

# LES PROTOCOLE CLINIQUE

## 3.1.1 Ethique animale

Tous les protocoles cliniques ci-après ont été réalisés dans le respect des règles de l'éthique animale et ont fait l'objet d'une demande d'autorisation à un comité d'éthique.

## 3.1.2 Choix du modèle animal

Le modèle animal choisi pour les mises au point est le chien. En effet, les outils moléculaires utilisés sont spécifiques à une espèce animale. La problématique étant la réponse immunitaire du chien, nous ne pouvions que mettre au point les outils sur ce modèle.

## 3.1.3 Protocole clinique 1 - vaccination par voie parentérale avec un virus inactivé

Toutes les manipulations des animaux du protocole 1 ont été faites par des techniciens animaliers de chez Boehringer Ingelheim® (Lyon, France) sous la supervision du Dr Karelle De Luca.

### Les animaux

Il s'agit de 6 chiens beagles mâles et femelles, âgés de 4 à 5 mois.

### Protocole de vaccination

Le vaccin RABISIN® (Boehringer Ingelheim®, LYON, FRANCE) est un vaccin anti-rabique inactivé à la betapropiolactone et contenant un adjuvant (Minke et al., 2009).

Quatre animaux ont été vaccinés par voie intramusculaire avec du vaccin RABISIN® (MERIAL®, LYON, FRANCE), deux avec le lot 4RBN5B021 et deux avec le lot 4RBN5A011.

Les deux animaux contrôles ont reçu de la même façon, 2 mL de PBS.

### Prélèvements sanguins

Un prélèvement de sang sur les six animaux, a été effectué 35 jours après vaccination, pour isolement de PBMC voir section 3.2.1 page 38).

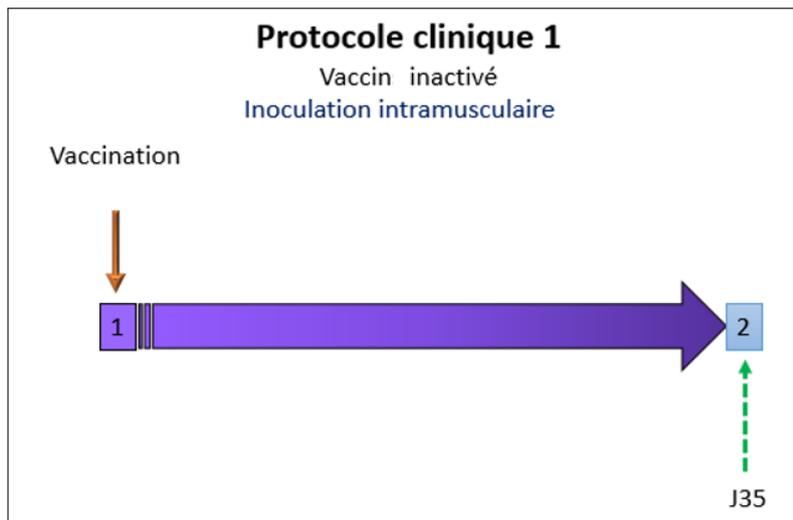


FIGURE 3.1 – Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 1. **1** : Vaccination de quatre animaux avec un vaccin inactivé Rabisin par voie intramusculaire, deux autres animaux ont reçu par voie intramusculaire, 2 mL de PBS ; **2** : Une prise de sang pour isolement de PBMC des 6 animaux, est effectuée 35 jours plus tard.

### 3.1.4 Protocole clinique 2 - vaccination par voie parentérale avec un virus vivant atténué

Les protocoles 2a et 2b, ont été réalisés à la station expérimentale de Atton (54, France) du laboratoire de la rage et la faune sauvage de Nancy de l'ANSES. Ils ont été hébergés dans des modules animaleries de niveau de sécurité A3 et manipulés par du personnel vacciné, habilité et compétent sous la supervision du Dr Jacques Barrat.

#### Les animaux

Les animaux des protocoles 2a et 2b, proviennent de différents protocoles expérimentaux qui ont fait l'objet de demandes d'autorisation auprès du comité d'éthique. Les procédures de prélèvements sanguins effectuées dans le cadre de mon projet ont été ajoutées aux dossiers correspondants.

Le protocole 2a concerne 4 chiens beagles mâles de 3 mois, acclimatés au laboratoire le jour des prélèvements sanguins.

Les animaux du protocole 2b sont 3 beagles mâles (A, B et C) de un an et demi, qui ont été inoculés à l'âge de un an avec des souches de virus RABV de l'Institut Pasteur de Paris (IPP).

En ce qui concerne le chien A, il a reçu 102.4 DL50 ICS de la souche 0842FRA de l'IPP (souche canine originaire du Maroc), sous forme d'un broyat de cerveau par voie intramusculaire.

Les chiens B et C ont été inoculés à l'âge de un an également, avec la souche vulpine RR1a, par voie intramusculaire et périnerveuse (mime de morsure). Ils ont reçu respectivement 103.3 DL50 IC souris et 106.0 DL50 IC souris.

Au bout de six mois, aucun des trois animaux inoculés n'est mort.

### **Protocole de vaccination**

Le vaccin SAG2<sup>®</sup> VIRBAC (Carros, 06 France) est un virus vivant atténué moléculairement par 2 mutations (Lafay et al., 1994).

Les trois animaux du protocole 2b (uniquement), ont reçu par voie intramusculaire (muscle fémoral), 2 mL d'un vaccin SAG2<sup>®</sup> du lot 4M75, titré à  $10^{8.7}$  TCID<sub>50</sub>/mL (voir définition d'un titrage).

### **Prélèvements sanguins pour analyses**

En ce qui concerne le protocole 2a, un prélèvement sanguin (protocole correspondant section 3.1.6 page 37) à été effectué sur chaque chien pour isolement de PBMC. Un prélèvement a également été réalisé pour confirmer l'absence de RVNA par FAVN test (voir section 3.3.1 page 48).

Un prélèvement sanguin à J0 (juste avant la vaccination) ainsi qu'à J35 (juste avant l'euthanasie), des animaux du protocole 2b a été réalisé dans le but de titrer les RVNA et confirmer le statut vaccinal des animaux. En parallèle, un prélèvement sanguin a été fait et les PBMC isolées et congelées.

Durant ladite phase vaccinale (avec le vaccin SAG2), des prises de sang ont été faites à J3, J6, J9, J13 et J20 après la vaccination (voir le schéma résumant le protocole 2b figure 3.2).

### **Euthanasie**

Ces animaux ont été euthanasiés et un diagnostic a été réalisé afin de confirmer l'absence de virus dans le SNC (protocoles correspondants section 3.3.2 page 49).

## **3.1.5 Protocole clinique 3 - vaccination par voie orale avec un virus vivant atténué**

Toutes les manipulations des animaux ont été effectuées par nos collègues de l'ONSSA dans leurs locaux prévus à cet effet sous la supervision du Dr Sami Darkaoui.

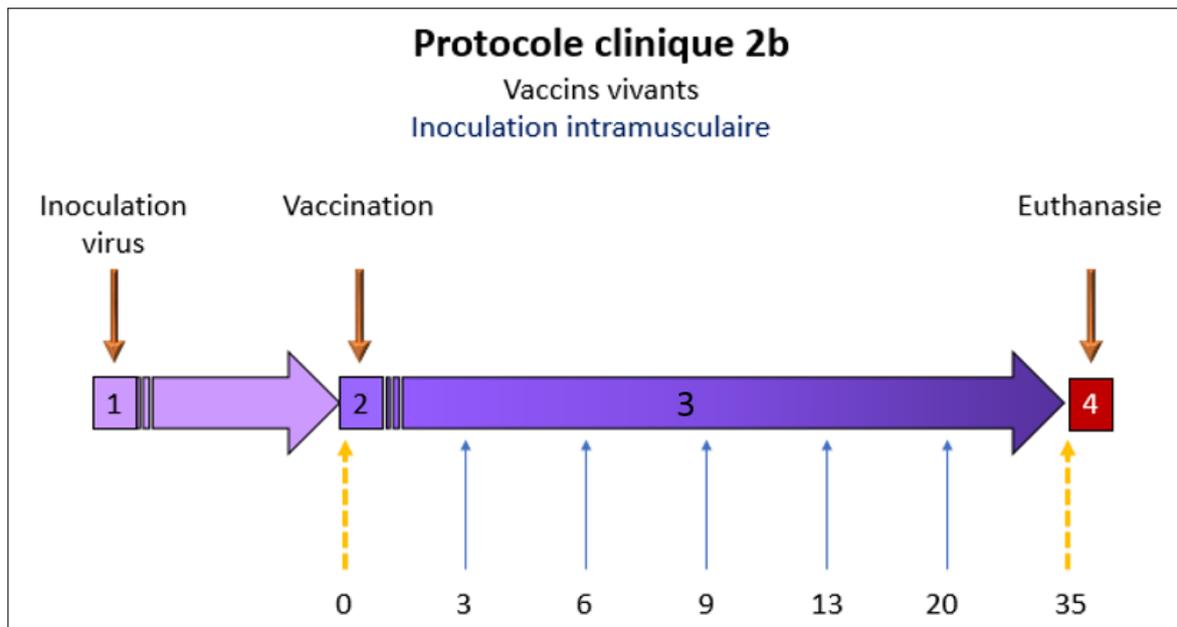


FIGURE 3.2 – Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 2 b. **1** : Les trois animaux vaccinés sont inoculés avec des virus RABV ; **2** : Après une prise de sang pour titrage sérologique et isolement de PBMC, une vaccination par injection intramusculaire de SAG2 est réalisée sur ces mêmes animaux ; **3** : Des prélèvements sanguins pour isolement de PBMC sont effectués à intervalle régulier durant environ 37 jours ; **4** : Après une prise de sang pour titrage sérologique et isolement de PBMC, les animaux sont euthanasiés et un diagnostic réalisé pour montrer l'absence de virus dans le SNC.

## Les animaux

Des chiens tout venant, sans race ont été capturés dans les environs de Rabat (Maroc) à environ 2 mois, juste sevrés et considérés comme n'ayant pas été en contact direct avec le virus.

Une période de quarantaine de 6 mois a été suivie pour que d'une part les anticorps de la mère le cas échéant puissent être éliminés et qu'une éventuelle contamination rabique puisse se révéler.

Les animaux ont été vaccinés contre le parvovirus et vermifugés à leur arrivée au centre. Ils ont été placés ensemble dans une grande pièce durant toute la quarantaine et la phase vaccinale. Après l'épreuve virulente, ils ont été isolés dans des cages individuelles.

## Protocole de vaccination

Le vaccin SAG2 utilisé titré à  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL, est le vaccin.

2 mL ont été instillés oralement (à l'aide d'une sonde de gavage pour rat) aux animaux du groupe A (6 animaux).

2 mL ont été injectés dans le muscle biceps fémoral, aux chiens du groupe B (2 animaux).

2 mL de PBS ont été injectés dans le muscle biceps fémoral, aux chiens du groupe C (4 animaux).

Un suivi de la température et du poids des animaux est effectué durant environ 6 mois jusqu'au jours de l'épreuve virulente.

### Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins en vue d'isoler les PBMC et le sérum sont effectués une fois par semaine pendant 7 semaines puis une fois par mois pendant 2 mois et enfin une fois juste avant l'épreuve virulente. Deux derniers prélèvements ont été effectués 7 jours et 2 mois après l'épreuve virulente (figure 3.3) .

		Code Animal	Phase vaccinale												
Groupe A	Voie Orale	C513	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C511	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C501	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C502	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C515	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C508	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
Groupe B	Voie IM	C509	*	*	*		*		*		*	*	*	*	*
		C504	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
Groupe C	Pas de vaccin	C506	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C512	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C510	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C514	*		*		*		*		*	*	*	*	*
			J-1	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J60	J90	J168	T7	T83
			Vaccination						Challenge						

FIGURE 3.3 – Schéma d'échantillonnage du protocole clinique d'efficacité vaccinale. Une astérisque (\*) représente une prise de sang pour sérologie et une prise de sang pour isolement de PBMC.

Les prélèvements sanguins ont été effectués selon la méthode décrite section 3.1.6 page 37.

### Epreuve virulente

L'épreuve virulente (ou challenge) ne concerne que le protocole 3. Il s'agit d'une inoculation de virus à une dose mortelle dans le but de démontrer la protection effective

d'un vaccin, les animaux non vaccinés développant la maladie, meurent. Cette épreuve est validée si 80 % des animaux naïfs meurent de rage.

Le virus utilisé pour l'épreuve virulente est le virus ariana 2 (ou lot NN44), premier passage sur chien d'une souche sauvage isolée de glandes salivaires d'un chien en Tunisie (Perrin et al., 1999). Il est issu d'un broyat de glandes salivaires diluées au cinquième dans du milieu de culture. Le surnageant a été aliquoté en ampoules de verre et stocké à l'azote. Il a souvent été utilisé dans ce type d'expérience. Ainsi sa létalité a été montrée sur chien et un suivi réalisé, les délais de mortalités étant observés selon la dose réellement inoculée (voir en annexe, figure 10).

Le titre du stock de la souche Ariana 2 est de  $10^{5,3}$  DL50ICS/0.03 mL de glande salivaire (GS).

La dose inoculée à des renards est habituellement de 1000 DL50ICS/mL alors que l'on vise habituellement 200 pour le chien.

On vise ici 500 DL50ICS/mL c'est-à-dire  $10^{2,7}$  DL50ICS/mL Ce qui correspond à une dilution du virus de -4,1 LOG (détail des dilutions du virus d'épreuve virulente figure 3.4).

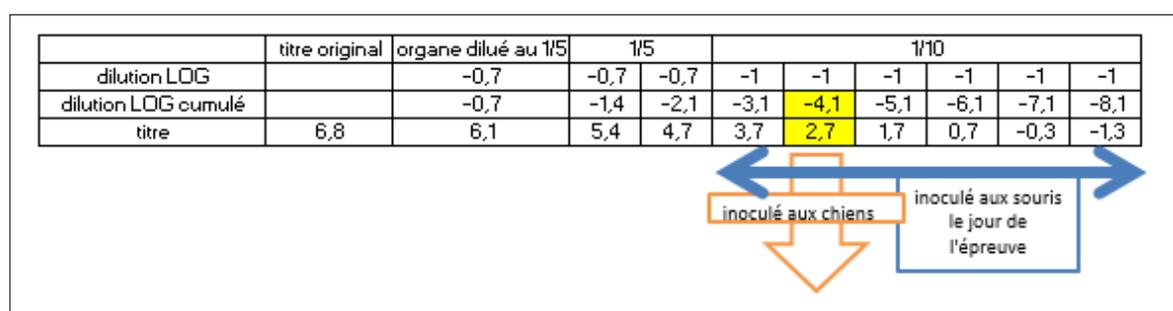


FIGURE 3.4 – **Série de dilutions du virus d'épreuve virulente.** Les six dernières dilutions entourant le titre visé ( $10^{2,7}$  DL50ICS/mL) sont inoculées à des souris pour titrage. On inocule au chien le titre visé.

1 mL de la dilution cible est injectée dans le muscle temporal. Immédiatement après, un titrage sur souris par inoculation intracrânienne est effectué avec les 6 dernières dilutions entourant le titre visé. Ce titrage est effectué ici, par nos collègues Marocains de l'ONSSA.

## Euthanasie

Ces animaux ont été euthanasiés et un diagnostic a été réalisé afin de confirmer l'absence de virus dans le SNC (protocoles correspondants section 3.3.2 page 49).

Le schéma figure 3.5 résume les grandes étapes du protocole clinique 3 concernant les animaux vaccinés.

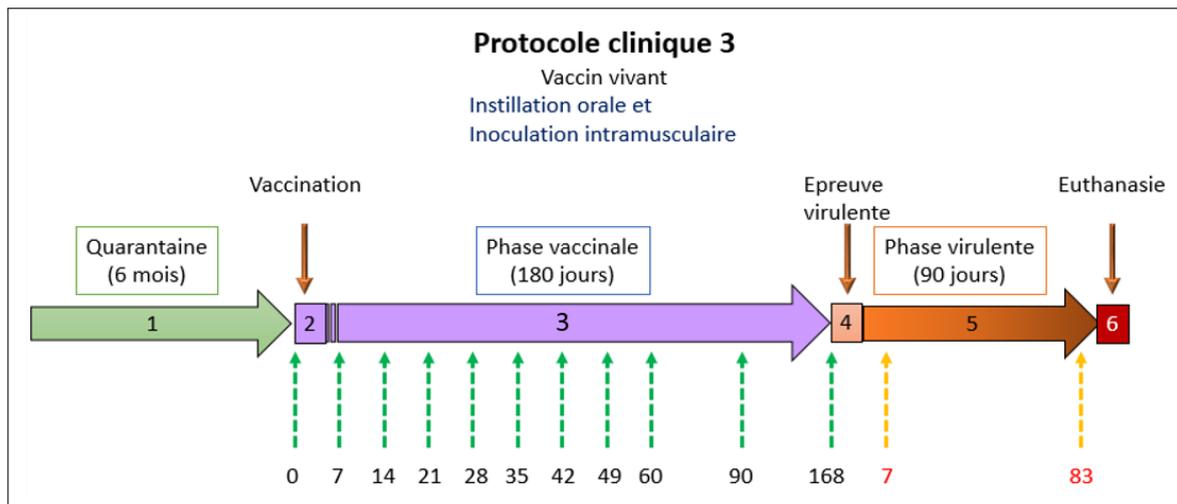


FIGURE 3.5 – Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 3. **1** : Les animaux, capturés sur le terrain à l'âge de 2 mois, sont maintenus en quarantaine durant 6 mois afin d'éliminer les RVNA maternels potentiels ou une possible contamination ; **2** : Après deux prélèvements sanguins pour titrage sérologique et isolement de PBMC, les animaux du groupe A reçoivent par instillation 2 mL de SAG2, les animaux du groupe B, une injection intramusculaire de 2 mL du même vaccin et les animaux naïfs du groupe C reçoivent une injection de 2 mL de PBS ; **3** : Durant la phase vaccinale, des prélèvements sanguins pour titrage sérologique et isolement de PBMC sont réalisés toutes les semaines jusqu'à 60 jours, puis deux autres un mois et deux mois post-vaccination ; **4** : Une épreuve virulente est réalisée en injectant à tous les chiens une dose d'un virus rabique d'une souche connue létale pour des animaux non vaccinés ; **5** : Durant la phase virulente, les animaux sont isolés et l'on surveille leur comportements et l'apparition des symptômes rabiques. Les animaux morts sont diagnostiqués pour la présence de virus dans le SNC ; **6** : Les animaux survivants sont euthanasiés et un diagnostic réalisé pour montrer l'absence de virus dans le SNC.

### 3.1.6 Méthode de prélèvements sanguins

En ce qui concerne le protocole 1, les seules informations en ma possession sont que les prélèvements sanguins ont été réalisés par des techniciens animaliers de chez Boehringer Ingelheim (Lyon, France) avec des tubes de prélèvement héparine calcium.

Ce protocole est régulièrement mis en application dans ce laboratoire et sa procédure est confortée par une mise sous qualité. En effet tous les lots de vaccins commerciaux comme RABISIN, doivent être libérés en testant leur immunogénicité. La méthode est donc une référence par rapport à ma méthode mise au point et non éprouvée.

J'ai participé aux échantillonnages des protocoles 2a et 2b. En ce qui concerne le protocole 3, un vétérinaire de l'ONSSA les a effectués.

Les prélèvements sanguins des protocoles 2a et b et 3, ont été effectués avec le protocole suivant.

Les prélèvements sanguins sont réalisés au niveau de la veine jugulaire ou bien la

veine saphène sur la patte avant, après un léger garrot. Le biseau de l'aiguille devant se placer parallèlement à la peau du chien préalablement rasée, il est important d'éviter de dégrader les tissus par risque de coagulation et réaction locale inflammatoire pouvant éventuellement apporter un «biais immunologique».

A l'aide de tubes S-Monovettes® (Sarstedt, France) « serum-gel » contenant un activateur de coagulation, nous avons prélevé 3 mL de sang pour le dosage des anticorps. Les tubes ont été centrifugés à 2000 g durant 15 minutes pour séparer le serum du sang total. Le serum a été conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse (voir section 3.3.1 page 48).

10 mL de sang pour l'isolement des PBMC (voir section 3.2.1 page 38) ont été prélevés à l'aide de tubes S-Monovettes® (Sarstedt, France) « Heparine-Lithium » contenant un anticoagulant. Moins nocif pour les cellules à moyen terme que l'EDTA, nous avons sélectionné celui-ci en prévision de manipulations sur le terrain, le temps avant traitement pouvant risquer d'être long.

## 3.2 Approche *in vitro*

### 3.2.1 Les cellules

La manipulation des PBMC est délicate car il s'agit de cellules primaires. Une variabilité de résultats pouvant provenir des différentes étapes décrites ci-après, une mise au point est nécessaire pour obtenir les meilleurs rendements, la meilleure qualité et une homogénéité dans les lots de cellules obtenues (Riedhammer et al., 2014).

#### L'isolement

Le sang total est constitué d'hématies, de plaquettes, et de cellules à noyau dont les polynucléaires et les PBMC qui regroupent les lymphocytes (T, B et NK) et les monocytes (macrophages et quelques CD).

**Isolement des PBMC du protocole 1** Les isollements des PBMC du protocole clinique 1, ont été réalisés par l'équipe R&D immunologie de Boehringer Ingelheim selon le protocole établi suivant.

Dans un flacon de 15 mL contenant 6 mL de milieu de séparation des lymphocytes PANCOLL® Humain (PAN biotech™) d'une densité de 1.077 g/mL et une osmolarité de 280 à 300 mOSM/kg, on ajoute délicatement (sans mélanger), 8 mL de sang total.

Une centrifugation 30 minutes à 1200 g à température ambiante et sans le frein, permet de collecter l'anneau de PBMC formé à l'interface PANCOLL/plasma. Les cellules sont

lavées 3 fois avec 15 mL de PBS stérile avec une centrifugation à 400 g durant 10 minutes à température ambiante.

Les PBMC sont re-suspendues dans un faible volume de milieu de culture (RPMI 1640 (Invitrogen, Life technologies), 10 % Sérum de Veau Foetal (SVF) irradié, 1 % Penicilline-streptomycine 5000 U/mL (Invitrogen, Life technologies), 0,01 % 2 $\beta$ -Mercaptoethanol) 14.3M solution (Sigma Aldrich) pour numération.

La qualité des cellules est mesurée et interprétée après une analyse par cytométrie en flux (section 3.2.1 page 42).

Ce protocole est régulièrement mis en application dans ce laboratoire et sa procédure est confortée par une mise sous qualité. Les cellules, issues de l'isolement par cette méthode sont donc considérées comme des cellules de référence, après validation par une méthode de référence (ELISPOT 3.3.5).

**Isolement des PBMC des protocoles 2a, 2b et 3** En ce qui concerne les protocoles 2a et b, j'ai réalisé toutes les manipulations au laboratoire de virologie de la station expérimentale de Atton (voir section 3.2 page 34).

Les isolements de PBMC dans le cadre du protocole 3 ont été effectués par une technicienne de l'ONSSA (voir section 3.5) que j'ai formé à distance à la technique, à l'aide de protocoles techniques détaillés et de nombreuses communications orales et emails.

Les PBMC de tous les protocoles cliniques ont été effectués avec le même protocole d'isolement, en déposant 10 mL de sang total de chien (voir section 3.1) dilué au demi, avec du PBS contenant 2 % de SVF décomplémenté, sur un coussin de 15 mL de lymphoprep® (Stemcell technologies™) ayant une densité de 1,007 g/mL. A cette pression osmotique, les granulocytes et les érythrocytes ont une densité supérieure et sédimentent à travers le tampon durant une centrifugation de 10 minutes à 1200 g. Les polysaccharides le constituant, permettent l'agrégation des érythrocytes en augmentant leur sédimentation. Les monocytes ayant une densité inférieure, restent à l'interface entre le plasma et le tampon.

Un tube spécifique est utilisé pour faciliter et accélérer le processus. En effet le tube Sepmate® (Stemcell technologies™) contient un anneau de plastique qui se situe au niveau de la surface du tampon. Après centrifugation (sans frein), l'interface plasma/tampon se situe juste au dessus et le culot est pris au piège au dessous. La phase supérieure peut alors être transférée par renversement dans un autre flacon. Dépourvues de lymphoprep, les PBMC peuvent être culotées ensuite avec du PBS 2 % SVF par une centrifugation à 400 g pendant 10 minutes à +4 °C et une reprise dans 5 mL de tampon de traitement. Un traitement (que l'on réalise systématiquement) est nécessaire pour éliminer les quelques traces d'hématies qui peuvent subsister.

On utilise alors le principe de choc osmotique pour que les cellules explosent dans le tampon dont la formule m'a été transmise (voir tableau 1 en annexe). Un contact de 10 minutes à +4 °C sous agitation suffit pour clarifier les monocytes.

8 mL de PBS 2 % SVF sont rajoutés ensuite avant un dernier lavage (centrifugation de 10 minutes à 400 g à +4 °C), nécessaire avant la numération. Le culot est repris avec 5 mL de PBS 2 % SVF. La suspension est stockée le temps de la numération, au maximum une heure à +4 °C).

Entre  $3,5.10^6$  et  $1,6.10^7$  cellules sont isolées par millilitre de sang en moyenne selon l'animal et le jour de la manipulation avec des viabilités systématiques de 100 % (voir section 3.2.1).

## La congélation

N'ayant que ponctuellement accès à des échantillons de sang de chien, une congélation des PBMC a été indispensable pour les mises au point des techniques utilisées. De plus, l'optique ayant été de réaliser des échantillonnages sur le terrain et d'effectuer les expérimentations en laboratoire, il était impératif de mettre au point une méthode fiable de congélation des PBMC.

Il a été montré que la congélation des PBMC maintenait les fonctions CD4+ et CD8+ en ELISPOT assay chez l'Homme ([Kreher et al., 2003](#)) ainsi que la production de cytokines ([Wang et al., 1998](#)). Par contre des limites ont été décrites dans l'utilisation de PBMC cryopréservées pour des essais fonctionnels de caractérisation des cellules T ([Costantini et al., 2003](#); [Weinberg et al., 2009](#)). Ainsi, une optimisation est nécessaire pour maximiser la préservation des fonctions antigènes spécifiques des lymphocytes après congélation ([Disis et al., 2006](#)).

Il s'agit de ramener les cellules à une température très basse pour leur conservation en azote liquide (-162 °C). Un refroidissement lent des cellules entraîne la mort cellulaire par déshydratation. Un refroidissement rapide entraîne la mort cellulaire par dommages dus aux cristaux de glace interne. On ne peut pas protéger les cellules d'un refroidissement rapide. On peut au contraire utiliser un agent cryoprotecteur (ici le DiMethyl SulfOxide (DMSO)) qui protégera les cellules de la déshydratation. De plus un abaissement de la température à une vitesse lente permet au DMSO de remplacer l'eau sans porter atteinte à l'intégrité de la cellule. Une vitesse de -1 à -3 °C/minute est préconisée.

Après une centrifugation des cellules obtenues après isolement (section 3.2.1), les culots cellulaires sont repris avec un mélange de milieu RPMI sans Glutamine (GLN) avec 10 % de DMSO et 20 % de SVF.

Les cellules sont congelées à une densité de  $7.510^6$  cellules par cryotube NUNC® de contenance 1.5 mL.

Les tubes sont placés dans des boites spécialement conçues pour faire descendre la température des tubes contenus, de  $-1$  °C/minute après stockage à  $-80$  °C (vitesse de diminution idéale).

En ce qui concerne les protocoles 1 et 2 (section 3.1.3 et 3.1.4), on a utilisé les boites CoolCell® (biocision™) (annexe 5A). Il s'agit d'une boite en polystyrène compact, comportant un anneau de métal en son coeur qui permet la baisse de température de façon homogène et répétable.

En ce qui concerne le protocole 3 (section 3.1.5), les boites Mr. Frosty® (Nalgene™) ont été utilisées (annexe 5B). Le principe est un support pour les tubes en plastique. Ce support, dans la boite, se trouve en contact avec une mousse qui doit être en permanence imprégnée d'isopropanol. Il est crucial que la mousse ne s'assèche pas, en vérifiant régulièrement le niveau du produit. En effet c'est ce dernier qui permet une baisse de température idéale de  $-1$  °C/minute.

En résumé, la congélation est une étape critique. Les cellules peuvent ne pas survivre à un contact trop long à température ambiante avec le milieu contenant du DMSO, ainsi qu'à une congélation trop rapide.

## La décongélation

La décongélation est également une étape critique et doit être optimisée ([Ramachandran et al., 2012](#)).

En effet, elle doit être rapide, et plusieurs lavages sont nécessaires pour éliminer l'agent cryoprotecteur des cellules. Elle doit malgré tout être délicate car les cellules ont été physiquement fragilisées.

Plusieurs paramètres ont été testés et celui donnant une meilleure viabilité des cellules après décongélation, a été retenu.

Les cryotubes sont placés au bain marie à  $+37$  °C jusqu'à ce que reste un petit glaçon. Une fois les tubes séchés et désinfectés, sous PSM, le contenu de plusieurs cryotubes est transféré, avec une pipette pasteur, délicatement (si nécessaire jusque 5, au delà, une perte de cellules a été constatée) dans un milieu complet (tableau 3.1 page 42) à température ambiante.

Un premier lavage avec une centrifugation à 400 g pendant 10 minutes permet d'éliminer le surnageant par renversement et le culot ressolubilisé dans le faible volume restant. Il s'agit d'une étape importante, un culot mal ressolubilisé à cette étape n'a que peu de chance de se solubiliser à nouveau. Un nouveau lavage est indispensable pour retirer tout

Tableau 3.1 – Composition du milieu complet

Milieu complet	
Réactifs	Concentration finale
RPMI	QSP
SVF	10 %
Glutamine	5 mM
Péniciline	100 mM
Streptomycine	100 U
Beta-mercapto-ethanol	$10^{-5}$ M

le DMSO. Même remarque que précédemment pour la solubilisation du culot qui est plus coriace lors de ce deuxième lavage. Il faut y mettre le temps suffisant.

### Analyse des cellules

Chacune des étapes de prélèvement sanguin (voir section 3.1.6), d'isolement des PBMC (voir section 3.2.1), de congélation (voir section 3.2.1) et de décongélation (voir section 3.2.1) est cruciale, et peut entraîner dans des conditions inadéquates, soit une perte de cellules, soit une mortalité ainsi que la perte de leur phénotype (capacité à sécréter correctement des cytokines etc.).

Il est indispensable de caractériser les différents lots de cellules en analysant ces trois paramètres. A chaque décongélation et avant toute utilisation d'une suspension cellulaire, la viabilité est mesurée et la concentration en cellule déterminée.

**Numération automatique des cellules et mesure de la viabilité** La numération se fait sur une dilution de la suspension au demi, avec du Bleu Trypan et est effectuée avec un compteur automatique, le TC20<sup>®</sup> (Biorad<sup>™</sup>). On obtient une concentration en cellules vivantes et le pourcentage de viabilité.

**Analyse détaillée des cellules par cytométrie en flux** On peut analyser lorsque cela est possible, également la composition des PBMC (types de cellules) et la viabilité associée à nos cellules cibles (les lymphocytes), par cytométrie en flux.

Nous n'avons pas de cytomètre en flux au laboratoire mais avons collaboré avec des collègues (équipe R&D immunologie, chez Boehringer Ingelheim<sup>®</sup>), ayant le matériel et l'expérience, j'ai été formée pour effectuer les manipulations nous ayant permis d'effectuer des analyses de viabilité sur toutes les cellules du protocole 1 (voir section 3.1.3) et quelques cellules du protocole 3 (voir section 3.1.5).

Le principe est le passage de cellules dans un canal très fin permettant d'isoler chaque

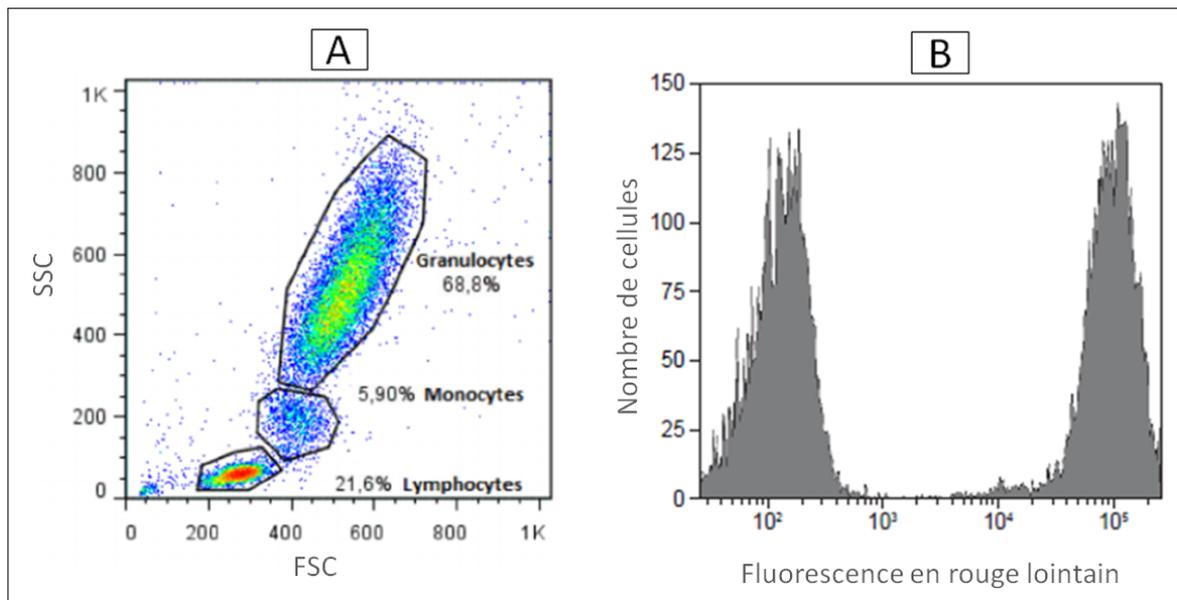


FIGURE 3.6 – **Caractérisation des cellules par cytométrie en flux A** : Différentes populations de cellules du sang total caractérisées en cytométrie en flux (BIO-RAD, 16). SSC-A représente la granularité et FSC-A la taille des cellules. **B** : Histogramme à un paramètre montrant le contraste entre le signal des cellules vivantes (pic de gauche) et cellules mortes (pic de droite) après un marquage au rouge lointain (far red) (image provenant du guide de l'utilisateur du kit LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits™ (Thermo Fisher Scientific Inc.).

cellule. Celles-ci passent devant des lasers et des capteurs situés à différents points et qui enregistrent un signal sur la base des caractéristiques de leur dispersion lumineuse.

On peut mesurer la taille des cellules, puis leur granularité. La représentation graphique a deux axes : SSC (Side light scatter) représentant la granularité ou la complexité, et en ordonnée FSC (Forward light scatter), pour la taille en abscisse. Les différentes populations de cellules du sang sont bien caractérisées avec cette technique car bien distinctes (voir figure 3.6A).

La viabilité cellulaire et la présence de composants cellulaires et de certaines protéines sont quelques-uns des paramètres qui peuvent être déterminés grâce au marquage des cellules avec des molécules ou anticorps fluorescents adaptés. La lumière fluorescente émise par ces colorants, quand ils traversent le laser d'excitation, est dirigée au travers du système optique puis analysée.

On utilise le kit VIVID LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit , for 633 or 635 nm excitation (Thermo Fisher Scientific Inc.) pour marquer les amines libres se situant à la surface des cellules et à l'intérieur de celles-ci. Le marqueur fluorescent pourra passer la membrane dégradée des cellules mortes, et aura accès aux amines libres internes, entraînant ainsi un marquage intense de ces cellules. La différence d'intensité entre les cellules mortes et vivantes est typiquement supérieure à 50 fois (voir figure

3.6B).

La lecture des signaux est réalisée avec le BD FACS CANTO™ II (BD) et l'analyse avec le logiciel du fabricant. Une première analyse est réalisée avec les critères SSC et FSC. On va alors repérer la population de lymphocytes (entre 50 K et 100 K) et les sélectionner pour ensuite visualiser les cellules avec les critères SSC et fluorescence en rouge lointain.

### Le transport des PBMC congelées

En ce qui concerne les PBMC du protocole clinique 3 réalisé au Maroc, les cellules ont été envoyées par un transporteur sous carboglace. Avant cela elles ont été transférées, par barrettes de 5 cryotubes sortant d'un tank à azote, dans des sacs étanches. En tout environs 700 tubes ont été transférés du laboratoire Marocain au laboratoire de l'ANSES. A l'arrivée du colis, les barrettes ont été triées rapidement avant d'être transférées dans un tank à azote compatible avec le système de barrettes. Au bout de quelques années de stockage, il a fallu transférer les cellules dans un nouveau tank à azote, plus petit et au format boîtes.

Les cellules ont été triées rapidement et transférées dans des boîtes puis stockées à nouveau à l'azote.

### 3.2.2 Les stimulations

**Principe et mise en œuvre** Il s'agit, lorsqu'ils sont présents, de réactiver *in vitro* les lymphocytes mémoires spécifiques d'un antigène, avec ce même antigène. Les cellules activées auront alors diverses réactions que l'on pourra caractériser par différentes techniques.

Les suspensions cellulaires sont réparties dans des puits d'une plaque de culture 96 puits à fond rond à raison de 100  $\mu\text{L}$  d'une suspension 2x concentrée dans du milieu complet (voir tableau 3.1).

Les principes actifs de stimulation, ou le milieu de culture (dans le cas de puits de cellules témoins non stimulées), sont répartis à raison de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution 2x concentrée.

L'incubation des plaques se fait dans une étuve humide à +36 °C à 5 % de  $\text{CO}_2$  avec un temps variable selon l'essai.

A la fin de l'incubation, les plaques sont centrifugées à 1000 rcf pendant 5 minutes. On transfère alors la totalité du volume de surnageant avec 400  $\mu\text{L}$  de milieu complet (dilution au tiers) que l'on stocke à -80 °C dans une plaque 96 puits à puits profonds «protein lowbind» (fabriquée avec un plastique traité pour ne pas capturer les protéines à sa surface), pour analyse des protéines du surnageant. Le culot est repris dans 200  $\mu\text{L}$

de Total RNA lysis buffer® du kit Iprep Purelink Total RNA® (INVITROGEN™) pour extraction d'ARN, après stockage dans des plaques 96 puits profonds DNA low bind (même remarque que plus haut mais les plaques sont traitées pour le stockage optimal d'acides nucléiques), à -80 °C.

### 3.2.3 Les antigènes

#### Les antigènes polyclonaux

**Concanavaline A** La Concanavaline A (ConA) est une lectine et se fixe principalement intracellulairement sur les groupes terminaux non réduits  $\alpha$ -D-mannosyl et  $\alpha$ -D-glucosyl. La ConA est connue pour stimuler quatre populations distinctes de LT et au moins un groupe de lymphocytes T humains (Palacios, 1982). Elle a été utilisée dans plusieurs travaux pour stimuler les lymphocytes canins (Chamizo et al., 2001; Saldarriaga et al., 2006; Im Hof et al., 2008; Rodrigues et al., 2009).

**PMA/iono** L'activation des lymphocytes T nécessite une cascade de réactions faisant intervenir plusieurs molécules et phénomènes clés. Elle passe par une activation d'une protéinase K C, et une augmentation de calcium intracellulaire.

Le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) est une petite molécule qui diffuse à travers la membrane plasmique et qui va directement activer une protéine kinase C shuntant la nécessité d'une fixation à un récepteur de surface. La ionomycine est un ionophore calcique sélectif très puissant qui augmente la concentration intracellulaire en calcium.

Ces deux molécules couplées ont été utilisées dans plusieurs travaux pour stimuler les lymphocytes canins (Lenarczyk et al., 2000; Hartley et al., 2014), en particulier Chapat et al. (2017) pour une stimulation *in vitro* avec un antigène rabique mettant en évidence par ELISPOT une immunité cellulaire spécifique.

Cette technique est utilisée comme recommandée dans cette dernière publication, à une concentration finale de 20 ng/mL de PMA et 1  $\mu$ M de ionomycine pour réaliser les stimulations dans le cadre de l'ELISPOT IFN $\gamma$ .

#### L'antigène non spécifique

Pour contrôler la spécificité de la réponse au virus de la rage, on utilise un contrôle avec un antigène assez proche.

Le Calici Virus Félin, de l'anglais «Feline Calici Virus» (FCV) est, comme le virus de la rage, un virus à ARN enveloppé. Ce dernier est inactivé à la  $\beta$ -propiolactone et est utilisé à une concentration finale de 10  $\mu$ g/mL.

Je n'ai pas plus de précisions sur ce Principe actif (PA) car provenant d'une production privée, il ne m'en n'a pas été donné les détails de sa fabrication et ses caractéristiques précises.

### **L'antigène spécifique rabique (antigène de rappel)**

Un virus rabique inactivé à la  $\beta$ -propiolactone est utilisé à une concentration finale de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  également.

Ce PA ayant la même provenance que l'antigène non spécifique et le même statut de propriété, je n'ai pas plus de précisions à détailler.

## **3.2.4 Les différents protocoles de stimulation mis en application**

### **Mise en évidence d'une variation de l'expression des cytokines $\text{IFN}\gamma$ et $\text{IL4}$ par qPCR**

Pour étudier l'effet dose par qPCR, d'un antigène polyclonal (la concanavaleineA) a différentes concentrations finales (0,63 ; 1,25 et 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), on réalise des stimulations sur les PBMC issues du protocole 2b, animal A et prélèvement sanguin de J3. Après décongélation, on réalise une stimulation de  $2 \cdot 10^6$  cellules par puits, en duplicat et on incube 6 h à  $+37^\circ\text{C}$  en étuve humide avec 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Les plaques sont centrifugées et les culots repris dans du tampon de lyse selon le protocole décrit 3.2.2 page 44.

Avec les PBMC issues du protocole 2b, animal A et prélèvement sanguin de J3, on cherche à déterminer le temps d'incubation adéquat à cette réponse à conA, en stimulant  $2 \cdot 10^6$  cellules par puits, en duplicat avec des concentrations finales de ConA de 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et une incubation de 6 h, 24 h et 48 h à  $+37^\circ\text{C}$  en étuve humide avec 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Les plaques sont centrifugées et les culots repris dans du tampon de lyse selon le protocole décrit 3.2.2 page 44.

Les ARN extraits sont traités en qPCR (section 3.4 page 53).

### **Validation des cellules de référence et l'antigène de rappel avec la méthode de référence ELISPOT $\text{IFN}\gamma$**

Cette méthode de mesure de l'immunogénicité spécifique antirabique après vaccination avec Rabisin est décrite par [Chapat et al. \(2017\)](#) .

Les suspensions cellulaires fraîchement isolées du protocole 1 (section 3.2.1 page 38) ajustées à  $10^7$  cellules/mL avec du milieu de culture (voir composition tableau 3.1 en annexe) sont, pour chaque animal, réparties en 4 puits contenant 500  $\mu\text{L}$  de milieu de culture à raison de 500  $\mu\text{L}$  par puits (soit  $5 \cdot 10^5$  cellules par puits). 100  $\mu\text{L}$  de PBS (NA), 100  $\mu\text{L}$  de PA FCV, 100  $\mu\text{L}$  de PA rage et 100  $\mu\text{L}$  de PMA/iono sont transférés aux concentrations décrites section 3.2.3 page 45. Une incubation de 48h est idéale et le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.3.5 page 52.

### **balayage des expressions en protéines et en transcrits, de plusieurs cytokines/chemiokines dont IFN $\gamma$**

Dans le but de réaliser un balayage grossier (pas de réplicat) des expressions en protéines de plusieurs cytokines/chemiokines différentes dont IFN $\gamma$  et IL4, on réalise un ELISA multiplexe grâce à la technologie luminex (voir section 3.3.4 page 51) sur les surnageants de stimulation et une qPCR sur les culots.

Ainsi les suspensions cellulaires précédemment décrites pour l'ELISPOT, sont en parallèle réparties en 4 puits d'une plaque 96 puits de culture cellulaire, à raison de 100  $\mu\text{L}$  par puits (soit  $10^6$  cellules par puits). 100  $\mu\text{L}$  de PBS (NA), 100  $\mu\text{L}$  de PA FCV, 100  $\mu\text{L}$  de PA rage et 100  $\mu\text{L}$  de PMA/iono sont transférés aux concentrations décrites section 3.2.3 page 45. Une incubation de 72 h est idéale et le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.2.2 page 44.

### **Mesure de l'expression des ARNm, après activation avec l'antigène de rappel**

Dans le but d'étudier le profil d'expression de IFN $\gamma$  et IL-4 après une stimulation spécifique, des PBMC de chiens hyperimmunisés avec un vaccin antirabique (voir protocole 2b section 3.1.4 page 32) sont stimulées avec le PA rage sur 3 réplicats techniques de  $10^6$  cellules par puits.

5 cryotubes de PBMC du chien C du protocole 2b isolées d'un prélèvement sanguin à J9, sont décongelés (selon le protocole section 3.2.1 page 41) et les cellules analysées.

Le PA rage est transféré dans les puits aux concentrations décrites section 3.2.3 page 45. Une cinétique d'incubation à 3 h, 6 h et 48 h est réalisée dans une étuve humide à  $+37^\circ\text{C}$  et 5 % de  $\text{CO}_2$ .

En parallèle on stimule un puits de cellules avec de la ConA à une concentration de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 6h et 48h.

De plus on réalise deux puits de contrôle de cellules non stimulées dans lesquels on transfère 100  $\mu\text{L}$  de PBS.

Le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.2.2 page 44 dans le but de récupérer les culots cellulaires et les surnageants de culture.

### **Détection de l'immunogénicité cellulaire antirabique par qPCR et ELISPOT**

On désire mesurer une réponse cellulaire T, spécifique de  $\text{IFN}\gamma$  après stimulation spécifique avec l'antigène de rappel (voir section 3.2.3 page 46) sur les PBMC des animaux des protocoles de vaccination avec un vaccin inactivé et un vaccin vivant, le tout comparé aux réponses obtenues par les animaux naïfs (voir protocoles 2a, 2b et 3 sections 3.1, 3.2 et 3.5 pages 32, 34 et 37). Les cellules des protocoles 1, 2a et 2b sont décongelées (section 3.2.1 page 41) et mises en culture à une concentration de  $10^7$  cellules/mL.

Pour ce qui est de l'ELISPOT, le protocole de stimulation est le même que celui utilisé pour la validation des cellules de référence (section 3.2.4 page 46). Des stimulations sont réalisées (section 3.2.2 page 44) en quatre réplicats pour les traitements avec le PA rage, le PA FCV, PMA/iono et le contrôle non stimulé NA.

En ce qui concerne la stimulation en plaque de culture 96 puits dans l'optique d'une analyse en ELISA et en qPCR, les cellules sont distribuées à raison de  $10^6$  cellules/puits et les stimulations comme décrites section 3.2.4 page 47 et le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.2.2 page 44 dans le but de récupérer les culots cellulaires et les surnageants de culture.

### **Mesure de la réponse cellulaire à un vaccin vivant inoculé par voie orale**

Suivant les résultats obtenus lors des stimulations décrites, les PBMCs du protocole clinique 3 seront toutes décongelées et on réalisera soit une stimulation en plaque ELISPOT, soit en plaque de culture pour un ELISA et une qPCR, soit les deux selon la quantité et la qualité des cellules après décongélation.

## **3.3 Approche analytique avec cibles protéiques**

### **3.3.1 Le titrage des anticorps neutralisants**

Les anticorps neutralisants présents dans le sérum des chiens vaccinés sont titrés selon la méthode FAVN test (Cliquet et al., 1998).

Les titrages ont été réalisés par l'équipe « sérologie » du laboratoire qui est formé à cette méthode dont le laboratoire est accrédité.

Brièvement, les sérums sous différentes dilutions sont placés en présence de virus fixe de référence ayant une concentration connue, dans des puits d'une plaque 96 puits. Après

incubation d'une heure à +37 °C, les cellules BHK21 sont ajoutées.

Après 48h d'incubation à +37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>, un immunomarquage à l'aide d'un anticorps antirabique marqué à la fluoresceïne isothiocyanate (FITC) est réalisé. Le nombre de puits par dilution, présentant de l'immunofluorescence est compté. Selon la méthode de Spearman-Kärber et grâce à l'utilisation d'un sérum de référence de titre connu, on calcule un titre d'anticorps correspondant à la quantité d'anticorps ayant neutralisé la moitié des virus, et qui s'exprime en "UI/mL".

### **3.3.2 Diagnostic de rage par immunomarquage direct (FAT) et de particules infectieuses en culture cellulaire (RTCIT)**

Le diagnostic de rage se réalise post-mortem en prélevant le SNC de l'animal décédé.

Le but est d'une part pour les animaux morts en cours de protocole clinique après une épreuve virulente (animaux naïfs du protocole 3), de savoir s'il s'agit d'une infection à virus rabique. D'autre part, en fin des protocoles cliniques 2b et 3 (pour les animaux vaccinés), il s'agit de confirmer l'absence d'infection.

Pour le protocole 2b, le diagnostic est réalisé au laboratoire de l'ANSES, par une équipe compétente et dédiée. En ce qui concerne le protocole 3, le même protocole est réalisé au laboratoire de l'ONSSA.

On cherche en parallèle à mettre en évidence la présence de protéines virales dans le SNC quel que soit l'état du virus (FAT) et la présence de virus infectieux (RTCIT). Ces techniques sont des techniques de référence de l'OIE pour le diagnostic rabique.

Brièvement, en ce qui concerne le FAT, une coupe de SNC est déposée sur une lame de microscopie pour en réaliser une empreinte. Après fixation à l'acétone, un conjugué anticorps anti-rabique et un FITC, sont déposés dessus. Après un lavage à l'eau, une lecture se fait sous un microscope à lampe de mercure. En cas de présence de virus, on peut voir des *foci* verts.

Le diagnostic en RTCIT se réalise à partir de cellules nerveuses saines (lignée N2a ATCC). Les virus sont inoculées aux cellules et après 48 h d'incubation à +37 °C en étuve humide avec 5 % de CO<sub>2</sub>, le tapi cellulaire est fixé à l'acétone et le conjugué immunomarqué est déposé et incubé à +37 °C en étuve humide avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Après un lavage à l'eau, une lecture se fait sous un microscope à lampe de mercure. En cas de présence de virus, on peut voir des *foci* verts.

### 3.3.3 La quantification des protéines par ELISA

On désire mesurer une réponse spécifique en protéines IFN $\gamma$  sécrétées dans le surnageant de culture, après stimulation spécifique avec l'antigène de rappel (section 3.2.3 page 46) sur les PBMC des animaux des protocoles 2 et 3. Des stimulations sont réalisées (section 3.2.2 page 44) en quatre réplicats pour les traitements avec le PA rage, le PA FCV, PMA/iono et la contrôle non stimulé NA.

Dans le but de mesurer une réponse en protéines IFN $\gamma$  dans le surnageant de culture cellulaire, on effectue un Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

On utilise les kits «Canine IFN-gamma DuoSet ELISA»<sup>®</sup> et «Canine IL-4 DuoSet ELISA»<sup>®</sup> de R&D systems<sup>™</sup>, selon les modes opératoires du fabricant. Les réactifs nécessaires se retrouvent sous une autre référence également chez le même fabricant : le Ancillary duoset reagents 2.

En ce qui concerne le kit ELISA IFN $\gamma$ , un standard est fourni et une courbe est effectuée avec les résultats de chacune des 6 dilutions au demi effectuées dans de la Bovine Serum Albumine (BSA), donnant une gamme allant de 2000 pg/mL à 31,3 pg/mL.

La gamme du standard de IL-4 va de 6000 pg/mL à 93,8 pg/mL.

#### Principe et mode opératoire

Le principe est un ELISA sandwich avec mesure par colorimétrie.

Il s'agit de plaques sur le fond des puits desquels on fait s'accrocher sur la nuit à température ambiante, des anticorps de captures dirigés contre les cytokines cibles. Chaque étape est suivie d'une série de trois lavages avec un tampon contenant 0,05% de tween dans du PBS.

Le fond de la plaque est «bloqué» avec de la BSA, c'est à dire que celle-ci s'accroche également au fond du puits, là où il n'y a pas d'anticorps, pour ne pas laisser de surface plastique pouvant accrocher nos protéines d'intérêt (baisse du bruit de fond).

100 $\mu$ L d'échantillon ou de standard sont transférés alors dans les puits et la plaque est incubée 2h à température ambiante.

Des anticorps de détection biotinylés sur leur partie Fc (figure 4 en annexe), sont introduits à une concentration optimisée par le fabricant. Ils reconnaissent la cible également.

L'étape suivante est la fixation par forte affinité à la biotine, de la streptavidine qui est couplée à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxydase).

Le substrat de l'enzyme HRP est ensuite introduit. Il s'agit du TMB (Tetramethylbenzidine), dont le produit de dégradation est bleu. Sa concentration est proportionnelle à la quantité d'anticorps de détection fixés, qui est proportionnelle à la quantité de protéines cibles introduites.

De l'acide chlorhydrique stoppe la réaction et transforme le bleu en jaune et stabilise la réaction durant quelques heures.

Lors de la lecture au spectrophotomètre un spectre lumineux continu provenant d'une lampe halogène traverse les puits et des lectures de longueur d'ondes (Densité Optique (DO)) sont effectuées avec un filtre principal à 450 nm et un filtre à 540 nm pour une correction et éliminer le bruit de fond individuel de chaque puits.

### Traitement des données brutes

Plusieurs étapes de traitements des données brutes sont effectuées.

En premier lieu une soustraction des valeurs de DO du filtre 540 nm aux valeurs du filtre 450 nm est effectuée pour retirer le bruit de fond, comme le préconise le fabricant.

Ensuite concernant le standard, la valeur du « blanc » (bruit de fond) est soustraite aux différentes valeurs des dilutions.

Les données ainsi transformées sont introduites dans l'application en ligne du site [www.elisaanalysis.com](http://www.elisaanalysis.com) afin d'obtenir une courbe de régression logistique à 4 paramètres (voir exemple annexe 9) avec le standard. Cette dernière permet d'obtenir les correspondances de chaque DO mesurée par échantillon (en réplicats), en concentration moyenne.

### Validation de l'essai

Pour valider un essai ELISA, on analyse le standard. Le  $R^2$  de la courbe doit être très proche de  $1 \pm 0,01$  et la DO du « blanc » doit être plus petite que celle de toutes les dilutions.

### 3.3.4 La quantification des protéines par Luminex

La technologie xMAP® Technology (unknown multi analyte profiling) permet de réaliser sur un même surnageant, un dosage type ELISA de de multiples protéines. Il s'agit de capturer les protéines par des anticorps de captures accrochés à un support. Ici on utilise des microbilles magnétiques. Les étapes suivantes consistent en un accrochage secondaire avec un anticorps de détection marqué dont on pourra lire la fluorescence avec un lecteur compatible. L'intérêt de cette technologie est qu'il est possible de fixer sur les billes des anticorps, jusqu'à 80 cibles différentes, pour réaliser en un seul puits une analyse multiplexe.

Après une stimulation (voir section 3.2.4 page 47), les concentrations de multiples cytokines canines (IL-8 (CXCL8), SCF, IL-2, IL-10, tumour necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , IL-4, IL-12/IL-23 p40, VEGF-A, IL-6, MCP-1 (CCL2) et IFN $\gamma$ ) sécrétées dans le surnageant

de culture ont été dosées en utilisant le kit LUMINEX (Affymetrix ProcartaPlex Canine 11-Plex, Ebioscience SAS, Paris, France), selon les recommandations du fabricant, la lecture se faisant avec l'appareil Luminex® FLEXMAP 3D® System et l'analyse avec le logiciel l'accompagnant.

Un standard est dilué en série pour chaque cible et une courbe de régression logistique à 4 paramètres est réalisée par le logiciel intégré à la machine. On pourra alors calculer les concentrations pour chaque cible dans chaque puits.

### 3.3.5 La détection de cellules immunitaires répondantes par ELISPOT IFN $\gamma$

L'ELISPOT IFN $\gamma$  est utilisé par Chapat et al. pour montrer une immunogénicité de leur vaccin (RABISIN) chez des chiens beagles (Chapat et al., 2017). C'est donc une méthode référente face à laquelle on compte comparer les résultats de notre méthode de qPCR.

#### Principe et mode opératoire

Les ELISPOT sont réalisés avec le kit Canine IFN-gamma ELISPOT R&D systems™ selon le mode opératoire décrit par Chapat et al. (2017) dans le laboratoire de laquelle j'ai été formée à cette technique). La lecture des spots se fait avec l'intermédiaire d'un lecteur automatique suivi d'une réinterprétation par un opérateur qualifié.

Le kit contient une plaque 96 puits «précoatée» avec des anticorps de captures reconnaissant l'IFN $\gamma$  canin. Le fond de ces puits est fait d'une membrane fine, permettant la culture de cellules sur une «couche» d'anticorps.

Après une étape d'hydratation de la membrane avec du milieu de culture pendant 2 h à température ambiante, nous réalisons alors une stimulation comme décrite plus haut (section 3.2.4 concernant les cellules du protocole clinique 1 fraîchement isolées et section 3.2.4) concernant les cellules du même protocole clinique 3 congelée et décongelées ainsi que les cellules des protocoles 2a et 2b.

Les clones de lymphocytes T répondant à la stimulation vont sécréter des cytokines qui seront immédiatement capturées par les anticorps sur lesquels les cellules reposent.

Après l'incubation de 48 heures, les surnageants sont retirés par retournement et 200  $\mu$ L d'eau froide déionisée sont ajoutées et incubées à température ambiante durant 5 minutes puis «flushées» (par aspiration refoulement rapide à l'aide d'une micropipette multicanale manuelle). Cette étape est recommandée pour éliminer le bruit de fond.

La plaque est lavée 3 fois à l'aide du tampon concentré du kit préalablement dilué 10

fois avec de l'eau déionisée.

100  $\mu\text{L}$  d'anticorps de détection biotinylés sont introduits pour se fixer sur les protéines d'intérêt et incubés une nuit à +4 °C.

100  $\mu\text{L}$  d'un conjugué alcaline phosphatase (AP) - streptavidine est ensuite ajouté après 3 lavages au tampon 1x suivi d'une incubation à température ambiante pendant 2 heures, la streptavidine se fixant fortement à la biotine.

L'ajout de 100  $\mu\text{L}$  du chromogène BCIP/NBT (nitro-blue tetrazolium et 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate), va réagir durant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité avec l'alkaline phosphatase pour produire un produit coloré visible au niveau de chaque clone ayant réagi positivement. Apparaîtront alors des points de couleur indigo que l'on nomme des "spots". Le comptage est effectué à l'aide d'une caméra CCD pilotée par un logiciel *SPOT Software* (Microvision Instruments, Lisses, France), et corrigé à l'œil par un opérateur expérimenté.

En ce qui concerne les stimulations des cellules fraîches du protocole clinique 1 et l'analyse des spots, ils ont été réalisés au laboratoire de R&D immunologie de Boehringer Ingelheim avec un opérateur expérimenté. Pour la stimulation et les stimulations concernant les protocoles 1 (cellules congelées) et 2, j'ai réalisé les manipulations au laboratoire de l'ANSES et effectué la lecture sur un appareil du CHU de Brabois mis à disposition. Je n'ai pas réalisé de correction post-analyse automatique car je ne suis pas expérimentée dans le domaine. Un bruit de fond sera possiblement supérieur pour cette expérience.

### Traitement des données brutes

Les spots sont comptés par puits.

Pour chaque traitement, on réalise un test statistique (voir section 3.5 page 68) sur les données brutes dans le but de déterminer s'il y a ou non une réponse T significative entre les cellules stimulées et les cellules non stimulées.

On calcule ensuite la différence entre le nombre de spots pour un traitement (pour chaque puits) et la moyenne du nombre de spots correspondant aux cellules non stimulées (NA) que l'on représente graphiquement ainsi que les médianes et les quartiles.

## 3.4 Approche analytique avec ciblage des transcrits

### 3.4.1 Les principes généraux

Lorsqu'une cellule reçoit un signal, une cascade de réactions est déclenchée. Selon le signal, un facteur d'expression va déclencher l'expression de certains gènes spécifiques en

se positionnant sur la région promotrice du gène. Celui-ci est composé d'introns (régions non codantes) et d'exons (régions codantes). Seuls ces derniers seront transcrits c'est-à-dire qu'un brin d'ARN complémentaire stabilisé (le «transcrit»), va être synthétisé par une ARN polymérase (ADN dépendante) (voir en annexe schéma 7). Ces derniers seront traduits en protéines. Dans notre projet, des cytokines sont produites à partir des transcrits, et sécrétées dans le surnageant.

Le principe de l'analyse des transcrits est de mesurer l'effet d'un traitement, sur l'expression d'un gène cible. On comparera alors la quantité d'ARN messager (ARNm) dans des cellules traitées par rapport à des cellules non traitées (le calibrateur). De plus l'expression de ces gènes d'intérêt sera calibrée par rapport à un gène qui ne sera pas impacté par le traitement (le gène de référence) (voir section 3.4.2 page 56).

Une fois l'ARN extrait et rétrotranscrit en ADN complémentaire, ce dernier pourra être amplifié par PCR.

La PCR ou Polymérase Chain Reaction conduit à l'amplification *in vitro* de plusieurs milliers de fois une séquence spécifique d'acide nucléique qui peut être minoritaire voire très rare (10-2pg) (Higuchi et al., 1992; Wittwer et al., 1997; Kubista et al., Jun). Elle exploite le processus de la réplication et fait appel, pour cela, à la capacité de l'enzyme ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, des amorces (ou primer) s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrins dans le sens 5' vers 3' et ainsi aboutir à la synthèse de nouveaux ADN doubles brins.

La PCR s'effectue en 3 étapes (voir figure 3.7 page 55) :

- Dénaturation thermique de l'ADN : à +95 °C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.
- Hybridation des amorces : le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrins d'ADN est comprise entre +50 °C et +65 °C (0 d'hybridation (T<sub>m</sub>)). Les amorces en large excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- Extension des amorces : intervention de la Taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée en s'accrochant à l'extrémité 3' d'une amorce. Cette étape s'effectue à une température de +72 °C.

- Au deuxième cycle : la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les 2 amorces font leur apparition.
- Au troisième cycle : Les premiers amplicons apparaissent (ADN double brins borné par les amorces correspondant au fragment d'ADN recherché).

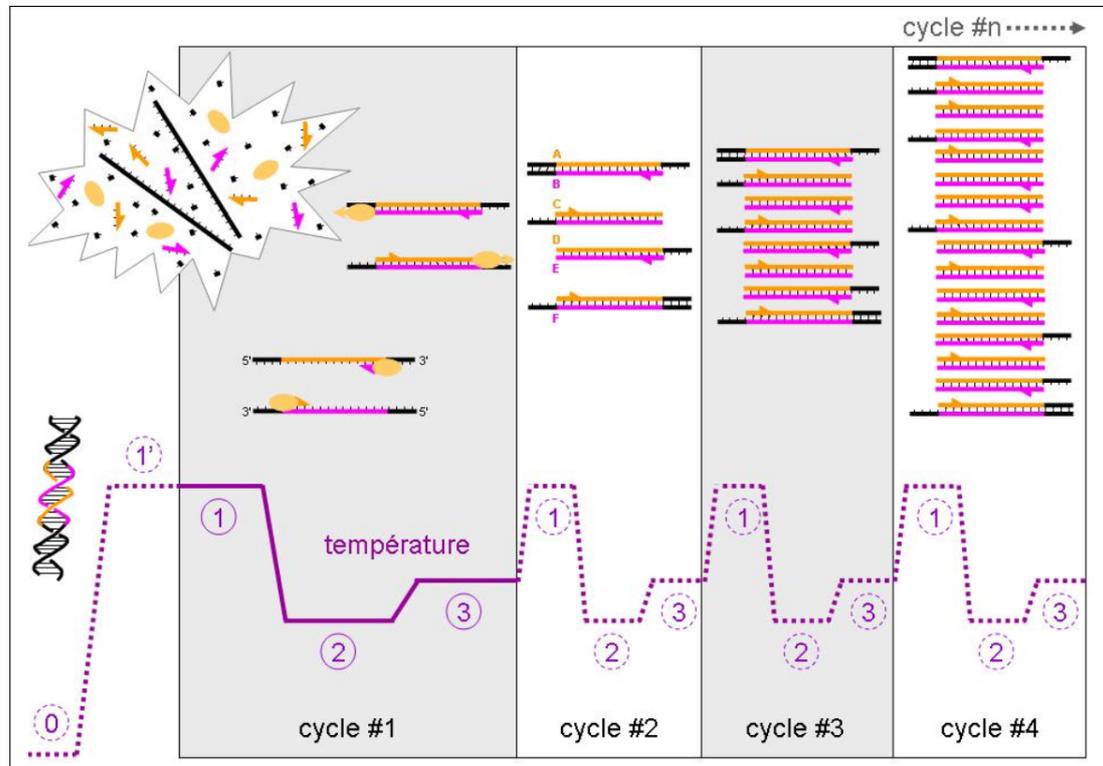


FIGURE 3.7 – Principe de la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR).  
wikipedia (licence GFDL + CC-by-sa)

La technique PCR se réalise par le biais d'un appareil programmable appelé un thermocycleur dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (conditions de la PCR). La réaction PCR est extrêmement rapide, elle ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

Lorsque la quantité de produits d'amplification est suffisante, ceux-ci sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose. Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné d'un produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques faisant apparaître à la molécule d'ADN une fluorescence sous illumination par des UV courts (environ 300 nm ou une lumière bleue). La vitesse de migration étant dépendante de la masse de la molécule, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons peuvent être facilement vérifiables sur le gel.

La technologie des sondes à hydrolyse (autrement appelées TaqMan<sup>TM</sup>) permet d'observer informatiquement l'amplification en temps réel. En effet elle fait intervenir un troisième oligonucléotide en plus des amorces : une sonde. Cet oligonucléotide est marqué en 5' par une molécule fluorescente (fluorochrome) et en 3' par une molécule qui annule la fluorescence du fluorochrome par sa proximité (le quencher). La sonde est complémentaire d'une zone se trouvant entre les deux amorces. L'ADN polymérase utilisée lors de la PCR a une activité polymérase en 3' mais également exonucléase en 5'. La sonde est alors lysée à son passage et les deux extrémités éloignées. Le fluorochrome peut alors exprimer sa fluorescence. Le thermocycleur de PCR en temps réel est équipé d'une lampe à large spectre pouvant exciter les fluorochromes, et d'un capteur et de plusieurs filtres de couleurs différents pouvant isoler des longueurs d'ondes d'intérêt avant lecture. En effet, on peut faire synthétiser des sondes avec une multitude de fluorochromes (et quenchers compatibles). On peut alors réaliser une multiplexe c'est à dire dans un même tube, amplifier et lire les signaux de plusieurs cibles différentes selon les filtres disponibles.

La PCR en temps réel permet, grâce à des «copies» de la cible, de concentration connue (standard) diluées en cascade (gamme), de quantifier précisément un échantillon inconnu d'où son appellation de PCR quantitative ou qPCR.

Un des moyens d'obtenir un standard est d'isoler les ARN messagers et de les inclure dans des plasmides bactériens circulaires de concentration connue. Une gamme de ce standard permet de mettre au point les conditions des qPCR des cibles correspondantes. En effet on pourra déterminer les conditions optimales de celle-ci en trouvant une efficacité proche de 100 % de la PCR.

### 3.4.2 Choix du gène de référence

La quantification relative fait intervenir un gène de référence qui va servir de normalisateur. Ce gène est en effet considéré comme stable dans le modèle présenté, il ne subira alors pas de changement d'expression en fonction des conditions analysées. Ce gène de contrôle va permettre de compenser d'éventuels biais de PCR provenant de :

- variations dans la quantité et la qualité des échantillons
- rendement d'extraction différent entre échantillons
- variations dans les erreurs de pipetage
- variations d'efficacité de RT

Nous avons choisi GAPDH car il a été énormément utilisé dans des études d'expression

relative de gènes chez les vertébrés (Suzuki et al., 2000), en particulier dans l'étude de l'expression de cytokines de PBMC de chiens (Chamizo et al., 2001).

### 3.4.3 Extraction

#### Extraction

L'ARN total des culots de cellules provenant des stimulations (voir en détails les sections 3.2.4, 3.2.4, 3.2.4 et 3.2.4 pages 47, 47, 46 et 48) est purifié avec le kit iPrep purelink total RNA (INVITROGEN™) basé sur une technologie de micoparticules (1  $\mu\text{m}$  de diamètre) de polymère sphériques superparamagnétiques de taille et de surface uniforme permettant une reproductibilité importante. Elles sont différemment sensibles en matière de capture des acides nucléiques en fonction des différents tampons en contact. En fonction des étapes d'extraction de l'ARN, elles sont, grâce à un aimant très puissant, isolées du tampon ce qui permet des lavages efficaces avec un minimum de contamination d'inhibiteurs. Lors de l'étape d'élution, les acides nucléiques se décrochent des billes dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau.

Un volume d'élution plus petit aurait été préférable mais l'appareil ne nous le permet pas avec ce kit.

#### Analyse des ARN

Les échantillons d'ARN sont analysés à l'aide d'un NanodropOne ((R) OZYME) par spectrophotométrie d'absorption.

Cet appareil fait traverser sur une distance fixe à travers un faible volume d'échantillon (micro goutte), un rayon lumineux provenant d'une lampe à décharge au xenon permettant une émission à large spectre.

Une analyse de l'absorbance (A) ou DO de l'échantillon permet d'obtenir des informations sur la concentration et la pureté de ce dernier.

En effet les acides nucléiques comme l'ARN ont une absorbance maximale à 260 nm, celle-ci (lorsque l'échantillon est pur) est proportionnelle à la concentration selon la loi de Beer-Lambert :  $A = \epsilon.l.c$  où « l » est la distance traversée par la lumière émise,  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire spécifique à sa longue d'onde d'absorption maximale (40  $\text{ng.cm}/\mu\text{L}$  pour l'ARN), et de la concentration de cette dernière.

D'autres substances pouvant se retrouver dans l'échantillon, ont une absorbance pouvant interférer sur le résultat de la concentration. Une contamination en protéine par exemple montrera un pic d'absorbance à 280 nm. Le ratio 260 nm/280 nm permet d'avoir une idée de l'importance de cette contamination. Un ratio acceptable se situe entre 2,0 et

2,2 pour l'ARN. Une contamination chimique avec des résidus de tampons de l'étape d'extraction par exemple, peuvent avoir un pic d'absorbance à 230 nm. Le ratio 260 nm/230 nm permet d'avoir une idée de la contamination. Il est idéal entre 2,0 et 2,2.

### 3.4.4 Rétrotranscription

#### Principe

Une PCR ne peut amplifier que de l'ADN. La première étape pour amplifier notre ARNm est de le rétrotranscrire en ADN complémentaire (ADNc) simple brin.

Le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase ((R) Thermofisher) est utilisé selon le protocole du fabricant à partir de 5  $\mu$ L d'ARN.

Il fait intervenir dans un premier temps une dsDNase (qui lyse les ADN double brin) qui élimine les traces d'ADN génomique pouvant inhiber la PCR, et les pseudogenes qui partagent les mêmes séquences en ADN que les ARNm cibles ([Johnson et al., 2004](#)) pouvant donc fausser le signal. La réaction se fait en 2 minutes à +37 °C.

Une transcriptase inverse (dérivée du virus de la leucémie murine ou M-MuLV) réalise ensuite la transcription dans un tampon contenant un inhibiteur de RNase protégeant la matrice des RNases A, B et C et un mix d'oligo (dT)<sub>18</sub> et d'amorces random hexamer pour des quantités d'ARN allant de 1 pg à 5  $\mu$ g. La réaction se fait 10 minutes à +25 °C suivie de 15 minutes à +50 °C pour finir avec une incubation de 5 minutes à +85 °C.

#### Les contrôles

On vérifie l'action de la dsDNase ainsi qu'une bonne conception d'amorces, lorsque la qPCR sur ARN, n'amplifie rien. On réalise alors lors de la rétrotranscription un contrôle sans enzyme de rétrotranscription, le «NoRT».

Le choix d'introduire systématiquement 5  $\mu$ L d'ARN sans prendre en compte le résultat du dosage peut être justifié.

En effet le même nombre de cellules est introduit dans les puits (distribution d'une suspension homogène) (voir section 3.2.2 page 44). De plus, les ARN sont extraits de façon automatisée. Finalement, les quantifications par PCR seront calibrées avec le gène de référence.

Egaliser les quantités d'ARN après stimulation, c'est effacer une éventuelle réaction de prolifération cellulaire donc une information.

Dans ce sens également, le dosage des ARN n'est pas précis parce que potentiellement pollué par des contaminants faussant légèrement les résultats du dosage (Voir section 3.4.3

page 57) et diluer des ARN c'est donc également diluer les contaminants qui n'auront pas la même concentration que les autres échantillons.

Ce choix de ne pas prendre en compte la quantité d'ARN lors de la rétro transcription sera à valider en analysant les Ct pour chaque traitement avec la cible GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase (GAPDH). Pour chacun, les Ct devront être très proches.

### 3.4.5 Conception des amorces

#### La méthode

Une première PCR en point final sera réalisée pour chaque transcrit dans le but d'en réaliser un clonage et construire un standard. On réalisera ensuite des qPCR en focalisant une petite zone de ces transcrits.

Le choix des amorces spécifiques d'un gène s'effectue à partir des séquences d'ADNc disponibles dans les bases de données nucléotidiques : <https://www.ensembl.org/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Les critères permettant de choisir les limites sont assez variables dans la littérature. J'ai choisi de suivre un compromis entre plusieurs chercheurs.

Les amorces sont sélectionnées à une longueur d'environ 20 nucléotides, dans l'optique également d'amplifier la longueur du transcrit complet pour la PCR point final et une zone de la séquence codante variant de 100 à 250 pb pour la PCR en temps réel.

La température d'hybridation ( $T_m$ ) à leur complément, doit être comprise entre +50 et +75 °C.

Le pourcentage en Guanine et en Cytosine (% GC) doit être compris entre 40 et 60%. Les 5 dernières bases (en 3') ne doivent pas contenir plus de 2 G ou C.

La formation théorique de boucles (hairpin) pourrait nuire à l'efficacité des PCR. Les configurations théoriques des boucles, peuvent être étudiées et la température d'hybridation correspondante minimisées si inférieure à +40 °C. De même les amorces peuvent s'apparier entre elles (self dimer). L'énergie correspondante (DeltaG) s'exprime en kcal/mole et doit être supérieure à -6kcal/mole. Ces critères sont vérifiés avec ces outils en lignes : OligoAnalyzer r Tool et PrimerQuestTool (IDT).

La spécificité (longueur et nombre de fragments obtenus, formation de dimères) est testée grâce aux logiciels Primer 3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012), BLAST (Basic Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Dans la mesure du possible, les couples d'amorces pour la qPCR sont choisis de part et d'autre d'un intron afin de pouvoir distinguer une éventuelle co-amplification d'ADN génomique.

En ce qui concerne les sondes, on ajoute d'autres critères. Ainsi le  $T_m$  doit être entre 8 et 10 °C de plus en moyenne que celle des amorces. On évite un G ou C en 5'.

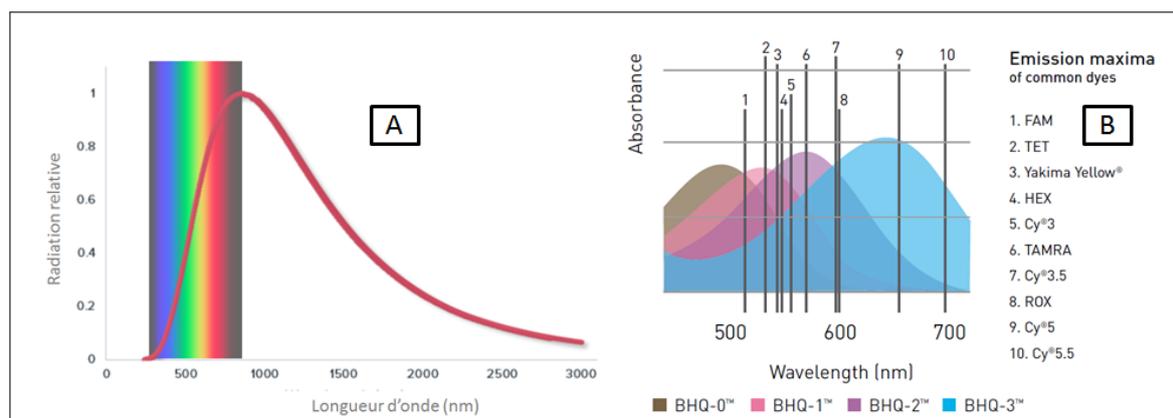


FIGURE 3.8 – **Choix des fluorochromes et quencher.** **A** : Spectre d'excitation de la lampe tungsten halogen du thermocycleur temps réel MX3005P. Les sondes ont des fluorochromes dont l'excitation se fait dans le visible (380nm à 780nm) ; **B** : Spectres d'absorbance des quenchers de la famille des BHQ. Les pics d'émission de certains fluorochromes ont été représentés (barres verticales. source : <https://secure.eurogentec.com/>

## Application

Le chien a 39 paires de chromosomes.

Le gène de l'IFN $\gamma$  de 4,83 kb (Voir annexe 14) se situe sur le chromosome 10. Son transcrit *NM<sub>0</sub>01003174* de 1223 bp comporte 4 exons (Voir annexe 11) et code pour une protéine de 166 acides aminés.

Le gène de l'IL-4 de 8,84 kb (Voir annexe 15) est situé sur le chromosome 11. Son transcrit *NM<sub>0</sub>01003159* de 560 bp comporte 4 exons (voir annexe 12) et code pour une protéine de 132 acides aminés.

Le gène de GAPDH de 3,46 kb (Voir annexe 16) se situe sur le chromosome 27. Son transcrit *NM<sub>0</sub>01003142* de 993 bp comporte 10 exons (Voir annexe 13) et code pour une protéine de 330 acides aminés.

Les caractéristiques des amorces et les conditions de PCR sont indiquées ci-dessous (Voir tableau 3.2 et tableau 3.3 page 61).

Toutes les amorces et sondes ont été synthétisées par un prestataire (EUROFINS Genomics) avec une purification sur colonne HPCL.

Pour chaque couple d'amorces, les conditions de PCR (température d'hybridation et nombre de cycles) ont été optimisées.

Une lampe tungsten halogen émet un spectre continu dans le visible (de 380 nm à 780 nm) (Voir figure 3.8A) et permet d'exciter un certain nombre de fluorochromes (molécule

Tableau 3.2 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des amorces d’amplification des transcrits

Cible	Oligo	Séquence 5' - 3'	Taille
IFN $\gamma$	Sens	GCC TAA CTC TCT GAA ACG ATG	1020 pb
	Antisens	TGG GTA CAG TCA TAG TTG TC	
IL-4	Sens	ATT GTG AGC CTC TCC TAG TA	465 pb
	Antisens	GCT TCA ATG CCT GTA GTA T	
GAPDH	Sens	ATG GTG AAG GTC GGA GTC AAC	961 pb
	Antisens	GTT GCT GTA GCC AAA TTC AT	

Tableau 3.3 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des amorces de qPCR

Cible	Oligo <sup>1</sup>	Séquence 5' - 3'	Taille	Site <sup>2</sup>	Tm	GC%
IFN $\gamma$	Sens	AGG AAG CGG AAA AGG AGT CA	67 pb	(553 $\rightarrow$ 573)	56	50
	Antisens	GGC AGG ATG ACC ATT ATT TCG		(619 $\leftarrow$ 599)	54	47.6
	Sonde	TGC TCT GCG GCC TCG AAA CAG A		(597 $\leftarrow$ 576)	63.3	59.1
IL-4	Sens	TGG CAA ACA AGA CCT GTT CTA	106 pb	(362 $\rightarrow$ 382)	62	42.9
	Antisens	CTT CAA TGC CTG TAG TAT TTC TTC TG		(467 $\leftarrow$ 442)	62	38.5
	Sonde	AGT ACA CTG AAA GAC TTC TTG GAA AGG CT		(400 $\rightarrow$ 428)	68	41.4
GAPDH	Sens	GAT TCT ACC CAC GGC AAA TTC	97 pb	(142 $\rightarrow$ 163)	61	47.6
	Antisens	GAT CTC GCT CCT GGA AGA TG		(239 $\leftarrow$ 219)	62	55
	Sonde	ACG GGA AAC TTG TCA TCA ACG GGA		(185 $\rightarrow$ 200)	68	50

<sup>1</sup> fluorochrome 5'-3'Quencher : HEX-BHQ2 [IFN $\gamma$ ], FAM-BHQ1 [IL-4], CY5-BHQ3 [GAPDH]

<sup>2</sup> Référence aux transcrit AF126247 [IFN $\gamma$ ], AF187322 [IL-4], AB038240.1 [GAPDH]

fluorescente). Ces derniers vont émettre une fluorescence d'un spectre de longueur d'onde plus grande (les fluorescences d'émission). Ces derniers doivent être absorbés par des quenchers associés, en 3' de l'amorce (Voir figure 3.8B page 60).

Les fluorochromes et quenchers ont été choisis dans une éventuelle future multiplexe. Ainsi leurs signaux d'émissions ne se chevauchent pas. Pour IFN $\gamma$  on a flanqué en 5' du fluorochrome HEX (excitation/emission : 535 nm/555 nm) et en 3' du quencher BHQ2 (pic d'absorbance à 580 nm). Pour IL-4 la sonde comporte en 5' le fluorochrome FAM (excitation/emission : 492 nm/516 nm) et en 3' du quencher BHQ1 (pic d'absorbance à 534 nm). La sonde de GAPDH est flanquée en 5' du fluorochrome CY5 (excitation/emission : 635 nm/665 nm) et en 3' du quencher BHQ3 (pic d'absorbance à 670 nm).

### 3.4.6 Conditions de PCR

#### Amplification des transcrits

Les amplifications des transcrits de IFN $\gamma$ , IL-4 et GAPDH sont réalisées à l'aide de la TaqPlatinum™ (INVITROGEN) qui est une ADN polymérase hot start c'est-à-dire qu'elle est associée, à température ambiante, à un anticorps monoclonal qui la bloque. Cet anticorps la libère à +94 °C lors d'une activation initiale.

Un master mix de 18  $\mu\text{L}$  est réalisé et 2  $\mu\text{L}$  de cDNA sont introduits à la réaction, les conditions de PCR ont été alors optimisées pour obtenir à la révélation, une bande marquée et isolée.

Les programmes de PCR sont mis en oeuvre dans le Vertity® Thermal Cyclor (Applied Biosystems™).

On fait migrer les produits de PCR dans un gel d'agarose (2 % dans du tampon TAE) avec un marqueur de taille 1 kb DNA ladder (Promega Corporation). Une fois la taille de la bande visualisée et contrôlée (voir tableau 3.2), on la découpe et réalise une purification du produit de PCR avec le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel) dont on suit le protocole du fabricant. Les produits de PCR purifiés sont ensuite prêts à être intégrés dans un plasmide (voir section 3.4.7 page 63)

**IFN $\gamma$  et IL-4** On utilise une concentration en MgCl<sub>2</sub> finale de 1,5 mM, un mix de dNTP à 250  $\mu\text{M}$  finale et 0,125  $\mu\text{L}$  de TaqPlatinum dans le tampon 1x, qsp 18  $\mu\text{L}$  d'eau libre de DNase. Les amorces sont utilisées à 600 mM final.

Après une activation initiale de la PCR à +94 °C 2 minutes, on réalise 13 cycles de trois étapes : une dénaturation à +94 °C durant 30 secondes, un « touch down » allant de +66 °C à +54 °C, 30 secondes à chaque température et enfin une étape d'extension à +72 °C pendant 2 minutes. Ensuite on réalise 32 cycles de trois étapes : une étape de dénaturation à +94 °C 30 secondes, une étape d'hybridation de +60 °C pendant 30 secondes et enfin une extension +72 °C pendant 2 minutes. La PCR se termine par une étape d'extension finale à +72 °C pendant 10 minutes.

**GAPDH** On utilise une concentration en MgCl<sub>2</sub> finale de 1 mM, un mix de dNTP à 250  $\mu\text{M}$  finale et 0,25  $\mu\text{L}$  de TaqPlatinum dans le tampon 1x, qsp 18  $\mu\text{L}$  d'eau libre de DNase. Les amorces sont utilisées à 2.5  $\mu\text{M}$  final.

Après une activation initiale de la PCR à +94 °C 5 minutes, on réalise 45 cycles de trois étapes : une dénaturation à +94 °C durant 30 secondes, une hybridation à +63 °C 30 secondes et enfin une étape d'extension à +72 °C pendant 1 minute 30 secondes. La PCR se termine par une extension +72 °C pendant 10 minutes.

## qPCR

Les qPCR sont réalisées à l'aide du kit Maxima probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific™) dont le tampon ne contient pas de ROX (molécule fluorescente optionnelle permettant de normaliser le signal en cas de variation de pipettage, nous ne l'utilisons pas).

Un master mix de 18  $\mu\text{L}$  est réalisé et 2  $\mu\text{L}$  de cDNA dilué au demi (pour éviter les inhibitions dûes au tampon de RT (voir section 3.4.4 page 58) sont introduits à la réaction, les conditions de PCR ont été alors optimisées.

En ce qui concerne le milieu réactionnel, on utilise le tampon du kit à raison de 12.5  $\mu\text{L}$  pour un volume final de 25  $\mu\text{L}$ . On teste deux concentrations (0.1 nM et 0.2 nM final) pour les amorces et les sondes. De l'eau DNase free complète le volume. On réalise la qPCR en duplicat pour chaque échantillon. Les concentrations retenues seront sélectionnées en fonction de l'efficacité la plus proche de 100% (voir section 3.4.8 page 66). Pour cela on fait des dilutions de plasmides en cascade au dixième.

Les programmes de PCR sont mis en oeuvre dans le MX3005<sup>®</sup> P (Applied Biosystems<sup>™</sup>) et les filtres de lectures sont FAM pour IL-4, CY5 pour GAPDH et HEX pour IFN $\gamma$ .

Après une dénaturation initiale de la PCR à +95 °C 10 minutes, on réalise 40 cycles de deux étapes : une dénaturation à +95 °C durant 15 secondes puis une hybridation/extension à +60 °C 60 secondes. A la fin de chacun des cycles, l'appareil fait une mesure de la fluorescence et l'enregistre.

### 3.4.7 Construction des standards par clonage

On réalise une construction moléculaire intégrant les transcrits amplifiés, dans des plasmides circulaires que l'on va multiplier par clonage. Après purification, on pourra calculer la concentration en copies du transcrit.

#### Insertion

**Principe** Un plasmide est un ADN double brin circulaire bactérien. Il a la particularité d'être multiplié par la machinerie cellulaire bactérienne. Cette dernière crée alors des clones de ce plasmide.

Des plasmides non linéaires (ouverts) sont fabriqués par biotechnologie pour être utilisés comme outil. Ils comportent beaucoup de gènes et marqueurs génétiques pouvant être reconnus et utilisés par des enzymes et autres facteurs de transcriptions de bactéries.

Les produits de PCR (section 3.4.6) sont insérés dans un plasmide linéaire. L'accrochage de cet insert circularisera le plasmide.

Pour le projet, on utilise le plasmide pJET1.2/blunt du kit CloneJET PCR Cloning Kit (référence K1232, *ThermoFischer SCIENTIFIC*<sup>™</sup>) (Voir figure annexe 6).

Il est terminé à ses deux extrémités par des bouts francs (absence de bases libres), et comporte un gène létal d'une endonucléase ECO47IR au milieu duquel le plasmide est linéarisé. Si l'insert n'est pas intégré, le plasmide autocircularisé sera exploité par la bactérie qui traduira le gène de l'endonucléase et mourra.

**Protocole** Une réaction d'élimination des bouts francs (ou réaction «blunt») de l'insert, est réalisé à partir de 2  $\mu\text{L}$  de produit de PCR. Un milieu réactionnel (18  $\mu\text{L}$ ) est composé de 10  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction 2x, 1  $\mu\text{L}$  d'enzyme «DNA blunt». Le tout est incubé à +70 °C pendant 5 minutes puis placé sur la glace.

La réaction de ligation s'effectue à partir de 2  $\mu\text{L}$  de la réaction de «blunt» auxquels on ajoute 1  $\mu\text{L}$  de pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) et 1  $\mu\text{L}$  d'enzyme T4 DNA ligase. Le tout est incubé à +22 °C pendant 5 minutes.

## **Transformation bactérienne**

**Principe** Une bactérie compétente (dont les propriétés ont été modifiées pour pouvoir accueillir des plasmides artificiels, est transformée c'est à dire qu'elle intègre le plasmide d'intérêt.

Elles sont étalées sur un milieu nutritif riche solide (LB AGAR) en présence d'un antibiotique contre lequel les plasmides comportent un gène de résistance permettant à leur bactérie hôte de résister contrairement à des bactéries opportunistes.

Ici on utilise la Bactérie One Shot® TOP10 (référence C4040-10, Life technologies™) qui va intégrer le plasmide suite à un choc thermique. Après une nuit à +37 °C, des colonies (ensemble de bactéries provenant toutes d'un même individu) sont visible sous forme de petits points. Le plasmide contenu dans ces clones est exactement le même pour tous.

**Protocole** 3  $\mu\text{L}$  de produit de ligation sont transférés dans 50  $\mu\text{L}$  (un tube) de bactéries compétentes. Une incubation sur la glace de 20 minutes est suivie d'un choc thermique à +42 °C pendant 30 secondes entraînant l'intégration du plasmide à travers les pores ouverts de la bactérie compétente. Après une incubation sur la glace durant 2 minutes, 500  $\mu\text{L}$  d'un milieu très nutritif liquide permettant à la bactérie de reformer sa paroi (SOC medium) sont ajoutés et les tubes sont mis sous une agitation de 300 rpm à +37 °C durant 30 min.

Les cellules sont étalées sur une boîte de Pétri de 20 cm précoulée avec un milieu très nutritif solide (LB AGAR) en présence de 50  $\mu\text{L}$  d'ampiciline. La boîte est incubée à +37 °C sur la nuit.

## **Sélection et criblage**

Les bactéries sont testées par PCR pour vérifier que l'insert ait intégré le bon produit amplifié.

Quelques colonies sont sélectionnées individuellement à l'aide d'une pipette que l'on trempe dans 20  $\mu\text{L}$  de milieu nutritif liquide (LB Broth). Après prélèvement de 1  $\mu\text{L}$  pour PCR de criblage, on ajoute du milieu LB Broth et on place les tubes sous agitation à +37 °C sur la nuit.

La réaction se fait à partir de 1  $\mu\text{L}$  de bactérie en suspension. Le milieu réactionnel de la PCR de criblage est réalisé avec la Platinum™ Taq DNA Polymerase 5 U/ $\mu\text{L}$  (référence 10966034 , Thermo Fisher Scientific) est composé de tampon de 2  $\mu\text{L}$  de PCR 10x, 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2  $\mu\text{L}$  de dNTP 2 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  des amorces du kit (pJET1.2 forward et reverse sequencing primer), 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq et de l'eau ultrapure qsp 20  $\mu\text{L}$  .

Le programme de PCR est une activation initiale de 3 minutes à +95 °C puis 35 cycles d'une dénaturation à +94 °C durant 30 secondes, une hybridation à +60 °C 30 secondes et une extension de 2 minutes à +72 °C.

La taille des produits de PCR est vérifiée sur un gel d'agarose 2%, puis on le fait séquencer (Beckman Coulter Genomics). On réalise un alignement avec des séquences connues avec le logiciel VNTi© (INVITROGEN™).

## La multiplication et la purification plasmidique

Les clones d'intérêt sont ensuite cultivés dans un milieu nutritif riche liquide (LB Broth) afin de se multiplier et de multiplier en même temps le plasmide correspondant.

Lorsque la densité optimale de bactéries est atteinte (on peut, pour plus de précision la mesurer avec un spectrophotomètre à 620 nm), on effectue une purification plasmidique sur colonne, avec le kit fast plasmid mini kit (5 Prime™).

## Le dosage et calcul du nombre de copies

Le dosage permet d'obtenir une concentration en " $\text{ng}/\mu\text{L}$ ". On peut calculer avec une formule mathématique, le nombre de copies de notre insert par  $\mu\text{L}$  par exemple.

Les dosages des plasmides ont été effectués à l'aide du spectrophotomètre Qubit (INVITROGEN). Le principe est l'insertion d'une sonde moléculaire fluorescente et spécifique du double brin d'ADN (kit dsDNA Qubit assay), et d'en mesurer la fluorescence. Celle-ci est comparée à une gamme de concentrations connues et on peut alors mesurer la concentration en ADN double brin de nos échantillons.

Le plasmide et son insert mesurent exactement  $1020 + 2974 = 3994$  pb pour  $\text{IFN}\gamma$  ,  $465 + 2974 = 3439$  pb pour IL-4 et  $898 + 2974 = 3872$  pb pour GAPDH.

On considère qu'une paire de base pèse 650 Daltons donc une mole pèse 650 g et en sachant que la constante d'Avogadro est de  $6,022 \cdot 10^{23}$  molécules/mole, le nombre de copies peut être estimé en utilisant cette formule :

$$\text{Nombre de copies} = \frac{\text{Quantité d'ADN (ng)} \times 6,022.10^{23}}{\text{Longueur du plasmide (pb)} \times 10^9 \times 650} \quad (3.1)$$

### 3.4.8 Analyse des données brutes de qPCR et détermination des efficacités

#### Analyse des données brutes de qPCR

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant.

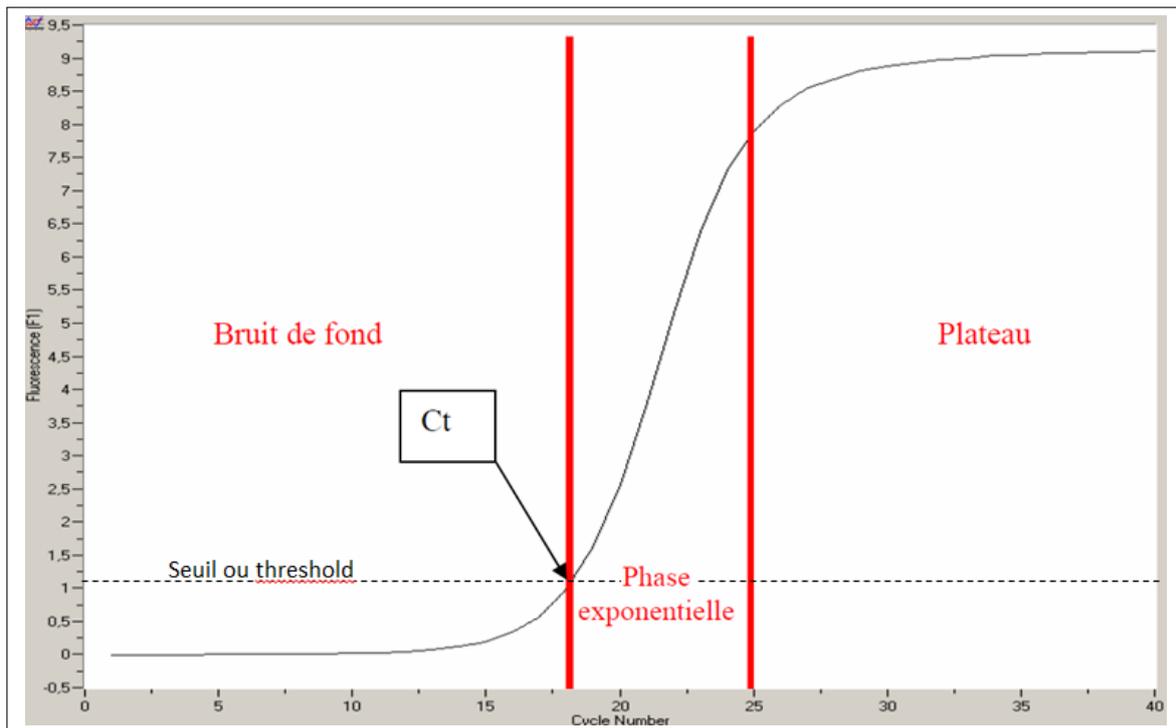


FIGURE 3.9 – Les différentes phases de l'amplification d'ADN par qPCR. (Figure inspirée des «Principes de la PCRq» <https://www.institutcochin.fr/>)

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une qPCR, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (figure 3.9) :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié

double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.

- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

Le seuil (ou threshold) va être dépassé par le signal à un certain nombre de cycles : le nombre de cycles correspondant est le Ct (ou cycle de threshold). Cette valeur est directement proportionnelle avec le nombre de copies (ou quantité d'ARN ou d'ADNc initial).

### Détermination des efficacités

La droite standard va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au log base 10 de la concentration initiale en molécules cibles. Le Ct obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard.

Les efficacités observées doivent suivre une augmentation de 3,4 Ct pour une dilution au dixième de la quantité de cible. Les amorces peuvent alors être utilisées dans les conditions de l'essai, pour quantifier les ARNm cibles.

Pour déterminer ces efficacités, on réalise ces dilutions pour un échantillon, et on réalise une qPCR. Les Ct obtenus sont corrélés sur un graphique : nombre de copies (ou quantité d'ARN ou de cDNA) introduit en fonction du Ct. La pente de la droite donne l'efficacité par les formules 3.2 et 3.3.

Les efficacités des cibles IFN $\gamma$  et IL-4 doivent être proches de celle de GAPDH (voir 3.4.2) (Johnson et al., 2014), pour pouvoir en mesurer l'expression.

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Pente}}} \quad (3.2)$$

$$E (\%) = (E - 1) \times 100 \quad (3.3)$$

### 3.4.9 Mesure de l'expression des gènes

On utilise la méthode de quantification relative normalisée par un calibrateur (Pfaffl, 2001) (<http://www.gene-quantification.info/>) ou  $\Delta\Delta\text{Ct}$ .

L'expression de gènes cibles et de référence, est fonction de l'efficacité de la PCR et du Ct enregistré. Avec cette technique, nous n'avons pas besoin d'une droite standard pour chaque run, il n'est pas nécessaire de connaître la valeur absolue du nombre de copies des échantillons. Les résultats sont exprimés par un rapport cible/référence de chaque échantillon normalisé par le rapport cible/référence d'un échantillon appelé calibrateur. Dans cette méthode, la précision du résultat dépend des efficacités de PCR des gènes cibles et référence.

Ces 2 efficacités doivent être les plus proches l'une de l'autre.

Il est important, pour valider cette méthode de quantification, de prouver que les efficacités de PCR de la cible et de la référence sont très proches. Un moyen de le prouver est de calculer les  $\Delta Ct$  en fonction des dilutions successives d'un même échantillon.

La valeur absolue de la pente  $\Delta Ct = f(\text{dilution de l'échantillon})$  doit être inférieure à 0,1. Une fois validée, on peut utiliser la méthode des  $\Delta\Delta Ct$  pour la quantification relative sans avoir à créer de courbes standards en parallèle.

Principes :

1. Dans une première étape, le rapport cible/référence pour chaque échantillon et l'échantillon calibrateur est calculé. Les biais liés aux différences de qualités et quantités des échantillons sont éliminés (le biais est le même pour la cible et pour la référence et donc s'annule).
2. Dans une seconde étape, le rapport obtenu pour chaque échantillon est divisé par le rapport obtenu pour l'échantillon calibrateur. Les biais liés aux différences de sensibilité dans la détection du gène cible et référence vont alors s'annuler. La normalisation par l'échantillon calibrateur permet de comparer les échantillons entre eux grâce à un Ratio.

Ces principes sont appliqués avec cette équation (Pfaffl, 2001) :

$$\frac{E_{\text{Cible}}^{\Delta Ct(\text{Calibrateur-Stimulé})}}{E_{\text{Ref}}^{\Delta Ct(\text{Calibrateur-Stimulé})}} \quad (3.4)$$

### 3.5 Les analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques de ce projet concernent un faible nombre d'échantillons. Tous les tests effectués sont de type non paramétriques.

Certains tests concernent une comparaison entre la réponse d'une même suspension cellulaire avant et après traitement. On effectuera alors un test des rangs signés de Wilcoxon car on considère les échantillons comme appariés.

Pour comparer les réponses entre des échantillons différents (animaux différents par exemples, on vérifie que des différences sont significatives avec un test de Mann-Whitney.

Les représentations graphiques ainsi que les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel Prism<sup>®</sup> 6 (GraphPad<sup>®</sup> Software Inc.)