étuve sèche à 27°C en l'absence de CO_2. On compte environ un passage tous les 3 jours quand les cellules sont à confluence, à environ 10^6 cellules/ml. On les divise au cinquième en changeant la boite et le milieu à chaque passage.

2.2. Transfection des cellules d'insectes

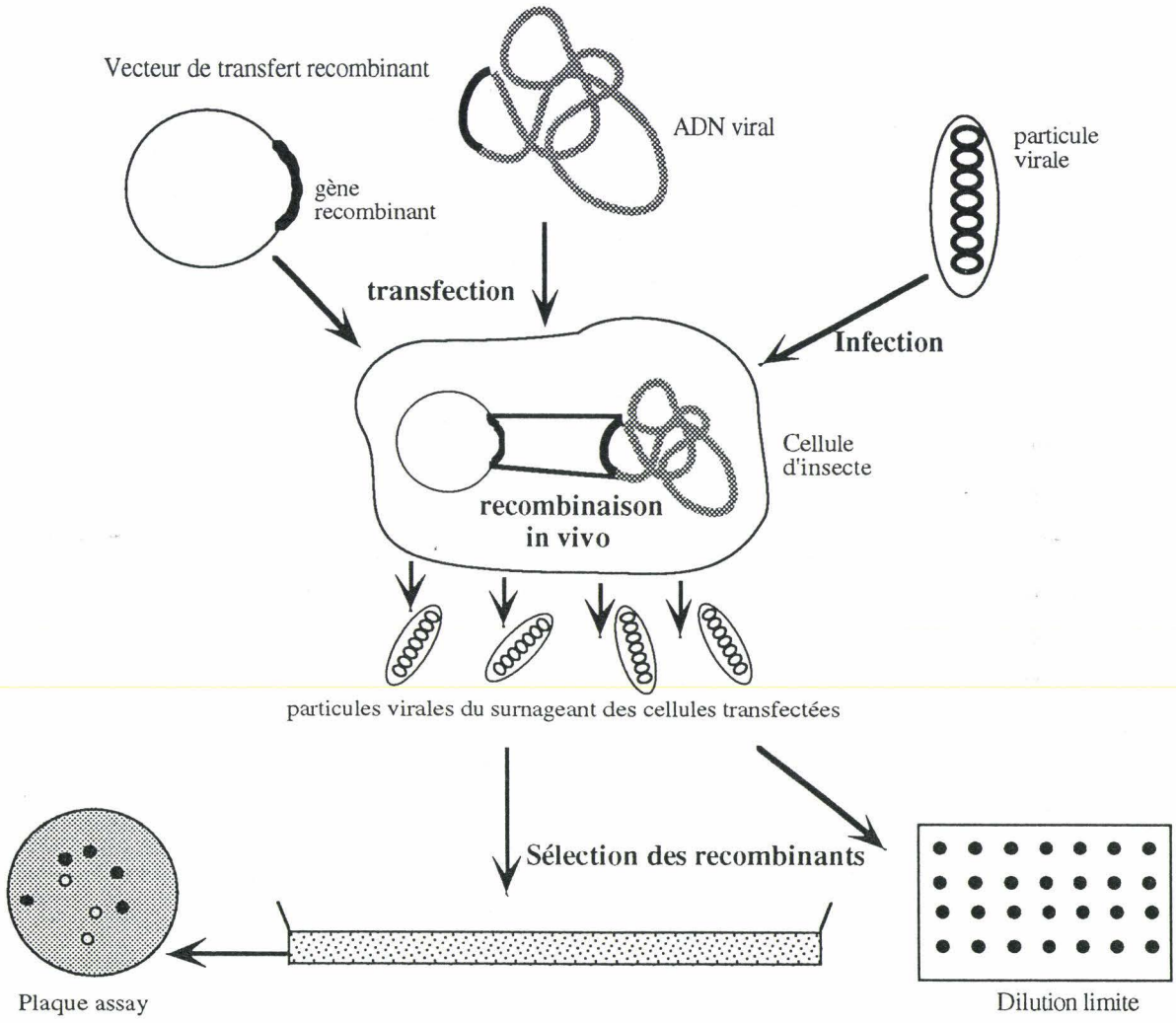
Les cellules sont transfectées à l'aide de liposomes cationiques en phase logarithmique de croissance à raison de 2.10^6 cellules par flacon de 25 cm^2. On laisse les cellules adhérer une heure à température ambiante. Le milieu est remplacé par 1 ml de Grace's et le flacon est remis 15 mn à température ambiante. Pendant ce temps, on prépare les liposomes (kit Invitrogen) :

- 3 µg de pBLUEBAC-IL-4m
- 1 µg d'ADN de baculovirus linéarisé
- 1 ml de Grace's
- 20 µl de solution de liposomes cationiques.

Ce mélange est incubé 15 mn à température ambiante et mis en présence des cellules pendant 4 heures en agitation douce, suivi de 48 heures d'incubation à 27°C. Le surnageant est alors prélevé et conservé à 4°C. Afin d'enrichir le surnageant en particules virales qui sont représentées à 99% par du virus sauvage et à 1% par du virus recombinant, une partie du surnageant est réamplifié sur des cellules saines pendant 7 jours. Ce stock viral sera alors utilisé pour la sélection des virus recombinants.

3. SÉLECTION DES VIRUS RECOMBINANTS

Nous avons testé différentes techniques pour la sélection des virus recombinants.



Expression d'un gène recombinant dans le système baculovirus

BU LILLE

3.1. Sélection par dilution limite

On peut par exemple utiliser des techniques fondées sur les dilutions limites. La culture et l'infection des cellules sont réalisées dans des plaques à 96 puits pendant 5 jours. On exécute des dilutions sérielles de 10 en 10 du surnageant viral. Les surnageants sont récupérés et analysés soit pour la présence de la protéine recombinante (Rodewald et coll., 1990), avec des anticorps par exemple, soit par hybridation avec une sonde nucléotidique spécifique de l'ADN codant pour la protéine recombinante, soit enfin par des techniques de PCR. L'avantage de ces techniques de sélection par hybridation homologue ou d'amplification génique spécifique est leur facilité et leur rapidité de mise en œuvre ((Summers et coll., 1988)). Cependant, la sélection ne se faisant que sur la présence des recombinants, une faible proportion de virus sauvages contaminants peut entraîner une émergence de ces derniers lors de l'infection *in vitro*, car leur réplication est plus rapide que celle des virus recombinants.

La technique que nous avons utilisée est celle de la fixation de l'ADN viral fixé sur une membrane de nylon et hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique du gène recombinant (Kafatos et coll., 1979).

•Les cellules sont distribuées dans une plaque de 96 puits à raison de $1,5.10^4$ cellules/puits. et on laisse les cellules adhérer 1 heure à 27°C.

•On procède à des dilutions sérielles de 10 en 10 du stock viral (de 10^{-4} à 10^{-8}).

•On infecte une plaque de 96 puits par dilution, en laissant une ligne sans virus comme controle négatif.

•On incube les plaques 4 à 5 jours à 27°C,

•Les surnageants sont alors transférés dans une nouvelle plaque de 96 puits et conservés à 4°C.

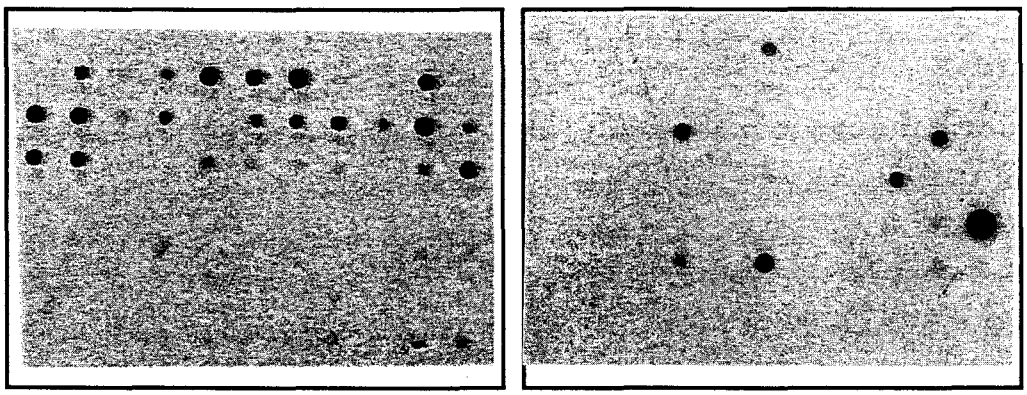
•Les cellules sont lysées par 200 µl de soude 0,5 N et neutralisées par 20 µl d'acétate d'ammonium 10 M.

•Les lysats cellulaires sont transférés sur une membrane de nylon à l'aide d'un appareil à Dot-blot.

•L'ADN viral est fixé sur la membrane par exposition aux UV pendant 3 mn.

•La membrane est ensuite hybridée avec la sonde spécifique de l'IL-4 murine marquée par la technique de random priming avec 50 µCi de dCTP ^{32}[P].

• Les clones positifs sont ensuite réamplifiés et analysés de la même façon jusqu'à l'obtention d'un virus recombinant pur.



Sélection des virus recombinants par la technique de Dot blot. Dilution du surnageant des cellules infectées 10^{-5} (plaque de gauche) et 10^{-6} (plaque de droite)

Cette technique présente deux inconvénients majeurs.

D'une part la sélection se fait uniquement sur la présence des recombinants et non pas sur l'absence de virus sauvage ce qui ne permet pas de connaître la pureté du virus sélectionné.

D'autre part, l'hybridation est effectuée sur l'ADN viral intracellulaire alors que ce sont les surnageants qui sont sélectionnés. Le problème est que le cycle viral est en grande partie intracellulaire et que les virions présents dans les surnageants proviennent soit d'une lyse cellulaire, soit d'une voie annexe par bourgeonnement dans le cas d'infection secondaire. La quantité de virus présents dans les cellules ne peut donc pas renseigner sur la quantité de virus présents dans les surnageants.

Cette technique qui paraît simple et attractive peut si l'on ne tient pas compte de ces arguments conduire rapidement à une perte du taux de virus recombinants. La solution serait d'attendre que les cellules soit lysées (environ 7 jours) et de tester une partie des surnageants en hybridation double avec des sondes spécifiques du gène recombinant et de la polyhédrine synthétisée par les virus sauvages. Cette hypothèse n'a pas été concrétisée car dans le même temps la deuxième technique de recombinants par plaque assay nous a donné des résultats très satisfaisants.

Dans cet ordre d'esprit, un système intermédiaire permettrait d'envisager une évaluation des virus recombinants d'une part et des virus sauvages d'autre part. Par la technique de Southern-Dot-blot il faudrait faire en parallèle deux hybridations, respectivement avec les sondes spécifiques de la polyhédrine et du gène recombinant. Par la technique de PCR, on pourrait envisager une coamplification des deux gènes avec un mélange des différents oligonucléotides spécifiques de la polyhédrine d'une part et du gène recombinant d'autre part. En faisant varier les proportions de l'un des couples d'oligonucléotides par rapport à l'autre, il serait possible d'évaluer approximativement l'importance relative des deux gènes. Néanmoins, il est indispensable de pouvoir évaluer le pouvoir lytique du virus qui est fonction du nombre de particules virales infectantes. Cette évaluation est nécessaire pour déterminer le titre du stock viral recombinant afin d'envisager une cinétique reproductive de la production de protéines recombinantes. Cette évaluation peut-être évincée lors de la sélection des virus recombinants, mais est nécessaire pour la determination du titre. C'est une standardisation de l'activité fonctionnelle des particules virales qui demande néanmoins une grande expérience.

3.2. Sélection par la technique de plaque assay

Le principe de cette technique est de visualiser la lyse cellulaire provoquée par les virus recombinants ou sauvages après addition d'agarose sur le tapis cellulaire. Les zones où les cellules sont lysées sont appelées plages de lyse.

L'identification de ces plages de lyse au microscope inversé reste très délicate et nécessite une grande expérience. Plusieurs astuces nous permettent néanmoins de les identifier :

•la présence de virus sauvages ne pose aucun problème dans le cas du baculovirus car les cristaux de polyhédrine qui renferme ces derniers sont facilement identifiables.

•Le problème des virus recombinants est quant à lui plus délicat, :

- Il existe trois possibilités :

-La reconnaissance directe d'une plage de lyse au microscope

-l'addition d'un colorant vital (bleu trypan ou rouge neutre) à la gélose à cinq jours pour visualiser plus facilement les cellules morte ou vivantes

-La coexpression du gène recombinant avec une enzyme qui après digestion de son substat chromogène permettra la visualisation de la plage de lyse recombinante.

Vialard et al. (Vialard et coll., 1990) ont utilisé le gène de la β galactosidase (qui en présence de son substrat : X-gal, donne une coloration bleue) pour construire un vecteur d'expression avec deux promoteurs, le premier, celui de la polyhédrine va induire la production tardive du gène recombinant, le second, le promoteur de la molécule P10, guide l'expression de la β galactosidase.

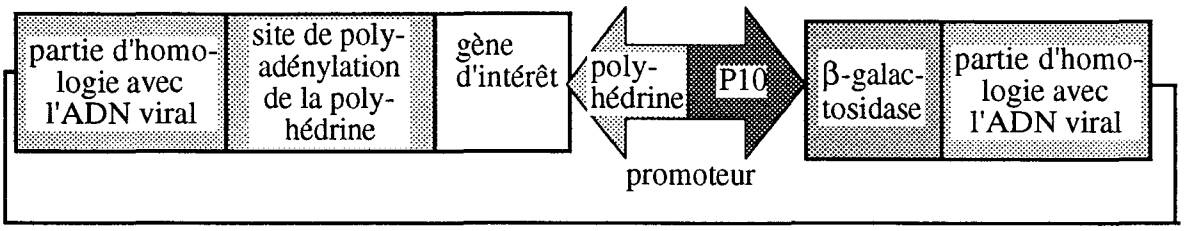


Schéma d'un vecteur de baculocirus portant le gène de sélection β galactosidase

S'il y a recombinaison homologue entre le virus sauvage et le vecteur recombinant, les particules virales recombinantes vont produire de façon concomittante le gène greffé et la β galactosidase qui avec son substrat présent dans l'agarose des plaques de sélection, va libérer un colorant bleu, permettant alors d'identifier les cellules infectées par des virus recombinants très facilement.

Cette méthode de sélection est très simple et permet à la fin de sélectionner les recombinants sur 3 cycles de purification mais également de déterminer le titre du virus.

C'est cette dernière technique que nous avons choisie.

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits (3 cm de diamètre) à raison de 5.10^5 cellules /puits. Après adhérence, chaque puits est infecté pendant une heure à 27°C avec une dilution du stock viral (de 10^{-4} à 10^{-7}); on laisse un puits non infecté comme contrôle négatif. Le surnageant est enlevé et deux ml d'une solution à 0,7% de gélose à 40°C dans du milieu complet contenant le substrat de la β-galactosidase : l'X-gal à 150 µg/ml, est coulée dans chaque puits. La plaque est incubée pendant environ 5 jours jusqu'à visualisation des plaques bleues. Ces dernières sont repérées au microscope puis prélevées à l'aide d'un cône stérile de 200 µl et transférées sur une culture de cellules saines. Le virus enrichi en recombinants subit alors un deuxième cycle d'infection, les surnageants seront prélevés à 5 jours et retestés dans les mêmes conditions. Au fur et à mesure de l'enrichissement en recombinants, on observe une nette diminution, jusqu'à la disparition totale des cristaux de polyhédrine. Il faut en général 3 cycles de purification pour obtenir du virus recombinant pur.

Cette technique de purification des recombinants est simple même s'il faut compter un à deux mois pour la purification des virus recombinants. Elle permet, par la visualisation de la polyhédrine, d'être sûr de l'absence de virus sauvage. L'inconvénient majeur est que de nombreux paramètres influent sur la réussite de cette technique qui demande donc de l'expérience au manipulateur.

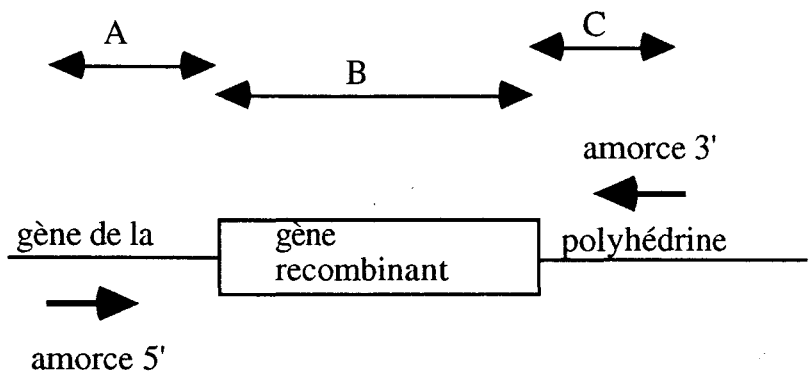
3.3. Autres techniques de sélection des virus recombinants

3.3.1. Hybridation d'empreintes

Le principe de cette technique consiste à réaliser une empreinte sur membrane de nylon de la face de la gélose qui a été en contact pendant 5 jours avec le tapis cellulaire infecté par les particules virales (Summers et coll., 1988)., (Waterfield et coll., 1991) On réalise ensuite une dénaturation de l'ADN par la soude suivie d'une neutralisation dans un tampon Tris 1M. L'ADN est fixé pendant 3 mn aux UV, puis hybridé avec une sonde spécifique du gène d'intérêt qui permettra après exposition de la membrane sur un film autoradiographique de localiser le ou les clones de cellules infectées. Les virus recombinants sont ensuite prélevés et amplifiés comme dans la technique de plaque assay. Cette technique est difficile à réaliser car il faut pouvoir récupérer correctement la gélose; si elle est trop humide, elle adhère aux cellules, si elle est trop sèche, elle casse. Cette technique n'est pas fiable car sa reproductibilité est trop dépendante des conditions d'hygrométrie.

3.3.2. Par PCR

Le principe de cette technique consiste à sélectionner le virus recombinant dès la première étape de plaque assay (Sisk et coll., 1992). On vérifie simplement par cette méthode le taux de contamination en virus sauvages. Après prélèvement des fragments de gélose "recombinants", ceux-ci sont remis en suspension dans un millilitre de milieu Grace's puis agités et soumis à des chocs thermiques afin de libérer l'ADN viral. Dix microlitres de ce lysat sont analysés par PCR à l'aide d'amorces flanquant la zone d'insertion du gène recombinant, sur le gène de la polyhédrine.



Après analyse sur gel des fragments de PCR on pourra obtenir 3 profils différents :

- A+C : virus sauvage
- A+B+C : virus recombinant pur
- 2 bandes A+C et A+B+C : mélange de virus recombinants et de virus sauvages.

Cette technique très rapide de contrôle permet de gagner quelques semaines de purification.

4. PRÉPARATION DES STOCKS VIRAUX

En vue de la standardisation de la production de protéines in vitro, il est nécessaire de préparer un stock important et concentré en particules virales (le baculovirus étant lytique pour les cellules, la production de protéines se fait par infection de cellules saines pendant 5 jours). Il sera nécessaire également de déterminer le titre du stock viral de façon à pouvoir réaliser des infections de 10 particules virales par cellules : MOI=10; (Multiplicity Of Infection).

4.1. Préparation N°1 (P1)

On appelle P1 le surnageant de particules recombinantes récupérées après sélection des recombinants.

4.1. Préparation N°2 (P2)

Deux flacons de 25 cm^2 contenant chacun 2.10^6 cellules sont respectivement infectés par 100 µl de P1 et incubés à 27°C pendant 5 jours jusqu'à ce que 90% des cellules soient lysées. Le surnageant recupéré est alors appelé P2

4.3. Préparation N°3 (P3)

500 ml de cellules à 2.10^6 cellules/ml sont infectées avec la totalité du P2. Quand les cellules sont lysées, le surnageant P3 est récupéré, une partie (environ 10 ml) est congelée à -80°C en vue d'un stockage à long terme, le reste est conservé à 4°C et le titre du virus sera déterminé.

4.4. Détermination du titre viral.

La technique utilisée est celle du "plaque assay". Les dilutions sérielles de 10 en 10 sont effectuées jusque 10^{-8}. On compte le nombre de plaques recombinantes, le calcul du titre se fait de la façon suivante : Nombre de plaques /dilution = pfu/ml.

On utilise la formule suivante pour déterminer la quantité d'inoculum viral pour infecter à une MOI déterminée :

Nombre de ml d'inoculum = MOI (pfu/cellule) x Nombre de cellules/ titre du virus (pfu/ml).

En général pour avoir une bonne production de protéines, on infecte les cellules à une MOI de 10. On détermine alors la cinétique de production de la protéine récupérée dans le surnageant si la protéine posséde un peptide signal, ou dans les cellules dans le cas contraire.

5. ANALYSE DE LA PROTÉINE

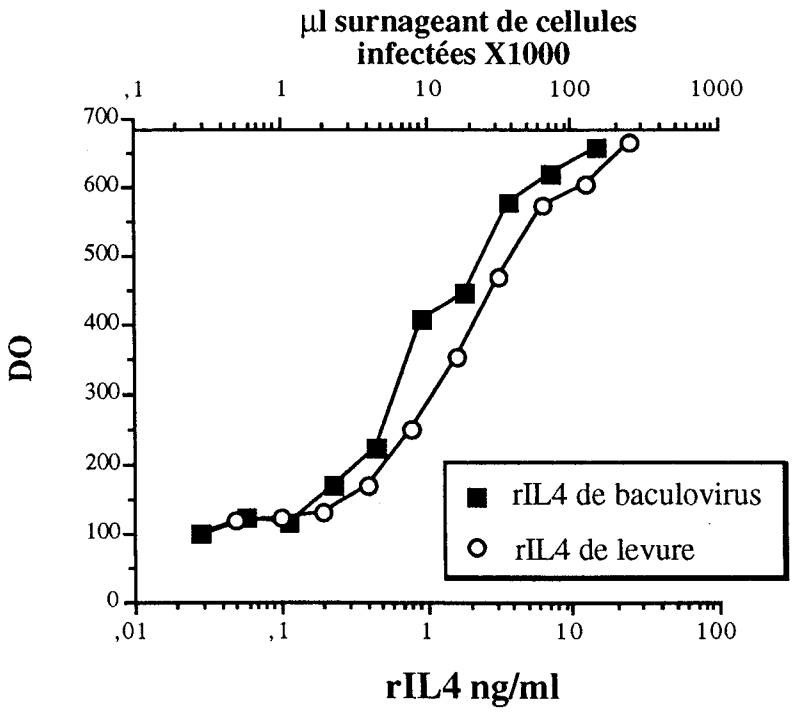
5.1. Caractérisation de la protéine:

5.1.1. Détection par ELISA

La détection d'IL-4 recombinante dans les surnageants de cellules infectées a été réalisée par une technique d'ELISA.

C'est une technique "sandwich" classique (Abrams et coll., 1992) qui utilise deux anticorps monoclonaux, le premier : 1D11, est fixé pendant 18 heures à 4°C au fond des plaques dans un tampon carbonate, 0,1 M pH8, 2 à raison de 0,1 µg/puits. Les plaques sont saturées en PBS, 3% BSA, puis les échantillons sont répartis dans les puits et incubés une nuit à 4°C. Les plaques sont lavées en PBS tween, et l'anticorps secondaire biotinylé : 24G2, est ajouté à raison de 0,1 µg/puits et incubé une heure à 20°C. Les plaques sont lavées; on ajoute ensuite l'avidine-péroxydase pendant 30 mn à température ambiante, La révélation se fait par l'addition du substrat chromogène de la péroxydase : l'OPD (O-phénylenediamine dihydrochloride). La réaction est stoppée par de l'HCl 1N. La plaque est analysée sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 492 nm.

On introduit, comme contrôle positif, de l'IL-4 recombinante commerciale produite chez la levure (Genzyme).



Dosage par la technique ELISA de l'IL-4 produite par les cellules infectées par le baculovirus recombinant ou de l'IL-4 contrôle produite chez la levure.

Par comparaison avec l'IL-4 recombinante utilisée comme standard, on peut estimer la quantité d'IL-4 présente dans le surnageant de cellules infectées (P3) à 20 µg/ml.

D'autre part, l'étude par ELISA de la cinétique d'expression de l'IL-4 dans les surnageants de cellules infectée montre que cette protéine est produite dès 24 heures à 4 ng/ml et atteint un maximum à 48 heures de 20 µg/ml.

5.1.2. Western blot

Les échantillons sont analysés sur SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Nous avons utilisé des gels d'acrylamide à 15%, avec un gel de concentration de 5%. L'immunodétection de l'IL-4 recombinante a été effectuée après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.

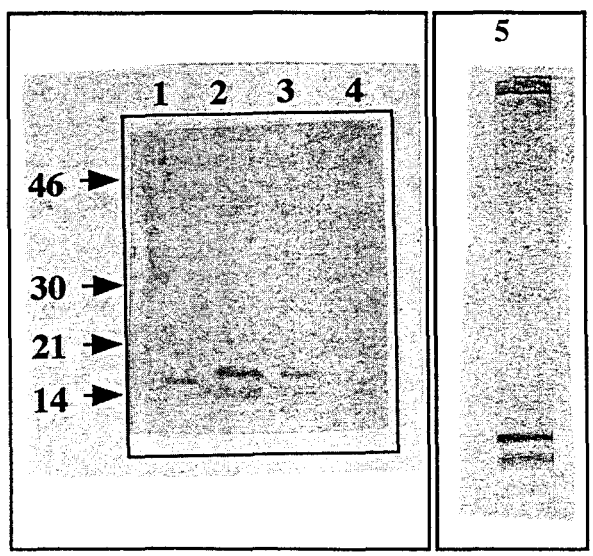
•saturation de la membrane en PBS 5% lait au moins 3 heures à température ambiante.

•on ajoute le monoclonal de rat 1D11, anti-IL-4 au 1/500° en PBS 5% lait, 0,1% Triton X100, 0,01% Tween 20. Pendant 18 heures à 4°C sous agitation.

•après lavage de la membrane, on ajoute un anticorps de lapin anti-immunoglobulines totales de rat au 1/250° (Nordic) pendant 1 heure 30 à température ambiante.

•après lavage, on ajoute un anticorps anti-immunoglobulines de lapin marqué à la péroxydase (Diagnostic Pasteur) au 1/500° pendant 1 heure 30 à température ambiante.

•On révèle avec du DAB (Diaminobenzidine tétrahydrochloride) 0,1% avec 0,02% d'H_2O_2.



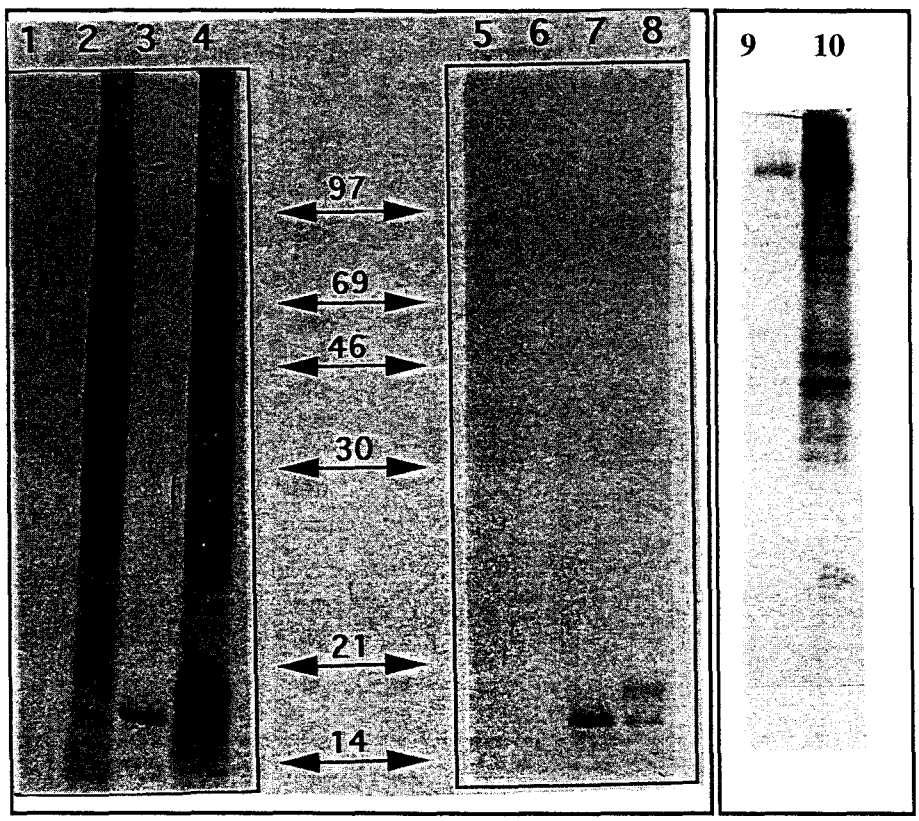
Analyse par Western blot des surnageants de cellules infectées par le baculovirus recombinant. Ligne **1**: rIL-4 de levure. Ligne **2** : surnageant de cellules infectées avec pIL4-BlueBac après 72h. Ligne **3** : surnageant de cellules infectées avec pIL4-BlueBac après 24h. Ligne **4** : cellules non infectées. Ligne **5** : surnageant P3.

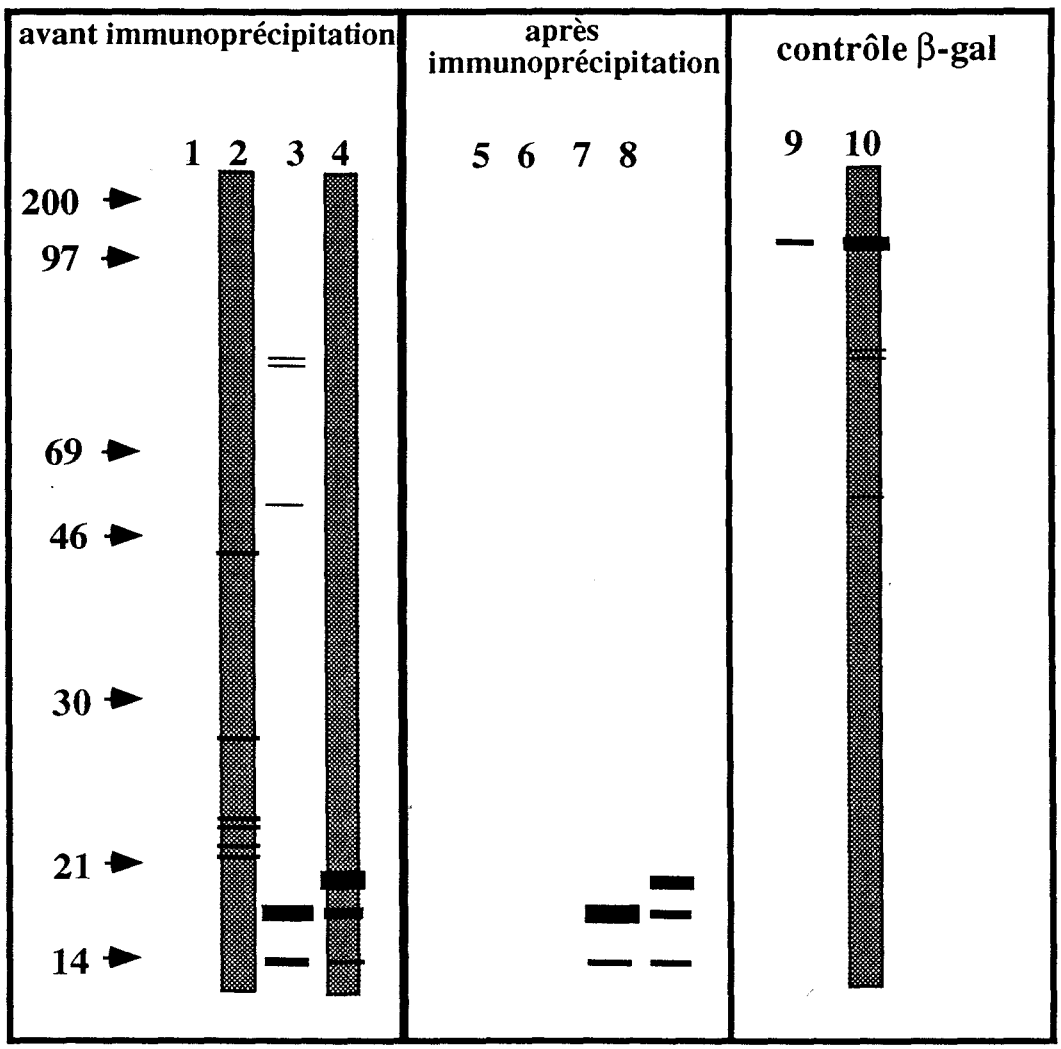
Sur la figure précédente, on peut distinguer deux bandes spécifiques dans les surnageants de cellules infectées, respectivement de 14 et 17 kDa. L'IL-4 recombinante de levure présente quant à elle un poids moléculaire apparent de 15 kDa (piste 1). La molécule de 14 kDa correspond à la

protéine mature non glycosylée. On peut supposer que les formes de 15 et 17 kDa correspondent à différents types de glycosylation de la protéine obtenue par des systèmes d'expression eucaryotes différents. L'IL-4 physiologique présente un poids moléculaire apparent de 17 à 20 kDa et après déglycosylation de 14 à 16 kDa (Banchereau, 1990). Apparemment, on obtient dans les surnageants de cellules infectées environ 70% de la forme glycosylée et 30% de la forme non glycosylée.

5.1.3. Marquage métabolique et immunoprécipitation

Les cellules SF9 sont réparties à raison de 10^6 cellules par puits et pendant quatre heures infectées à une MOI de 10 avec le virus recombinant IL-4 ou le virus recombinant β-galactosidase (virus témoin contenant deux gènes de la β galactosidase, l'un sous le contrôle du promoteur P10, l'autre sous celui de la polyhédrine Invitrogen). Trente heures après l'infection, les cellules sont lavées en milieu Grace's sans méthionine, puis laissées deux heures dans ce milieu avec ou sans sérum de veau fœtal dialysé. Après deux heures, le milieu est de nouveau changé, on rajoute alors 300 µCi de méthionine ^{35}[S] par puits pendant 4 heures. Le surnageant est alors récupéré et centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Les cellules sont lysées dans un tampon contenant du Tris 50 mM pH 7,4, 150 mM NaCl et 1% Triton X100.





Analyse des différentes formes d'IL4m dans les surnageants et les culots cellulaires après marquage métabolique suivi ou non d'une immunoprécipitation. Ligne **1**, **3**, et **9** : culots cellulaires provenant respectivement de cellules non infectées, de cellules infectées par pIL4-BlueBac ou par le contrôle β-galactosidase. Ligne **2**, **4** et **10** surnageants des mêmes cellules. Lignes **5** et **7** immunoprécipités avec un anticorps anti-IL-4 sur des culots provenant respectivement de cellules non infectées ou de cellules infectées avec pIL4-BlueBac. Lignes **6** et **8** : immunoprécipités sur les surnageants des mêmes cellules.

Analyse des surnageants

Après marquage métabolique pendant quatre heures, on retrouve le même profil que celui obtenu avec l'étude par Western blot, c'est à dire deux bandes, l'une de 14 kDa et l'autre de 17 kDa. Avant immunoprécipitation, on remarque que ce sont pratiquement les seules molécules sécrétées détectables pendant ce laps de temps. L'immunoprécipitation confirme que ces deux formes protéiques sont de l'IL-4 recombinante (piste7). Le surnageant des cellules infectées par un virus recombinant ne contenant que le gène de la β-galactosidase, qui sert de contrôle, contient une protéine dont la taille est approximativement de 100 kDa, ce qui correspond à la taille de la β-galactosidase (110 kDa)(piste 9).Aucune protéine n'est précipitée par l'anticorps anti IL-4 dans ces surnageants témoins.

Analyse des culots

Après lyse des cellules infectées, on remarque que les deux bandes correspondant à l'IL-4 recombinante (14 et 17 kDa) sont très fortement marquées, ce qui montre que c'est une des principales protéines produite à ce stade de l'infection (piste 4). Après immunoprécipitation de ces culots cellulaires, on remarque en plus des deux bandes de 14 et 17 kDa, une troisième bande de 19 kDa (piste 8). Cette protéine est reconnue par l'anti-IL-4, il s'agit donc d'une troisième forme d'IL-4 intracellulaire Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la présence de cette troisième bande :

•il peut s'agir d'une forme hyperglycosylée.

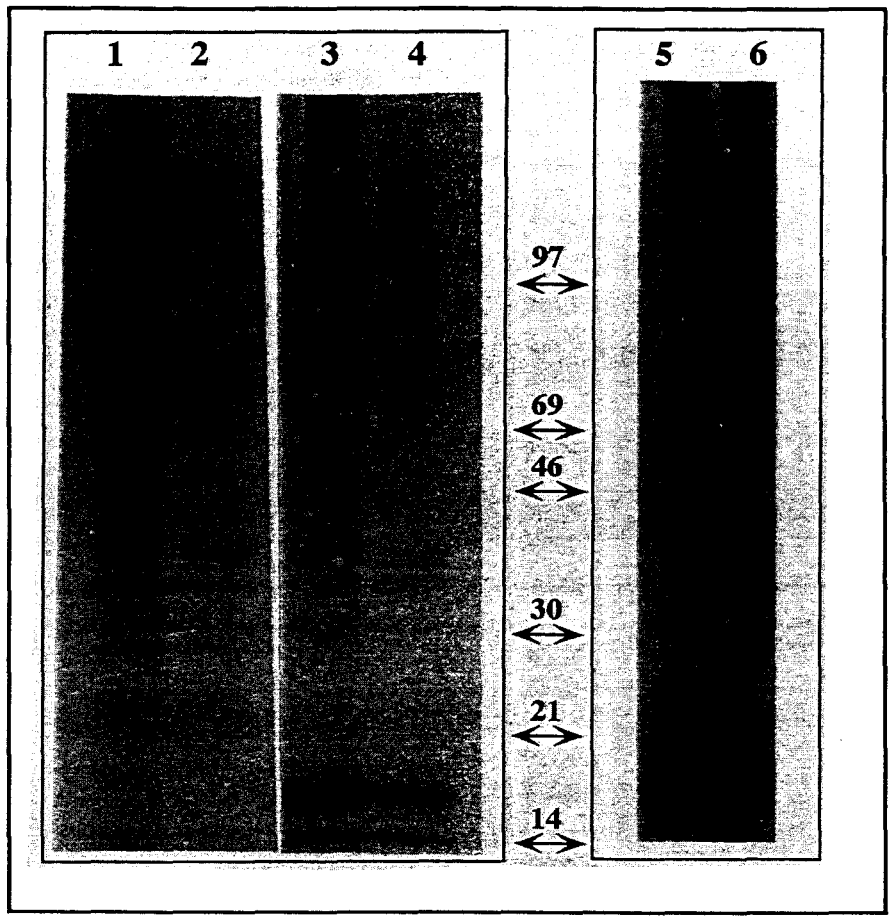
•ou d'une préprotéine glycosylée dont le peptide signal n'a pas été coupé; un précédent ayant déjà été décrit dans le cas de l'IL2 (Smith et coll., 1985)

•ou d'une protéine de fusion. En effet, les premiers plasmides de transfert étaient construits après une délétion du gène de la polyhédrine, mais on s'est rendu compte qu'une plus grande efficacité de transcription était obtenue si on conservait la partie 5' non traduite ainsi que les 35 premiers acides aminés de la polyhédrine. Pour éviter la traduction d'une protéine de fusion, le codon de départ de la polyhédrine a été muté de AUG en AUU. Malheureusement, dans certains cas, si le gène d'intéret est inséré dans un cadre ouvert de lecture avec ce codon AUU, on observe malgré tout l'expression d'une protéine de fusion entre les 35 premiers acides aminés de la polyhédrine et la protéine recombinante qui démarre au codon muté (Beames et coll., 1991). Or, le gène de l'IL-4 murine a été inséré dans un cadre ouvert de lecture par rapport à ce codon de départ muté; la protéine observée pourrait donc correspondre à une protéine de fusion non glycosylée : 3 kDa de polyhédrine, 2 kDa de peptide signal et 14 kDa d'IL-4

Pour connaître la nature exacte de cette protéine, nous avons réalisé des expériences de déglycosylation.

5.1.4. Etude de la glycosylation

Nous avons étudié la glycosylation des protéines obtenues grâce à la propriété que présente la concavalline A en tant que lectine, à se fixer sur les sucres (α D mannose et α D glucose). Après un marquage métabolique des cellules grâce au ^{35}S, nous avons récupéré les surnageants et les culots cellulaires. Une partie des surnageants a directement été incubée en présence de billes de sépharose recouvertes de ConA. Après 5 heures d'incubation, le produit qui ne s'est pas fixé sur la ConA est récupéré et analysé sur un gel de polyacrylamide en parallèle avec le surnageant initial.



Etude de la glycosylation de l'IL-4 recombinante. Autoradiographie de surnageants ou d'immunoprecipités de culots de cellules infectées par le baculovirus recombinant (piste 3 à 6) ou de cellules contrôles (pistes 1 et 2) et marquée métaboliquement avec de la méthionine ^{35}S. Une partie des surnageants est incubée en présence de ConA-sépharose et déposée sur le gel (piste 2 et 4), à coté du surnageant total . Une partie des immunoprecipités des cellules infectées a également été incubée en présence de ConA-sépharose et est déposée sur le gel (piste 5) à coté de l'immunoprécipité total (piste 6)

La comparaison des bandes obtenues par autoradiographie avant et après passage sur les billes de ConA-sépharose confirme que la bande de 17 kDa est bien une protéine glycosylée (puisqu'elle est retenue sur les billes) alors que la forme de 14 kDa n'est pas glycosylée.

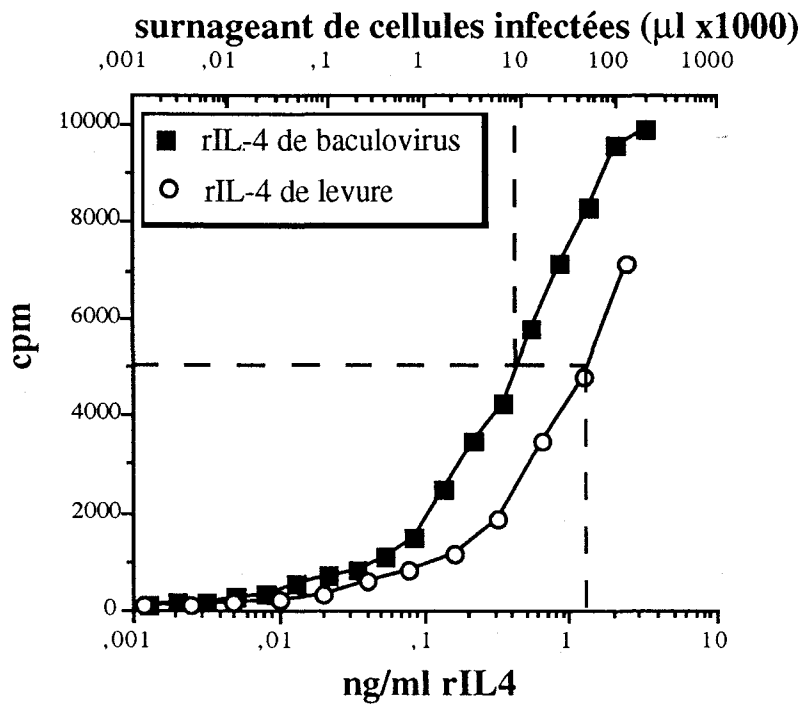
D'autre part, pour analyser l'éventuelle glycosylation de la forme intracellulaire de 19 kDa, nous avons réalisé une immunoprécipitation des culots de cellules marquées à la méthionine ^{35}S et une partie de cette immunoprécipitation a été incubée en présence de billes de ConA-sépharose.

L'analyse de ce film autoradiographique montre que la forme protéique de 19 kDa n'est pas glycosylée puisqu'elle n'est pas retenue sur les billes de ConA-sépharose. Ceci renforce donc la thèse d'une protéine de fusion entre les 35 premiers acides aminés de la polyhédrine et l'IL-4. Cette forme qui n'a pas de peptide signal fonctionnel n'entre pas dans le réticulum endoplasmique. Elle n'est donc ni secrétée, ni glycosylée.

5.2. Caractérisation de l'activité biologique

L'activité biologique de l'IL-4 murine est appréciée grâce à la lignée murine CTL-L-2 dépendante d'IL-2 pour sa croissance et en moins grande proportion d'IL-4 de souris.

Le principe de ce test est le suivant : les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance, 48 heures après stimulation par de l'IL-2r. Après deux étapes de lavage qui permettent d'enlever l'IL-2 résiduelle, les cellules sont réparties en plaques de 96 puits à raison de 10^4 cellules/puits. Des dilutions sérielles de 2 en 2 sont effectuées sur des surnageants de cellules infectées par le baculovirus recombinant pour l'IL-4 de même que pour le standard IL-4 recombinant de levure. L'activité biologique de l'IL-4 standard a été déterminée par la société qui le commercialise. Les différentes dilutions de surnageants à tester sont déposées sur les cellules, puis incubées 48 heures à 37°C. Dans les 8 dernières heures, on procède à l'incorporation de thymidine tritiée qui permettra de suivre la multiplication cellulaire en fonction de la quantité d'IL-4 présente.



Incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTL-L-2 activées avec différentes concentrations d'IL-4 provenant soit d'IL-4 recombinante produite chez la levure (comme contrôle positif) soit de surnageants de cellules infectées par un baculovirus recombinant.

Un témoin sans IL-4 nous permet de contrôler la dépendance des cellules à l'IL-2 ou à l'IL-4. (Ces cellules conservées longtemps en culture perdent leur dépendance) Dans ce témoin, les cellules meurent habituellement dans les 8 premières heures.

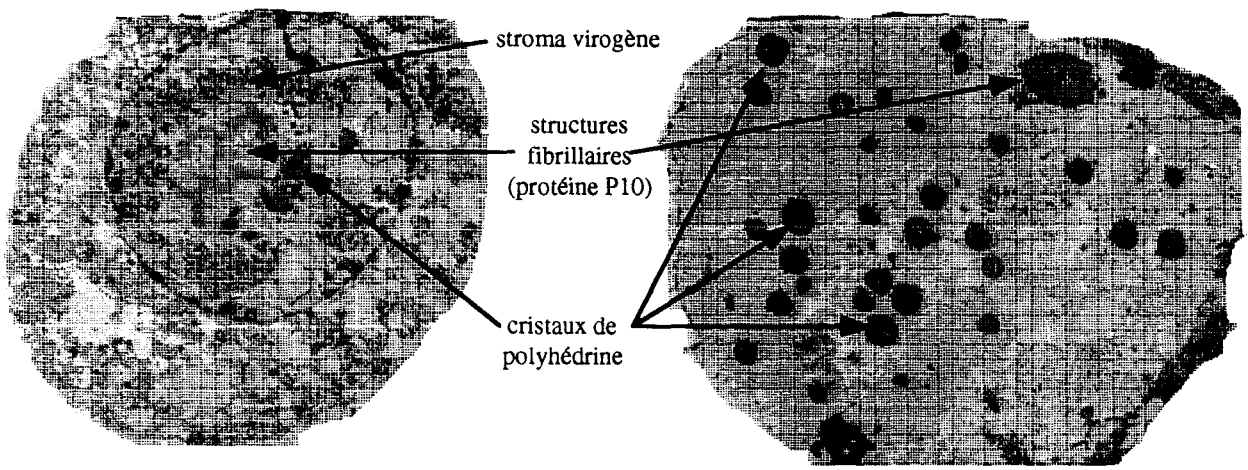
Afin de savoir si la prolifération est bien due à la présence d'IL-4m, on rajoute une étape supplémentaire : les surnageants testés sont incubés avec un anticorps anti-IL-4m (11B11) qui bloque la prolifération IL-4 dépendante des cellules. (afin de déterminer une éventuelle cytotoxicité de l'anticorps, on réalise un témoin où les cellules CTL-L-2 sont additionnées d'IL-2 pour leur croissance et d'anticorps anti-IL-4m à la concentration la plus élevée)

Nous avons donc constaté que l'IL-4m recombinante produite par les baculovirus est biologiquement active, en induisant une prolifération IL-4 spécifique de la lignée CTL-L2 (l'addition d'anti-IL-4 inhibe cette prolifération). La définition d'une unité en activité biologique est la quantité de facteurs de croissance nécessaires pour induire 50% du maximum de prolifération. L'IL-4m produite par notre système d'expression en baculovirus possède une activité biologique de 1U pour 8.10^{-3} µl de P3 ce qui équivaut à 1 unité pour 160 pg d'IL-4. Cette proteine a donc une activité biologique de $2,5.10^{7}$ U/mg (l'IL-4 murine de levure est commercialisée avec une activité biologique de 2.10^{7} U pour 1 mg).

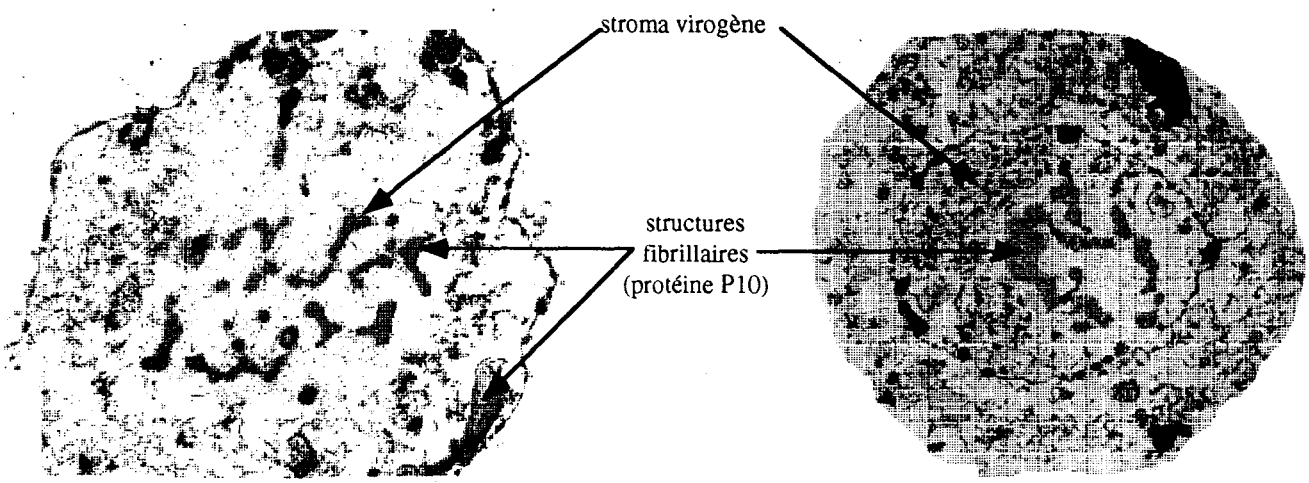
Si on compare l'activité de l'IL-4 de levure par rapport à sa quantité appréciée par ELISA on note qu'une unité de levure correspond à 1,3 ng. Cette interleukine est commercialisée avec une activité de 1 unité pour 0,20 ng. Cette différence est due soit à une différence dans la sensibilité de la lignée de cellule CTL-L2 utilisée, soit à une perte de l'activité biologique de l'IL-4 conservée à -20°C.

5.3. Analyse de l'expression d'IL-4 par immunofluorescence

Pour caractériser les voies de sécrétion à l'intérieur de la cellule d'insecte infectée par un baculovirus recombinant, nous avons réalisé des expériences d'immunomarquage (Waterfield et coll., 1991). Après 48 heures d'infection à une MOI de 10, les cellules sont prélévées, lavées avec du PBS et déposées sur une lame par centrifugation (500 t/mn pendant 2 mn). Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 18 heures et perméabilisées par un bain de 2 heures dans une solution de PBS + 0,1% triton X100. Les cellules sont ensuite marquées pendant 20 mn à 37°C avec un anticorps anti-IL-4 biotinylé. Celui-ci est révélé avec une streptavidine couplée à de la phycoérythrine. La fluorescence rouge est ensuite analysée soit avec un microscope optique fluorescent ou avec un microscope confocal.



Cellules Sf9 infectées avec un Baculovirus sauvage



Cellules Sf9 infectées avec un Baculovirus recombinant

DU LILLE

5.4. Caractérisation structurale de la cellule d'insecte transfectée

Les cellules SF9 sont infectées pendant 40 heures avec une MOI=10.

Elles sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde, incluses dans une résine, puis les coupes sont réalisées avec un microtome et les préparations sont traitées pour la microscopie électronique.

6. ARTICLE

Murine IL-4 production with baculovirus : an easy and rapid method for a small scale production of functional interleukins

by Françoise Cottrez, Claude Auriault, Jean-Pierre Kusznier, and Hervé Groux

from Unite CNRS-URA 1854, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Pr. A. Calmette, 59019 Lille Cedex

Immunological experimentations often require large quantities of interleukins especially for the culture of dependent cell lines used in biological assays, for in vivo injection, or for the production of specific monoclonal antibodies.

The baculovirus provides an effective expression system for the production of large quantities of recombinant proteins in insect cells (Summers & Smith, 1988). It present several avantages over others expression systems : proteins are produced in high quantity (in µg/ml) with equivalent post-transcriptional processings and glycosylations as in mammalian cells. Moreover, the presence of a signal peptide allows the secretion of the protein in the insect cells culture supernatant. Insect cells can be handled routinely in a laboratory involved in mammalian cell culture without the troubleshooting of contaminations sometimes encountered with E. coli and mostly with yeast expression systems. Moreover, as interleukines are secreted at high concentration in the insect cell medium, which is closely related to mammalian cells culture media, it can be used directly without further purification for routine lymphocyte culturing. This is not the case for bacterial or yeast recombinant protein production.

Recombinant baculoviruses are formed by homologous recombination in insect cells, after cotransfection of viral DNA and a transplacement plasmid containing the gene of interest (Summers & Smith, 1988). The recombinant frequency is between 10^{-2} and 10^{-3}. Since the introduction of the foreign gene deletes or inactivates the baculovirus polyhedrin gene, recombinant virus fails to produce inclusion bodies in infected cells. Therefore, cells infected with recombinant and wild type virus can be distinguished by visual inspection of viral plaques formed in soft agar. However, this procedure required considerable experience and adequate plaques need to be picked and characterized further by DNA or immunoblotting techniques. Another possibility is to use a transplacement plasmid which coexpresses the gene of interest and a marker for the detection of recombinant viruses, the most usually used is the β-galactosidase gene (pBlueBac, Invitrogen) (Vialard, et al., 1990). With this type of marker, recombinant viruses, which have integrated both the recombinant and the β-galactosidase gene, are detected in soft agar plates containing X-gal, by visual inspection of typical blue viral plaques.

Besides, one can now easily obtained the synthetic cDNAs for the interleukin of interest with appropriate restriction sites for direct cloning into the transplacement plasmid with PCR techniques.

Here we report the use of this strategy to produce murine IL4 into the culture supernatant of infected insect cells.

Materials and methods

Viruses and cells

Standard methods of gene expression using the baculovirus vector system were used as previously described by Summers and Smith (Summers & Smith, 1988). The cell line *Spodoptera frugiperda* (Sf9) was propagated as a monolayer in

TNMFH medium (Sigma, France) containing 10 % fetal calf serum or in Sf900-II (Gibco-BRL, France) a medium containing no trace of protein. Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) (In vitrogen) and recombinant virus stock were propagated on Sf9 cells.

The CTL-L2 cell line which is responsive to both IL2 and IL4 was used to determine IL4 activity in culture supernatants of infected Sf9 cells. The cell line was routinely cultured in RPMI 1640 + 10% FCS and 10 U/ml rIL2 (Boehringer Mannheim).

Construction of synthetic IL4 cDNA

A synthetic cDNA for murine IL4 was produced with the PCR technique by using the following 2 primers : the 5' primer containing a restriction site for Nhe1, the ATG start codon and 25 mers specific for mIL4 cDNA (Nona, et al., 1986) (Lee, et al., 1986): 5'-AGTCACGCTAGCTTGATGGGTCTCAACCCCCAG-3' ; and the 3' primer specific for the 3' end of the mIL4 cDNA and containing a restriction site for BamH1 : 5'-TGAACGGGATCCACTACGAGTAATCCATTTGC-3'. This PCR fragment was subcloned into the PCRII plasmid using the TA cloning technique as described by the manufacturer (Invitrogen). The sequence of the insert was analyzed with the Autoread sequencing kit (Pharmacia, France) and the automatic DNA sequencer ALF (Pharmacia, France).

Construction of recombinant baculovirus

The Nhe1/BamH1 insert specific for mIL4 cDNA from the PCRII plasmid was excised and inserted in the pBlueBac plasmid (Vialard, et al., 1990). 3 µg of the pBlueBac-mIL4 plasmid was cotransfected with 1 µg of linearized AcNMPV DNA into Sf9 cells by using cationic liposomes. After 48 h, cells were washed and cultured for another 48 h period. The supernatant was then collected and the virus stock was further amplified on Sf9 cells during 6 days. The corresponding virus stock was then checked by PCR for the presence of recombinant virus with the IL4 specific primers and for the presence of the IL4 protein by using an ELISA assay.

Selection of recombinant viruses

The selection was performed with plaque assay by using the blue color provided by the expression of the β-galactosidase gene coexpressed with the gene of interest in the recombinant virus. In 6 well plates, cells in soft agar containing 150 µg/ml of X-Gal (Sigma, France) were infected with serial dilutions of virus stock and after 8 days blue colonies were picked out with a sterile tip. The virus was then expanded on fresh Sf9 cells for another round of 5 days and the new virus stock selected again by plaque assay. Three rounds of purification were necessary to obtain pure IL4 recombinant virus. This recombinant virus was then expanded to obtain a large virus stock which was titrated by plaque assay in order to obtain a synchronous infection and to measure the multiplicity of infection (MOI). The recombinant IL4 was then produced by infecting Sf9 cells at a MOI of 10.

Detection of IL4

An ELISA assay was developped for the detection of IL4 using 1D11 (Pharmingen) as a capture antibody and the biotinylated 24G2 (Pharmingen) monoclonal antibody for the detection of captured IL4. The biotin on the second antibody was detected with a peroxidase coupled-streptavidin (Sigma, France) plus DAB (vectastain, Vector).

IL4 activity was evaluated on CTL-L2 cell line as previously described (Paul & Ohara, 1987). A yeast derived IL4 (Genzyme, France) was used as internal reference for IL4 activity.

Radiolabeling and immunoprecipitation

Sf 9 cells in 24 well plate (10^6cells/well) were infected at a MOI of 10 with the recombinant baculovirus containing the IL4-gene during 4 hr. At 30 hr post infection cells were washed in Grace's medium lacking methionine. After 2 hr of starvation, 300 µCi of ^{35}[S]-methionine were added per well. Labeling was carried out for 4 hr. Media and cells were separated by low-speed centrifugation. Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM) and 0.5 µg/ml each of trypsin inhibitor, aprotinin, pepstatin and TLCK were added to the supernatants to inhibit proteolysis. Cell pellet was lysed with a buffer containing 50 mM Tris pH 7.4; 150 mM Nacl; 1% NP40 and protease inhibitors. Immunoprecipitation was carried out with anti-IL4 mAb (1D11, Pharmingen) and a secondary antibody (rabbit anti-rat IgG, Nordic) coupled to protein A Sepharose beads (Pharmacia, France). Total radiolabeled proteins or immunoprecipitates were analysed by SDS-PAGE (15% gels). Gels were fixed with 50% methanol, 10% acetic acid, fluorographed with amplify (Amersham, France), dried and autoradiographed.

Western blotting

Following SDS-PAGE (15% gels), proteins were transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting. Membranes were blocked with 5% dry non fat milk in PBS and then incubated with the primary antibody (1D11 anti-IL4 mAb, 0.5 µg/ml in PBS containing 5 % of dry nonfat milk, 0.1% triton X100 and 0.05% Tween 20%) for 18 hr. Following washing, membranes were incubated with a second antibody (rabbit anti-rat IgG, Nordic, 1/250 serum dilution) for 1 hr 30 and then with a peroxidase-conjugated antibody (sheep anti-rabbit IgG, Pasteur Diagnostic, 1/500 dilution) and finally developed using the DAB Vector Stain substrate kit (Vectastain, Vector).

Deglycosylation

For the deglycosylation experiment, SF9 cells in culture were infected at a MOI of 10 and 3 days later the supernatant was collected. .

Immunofluorescence

24 or 48 hours after infection, cells were collected and cytospun at 400 g for 2 mn. After a 12 hours period in PFA 4% for fixation, cells were permeabilized with 0.1 % triton in PBS during 1 hour. Slides were incubated for 1 hour with a biotinylated anti-IL4 mAb and detection was performed with Phycoerythrine-Streptavidin (30 mn incubation) and analysed by confocal microscopy.

Results

Production of IL4 in Sf 9 infected cells

The synthetic cDNA coding for murine IL4 was inserted adjacent to the polyhedrin promotor in a specially constructed plasmid transfert vector pBlueBac (Invitrogen) (Vialard, et al., 1990). The synthetic IL4 cDNA was obtained by PCR and contain the starting codon and 5' leader sequence in order to obtain a secreted protein form from infected insect cells (Nona, et al., 1986) (Lee, et al., 1986). pIL4-BlueBac was mixed with linearized AcNPV cDNA and transfected by the cationic liposome technique into Sf9 cells. Recombinant viruses were selected by plaque assay with the distinctive blue color provided by the β galactosidase gene inserted in the transplacement plasmid.

To assess the time course and the amount of IL4 secreted by infected cells we compare the IL4 activity of infected Sf9 supernatants with a yeast derived recombinant IL4 (Genzyme) both by an ELISA assay (Fig 1) and by the CTL-L2 response (Fig 2). With a MOI of 10, IL4 can be detected in infected supernatants as early as 24 hr after infection, with a maximun production at 72 hr. By comparison with the yeast derived rIL4 one can estimate at 25 µg/ml the amount of IL4 in the supernatant of infected Sf9 cells 72 h after infection.

To obtain the half maximun of stimulation of CTL-L2 cells one required 2 ng/ml of recombinant yeast derived IL4 (Fig 2), the same level of ^{3}[H]-TdR incorporation was achieved by 8.10^{-3} µl of infected cells supernatant. Thus, the biological activity for 1 mg of Bac-IL4 correspond to 2.5. 10^{7} U/mg of rIL4 reference.

Comparison of yeast derived and baculovirus derived IL4

The biochemicals features of recombinant IL4 produced in the insect cells were compared with yeast derived IL4 (Fig 3). Immunoblot analysis revealed that the insect material separated into 2 components, a major species at 17 kDa and a minor species at 14 kDa (Fig 3: lane 2, 3 and 4). The yeast derived rIL4 migrate at an intermediate length corresponding to 16 kDa (Fig 3 lane 1). The minor component in infected cells supernatants may represent the non-glycosylated IL4 polypeptide whereas the yeast derived and the major componant in insect cells supernatants may represent variants in glycosylation.

Identification of IL4 produced in infected insect cells.

To further identify the IL4 polypeptides being made, IL4 infected cells were incubated with ^{35}[S] methionine at 30 hr post infection during 4 hr. Then the labeled proteins from infected cells or the culture media were either run on a SDS-PAGE or immunoprecipitated with anti-IL4 mAb. The 17 kDa and 14 kDa bands detected by Western blotting were major labeled proteins in the infected cells (Fig 4 lane 4) and almost the only protein forms detected in the culture medium (Fig 4 lane 3). These proteins (Mr 14 and 17 kDa) were immunoprecipitated with anti-IL4 mAb from cell pellets and cell supernatants

(Fig 4 lane 7 and 8). In addition, immunoprecipitations revealed that one IL4-related Mr 19 kDa protein was present in cell pellets. This protein was not detected in the culture medium. Different explanations can account for the presence of this intra-cellular Mr. 19 kDa IL4 protein. It can be a hyperglycosylated, non secreted form, a glycosylated pre-IL4 form (as already described for IL2 expressed in the baculovirus expression system (Smith, , et al., 1985) or a fusion protein with the 35 first amino acid of polyhedrin (as already described (Beames,, 1991). We have analyzed the glycosylation of IL4 to determine the nature of these different protein forms.

Analysis of glycosylated forms of rIL4

The glycosylation of IL4 was assessed by using ConA-sepharose beads. After radiolabeling with ^{35}S-methionin, cell supernatants were incubated during 5 hours with ConA-sepharose beads. Beads were then centrifuged and supernatants were loaded on a 15% polyacrylamide gel and analyzed by autoradiography. After incubation on ConA-sepharose beads, one observed a less intense 17 kDa band, as compare with the non treated supernatant (Figure 5, lane 2 and 3) whereas the intensity of the 14 kDa band remain the same. This result demonstrates the presence of N-linked sugars (Paul & Ohara, 1987) (which is in accordance with the 3 N-glycosylation sites described on the primary sequence (Lee, et al., 1986), (Nona, et al., 1986)) and suggests that the heterogeneity in migration shown by the recombinant molecules in SDS-PAGE analysis (Fig 3 and 4) may be due to differences in glycosylation.

Then, to analyze whether the 19 kDa intracytoplasmic form was glycosylated or not, we have performed immunoprecipitation experiments on cell pellet metabolically labeled with ^{35}[S]-Methionine with an anti-IL4 monoclonal antibody. One half of the immunoprecipitate was incubated during 5 hours on ConA-sepharose beads and loaded on polyacrylamide gel beside the second half. In this case, no diminution in the intensity of the bands can be detected after incubation on ConA-sepharose beads, suggesting that this 19 kDa protein form is not glycosylated.

In conclusion, the 19 kDa intracytoplasmic form appears to be a fusion protein between the 35 first amino acid of polyhedrin and murine IL4. This protein, which lacks a signal peptide is not secreted in the culture supernatant.

Immunodetection of IL4 in infected cells.

To characterize the secretory pathway of rIL4 in the infected insect cells we have performed immunofluorescence detection of IL4 by using a biotinylated anti-IL4 mAb and confocal analysis. The highest fluorescent signal was in a perinuclear location, a site characteristic of the Golgi apparatus (Fig 5a), and moreover a clear immunofluorescence can be detected in secretory vesicles present in infected cells (Fig 5b), showing that the rIL4 is produced and secreted in the infected insect cells via a similar pathway to the one use in mammalian cells.

Discussion

We have described a simple experimental strategy for the production of recombinant interleukins in the baculovirus expression system. The main problem in baculovirus technology is the selection and the purification of recombinant virus. Usually, the selection is based upon the deletion or insertional inactivation of the polyhedrin gene resulting in the production of occlusion negative viruses, which form plaques that are distinctively different from those of wild type, occlusion positive viruses. However, the visual detection of recombinant plaques requires considerable experience. Another method, especially in the case of secreted recombinant proteins, relies on direct testing for the biological activity of the proteins. If the strategy seems easy and fast, it is hampered by the fact that one cannot check for the presence of trace of wild type viruses in the recombinant stock virus selected. As the replication rate of the wild type virus is often higher than the one of recombinant virus, after several rounds of infection the recombinant virus is less and less pure. An alternative approach, whereby two different promoters controlling β-galactosidase and foreign gene expression recombine as a unit with wild-type viral DNA has proven to be very successful. Recombinant virus was visualized as blue plaques when β-galactosidase indicator was included in the agar overlay of plaque assays. We have used such a transplacement vector designed to accelerate the screening of recombinant virus. This vector contained two promoters active very late in infection: the P10 promoter and polyhedrin promoter (pBlueBac, Invitrogen). With this construction, recombinant plaques were easily detected and picked out, and thus only three rounds of selection were necessary to isolate a pure recombinant virus.

The amount of IL4 in culture supernatants of infected cells increased and reached a plateau at 72 hr post infection. Supernatants contained approximatively 20 μg/ml of recombinant IL4 with a biological activity of 2.5 X 10^7 U/mg as assessed on CTL-L2 response. This result shows that we obtained high quantity of a biologically active IL4 which can be used directly (without further purification) for routine lymphocyte culturing or other immunological experiments.

Visualisation of recombinant IL4 by Western blotting or metabolic radiolabelling with ^{35}[S]-methionine techniques at 48 hr post infection in culture supernantants or cell pellets revealed two characteristic bands of 14 and 17 kDa in the former and three bands of 14, 17 and 19 kDa in cell pellets. All this material was specifically immunoprecipitated with an anti-IL4 mAb. Incubation on ConA-sepharose beads shows that the two secreted bands are respectively unglycosylated and glycosylated forms of IL4, the latter being more abundant in cell culture supernatants. The third band of 19 kDa ,which was detected in the cells, could be either a hyperglycosylated, non-secreted form, a glycosylated pre-IL4 (Smith, et al., 1985) or a fusion protein (Beames, et al., 1991). As this band of 19 kDa was not absorbed on ConA-sepharose beads, it seems to be a polyhedrin-IL4 fusion protein (Beames, et al., 1991). Indeed, for obtimal protein expression, the pBlueBac vector, like other communly used baculovirus transfert plasmid, has

retained the polyhedrin 5' non-translated region and the first 35 bases of the structural gene, but with the polyhedrin initiator AUG mutated to AUU. Translation was expected to begin at the initiator AUG of the foreign gene, while the polyhedrin translation would be prevented by the altered AUU codon. However, it has already been shown that genes cloned in-frame with the mutated polyhedrin AUU codon are expressed both as a normal recombinant protein and as a fusion protein that contains the amino terminus of the polyhedrin polypeptide. We have cloned the IL4 gene in-frame with this altered AUU codon. Moreover, the apparent molecular weight of this protein (19 kDa : 14 kDa for the IL4 polypeptide + 2 kDa for the signal peptide + 3 kDa for the polyhedrin polypeptide)) and the fact that it is not glycosylated (because of the absence of the normal signal peptide in this protein form) is in accordance with this explanation.

Finally, immunofluorescence experiment shows that the IL4 present in the supernatant was processed and released from the cells along a secretory pathway similar to the secretory pathway described for mammalian cells.

In conclusion we have described a simple, fast and easy system using baculovirus expression, to provide a convenient source of recombinant lymphokines for immunological experiments.

Beames, B., Braunagel, S., Summers, M. D., & Lanford, R. E. (1991). Polyhedrin initiator codon altered to AUU yields unexpected fusion protein from a baculovirus vector. BioTechniques, 11(3), 378-383.

Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Meyerson, P., Villaret, D., Coffman, R., Mosmann, T., Rennick, D., Roehm, N., C., S., Zlotnik, R., & Arai, K.-I. (1986). Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that express B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell derived mast cells-stimulating activities. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 83, 2061-2065.

Nona, Y., Sideras, P., Naito, T., Bergstedt-Lindquist, S., Azuma, C., Severinson, E., Tanabe, T., Kinashi, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., & Honjo, T. (1986). Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promotor. Nature, 319, 640.

Paul, W. E., & Ohara, R. L. (1987). B-cell stimulatory factor-1/Interleukin 4. Annu. Rev. Immunol., 5, 429.

Smith, G. E., Ju, G., Ericson, B. L., Moschera, J., H.-W., L., Chizzonite, R., & Summers, M. D. (1985). Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. Proc; Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404-8408.

Summers, M. D., & Smith, G. E. (1988). A manual of methods for baculovirus vectors and insect cells culture procedures.

Vialard, J., Lalumière, M., Vernet, T., Briedis, D., Alkhatib, G., Henning, D., Levin, D., & Richardson, C. (1990). Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the β-galactosidase gene. J. Virol., 64(1), 37-50.

Figure 1 : Detection and titration of IL4 produced in infected insect cells supernatant. ELISA specific for IL4 performed on serial dilutions of a commercially available rIL4 produced in the yeast system (lower axe and open circles) or on serial dilution of infected cells supernatant collected 72 hours after infection (upper axe and close scare). The assay was performed as described and the data shown are one representative experiment out of 4.

Figure 2 : Biological activity and titration of IL4 produced by infected SF9 cells. The IL4 biological activity present in serial dilutions of the media of pIL4-BlueBac infected cells (upper axe, close scare) was determined with the CTL-L2 assay as described and compared with a commercially available rIL4 produced in the yeast system (lower axe, open circles).

Figure 3 : Western blot analysis of IL4 present in pIL4-BlueBac infected cells supernatants. Infected cells supernatants were collected after various times of infection and loaded on a polyacrylamide gel. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane and revealed with an anti-IL4 monoclonal antibody

(1D11). Lane 1 : yeast derived recombinant IL4 as control. Lanes 2 to 4 : infected insect cells after 72 h (lane 2), 48 h (lane 3) and 24 h(lane 4).

Figure 4 : SDS-PAGE and IL4 immunoprecipitate analysis of supernantants or cells pellets from metabolically labeled pIL4-BlueBac infected SF9 cells. SF9 cells were infected with pIL4-BlueBac for 30 hr and incubated during 4 h with ^{35}[S] methionine. Then the labeled proteins from infected cells or from culture supernatants were either run on a SDS-PAGE or immunoprecipitated with anti-IL4 mAb. : supernatant (Lane 1) and pellet (Lane 2) of uninfected cells. Supernantant (Lane 3) and pellet (Lane 4) of pIL4-BlueBac infected cells. IL4-immunoprecipitate of supernatant (Lane 5) and pellet (Lane 6) of uninfected cells. IL4-immunoprecipitate of supernatant (Lane 7) and pellet (Lane 8) of pIL4-BlueBac infected cells.

Figure 5 : Glycosylation analysis of the different forms of IL4 produced in the baculovirus system expression. Cells were infected with pIL4-BlueBAC and metabolically labeled with ^{35}[S]-methionine. Cell pellets were immunoprecipitated with an anti-IL4 monoclonal antibody and both immunoprecipitates and cell supernatants were incubated with ConA-Sepharose beads. After centrifugation of beads, the supernatants were collected and loaded onto a polyacrylamide gel beside the same quantity of either IL4-immunoprecipitate from cell pellet or infected cell medium. pIL4-BlueBac infected cells supernatant before (Lane 1) or after (Lane 2) incubation on ConA-sepharose beads. IL4-immunoprecipitate of cell pellet (Lane 8) from pIL4-BlueBac infected cells before (Lane 3) or after (Lane 4) incubation on ConA-sepharose beads.

Figure 6 : Confocal analysis of pIL4-BlueBac infected cells labeled with an anti-IL4 monoclonal antibody. Infected cells (picture N°1 and 2) or uninfected controls (picture N°3) were immunolabeled with a biotinylated anti-IL4 monoclonal antibody revealed by a Phycoerythrine-Streptavidin complex and analyzed on a confocal microscope.

Les différentes figures sont présentées dans le mémoire

7. CONCLUSION

Nous avons décrit une stratégie expérimentale permettant la production de cytokines recombinantes dans le système baculovirus. L'obstacle majeur à la mise en place de ce système d'expression était la sélection et la purification des virus recombinants. Habituellement, cette sélection était basée sur la discrimination entre les virus sauvages capables de former des cristaux de polyhédrine dans les cellules infectées et les virus recombinants pour lesquels cette protéine est délétée ou inactivée du fait de l'insertion du gène recombinant. Cependant, la détection visuelle des plaques de lyse recombinantes nécessite une grande expérience dans l'inspection optique des plages de lyse virales. Nous avons utilisé une autre approche où dans le plasmide de transfert, deux promoteurs tardifs contrôlent à la fois l'expression du gène d'intérêt et celui de la β-galactosidase. Les plages de lyse contenant le virus recombinant sont alors détectées grâce à la couleur bleue caractéristique produite par l'action de la β-galactosidase sur son substrat inclus dans l'agarose des plaques. Avec ce type de vecteur de transfert, les plaques recombinantes sont très facilement détectables et on peut obtenir un virus recombinant pur après seulement trois cycles de sélection.

La quantité d'IL-4 recombinante présente dans les surnageants de cellules infectées atteint un plateau après 72 heures. Les surnageants contiennent en moyenne 20 µg/ml d'IL-4 recombinante ayant une activité biologique de $2,5 \times 10^7$ U/mg testée sur les cellules CTL-L2. Ceci montre que nous avons pu obtenir une très grande quantité d'IL-4 biologiquement active qui peut être utilisée directement pour la culture de cellules ou pour d'autres types d'expériences en immunologie.

Par les techniques de Western blot ou de marquage métabolique, la visualisation de l'IL-4 recombinante montre deux bandes de 14 et de 17 kDa dans les surnageants et trois bandes de 14, 17 et 19 kDa dans les culots cellulaires. Ces différentes protéines sont immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-IL-4, confirmant qu'il s'agit bien d' IL-4 exprimée sous différentes formes. Les deux formes secrétées sont respectivement les formes non glycosylées et glycosylées de l'IL-4, cette dernière étant la forme la plus abondante présente dans les surnageants cellulaires. La troisième bande de 19 kDa, qui n'est détectée qu'à l'intérieur des cellules est une protéine de fusion (Beames, et al., 1991) entre les 35 premiers acides aminés de la polyhédrine et l'IL-4 murine.

Enfin, les études d'immunofluorescence montrent que l'IL-4 présente dans le surnageant de culture des cellules infectées est maturée et sécrétée par les voies classiques de transport des protéines décrites chez les mammifères.

En conclusion, nous avons décrit un système simple et facile qui nous permet en utilisant le système d'expression du baculovirus, d'obtenir de grandes quantités d'interleukines qui peuvent être utilisées directement dans la plupart des expérimentations en immunologie.

8. BIBLIOGRAPHIE

Abrams, J. S., M. G. Roncarolo, H. Yssel, G. J. Anderson, G. J. Gleich, and J. Silver.: Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development. (1992) *Immunol. Rev.* **127** : 5.

Ada, G. L. "Vaccines." In Fundamental Immunology, Third Edition, ed. W.E. Paul. 1309. New York: Raven Press, 1993.

Alcover, A., F. Hervé, J.-P. Boursier, G. Spagnoli, D. Olive, R. A. Mariuzza, and O. Acuto.: A soluble form of the human CD8 alpha chain expressed in the baculovirus system : biochemical characterization and binding to MHC class I. (1993) *Mol. Immunol.* **30** : 55.

Banchereau, J.: Interleukine 4. (1990) *Medecine et Sciences* **6** : 946.

Banchereau, J.: The cytokine club. (1993) *BioFutur* **117** : 21.

Beames, B., S. Braunagel, M. D. Summers, and R. E. Lanford.: Polyhedrin initiator codon altered to AUU yields unexpected fusion protein from a baculovirus vector. (1991) *BioTechniques* **11** : 378.

Bhargava, P. M. and G. Schanmugan.: Uptake of non viral nucleic acids by mammalian cells. (1971) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **11** : 103.

Connell, N., C. K. Stover, and W. R. Jacobs.: Old microbes with new faces: molecular biology and the design of new vaccine. (1992) *Current Opinion Immunol.* **4** : 442.

De Boer, M., L. Conroy, H. Y. Min, and J. Kwekkeboom.: Generation of monoclonal antibodies to human lymphocyte cell surface antigens using insect cells expressing recombinant proteins. (1992) *J. Immunol. Methods* **152** : 15.

Devauchelle, G. and M. Cérutti.: Les baculovirus d'insectes vecteurs de genes étrangers. (1993) *Regard sur la Biochimie* **1** : 57.

Dodet, B.: Les voies de la thérapie génique. (1992) *BioFutur* **117** : 20.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen.: Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure. (1987) *Proc. natl. Acad. Sci.USA* **84** : 7413.

Fleer, R.: Engineering yeast for high level expression. (1992) *Current Opinion Biotech.* **3** : 486.

Fraley, R., R. M. Straubinger, G. Rule, E. L. Springer, and D. Papahadjopoulos.: Liposome mediated delivery of deoxyribonucleic acids to cells: enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions. (1981) *Biochemistry* **20** : 6878.

Gilboa, E., M. A. Eglitis, P. W. Kantoff, and W. French Anderson.: Transfert and expression of cloned genes using retrovirus vectors. (1986) *Biotechniques* **4** : 504.

Grabenhorst, E., B. Hofer, M. Nimtz, V. Jäger, and H. S. Conradt.: Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells. (1993) *Eur. J. Biochem.* **215** : 189.

Grace, T. D. C.: (1962) *Nature* **195** : 788.

Graham, F. L.: Adenovirus as an expression vecytors and recombinant vaccine. (1990) *Trends Biotech* **8** : 85.

Henderson, G. H., J. T. Conary, M. Summar, T. L. McCurley, and D. G. Colley.: In vivo molecular analysis of lymphocytes involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. I IL-4 mRNA, not IL-2 mRNA is abundant in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens of infected mice. (1991) *J. Immunol.* **147** : 992.

Hu-Li, J., J. Ohara, C. Watson, W. Tsang, and W. E. Paul.: Derivation of a T cell line that highly responsive to IL-4 and IL-2 (CT.4R) and of an IL-2 hyporesponsive mutant of that line (CT.4S). (1989) *J. Immunol.* **142** : 800.

Jallat, S.: Les souris transgéniques. (1991) *BioFutur* **102** : 3.

Kafatos, F. C., C. W. Jones, and A. Efstratiadis.: Determination of nucleic acid sequences homologies and relative concentrations by dot hybridization procedures. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7** : 1541.

Kitts, P. A. and R. D. Possee.: A method for producing recombinant baclovirus expression vectors at high frequency. (1993) *BioTechniques* **14** : 810.

Klein, B. K.: Effects of signal peptide changes on the secretion of bovine somatotropin (bST) from *Escherichia coli.* (1992) *Protein Engin.* **5** : 511.

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* **227** : 680.

Lee, F., T. Yokota, T. Otsuka, P. Meyerson, D. Villaret, R. Coffman, T. Mosmann, D. Rennick, N. Roehm, S. C., R. Zlotnik, and K.-I. Arai.: Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that express B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell derived mast cells-stimulating activities. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **83** : 2061.

McKnight, S. and R. Tjian.: Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. (1986) *Cell* **46** : 795.

Miner, J. N. and D. E. Hruby.: Vaccinia virus : a versatile tool for molecular biologists. (1990) *Trends biotech.* **8** : 20.

Mohler, K. M. and L. D. Butler.: Differential production of IL2 and IL4 mRNA in vivo after primary sensitization. (1990) *J. Immunol.* **145** : 1734.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Geidein, and R. L. Coffman.: Two types of murine helper T cell clone. (1986) *J. Immunol.* **136** : 2348.

Naviaux, R. K. and I. M. Verma.: Retroviral vectors for persistant expression in vivo. (1992) *Current Opinion in Biotech.* **3** : 540.

Nona, Y., P. Sideras, T. Naito, S. Bergstedt-Lindquist, C. Azuma, E. Severinson, T. Tanabe, T. Kinashi, F. Matsuda, Y. Yaoita, and T. Honjo.: Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promotor. (1986) *Nature* **319** : 640.

Paul, W. E. and R. L. Ohara.: B-cell stimulatory factor-1/Interleukin 4. (1987) *Annu. Rev. Immunol.* **5** : 429.

Rodewald, H.-R., J. Langhorne, K. Eichmann, and J. Kupsch.: Production of murine interleukine-4 and interleukine-5 by recombinant baculovirus. (1990) *J. Immunol. Methods* **132** : 221.

Rosenfeld, A. M.: In vivo transfert of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the aitway epithelium. (1992) *Cell* **68** : 143.

Rosenfeld, M. A.: Adenovirus-mediated transfer of a recombinant a-anti-trypsin gene to the lung epithelium in vivo. (1991) *Science* **252** : 431.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning. A laboratory manual. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Sarmientos, P., M. Duchesne, P. Denèfle, J. Boiziau, N. Fraomage, N. Delporte, F. Parker, Y. Lelièvre, J.-F. Mayaux, and T. Cartwright.: Synthesis and purification of active human tissue plasminogen activator from *Escherichia coli.* (1989) *Bio/Technology* **7** : 495.

Schaffner, W.: (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **77** : 2163.

Sisk, W. P., J. D. Bradley, L. L. Seivert, R. A. Vargas, and R. A. Hortlick.: An improved method for rapid screening of baculovirus recombinant plaques by PCR amplification. (1992) *BioTechniques* **13** : 186.

Smith, D. B. and K. S. Johnson.: Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. (1988) *Gene* **67** : 31.

Smith, G. E., G. Ju, B. L. Ericson, J. Moschera, L. H.-W., R. Chizzonite, and M. D. Summers.: Modification and secretion of human interleukine 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. (1985) *Proc; Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 8404.

Stern, L. J. and D. C. Wiley.: The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty αβ heterodimers in the absence of antigenic peptide. (1993) *Cell* **68** : 465.

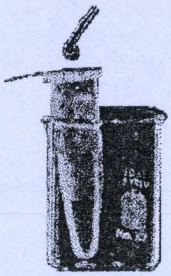
Studier, F. W. and B. A. Moffat.: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. (1986) *J. Mol. Biol.* **189** : 113.

Summers, M. D. and G. E. Smith. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cells culture procedures. ed. Texas agricultural experiment station. 1988.

Taylor-Robinson, A. W., R. S. Phillips, A. Severn, S. Moncada, and F. Y. Liew.: The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. (1993) *Science* **260** : 1931.

Vialard, J., M. Lalumière, T. Vernet, D. Briedis, G. Alkhatib, D. Henning, D. Levin, and C. Richardson.: Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the β-galactosidase gene. (1990) *J. Virol.* **64** : 37.

Waterfield, M. D. and C. Greenfield.: Expression and properties of epidermal growth factor receptor expressed from baculovirus vectors. (1991) *Methods Enzymol.* **200** : 627.



Annexe technique

PURIFICATION DES ARNs PAR LA TECHNIQUE DU RNAzol-1

MATERIEL

-RNAzol
-cônes P200 et P1000 autoclavés pendant 2 heures
-microtubes de 1,5 ml autoclavés 2 heures
-gants
-chloroforme/alcool isoamylique (24/1)
-Ethanol
-eau PPI ou Tris/EDTA (10/1)
-Centrifugeuse à 4°C pour microtubes de 1,5 ml
-glace

PRECAUTIONS D'EMPLOI

-tous les réactifs seront traités contre les RNAses (autoclave 2h) ou additionnés de DEPC (diéthylpyrocarbonate) de la façon suivante :

-0,2 ml DEPC dans 100ml de solution à traiter
-mélanger fortement
-autoclaver pour inactiver le DEPC

PURIFICATION DES ARNs PAR LA TECHNIQUE DU RNAzol-2

LYSE DES CELLULES

sur 5 à 50x10^{6}cellules

Dans le cas où les cellules sont adhérentes ou quand on peut prélever le milieu sans emporter les cellules

Les cellules en suspension

enlever le milieu

centrifuger rapidement 5 mn à 1800 t/mn
bien retirer le milieu, remettre les cellules en suspension

+ 1 ml RNAzol
-bien mélanger à la pipette Gilson de 1 ml pour casser l'ADN
-vortexer éventuellement
-stocker à -20°C jusqu'à l'extraction

EXTRACTION DES ARNs

-extraction phénol/chloroforme

-laisser décongeler les tubes de RNAzol dans la glace
-ajouter 200 µl de chloroforme/alcool isoamylique
-centrifuger à 15 000 t pendant 20 mn à 4°C
-récupérer le surnageant et le transférer dans de nouveaux tubes
-ajouter un volume (env 400 µl) d'isopropanol
-mélanger par retournements, puis incuber de 2 heures à une nuit à -20°C selon la quantité de matériel
-centrifuger à 15 000 tours/mn pendant 30 mn
-enlever le surnageant
-ajouter 1 ml d'alcool à 70%
-mélanger
-centrifuger à 15 000 Tours/mn pendant 5 mn
-enlever complètement le surnageant sans laisser d'alcool
-ajouter de 10 à 50 µl d'H2O PPI (suivant la quantité de matériel)

REFERENCE DES REACTIFS

RNAZOL : BIOPROBE ref ZOL 1505-200 200 ml : 1150F contrat annuel

NORTHERN BLOT-1

MATERIEL POUR LE NORTHERN BLOT

-Eau PPI

-MOPS 10X

-tampon de charge

-20 X SSC

-SDS 10%

-Formamide désionisée

-Formaldéhyde à 37%

-solution de bromure d'éthidium à 5 mg/ml

-ADN de sperme de saumon

-Denhardt's 100X

-Kit de marquage de sonde par random priming (Amersham)

-32P αdCTP (10 mCi/ml)

-bain marie à 65°C

-cuve d'électrophorèse avec plateau et peignes. Générateur de courant continu

-Papier Whatman 3

-Membrane de nylon (Hybond, Amersham)

-Table UV

-Bain marie agitant

NORTHERN BLOT-2

- TEMPS DE MANIPULATION:

- une journée pour le gel
- une nuit pour le blot
- deux jours pour l'hybridation

-Travailler dans des conditions exemptes de RNAses (RNAse free)

-Prendre les densités optiques des différents échantillons de RNA

Dilution au 1/100 dans de l'eau PPI (1µl/100µl).
lire à 260 et 280 nm
faire le rapport 260/280 qui doit être compris entre 1,8 et 2.

LA VEILLE

-Préparer le matériel

Les cuves, les peignes sont placés dans une solution de DEPC (50µl par litre d'eau PPI) sous une hotte aspirante.

LE LENDEMAIN

-Nettoyer la cuve, les peignes à l'eau PPI en rinçant abondamment

-Préparer le gel d'agarose

-Pour des ARNs dont la taille est d'environ 1 kb, on utilise une concentration d'agarose à 1,5%

Pour 100 ml de gel

-1,5 g agarose
-10 ml de tampon MOPS 10X
-185 ml H2O PPI

-Dissoudre l'agarose au micro-ondes
-laisser refroidir à 50°C en mélangeant avec un barreau magnétique
-ajouter 5,4 ml de formaldéhyde goutte à goutte (travailler sous une hotte chimique)
-ajouter 15µl de BET à 5 mg/ml
-laisser refroidir pendant 15 mn en agitation douce et constante
-couler le gel dans la cuve.

-Préparation des ARNs

-10µg/point dans 15 µl d'eau PPI
-ajouter 5 µl de tampon de charge
-chauffer 5 mn à 65°C
-mettre sur de la glace avant le dépot
-préparer le tampon d'électrophorèse (1 litre de MOPS 1X)
-Déposer les échantillons et faire migrer à 100V

NORTHERN BLOT-3

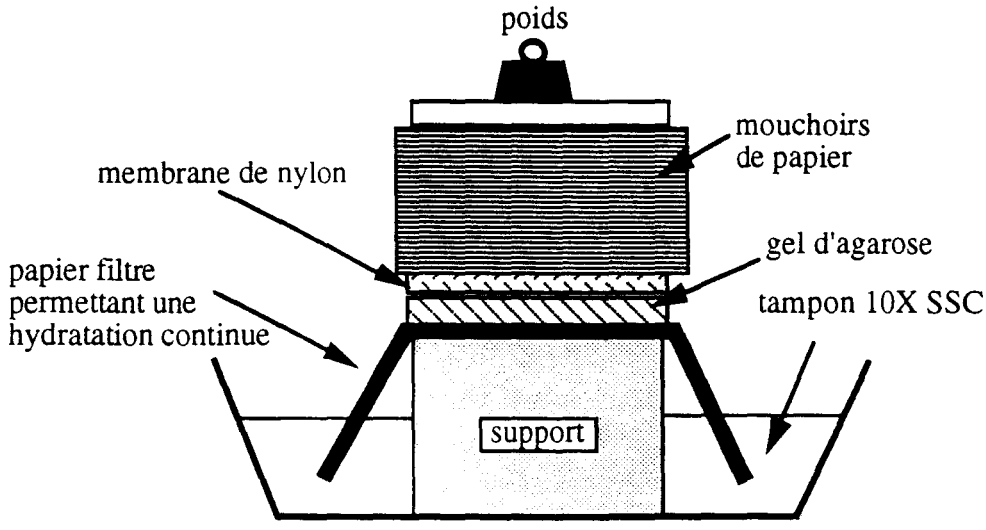
APRES L'ELECTROPHORESE

-rincer deux fois le gel pendant 30 mn dans 500 ml de tampon 10XSSC de façon à enlever la formaldéhyde

-faire une photo

-faire un transfert par capillarité sur membrane de nylon

-découper une bande de papier Whatman 3 de 50x25 cm
-dans un bac contenant 500 ml de 10xSSC, poser une plaque de verre et la bande de Whatman imbibée de tampon à cheval sur celle-ci
-enlever les bulles d'air en roulant le Whatman avec une pipette stérile
-poser le gel face dessus contre la plaque de verre et le Whatman
-poser la feuille de nylon (préalablement rincée à l'eau PPI) contre le gel. Enlever les bulles d'air
-poser 3 feuilles de Whatman 3 (préalablement imbibées de tampon 10xSSC) sur le nylon
-poser les feuiiles de papier absorbant
-terminer par un poids
-incuber toute la nuit.



-Le lendemain, fixer les ARNs transférés en plaçant la membrane pendant 3 mn sur une table UV, tout en laissant les feuilles de Whatman pour que la membrane ne sèche pas.

-Laisser la membrane et le Whatman dans un sachet plastique hermétiquement fermé à 4°C

NORTHERN BLOT-4

HYBRIDATION

-1) Préhybridation pendant au moins 2 heures à 42°C dans le bain marie agitant dans une solution de préhybridation

- Préparer le tampon à l'avance, aliquoter par 50 ml et conserver à -20°C

-2) Marquage de la sonde avec le kit de random priming d'Amersham (nonameres)

-50 µL au total
-100 ng de sonde dans 23 µl d'eau
-bouillir 5 mn puis laiser refroidir sur la glace
-ajouter 20 µl de tampon (bouchon bleu)
-ajouter 10 µl de nonamères (bouchon noir)
-ajouter 5 µl 32P a dCTP
-ajouter 2 µl d'enzyme (l'enzyme ne doit pas sortir du congélateur)
-incuber à 37°C pendant 30 mn

-Separation des nucléotides non incorporés de la sonde marquée

-utiliser les colonnes de Boehringer G50
-faire couler l'excès de tampon
-centrifuger 2mn à 1200 g
-changer de tube
-déposer la sonde bien au centre de la colonne
-centrifuger 4 mn à 1200 g
-récupérer l'éluat
-compter 1 µl pour calculer le rendement de marquage (30 à 50x106cpm au total)

-3 Hybridation

-on compte environ 1 à 2 x 106 cpm par ml de milieu d'hybridation. Il faut 20 ml pour couvrir une membrane de 10x10 cm dans une boite d'hybridation
-incubation toute la nuit à 42°C dans un bain marie agitant

-le lendemain

-la sonde est récupérée dans un corning et peut être réutilisée environ deux fois dans un délai de 3 semaines(demi-vie du 32P).

- 4) Lavages

Les conditions de lavage sont à mettre au point pour chaque type de sonde

En général:

-Le premier lavage est effectué en 5xSSC; 0,1% SDS pendant 10 mn à 42°C
-deuxième lavage en 1xSSC; 0,1% SDS pendant 10 mn à 50°C
-troisième lavage en 0,5xSSC; 0,1% SDS pendant 10 mn à 50°C
-contrôler avec le compteur geiger le bruit de fond et le marquage
-poursuivre les lavages dans le cas d'une sonde homologue
-en 0,1xSSC; 0,1 % SDS pendant 10 mn à 60°C
-mettre le blot en exposition (enfermé dans une pochette plastique soudée).

NORTHERN BLOT-5

TAMPONS POUR LE NORTHERN BLOT

MOPS 10X

pour 1 litre

0,2 M MOPS	41,86 g/l
0,05 M Na+ACOO-	156,O8g
0,01 M EDTA	20 ml à O,5M

le tampon est autoclavé 2 heures et conservé à l'abri de la lumière

TAMPON DE CHARGE

pour 10 ml, aliquoter en 0,5 ml et conserver à -20°C
- -0,72 ml formamide
- -0,16 ml 10x MOPS
- -0,26 ml formaldéhyde
- -0,18 ml H2O
- -0,1 ml 80% glycerol
- -0,08 ml bleu de bromophénol saturé.

20 X SSC

3M NaCl	175 g/l
0,3 M Na3citrate 2 H2O	88 g/l

ajuster le pH à 7 avec de l'HCl 1M

100 X DENHARDT'S

pour 500 ml
- -10 g Ficoll 400
- -10 g polyvinylpyrolidone
- -10 g BSA

filtrer et conserver à -20°C en 25 ml

DNA DE SPERME DE SAUMON

-1 g de DNA pour 100 ml d'H20
-casser l'ADN avec une seringue et une aiguille assez grosse
-la solution obtenue est très visqueuse
-il faut casser l'ADN en petits fragments par ultrasonication
-travailler dans la glace. Quand la solution est fluide, arrêter les ultra sons
-conserver à 4°C

NORTHERN BLOT-5

TAMPON DE PREHYBRIDATION

concentration finale	
-25 ml Denhardt's 100x	5x
-0,5 ml SDS 10%	0,1%
-25 ml formamide	50%
-2,5 ml 1M Na2HPO4	50 mM
-12,5 ml 20xSSC	5x
-1,25 ml de DNA carrier à 10 mg/ml à ajouter extemporanément	250µg/ml

qsp 50 ml H2O

TAMPON D'HYBRIDATION

Dans le tampon de préhybridation ajouter :

-5% sulfate de dextran
-vérifier le pH : 7,3-7,4

REFERENCES REACTIFS

Formamide : Sigma F 7503 100 ml : 62,40F

Sulfate de dextran: Pharmacia 17034001 100g

DNA de sperme de saumon : Sigma

Ficoll 400 : Sigma F2637 25g : 404,40F

Polyvinylpyrolidone: Sigma P5288 500 g 219,20F

MOPS : Sigma M8899 500g : 1135F

Kit de marquage : Megaprime Amersham 60 tests RPN 1607 1990F

Membrane de nylon : Hybond Amersham RPN 303N
30 cm x 3 m 1180F

Quick spin column : Boehringer 1273-965 560F les 50

TECHNIQUE DE REVERSE TRANSCRIPTION-1

MATERIEL

-Bain marie 70/90°C
-Bain marie 42°C

tRNA

-tRNA d'E. coli à 1 mg/ml ref : MRE60 109541 Boehringer, 835F pour 100 mg

M-MLV

-Gibco-BRL ref 510 8025 SA
-724F 40000 unités. 200 U/µl
-livrée avec tampon 5x et DTT 100 mM

Oligo-dT

-18 mers, synthétisé par Jean-Pierre Kusznier
-concentration finale 1µg/µl

dNTP

-dATP : ref. ATP-27-2050-01 100 mM chez Amersham
-dTTP : ref. TTP-27-2080-01 100 mM chez Amersham
-dCTP : ref. CTP-27-2060-01 100 mM chez Amersham
-dGTP : ref. GTP-27-2070-01 100 mM chez Amersham

-dilution au 1/10
-soit 50 µl de chaque plus 300 µl d'H2O

RNAsin

-Promega ref N2512 104 U
-40 U/µl 1140F

Pointes

-P 1000 et P 200
-autoclavées 2 heures

Eau PPI

TECHNIQUE DE REVERSE TRANSCRIPTION-2

-25 µl final

y = quantité de RNA 2 µg maximum.
n = nombre d'échantillons

11 µl
- y µg de RNA totaux dans 10 µl d'H2O (extraits par la méthode du RNAzol)
- + 1 µl d'une solution [(y/2)n µl d'oligo dT + n/10 µl de RNAsin qsp 1 µl H2O

-70°C pendant 5 mn

-laisser revenir à température ambiante

-ajouter 13 µl d'une solution

13 µl
-0,1 µl de RNAsin
-1 µl de tRNA
-5 µl de tampon 5x
-1 µl de DTT
-1 µl de reverse transcriptase du M-MLV
-5 µl de dNTP

-1 heure à 42°C
-10 mn avant la fin, monter un bain marie à 90°C

-après une heure,3 mn à 90°C
-refroidir sur la glace

-+ 1 µl d'une solution

1 µl
-0,2 µl d'H2O
-0,1 µl de RNAsin
-0,2 µl de tampon 5x
-0,5 µl reverse transcriptase du M-MLV

-1 heure à 42°C

-5 mn à 95°C

-Stockage à -20°C

TECHNIQUE DE PCR-1

MATERIEL DE PCR

-dNTP

-dATP : ref. ATP-27-2050-01 100 mM
-dTTP : ref. TTP-27-2080-01 100 mM
-dCTP : ref. CTP-27-2060-01 100 mM
-dGTP : ref. GTP-27-2070-01 100 mM
-concentration de la solution mère : 1,25 mM : 12,5 µl à 100 mM qsp 1ml
-conc. finale 200 µM : dilution au 6,25ème

-Tampon 10X (Taq Cetus)

-100 mM Tris HCl pH 7,3
-15 mM MgCl2
-0,1% (p/v) de gélatine
-500 mM KCl
-à préparer en atmosphère exempte de produits d'amplification

-Amorces

-solution mère à 20 µM
-utiliser au 40ème à 0,5 µM

-Taq polymérase

-ref Taq Cetus : 8010060 : 1690F les 250 unités
-ref Taq Bioprobe : Btaq 002 425F les 250 unités
-solution mère à 250 U dans 50 µl
-à utiliser à 0,6 U/25 µl

-Tubes

-microtubes 0,650 ml Ref J Bio 1048003 150Fles 500
-tubes siliconés : Ref Costar 3206 300Fles 500

-Pointes

-jusque 50 µl : Ref : 1023 4810 - 105Fles 100
-jusque 150 µl : Ref : 1024 5810 - "
chez TEBU

-Huile minérale

Heavy white oil Sigma, ref : 400-5 500ml : 63,50F

TECHNIQUE DE PCR-2

-Toutes les précautions doivent être prises afin de travailler dans des conditions propres à éviter les contaminations

-tous les réactifs sont aliquotés

-séparation physique des étapes techniques

-pipettes spéciales PCR

-embouts de pipettes cotonnés

-Préchauffer l'appareil de PCR à 94°C

-préparation du mélange réactionnel sous une hotte à air pulsé

-volume final 25 µl
-préparer une solution contenant les réactifs suivants
(à multiplier par le nombre de tubes)

-4 µl dNTP à 1,25 mM
-2,5 µl de tampon 10X
-1,25 µl d'amorces
-17 µl H2O
-0,125 µl Taq polymérase

-ajouter 50 µl d'huile

-sortir de la hotte et distribuer l'ADNc

-1 µl par tube (pour 1 µg d'ARN total reverse transcrit dans 25 µl)

-refermer les tubes et les centrifuger 10 secondes

-les placer dans l'automate de PCR

TECHNIQUE DE PCR-3

PROGRAMMATION DE L'AUTOMATE DE PCR (Perkin Elmer Cetus)

-plusieurs types de programmes sont disponibles et sont stockés de la façon suivante :

-**File 1** : température variable, temps indéterminé

-**File 2** : température variable, temps variable

-**File 4** : suite de température et de temps à déterminer pendant un nombre de cycles variables

ex : -1mn à 94°C
-1 mn à 60°C
-1 mn à 72°C
pendant 30 cycles

-déterminer tout d'abord les différentes étapes de la PCR (menu) et les numéros des files

Exemple:

-2 mn à 94°C	File 11	dénaturation
-1 mn à 94°C -1 mn à 60°C -1 mn à 72°C 30 cycles	File 12	déroulement de l'amplification
-10 mn à 72°C	File 13	élongation finale
4°C	File 14	stockage

TECHNIQUE DE PCR-3

-commencer la programmation par la fin

-pour le File 14 : appeler le File 1
-Step- entrer 4°C
-Enter (Run-Store?)
-No‹le curseur se déplace sur Store
-N° user 11
-N° File 14
-Yes, Enter

-pour le File 13 : appeler le File 2
-Step‹entrer la température 72°C et le temps 10 mn
-Enter
-Store
-User 11
-File 13
-Link to File 14

-pour le File 12 : appeler le File 4
-Step-entrer successivement les températures et les temps déterminés en appuyant sur Enter à chaque fois (si erreur appuyer sur Help : retour en arrière)
-Store
-User 11
-File 12
-Link to File 13

-pour le File 11 : appeler le File 2
-Step-entrer la température 94°C et le temps 2 mn
-Enter
-Store
-User 11
-File 11
-Link to File 12

-Refaire défiler le menu pour vérification

-L'appareil est programmé

TECHNIQUE DE PCR-55

MISE EN ROUTE DE L'AUTOMATE DE PCR

-avant la mise en route de l'appareil, on revérifie les données programmées dans le menu.

-Pour chaque File dérouler le menu après avoir entré le numéro du file en appuyant successivement sur Step et Enter

-Si les données doivent être changées, il faut bouger le curseur sur Store

-Le File 9 est un programe de préchauffage de l'appareil à 94°C (pendant la préparation des tubes de PCR)

-Quand les tubes sont prêts

-Les centrifuger 10 s
-mettre une goutte d'huile dans les puits de l'appareil destinés à les recevoir
-bien enfoncer les tubes
-arrêter le File 9
-appeler le File 11
-Start

Entretien de l'automate

-nettoyer régulièrement
-le couvercle avec un chiffon

-les puits (des puits propres sont garants d'une bonne diffusion de la température autour des tubes)

TECHNIQUE DE PCR-6

CALCUL DE LA CONCENTRATION D'AMORCES EN PCR

CONCENTRATION FINALE : 0,5 µM

CONC. SOLUTION MERE : 20 µM = 2 nmoles/100µl
dilution de la solution mère au 1/40
soit 1,25 µl (= 25 pmoles) / 50 µl de volume final de PCR

1- Reprendre les amorces lyophilisées dans 100 µl d'H2O PPI

2- Vortexer vigoureusement

3- Attendre 10 mn sur la paillasse

4- Centrifuger 1 mn à 13 000 trs/mn

5- Récupérer le surnageant

6- Lire le D.O. à 260 nm : 1 µl dans 1 ml d'eau

7- Calcul de la concentration

Calcul en moles (suivant le nombre de bases de l'oligonucléotide) :

x nmoles / 1 µl = D.O./ (nombre de nucléotides)x10

Faire la dilution de façon à obtenir une concentration finale de

2 nmoles / 100 µl

8- Aliquoter en 10 tubes de 10 µl chacun

9- Utilisation en PCR :

-1,25 µl / 50 µl PCR / amorce soit 2,5 µl / couple d'amorces = 25 pmoles

-0,625 µl / 25 µl PCR / amorce soit 1,25 µl / couple d'amorces = 12,5 pmoles

10- Aliquoter de façon à prévenir les contaminations

ADJONCTION D'UNE QUEUE POLYNUCLEOTIDIQUE A L'EXTREMITE 3' D'UN BRIN D'ADN PAR LA TERMINAL TRANSFERASE

SUR L'ADN PRECIPITE

25 µl final

- ajouter 13 µl H2O
- + 5 µl tampon 5x
- + 3 µl terminale transferase (Tdt à 15 U/ml)
- + 4 µl dNTP (à 1,25 mM donc 0,25 mM final)

Tampon 5X

0,5M potassium cacodylate pH 7,2
10 mM CaCl2
1 mM DTT

-mettre au bain marie à 37°C pendant 60 mn
-compléter à 200 µl avec H2O
-ajouter 200 µl de phénol/chloroforme
-extraction et récupération du surnageant
-ajouter 2,5 volumes d'ethanol et 0,2 M final de NaCl
-placer à -20°C pendant une nuit
-centrifuger et laver
-reprendre le surnageant dans de l'eau ou du TE

TRANSCRIPTION D'ARN "IN VITRO"

-préparation du plasmide sur une colonne de Qiagen

-reprendre dans de l'eau ou du TE(10:1) sans RNAse

-linéariser en amont ou en avaol du DNA à transcrire

-extraction phénol/chloroforme puis précipitation et reprise du culot en eau ou TE

-utiliser le promoteur pour l'ARN polymérase disposé en amont de l'ADN à transcrire (dans le sens 5' vers 3')
Utilisation du kit de transcription Promega

-25µl final	-5 µg d'ADN linéarisé -2 µl de chaque ribonucléotides (10 mM) -1 µl RNAsin -5 µl tampon 10X -1 µl ARN de transfert (10 mg/ml) -2 µl RNA polymérase (env. 20U/ml) -8 µl H2O

tampon de transcription 10X
-400 mM Tris HCl pH 7,5
-60 mM MgCl2
-20 mM spermidine
-100 mM NaCl

-purification de l'ARN par chromatographie sur Quick spin colonne de Boehringer sans RNase (voir la technique de Northern blot)

TECHNIQUE DE PURIFICATION DES ARNs POLY-A+

- 50 ml d'ARN purifié + 50 ml de tampon de binding

-65°C pendant 2 minutes

-Préparer les billes magnétiques: (kit de DYNAL)

-Les laver avec 100 ml de tampon de binding
-Enlever le surnageant, et relaver une fois
-Ajouter l'ARN
-Incuber de 3 à 5 minutes
-Aimanter le tube (les billes restent sur la paroi du tube)
-Laver avec 200 ml de tampon de binding
-Ajouter 20 ml de tampon d'élution
-65°C pendant 2 minutes
- Récupérer le surnageant
-Vérifier 1 ml d'ARN sur gel d'agarose 2% RNase free (bande à 450 pb)
- A titre indicatif, la récupération est d'environ 200 ng d'ARN pur.
-L'ARN est prêt à être reverse transcrit

ANALYSE DES FRAGMENTS D'AMPLIFICATION-1

-cette étape s'opère dans un local approprié où les risques de contaminations par aérosol d'ADN ne posent pas de problèmes.

analyse sur gel d'agarose 2% en TAE ou TBE
- -dissoudre l'agarose au micro-ondes
- -ajouter 15 µl de BET à 5 mg/ml
- -laisser durcir le gel
- -préparer les microtubes pour l'analyse des produits d'amplification
  - -2µl de tampon échantillon ADN
  - -10 µl de produit d'amplification
- -déposer sur le gel
- -faire migrer à 100 V pendant environ une heure

TBE 20X

pour un litre
- -216 g de Tris
- -110 g d'acide borique
- -80 ml d'EDTA 0,5M pH 8

-utilisation à 0,5 x

TAE 50X

pour un litre
- -242 g de Tris
- -57,1 ml d'acide acétique glacial
- -110 ml d'EDTA 0,5 M pH 8

utilisation à 1 x

EDTA 0.5 M

pour 100 ml
- -18,6 g EDTA
- -ajouter 80 ml d'eau
- -dissoudre et ajuster à pH 8 avec NaOH (environ 2 g de NaOH)
- -compléter à 100 ml avec H_2O
- -autoclaver

TAMPON DE CHARGE ADN

pour 10 ml

-0,25 % bleu de bromophénol	25 µl
-30% glycérol	3 ml
-TBE 1X	7 ml

migration à environ 200 pb dans un gel à 1,5%

ANALYSE DES FRAGMENTS D'AMPLIFICATION-2

-si le gel doit ête analysé par hybridation pour augmenter la sensibilité, il faut dénaturer l'ADN dans le gel

-**tampon de dénaturation:** agitation pendant **30 mn**

-NaOH	20 g/l	(0,5M)
-NaCl	87,6 g/l	(1,5 M)

-1 lavage en eau déminéralisée

-**tampon de neutralisation: 45 mn** en agitation en changeant le bain

-Tris	121,1 g/l	(1M)	Ph 7,4
-HCl fumant	70ml		
-NaCl	87,6 g/l	(1,5M)	

-Blotter et hybrider (cf Northern blot).

UTILISATION DE L'ANALYSEUR AUTOMATIQUE D'ADN-1

•laver les plaques (thermostatée et à encoche) avec un détergent comme l'ALCONOX puis les rincer avec de l'eau bidistillée

Montage des plaques

•Positionner la plaque thermostatée de la façon suivante :
-face à vous sur un support plan,
-les deux connecteurs en bas à gauche,
-la plaque de verre en relief sur le dessus,
-rincer légèrement avec de l'eau distillée

•Placer les trois spacers et le joint de lumière :

à gauche de haut en bas,
-le spacer court,
-au niveau des guides, le joint de lumière préalablement graissé sur sa partie centrale et sur ses deux faces,
-le spacer moyen

à droite,
-le spacer long

•Placer au dessus du montage la plaque à encoche, la face gravée sur le dessus

Le montage est correct lorsque le joint de lumière dépasse à l'extérieur de 4-5 mm et que la plaque à encoche est allignée sur le bord en relief de la plaque thermostatée.

•Serrer avec les 4 pinces noires,
-positionnées au niveau des quatre guides,
-vis blanches au dessus.

Coulage du gel

•Préparer le mélange Acryl/Bis/TBE/Urée

-Acrylamide BIS : 12 ml à 40%
-Urée 7M : 33,6 g
-TBE 10 X 4,8 ml
-compléter à 80 ml avec H_2O PPI
-dissoudre ce mélange au bain marie à 37°C
-filtrer (0,45 µm) sur un Erlenmeyer en verre
-ajouter Temed : 70 µl
-persulfate d'ammonium 10% : 280 µl

UTILISATION DE L'ANALYSEUR AUTOMATIQUE D'ADN-2

•Couler le gel directement à partir de l'Erlenmeyer
attention à éliminer les bulles au niveau du joint de lumière et sur le trajet du laser
•Glisser le peigne (les dents 1 à 40 étant au niveau des guides verticaux)
•Le fixer avec des pinces à dessin
•Laisser polymériser au moins une heure, au mieux une nuit. Pour l'analyse des fragments de PCR il est important de le laisser polymériser une nuit

Montage du gel

•Retirer les pinces à dessin
•Enlever l'acrylamide et l'urée cristallisées avec de l'eau distillée
•Nettoyer le joint de lumière délicatement
•Nettoyer la plaque de verre en regard des diodes
•Mettre en place le bac supérieur
-réservoir au dessus
-ouverture coté peigne
-vis de serrage au dessous

Dans la chambre de séparation :

•Mettre en place la cuve inférieure,
-La raccorder,
-Mettre les 2 supports en position basse, les 2 ailettes vers la gauche,
-Remplir de tampon TBE,
-Poser le gel sur les supports de la cuve inférieure,
-Faire glisser les 4 vis noires dans les encoches des pinces à gel,
-Vérifier la position des 2 guides verticaux : ils doivent être alignés sur les diodes 1 et 40,
-Serrer les 4 vis noires,

Alignement du laser

•Activer "laser beam adjustment",
•Rabattre la barre noire transversale,
-le laser doit passer au centre de chaque diode,
•Pour régler la position du laser, désserrer légèrement les vis blanches des pinces à gel, puis jouer sur les ailettes de la cuve inférieure,
•Resserrer les vis blanches une fois la position optimale obtenue,
•Régler l'intensité du laser avec le bouton gris situé dans la chambre de séparation en bas à gauche (le rayon laser se déplace latéralement dans l'épaisseur du gel)
•Une fois l'alignement terminé, positionner définitivement le réservoir supérieur sur son support,
•Serrer le joint au maximun.
•Raccorder le bac,
•Remplir de tampon TBE.
•Retirer délicatement le peigne.
•Enlever le reste du gel polymérisé sur le bord de la plaque de verre avec une lame de scalpel,
•Activer la thermostation en cliquant sur "water preheat".
•Faire les dépôts,
•Fermer la chambre de séparation
•Démarrer en cliquant sur Start.

UTILISATION DE L'ANALYSEUR AUTOMATIQUE D'ADN-3

Solutions stocks

TBE 10X

Pour un litre :
Tris base : 121,14 g
Acide Borique 51,32 g
EDTA 3,72 g
Conservation un mois à 4°C à l'abri de la lumière

Acrylamide BIS 40%

Pour 200 ml de solution dissoudre :
Acrylamide : 38 g
Bis Acryl 2 g
Désioniser en passant sur une colonne de désionisation : BIORAD AG 501 X8
Conservation un mois à 4°C à l'abri de la lumière

Persulfate d'ammonium

Pour 10 ml dissoudre 1 g
Conservation un mois à 4°C à l'abri de la lumière

BIBLIOTHÈQUE LILLE