Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Construction d'un standard interne pour la quantification de l'ARNm de l'interleukine 4 murine

Lockman, Laurence

Award date:
1997

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

SECRETARIAT BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
Rue de Bruxelles, 61
B - 5000 NAMUR

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

CONSTRUCTION D'UN STANDARD INTERNE POUR LA QUANTIFICATION DE L'ARNm DE L'INTERLEUKINE 4 MURINE.

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

Laurence LOCKMAN

Juin 1997

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Construction d'un standard interne pour la quantification de l'ARNm de l'interleukine 4 murine.

LOCKMAN Laurence

Résumé

Ce travail consiste à développer une méthode de quantification de l'ARNm de l'IL 4 murin basée sur une PCR compétitive suivie d'une hybridation en colorimétrie.
Il faut savoir que l'IL 4 est une cytokine majeure intervenant lors d'une réaction allergique. Il est donc intéressant de pouvoir doser l'IL 4 chez un patient soupçonné d'allergie mais aussi chez un patient allergique suivant un traitement.
Dans un premier temps, nous avons construit un standard interne qui sera par la suite amplifié avec les mêmes amorces de manière compétitive par rapport au cible cDNA IL 4 murin. Ce standard interne possède une partie identique à l'IL 4 murin qui sera reconnue par le trappeur, mais également une séquence plus courte qui sera reconnue par la sonde. Cette séquence sera spécifique et différente de celle de l'IL 4.
La séquence trappeur est fixée dans le fond des puits en polystyrène. Lors du processus de détection, la séquence du cible ou du standard interne complémentaire du trappeur, s'hybride à ce dernier. La sonde spécifique et biotinylée en 3' de chacun de ces élèments est ajoutée et s'hybride à son brin complémentaire. La détection en colorimétrie est alors assurée par le conjugué streptavidine/ Horse Radish Peroxydase car la streptavidine reconnaît la biotine et s'y fixe. L'activité de la peroxydase est mesurée suite à l'ajout de TMB (Tetraméthylbenzidine) en présence de H_2O_2. Nous avons également optimalisé cette technique d'hybridation.
Les prochaines étapes qui permettront de réaliser l'ensemble de la quantification sont la mise au point de la PCR compétitive du standard interne et du cible IL 4 murin, ainsi que l'application de ce processus non plus à l'ADN, mais bien à l'ARNm. Pour cela, il faut d'abord procéder à une RT-PCR qui assurera la transcription inverse de l'ARNm en ADN de l'IL 4 et du standard interne.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 97
Promoteur: J. Remacle

Ce mémoire clotûre 4 années d'études. Je tiens donc à exprimer ma reconnaissance vis-à-vis de toutes les personnes qui m'ont aidée à franchir ce cap.

Tout d'abord, je remercie Monsieur le Professeur Remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci à toi Isabelle A. de m'avoir suivie durant ces quelques mois. J'ai particulièrement apprécié ton dynamisme et ton enthousiasme tout au long de ces expériences.

Isabelle E., merci pour tes nombreux conseils qui m'ont aiguillée au cours des dernières manipulations.

Nathalie Z., je tiens à te remercier d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions. Sois toujours consciente qu'un inch = 2,54 cm !!

Nath. C., notre cuisinière en chef, merci pour ta disponibilité et ta serviabilité.

Merci Catherine pour ton initiation "fumante" aux maxi-préps.

Michet, merci pour ton aide lors de mes tentatives d'applications informatiques.

Merci Fred. pour tes nombreux conseils d'hybridation.

Merci à Sandrine, Patsy, Mumu et Isabelle G. pour avoir répondu à mes nombreuses questions.

Merci Anne et Marc pour vos conseils et votre aide lors de l'utilisation du matériel informatique.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du laboratoire pour leur disponibilité et leurs conseils.

Merci à Anne-Catherine, Maryse, David, Jean-Baptiste, Aurore, Jehan ainsi que les autres mémorants pour les bons moments passés ensemble au cours de ces années d'études.

Je tiens aussi à remercier mes parents qui m'ont permis de réaliser ces études, ainsi que mon frère Joël pour sa bonne humeur et sa serviabilité.

Merci à toi Roland de m'avoir épaulée et encouragée durant ces années.

Pour terminer, je remercie toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS.

- A : Adénosine
- ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- Amp : Ampicilline
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messager
- ATP : Adénosine triphosphate
- bp : paire de base
- C : Cytosine
- CD : Cluster of differentiation
- DMSO : Diméthyl sulfoxide
- EDC : 1-éthyl-3(-3 diméthylaminopromyl) carbodiimide
- EDTA : Ethylène diamine tétraacétate de sodium
- ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
- Fc : Fragment C
- G : Guanine
- GM-CSF : Granulocyte macrophage stimulating factor
- IFN : Interféron
- Ig : Immunoglobuline
- IL : Interleukine
- LT : Lymphocyte T
- LB : Lymphocyte B
- MEIM : Méthylimidazol
- MOPS : 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
- NK : Natural Killer
- PCR : Polymerase chain reaction
- rpm : Rotation par minute
- RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction
- SDS : Sodium dodecyl sulfate
- SSC : Sodium saline citrate
- T : Thymine
- TAE : Tris-acetate/ EDTA
- TBE : Tris-borate/ EDTA
- Tc : T cytotoxique lymphocyte

- Tét : Tétracycline
- Th : T helper lymphocyte
- TMB : Tetraméthyl benzydine
- TNF : Tumor necrosis factor
- Tween : Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
- VLDL : Very low density lipoproteines

1. INTRODUCTION

1.1 Les cytokines **1**

1.1.1 Généralités 1

1.1.2 Les cytokines dérivées des lymphocytes T 2

- GM-CSF 3
- Interleukine 3 3
- Interféron-gamma 3
- Interleukine 2 4
- Interleukine 5 5
- Tumor Necrosis Factor 5

1.1.3 Les cytokines dérivées des monocytes 5

- Interleukine 1 5
- Interleukine 6 6

1.2 L'interleukine 4 **6**

1.2.1 Différenciation des lymphocytes T 6

1.2.2 Description de l'interleukine 4 7

1.2.3 L'interleukine 4 et les réactions allergiques 8

1.2.4 Importance de l'IL 4 et de l'IFN-gamma dans l'allergie 9

1.2.5 Le switch des immunoglobulines 10

1.2.6 Le principe de la vaccination 10

1.2.7 Méthodes actuelles de quantification de l'IL 4 murin 11

1.3 La polymerase chain reaction **12**

1.3.1 Introduction 12

1.3.2 Principe de la PCR 12

- Composition de la solution PCR 12
- Cycles de la PCR 12

1.3.3 Facteurs affectant l'efficacité de la PCR 13

- Le tampon de réaction 13
- Les oligonucléotides 13
- L'ADN cible 13
- La polymérase 14
- Les dNTP 14
- Le cycle 14

1.3.4 Différents types de PCR 15

- La PCR qualitative ou simple 15
- La PCR quantitative 15

Objectif du travail **19**

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Souches bactériennes et plasmides **20**

2.1.1 Souches bactériennes 20

2.1.2 Plasmides bactériens 20

2.2 Préparation de cellules $CaCl_2$ compétentes **21**

2.2.1 Bactéries $CaCl_2$ compétentes 21

2.2.2 Choc thermique 22

2.3 Préparation des milieux de culture **22**

2.3.1 Le milieu Luria Bertani 22

2.3.2 Le milieu LB solide 23

2.4 Mise en culture **23**

2.4.1 Milieu solide 23

2.4.2 Mini-culture 23

2.4.3 Maxi-culture 24

2.5 Extraction d'ADN plasmidique **24**

2.5.1 Maxi-préparation d'ADN plasmidique 24

2.5.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique 26

2.6 Restriction d'ADN **27**

2.7 Electrophorèse sur gel d'agarose **27**

2.8 Réaction de polymérisation en chaîne **29**

2.8.1 Mélange réactionnel 29

2.8.2 Amplification des cycles PCR 29

2.9 Purification des produits PCR **30**

2.10 Purification par le phénol-chloroforme **31**

2.11 Réaction de ligation **32**

2.12 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose **32**

2.12.1 Utilisation d'un gel TAE agarose 32

2.12.2 Extraction et purification des fragments d'ADN 33

2.13 Le séquençage **33**

2.13.1 La réaction PCR 34

2.13.2 Purification des produits résultant de la PCR 34

2.14 Fixation du trappeur **35**

2.14.1 Calcul du pourcentage de fixation en radioactivité 35

2.14.2 Fixation du trappeur phosphaté 37

2.15 Hybridation d'ADN sur support solide **37**

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Construction du standard interne **40**

3.1.1 Recherche de séquences spécifiques de l'IL 4 murin 40

3.1.2 Caractérisation du plasmide pSP64 poly(A) 41

3.1.3 Vérification de l'efficacité des primers 1 et 3 42

3.1.4 Synthèse du trappeur comprenant 2 sites de restriction 43

3.1.5 Hybridation des 2 oligonucléotides formant la sonde spécifique du standard interne 44

3.1.6 Ligation de la sonde et du trappeur restreints par Xba I 45

3.1.7 Insertion du standard interne dans le pSP64 poly(A) 46

3.1.8 Réaction de séquençage 47

3.2 Fixation du trappeur **48**

3.2.1 Fixation du trappeur en radioactivité 49

3.3 Optimalisation de l'hybridation **50**

3.3.1 Spécificité de la sonde de l'IL 4 murin 50

3.3.2 Spécificité de la sonde du standard interne 51

3.3.3 Influence de la température et de la concentration en sels des solutions de lavage 52

3.3.4 Influence de la concentration en sels de la solution d'hybridation 53

3.4 Influence de la contamination **54**

3.4.1 Utilisation d'un nouveau plasmide 54

3.4.1 Utilisation de nouvelles amorces 55

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **57**

5. BIBLIOGRAPHIE **59**

1. INTRODUCTION

L'allergie correspond à une hypersensibilité de type 1, c'est-à-dire une augmentation de l'aptitude des lymphocytes B à produire des IgE activant le système immunitaire.
Chez les individus allergiques, un simple signal de tolérance est transformé en un puissant stimulus donnant lieu à des procédés inflammatoires. Parmi les réactions allergiques, on retrouve l'urticaire atopique et l'allergie alimentaire mais également des effets au niveau respiratoire. L'urticaire atopique se manifeste par des surélévations circonscrites de la peau disparaissant en 12 ou 48 heures. L'allergie alimentaire se traduit par des réactions digestives et systémiques apparaissant dans les minutes ou les heures suivant l'ingestion de certains aliments (Bach et al. , 1981). Au niveau respiratoire, on retrouve le rhume des foins mais également la bronchoconstriction responsable de l'asthme.
Une molécule agissant comme médiateur intercellulaire dans la réaction allergique est l'interleukine 4, une cytokine du système immunitaire. Il est donc intéressant de pouvoir la détecter chez un patient soupçonné d'allergie mais également de pouvoir la quantifier chez un patient allergique suivant un traitement.
Avant de développer quelques informations sur l'IL 4, nous allons brièvement expliquer, ce que sont les cytokines et les cytokines principales qui interviennent dans la réponse immunitaire.

1.1 LES CYTOKINES.

1.1.1 GENERALITES.

Les cytokines sont des protéines de nature non-immunoglobulinique et non-endocrinienne qui affectent souvent localement le fonctionnement d'autres cellules du même organisme.
Toutes les étapes du fonctionnement du système immunitaire sont sous le contrôle étroit de ces médiateurs polypeptidiques.

En outre, certaines de ces cytokines intègrent le système de défense aux autres systèmes homéostasiques de l'organisme, en modulant les réponses hormonales ou la réponse nerveuse. Ces facteurs affectent également la croissance et la différenciation de nombreux types cellulaires en dehors du système immunitaire.

Les cytokines sont actives à faible concentration (de l'ordre de 10^{-10} M), ce qui est dans la gamme de concentrations couvertes par les hormones endocriniennes.

Ces médiateurs sont actifs généralement localement d'où activité nommée paracrine voire même autocrine. Cette action localisée est expliquée par la courte demi-vie des cytokines mais, empêche aussi des effets indésirables à distance de leur lieu de synthèse.

Les cytokines ne sont pas préformées et stockées dans des granules mais, elles sont synthétisées en réponse à un stimulus adéquat. Il est donc difficile sinon impossible de détecter l'ARNm spécifique de ces médiateurs en dehors d'une stimulation.

Le nombre de récepteurs aux cytokines est de quelques centaines à quelques milliers par cellule et l'affinité pour le récepteur est de l'ordre de celle des hormones endocriniennes.

Chaque cytokine présente un grand éventail d'activités biologiques. L'effet engendré par ces cytokines est étroitement dépendant de l'état de différenciation de la cellule cible mais aussi de la concentration effective de ces médiateurs dans l'environnement local.

Si nous prenons le cas de l'interleukine 4, sous concentration normale (inférieure à 50 µg/ ml), elle provoque l'activation des cellules B mais, sous concentration 10 à 100 fois supérieure, elle induit la maturation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgG1 ou d'IgE.

Il faut aussi noter que plusieurs de ces cytokines médient le même effet ou des effets très similaires.

Les cytokines produites par les lymphocytes sont souvent appelées lymphokines mais, cette nomenclature est confuse car certaines lymphokines sont aussi secrétées par des cellules non-lymphoïdes. Il est donc plus correct d'employer le terme général "cytokine". De nombreuses cytokines produites par les cellules T prennent le nom d'interleukine.

1.1.2 LES CYTOKINES DERIVEES DES LYMPHOCYTES T.

Les cytokines lymphocytaires sont essentiellement synthétisées par le lymphocyte T helper (CD 4+).

La majorité des effets de ces cellules sur l'activation, la croissance et la différenciation des diverses cellules du système immunitaire est médiée par l'intermédiaire de ces cytokines.

A l'exclusion de lignées tumorales transformées, les cytokines ne sont pas produites constitutivement par ces lymphocytes au repos.

Leur synthèse est une propriété inductible des lymphocytes activés; cette activation se passe essentiellement in vivo suite à la reconnaissance d'un fragment de l'antigène par le biais de leur récepteur spécifique.

Granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF).

Le GM-CSF est synthétisé par les LT activés, les cellules endothéliales et les fibroblastes, mais uniquement en réponse à une stimulation appropriée.

Au niveau des cellules immatures, il joue un rôle de facteur de croissance spécifique des lignées macrophagiques et granulocytaires.

Le GM-CSF est responsable de la régulation du nombre de cellules myéloïdes effectrices circulantes.

En ce qui concerne les cellules matures, il module l'état fonctionnel des cellules effectrices en interférant avec leur mobilité, leur métabolisme et leur capacité cytotoxique.

Le GM-CSF augmente également la réponse cytotoxique anticorps dépendante des macrophages, polymorphonucléaires et éosinophiles.

L'interleukine 3.

L'interleukine 3 est synthétisée par les lymphocytes T activés et s'avère jouer un rôle primordial dans l'hématopoïèse.

L'IL 3 provoque la prolifération et le maintien en culture de nombreux types cellulaires : granulocytes, macrophages, éosinophiles, mégacaryocytes, basophiles, mastocytes et érythrocytes.

L'interféron gamma.

L'IFN-gamma est produit en général par des lymphocytes T activés helper ou cytotoxiques. Il peut également être synthétisé par les cellules Natural Killer (NK) lors d'une réponse à une stimulation par du péroxyde d'hydrogène. On suggère alors que la réponse initiale des macrophages vis-à-vis des microorganismes, notamment la production de métabolites actifs de l'O_2 tel que le H_2O_2, peut stimuler les cellules avoisinantes à libérer un facteur capable d'augmenter l'activité de ces macrophages.

L'IFN-gamma est capable d'inhiber la réplication virale et ceci, en stimulant des cascades de réactions qui commandent la transcription de certains gènes en ARN messagers.

Ces ARNm sont traduits en protéines anti-virales (e IF-2-α protéine kinase et 2'-5'-oligo (A) synthétase) qui seront libérées par les cellules malades mais également par les cellules avoisinantes. Ceci explique l'effet de l'IFN-gamma sur les cellules voisines (paracrine). (Johnson et al. , 1994)

Il a aussi pour rôle d'attirer les macrophages sur le lieu de la réponse immune, les y retenir et les rendre plus efficients. L'activation des macrophages provoque une capacité anti-microbienne augmentée vis-à-vis de plusieurs pathogènes parasites intracellulaires. Les macrophages activés par l'IFN-gamma reconnaissent et détruisent les cellules néoplasiques. Lors d'un déficit en activation des macrophages, l'hôte succombe à des infections virales ou provoquées par d'autres pathogènes. L'IFN-gamma agit à différents niveaux de ces cellules :

- les lysosomes et phagolysosomes à l'intérieur des macrophages acidifient plus rapidement leur contenu
- la sécrétion des médiateurs de l'inflammation est augmentée. Parmi ces médiateurs, on retrouve l'IL 1, le TNF-alpha ainsi que l'activateur du plasminogène.
- le nombre de récepteurs au fragment Fc des Ig augmente, il y a donc facilitation de l'ingestion de proies opsonisées.

Ce médiateur est un co-facteur essentiel à la différenciation des précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques et à leur acquisition de la capacité cytotoxique.

Il favorise la synthèse de lymphotoxines (TNF-béta) par les cellules T.

L'IFN-gamma joue aussi un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules B en sécréteurs d'immunoglobulines mais ceci en coopération avec d'autres médiateurs.

Il intervient au niveau du "switch" Ig en favorisant la synthèse d'IgG2 et d'IgG3.

<u>L'interleukine 2.</u>

La source principale de l'IL 2 est le lymphocyte T helper (Th) activé.

Ce médiateur a pour rôle majeur d'induire la prolifération de lymphocytes T activés.

Il est également capable d'amplifier la synthèse d'autres lymphokines par les lymphocytes T activés.

L'IL 2 coopère avec d'autres lymphokines pour soutenir la croissance et la différenciation en plasmocytes des lymphocytes B (LB) activés.

Elle induit également l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK mais aussi leur croissance.

L'interleukine 5.

L'IL 5 est produite par les Th activés.
Elle agit principalement sur les lymphocytes B mais est incapable d'activer les cellules B au repos. Lorsque les cellules B sont en phase proliférative (G2), elle peut agir en tant que facteur de croissance. L'IL 5 semble diriger le "switch" Ig lors de la maturation finale des lymphocytes B en plasmocytes différenciés, vers une production accrue d'IgA.
Ce médiateur favorise la croissance et la différenciation des éosinophiles.

Le Tumor Necrosis Factor (TNF).

Il est produit par les lymphocytes T activés.
Le TNF-béta est responsable de la nécrose hémorragique de certaines tumeurs mais n'a aucun effet cytotoxique sur les cellules normales. Cette spécificité d'action est dûe à la synthèse par les cellules normales de "protéines" les protégeant de l'action destructrice du TNF-béta.
Par contre, les cellules tumorales sont dépourvues de ce moyen de défense.
Le TNF-béta a aussi un effet inhibiteur de lipoprotéines lipases. Une réduction de ces lipoprotéinases est responsable d'une mobilisation de triglycérides et d'une augmentation de Very Low Density Lipoprotéines (VLDL) d'où perte de poids importante chez les malades.

1.1.3 LES CYTOKINES DERIVEES DES MONOCYTES.

L'interleukine 1.

La principale source de sécrétion de l'IL 1 est constituée de monocytes et de macrophages mais, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les lymphocytes B sont aussi capables de la produire.
L'IL 1 peut présenter des effets locaux :

- Elle peut agir au niveau des cellules endothéliales des artères en provoquant leur vasodilatation, l'adhésion et l'infiltration des leucocytes mais également une augmentation de l'activité procoagulante de surface de l'endothélium.
- Elle assure la prolifération des fibroblastes et accroît la synthèse de collagène.

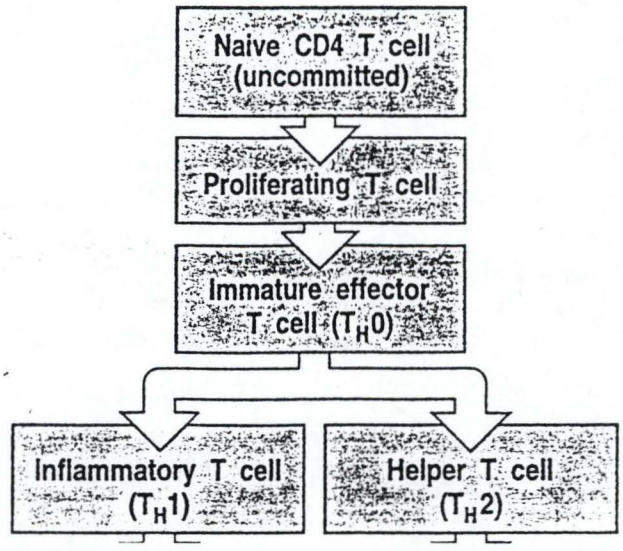


Fig. I 1.Mécanisme de différenciation des lymphocytes T (Janeway et al. , 1996).

- Elle intervient en tant que co-facteur d'activation des lymphocytes T mais aussi comme co-facteur durant la phase d'activation des LB.

Ce médiateur renforce la liaison des cellules NK aux cellules tumorales.
L'IL 1 provoque également des manifestations systémiques et celles-ci correspondent à la réponse de phase aigüe. Dans ces effets systémiques, on retrouve la fièvre, des altérations comportementales dont un arrêt de la prise d'aliments ainsi qu'une activité réduite. Des altérations métaboliques (accroissement de la synthèse des protéines de phase aigüe) et des altérations hématologiques se produisent aussi.

L'interleukine 6.

Les macrophages activés principalement, mais aussi les lymphocytes T activés et les fibroblastes sécrètent l'IL 6.
Elle a une activité redondante par rapport à l'IL 1 et au TNF-béta car elle est aussi un agent majeur des réponses inflammatoires.
L'IL 6 agit aussi sur les LB en provoquant leur différenciation finale en plasmocytes mais également en augmentant la synthèse d'Ig.

1.2 L'INTERLEUKINE 4.

1.2.1 DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T.

La différenciation des cellules précurseurs des lymphocytes T en lymphocytes T immunologiquement actifs ne peut avoir lieu qu'au niveau du thymus.
Suite à cette maturation, apparaissent des lymphocytes T helper (Th) et des lymphocytes T cytotoxiques (Tc). Les cellules Th possèdent le marqueur CD 4+, tandis que les cellules Tc présentent le marqueur CD 8+.
Lorsque les cellules Th sont naïves, elles répondent aux peptides montés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 en sécrétant de l'IL 2 et vont donc proliférer. Ce stade intermédiaire (Th 0) produit des cellules T CD 4+ inflammatoires ou des cellules T CD 4+ helper, et ceci en fonction du premier contact avec l'antigène (Fig. I. 1).
Les cytokines émises par les agents infectieux dans l'environnement des cellules T CD 4+, influencent fortement le devenir des cellules Th 0. Parmi ces cytokines, on peut retrouver l'IL 12 et l'IL 4.

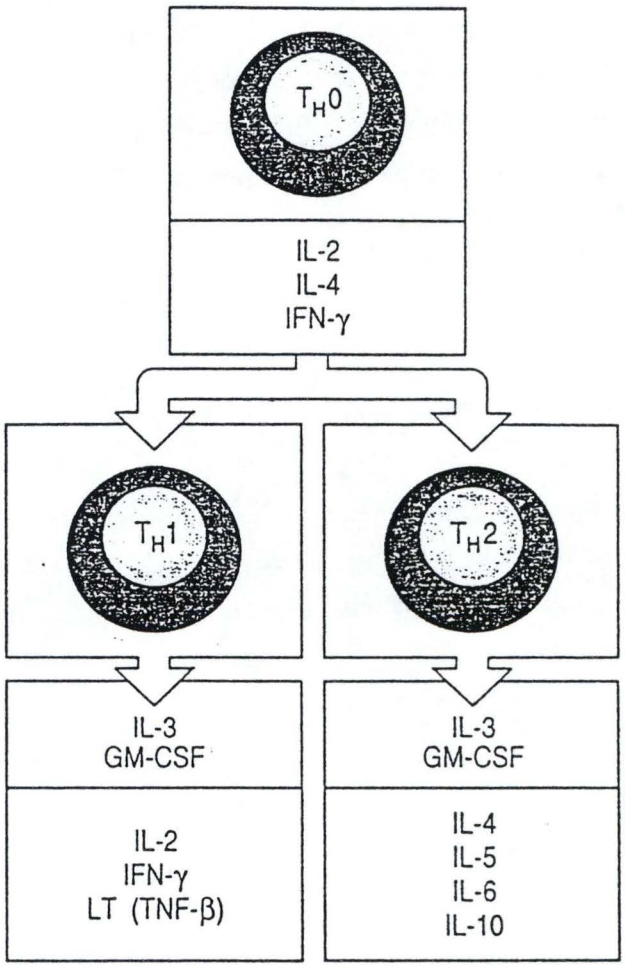


Fig. I 2. Sécrétions spécifiques des sous-populations Th 1 et Th 2 (Janeway et al. , 1996).

En présence d'IL 12 et d'IFN-gamma, les cellules T CD 4+ ont tendance à se différencier en cellules T inflammatoires alors que l'IL 4 provoque une différenciation des cellules T CD 4+ en cellules T helper.
L'IL 12 est sécrétée par les macrophages qui pourront activer les cellules natural killer à produire des IFN- gamma.
Une activation sélective des cellules T CD 4+ inflammatoires ou Th 1 entraîne une immunité médiée par les cellules alors qu'une production accrue de cellules T CD 4+ helper (Th 2) entraîne une immunité humorale.

Il est possible de séparer les sous-populations Th 1 et Th 2 en fonction des médiateurs synthétisés en réponse à un stimulus antigénique.(Fig. I. 2). La production d'IFN-gamma, d'IL 2 et du TNF-béta est assurée par les cellules Th 1 tandis que les cellules Th 2 synthétisent en exclusivité l'IL 4, l'IL 5 et l'IL 6. Les deux types de Th peuvent produire du GM-CSF et de l'IL 3.
La production d'une gamme distincte de médiateurs pourrait indiquer que ces deux sous-groupes de Th médient des activités biologiques relativement distinctes.
Les cytokines libérées par les cellules Th 2 interviennent aussi dans la réponse allergique ou anti-parasitaire car, l'IL 3 et l'IL 4 sont des facteurs de croissance pour les mastocytes. L'IL 4 joue, en plus, un rôle clé dans le "switch" vers la production d'IgE et l'IL 5 est un agent majeur de la différenciation des éosinophiles.
Par contre, les médiateurs libérés par les cellules Th 1 permettent de combattre les infections intracellulaires. L'IFN-gamma et le TNF-béta activent les macrophages facilitant ainsi la destruction des parasites intracellulaires. L'IFN-gamma provoque l'augmentation des récepteurs Fc et agit sur la synthèse d'IgG2a, ceci favorise les réactions ADCC (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps).
La plupart des réponses immunes normales impliquent une intervention combinée des deux types de Th.
En cas de réponse allergique, un déséquilibre au niveau des cellules Th 1 et Th 2 se produit et ceci en faveur de la réponse de type Th 2.

1.2.2 DESCRIPTION DE L'INTERLEUKINE 4.

L'interleukine 4 est un polypeptide de 129 acides aminés, glycosilé, sécrété par les cellules de type Th 2 et ayant un poids moléculaire compris entre 15 et 22 kdaltons.
Le gène de l'interleukine 4 humaine contient 4 exons et 3 introns. Il se situe sur le chromosome 5 et s'y étend sur 10 kilobases. L'exon 2 est le plus petit exon et code pour 116 acides aminés.(Alms et al. , 1996)

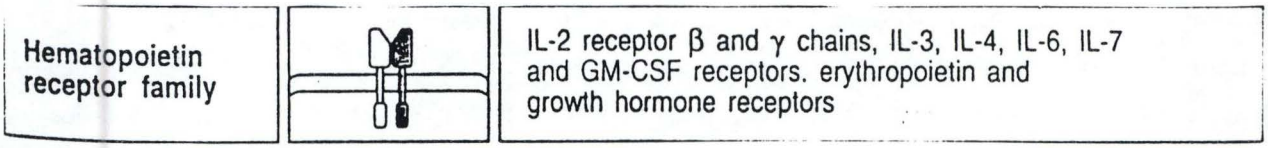


Fig. I 3. Famille des récepteurs de l'hématopoïètine dont fait partie le récepteur de l'Il 4 (Janeway et al. , 1996).

Le récepteur de l'IL 4 fait partie de la famille des récepteurs de l'hématopoïétine. La chaîne alpha de ce récepteur définit la spécificité du ligand, tandis que la chaîne béta assure la fonction de signalisation intracellulaire (Janeway et al. , 1996). (Figure I.3).

1.2.3 L'INTERLEUKINE 4 ET LES REACTIONS ALLERGIQUES.

L'allergie correspond à une hypersensibilité immédiate, elle peut être localisée ou généralisée dans les cas les plus graves. Le terme immédiat est justifié car les réactions allergiques se produisent dans les minutes qui suivent le contact avec l'antigène.
La réponse allergique n'a pas lieu lors de la première rencontre entre l'individu naïf et l'allergène, mais bien lorsque les anticorps ou les cellules T réagissant avec la substance étrangère, sont déjà produits.
L'allergie nous montre que le système immunitaire, destiné à protéger l'organisme, peut engendrer des réponses excessives causant certaines pathologies.

Lors de la première rencontre avec l'antigène, l'IL 4 libérée par les Th 2 activés, stimule les lymphocytes B à se différencier en plasmocytes. Suite à l'action de l'IL 4, les plasmocytes favorisent une production accrue d'immunoglobulines de type IgE. La concentration plasmatique en IgE en situation normale est inférieure à 50 µg/ml mais, elle peut atteindre 1 mg/ml en cas de situation pathologique.
Les IgE se fixent alors sur les mastocytes et les basophiles au niveau de récepteurs Fc grâce à leur fragment Fc. Quand le système immunitaire entre à nouveau en contact avec l'antigène, ce dernier est capté directement par les IgE fixés sur les mastocytes et les basophiles.
Ces cellules seront donc stimulées rapidement et vont dégranuler. Dans les dégranulations, on retrouve des :
- amines vasoactives
- protéines de granules et protéoglycanes
- médiateurs lipidiques
- cytokines

Les amines vasoactives sont préformées et donc stockées dans les granules. Chez l'homme, l'histamine est l'amine vasoactive deversée de manière prépondérante. Elle provoque la rétraction des cellules endothéliales et donc une augmentation de la perméabilité vasculaire.
Elle stimule également les cellules endothéliales à synthétiser des relaxants pour muscles lisses d'où vasodilatation.
Les protéines de granules et les protéoglycanes sont également préformés. Parmi ceux-ci, nous retrouvons l'héparine et la sérine protéase.

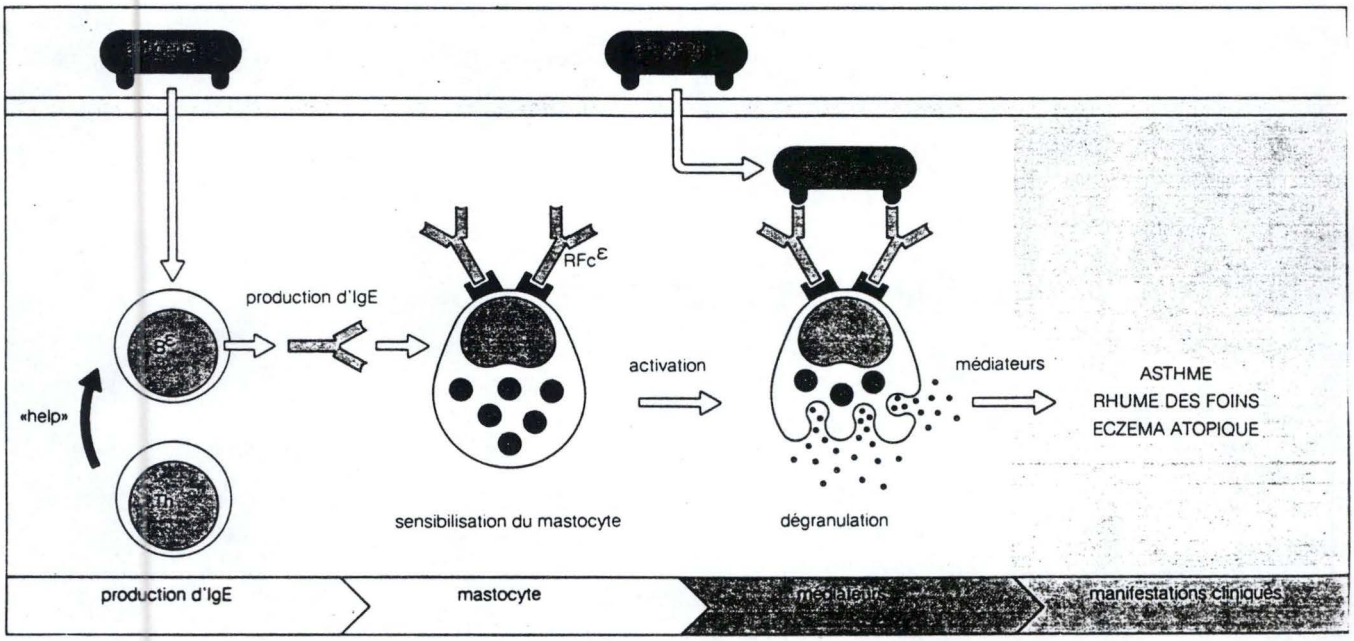


Fig. I 4. Mécanisme de l'allergie

L'antigène stimule avec l'aide des cellules T sécrétant l'IL 4, la production d'Ig E spécifiques par les cellules B. Les Ig E spécifiques se lient aux récepteurs mastocytaires par l'extrêmité Fc des Ig E. Les antigènes atteignant le mastocyte ainsi sensibilisé établissent un pontage entre les Ig E liées à sa surface. Ceci déclenche la dégranulation du mastocyte, qui libère les médiateurs responsables des symptômes cliniques de l'hypersensibilité de type 1 (Janeway et al. , 1996).

Les médiateurs lipidiques ainsi que les cytokines sont néosynthétisés. Les prostaglandines de type D2 possèdent des récepteurs sur les muscles lisses et prolongent l'action de l'histamine.(Figure I.4).

1.2.4 IMPORTANCE DE L'IL 4 ET DE L'IFN-GAMMA DANS L'ALLERGIE.

L'interleukine 4 est synthétisée par les lymphocytes de type Th 2 alors que l'interféron gamma provient des lymphocytes Th 1. L'interleukine 4 inhibe l'activité de sécrétion des cellules de type Th 1 et active le switch vers une production accrue d'IgE. L'interféron gamma, lui, inhibe les cellules de type Th 2 ainsi que le switch vers les IgE. Ces deux cytokines vont donc agir de manière réciproque en s'inhibant l'une l'autre.

Lorsque cette balance est maintenue, aucune accumulation excessive d'IgE n'est possible et aucune réaction allergique ne peut être déclenchée (Sutherland et al. , 1993).

Par contre, une altération de la balance entre l'IL 4 et l'IFN-gamma semble être une première anormalité présente chez les individus atopiques (Björksten et al. , 1995). Il a d'ailleurs été démontré que la production d'IFN-gamma est fortement réduite chez les patients allergiques alors que la synthèse d'IL 4 est très élevée chez ces mêmes personnes. Il faut signaler que la gravité de l'allergie est en corrélation avec le degré de déséquilibre de la balance IL 4-IFNgamma (Pène et al. , 1994).

Lorsque l'IL 4 est produite en excès, des réactions allergiques se produisent mais également une inhibition de la secrétion d'IFN-gamma; or, l'IFN-gamma a pour rôle d'inhiber la réplication virale. Un individu allergique est donc plus sensible vis-à-vis des maladies virales (Raychandhuri et al. , 1995).

Un excès d'IFN-gamma présente également des désavantages car il inhibe le switch vers une production d'IgE. Les IgE sont responsables de la dégranulation des mastocytes et des basophiles. Or, les mastocytes libèrent de l'héparine anti-coagulante (Roitt et al. , 1985).

Aucune de ces deux cytokines ne doit donc être produite en excès par rapport à l'autre afin de maintenir un équilibre et donc éviter des effets secondaires négatifs.

1.2.5. LE SWITCH DES IMMUNOGLOBULINES.

La spécificité de la réponse d'un anticorps est déterminée par le site de liaison à l'antigène. Ce site comprend les domaines variables des chaînes L et H des immunoglobulines. Par contre, l'activité de l'anticorps est associée à l'isotype des domaines constants de la chaîne lourde de l'immunoglobuline.
Le réarrangement de l'ADN lors d'un changement d'isotype est médié par des cytokines libérées par les cellules Th 2.

Toutes les cellules B matures expriment des IgM et des IgD en surface. L'Ig la plus abondante dans le plasma est de type G.
Plusieurs expériences ont prouvé que les différentes cytokines induisent préférentiellement le switch d'immunoglobulines vers un isotype particulier. Ainsi, l'IL 4 agit sur les plasmocytes en induisant le switch d'isotype vers une production accrue d'IgG1 et d'IgE.
(Janeway et al; , 1996). Or, les IgE sont les principaux anticorps responsables des réponses allergiques. L'IL 4 joue donc un rôle primordial dans l'hypersensibilité immédiate.

1.2.6 LE PRINCIPE DE LA VACCINATION.

Le but des vaccinations est d'induire une réponse immunitaire qui prévienne la prolifération d'un agent infectieux bactérien ou viral introduit dans l'organisme (Bach et al. , 1981).
Le principe de la vaccination est de modifier un micro-organisme ou un de ses composants de telle sorte qu'ils deviennent inoffensifs tout en conservant leur antigénicité. Le produit résultant de cette modification est utilisé comme vaccin.
Le système immunitaire spécifique développe une réponse beaucoup plus intense lors d'une deuxième agression par le même antigène. Le vaccin correspond au premier contact avec l'antigène et donc, en cas d'un second contact avec ce même antigène, les cellules B reconnaissent rapidement cette substance et libèrent des anticorps en grande quantité (Roitt et al., 1985).
Les vaccins peuvent être constitués d'éléments microbiens *tués* par un traitement physique ou chimique ou même d'extraits microbiens purifiés, comme pour les anatoxines qui sont des toxines traitées par le formol.

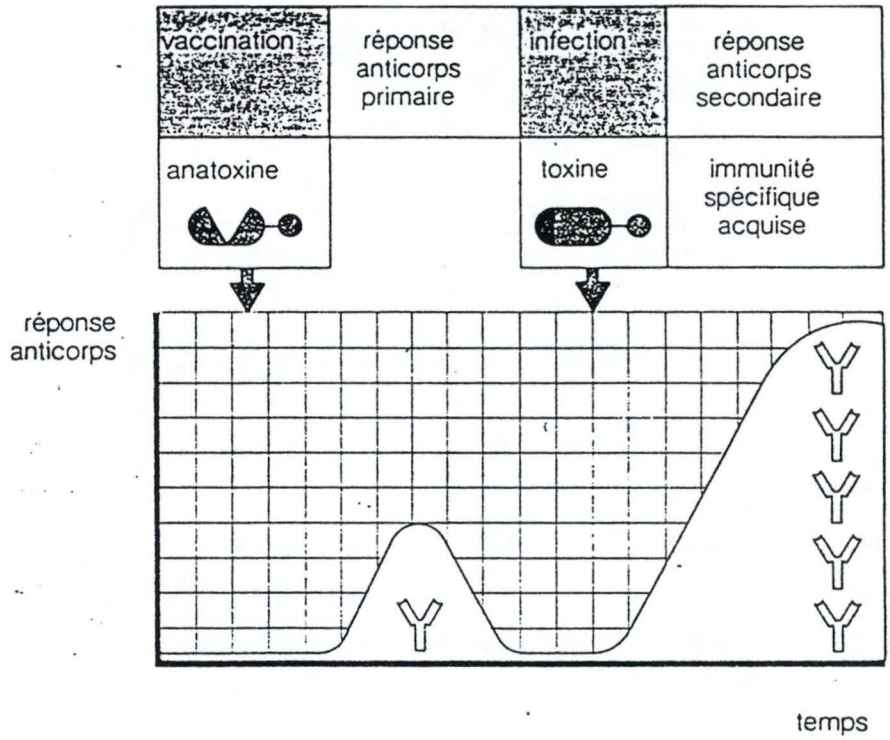


Fig. I 5. Principe de la vaccination

Le vaccin conserve certains épitopes de l'agent infectieux et donc son antigénicité tout en étant inoffensif. Une réponse anticorps primaire dirigée contre ces épitopes se produit . A l'occasion d'un contact réel avec l'agent infectieux, les cellules B mémoire sont restimulées et réagissent très rapidement en donnant une réponse anticorps secondaire très forte contre les épitopes (Roitt et al . , 1995).

Les vaccins *vivants* sont constitués de germes vivants, éventuellement atténués; ils sont surtout constitués de virus qui stimulent seulement les cellules T s'ils leur sont présentés intégrés dans les membranes de cellules vivantes et, de façon plus générale, quand ils est souhaitable de stimuler l'immunité à médiation cellulaire (Bach et al. , 1981).(Figure I.5).
Il est donc intéressant de pouvoir détecter et quantifier l'ARNm de l'IL 4 lors de l'élaboration d'un vaccin afin d'éviter une réaction allergique dans le modèle murin tout d'abord et ensuite chez l'homme.

1.2.7 METHODES ACTUELLES DE QUANTIFICATION DE L'IL 4 MURIN.

L'IL 4 murin est principalement quantifié par des tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Ouyang et al. , 1995; Ebtekar et al. , 1995). Le principe de cette quantification est basé sur la reconnaissance anticorps-antigène.
Cette technique correspond à la fixation d'anticorps purifiés de rat anti-IL 4 murin dans des micropuits. Les échantillons sont alors ajoutés et l'IL 4 murin reconnu par les anticorps de rat anti-IL 4 se fixe. Après quelques lavages permettant l'élimination des élèments non fixés, des anticorps biotinylés de rat anti-IL 4 de souris sont ajoutés puis un conjugué streptavidine-péroxydase. Ces conjugués sont détectés grâce à l'ajout d'une solution composée de tampon M citrique-phosphate, de tétraméthylbenzidine et de H_2O_2 qui forme après réaction un produit coloré. Suite à l'arrêt de la réaction, l'adsorption lumineuse est mesurée et l'IL 4 est aussi quantifiée (Ouyang et al. , 1995; Ebtekar et al. , 1995).
Cette technique de quantification pose un problème de spécificité car certaines réactions croisées peuvent se produire.
Une technique plus spécifique est celle qui utilise la quantification de l'ARNm correspondant à l'IL 4. Cette technique fait appel à la biologie moléculaire basée sur une amplification de la séquence par la méthode de « Polymérase Chain Reaction » ou PCR (Ochi et al. , 1996; Tanigushi et al. , 1993).

1.3 LA POLYMERASE CHAIN REACTION.

1.3.1 INTRODUCTION.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN de manière exponentielle. L'efficacité et la spécificité de l'amplification dépendent de divers paramètres intervenant dans sa réaction.

1.3.2 PRINCIPE DE LA PCR.

Composition de la solution PCR.

La solution PCR est composée de l'ADN cible à amplifier ainsi que de deux oligonucléotides, ou amorces, spécifiques du brin d'ADN cible à amplifier. Ces amorces vont assurer la formation d'une séquence double brin nécessaire à la fixation et à l'activation d'une polymérase thermorésistante. Cet enzyme a pour rôle la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au brin d'ADN cible et ceci à partir des amorces.
La solution PCR doit également contenir des bases nucléotidiques (dATP, dGTP, dCTP et dTTP) afin de permettre la synthèse de ce nouveau brin d'ADN.

Cycles de la PCR.

Un cycle PCR est composé de trois étapes se réalisant à trois températures différentes.
L'étape de dénaturation dans laquelle la température est relativement élevée (94 °C) afin de permettre la dénaturation des deux brins de l'ADN cible.
L'étape d'hybridation ou "annealing" va permettre la fixation des deux oligonucléotides au niveau de leur région complémentaire sur l'ADN cible. La température d'hybridation est déterminée par le nombre de bases G-C et la longueur de l'amorce; elle varie de 45°C à 65°C.
L'étape d'élongation permet à la polymérase de reproduire l'ADN cible. La température d'élongation est la température optimale d'activité de la polymérase.

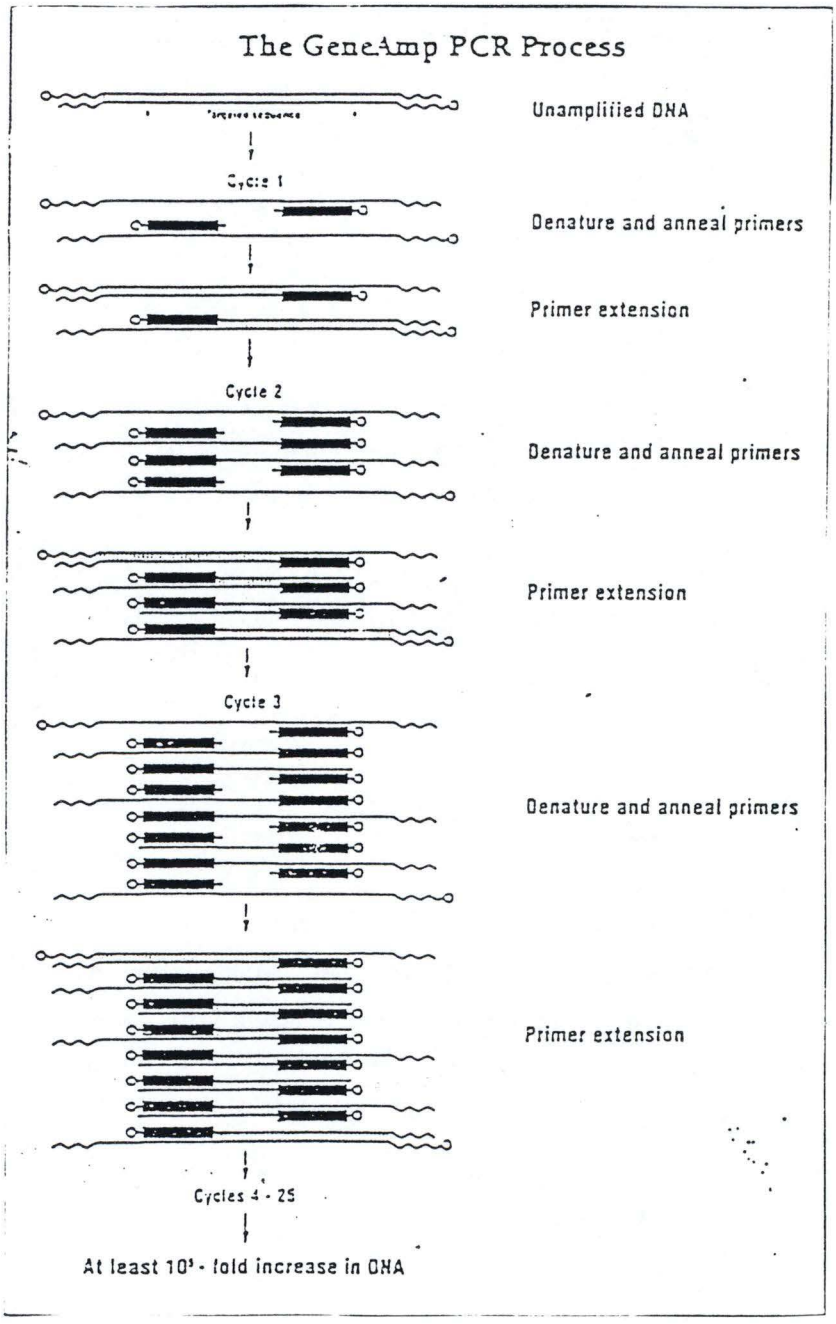


Fig. I 6. Schéma de la PCR

Le double brin d'ADN est dénaturé suite à une augmentation de la température. Lors de l'étape d'hybridation, les amorçes se fixent au niveau de leur région complémentaire. Durant l'étape d'élongation, la polymérase s'active et reproduit le fragment anti-complémentaire de l'ADN cible à partir des amorçes.

En conditions standard, la solution PCR passe 1 minute à chacune de ces températures. Une PCR comporte habituellement entre 25 et 40 cycles afin d'amplifier jusqu'à plusieurs millions de fois l'ADN cible. (Figure I.6).

1.3.3 FACTEURS AFFECTANT L'EFFICACITE DE LA PCR.

Le tampon de réaction.

La concentration en Mg ++ doit être optimalisée pour chaque amorce. Une concentration trop importante entraîne une amplification non spécifique alors que trop peu de Mg ++ provoque une diminution d'efficacité de l'amplification.

Le DMSO permet une diminution des structures secondaires de l'ADN template mais également une diminution de l'efficacité de la Taq polymérase.

Une faible quantité de KCl est requise pour activer la polymérase mais, une quantité trop importante inhibe l'enzyme.

Lorsque le pourcentage de G-C est élevé, du glycérol peut être ajouté.

Les oligonucléotides.

Ces amorces doivent être spécifiques de la séquence à amplifier.

La distance entre deux amorces varie de 100 bp à 3000 bp car au-delà, l'efficacité de la PCR diminue.

La longueur optimale d'une amorce se situe entre 20 et 30 bp.

Le pourcentage de G-C doit être assez important afin de réaliser l'hybridation à une température supérieure à 50°C.

Il y a possibilité d'introduire des sites de restriction en allongeant l'amorce du côté 5' même si cette séquence n'est pas complémentaire de l'ADN cible.

L'ADN cible.

Il est utile de purifier l'ADN au préalable afin d'éviter la présence de contaminants et notamment d'inhibiteurs de la Taq polymérase.

La quantité d'ADN cible est également importante car si cette quantité est trop élevée, l'efficacité de la PCR sera diminuée suite à la présence de contaminants. Par contre, une quantité trop faible d'ADN cible entraîne une amplification non spécifique.

La polymérase.

Il existe différentes sortes de polymérases ayant des caractéristiques et des températures optimales différentes.
Certaines possèdent une activité exonucléase 3'-5' de correction, elles reproduisent donc plus fidèlement l'ADN cible.

Une concentration trop élevée en polymérase dans la solution PCR entraîne une spécificité moins grande alors qu'une concentration trop faible diminue le rendement de l'amplification.

Les déoxyribonucléotides (dNTP).

Les dNTP complexent le Mg ++ et leur concentration va influencer la concentration optimale en Mg ++.
Si la concentration en dNTP est trop élevée, il y a une mauvaise incorporation des nucléotides par la polymérase. Lorsque la concentration diminue, la spécificité et la fidélité de la réaction augmentent.

Le cycle.

Au niveau de la dénaturation, un chauffage suffisant est requis pour la séparation des deux brins d'ADN mais, une dénaturation trop longue diminue l'activité de la polymérase.
Le pourcentage de G-C détermine fortement la température nécessaire à l'hybridation. Cette température est optimale lorsqu'elle est de 5° à 10°C inférieure à la température de "melting" des amorces. La température de melting correspond à la température sous laquelle 50 % des primers sont hybridés.
Le temps d'extension est déterminé par la longueur de la chaîne à copier.

Le nombre de cycles ne doit pas dépasser 40 car les différents réactifs de la PCR sont alors épuisés. A ce niveau, les amplicons formés se réhybrident car ils sont en concentration très élevée et la réaction s'arrête.

1.3.4 DIFFERENTS TYPES DE PCR.

La PCR qualitative ou simple.

La PCR qualitative amplifie de manière spécifique un brin d'ADN cible s'il est présent dans l'échantillon à analyser.
Lorsque le brin d'ADN cible n'est pas présent, aucun brin n'est amplifié. On ne peut donc pas mettre en évidence le brin suspect lors du processus de détection.
Le brin cible est détecté habituellement après électrophorèse dans un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium s'intercale au niveau des doubles brins d'ADN et permet donc la visualisation de la bande d'ADN dont la longueur est déterminée par le choix des amorces.
Cette PCR qualitative permet d'établir un diagnostic à partir de l'analyse d'un échantillon sanguin, mais aussi d'affirmer la présence ou non d'une quantité, même très faible, d'ADN suspect dans l'échantillon d'un patient.
Par contre, la PCR qualitative ne donne pas de renseignement concernant la quantité d'ADN cible.

La PCR quantitative.

La PCR quantitative permet une quantification de l'ADN cible existant dans l'échantillon avant la PCR. Il existe deux types de PCR quantitative :

- PCR quantitative utilisant un standard externe
- PCR quantitative utilisant un standard interne

Ces deux techniques ont pour but la quantification d'un ADN cible.

La PCR a une efficience très variable d'un tube à l'autre. L'efficience dépend de nombreux facteurs dont :

- la longueur de l'ADN à amplifier
- la séquence de l'ADN à amplifier
- la séquence des primers utilisés
- la présence d'inhibiteurs dans les échantillons cliniques
- la variation d'un tube à l'autre

Ainsi la quantification par PCR pose des problèmes complexes du fait même de cette variabilité intrinsèque à la technique.
Au cours d'un cycle PCR, chaque molécule est susceptible de se dupliquer. Le rendement ou taux d'amplification r est la proportion moyenne des molécules se dupliquant au cours d'un cycle. Le nombre initial des molécules de type X dans la solution est noté Xo; Xn est le nombre de molécules de type X présentes dans la solution après n cycles.

Après le premier cycle d'amplification, les molécules initialement présentes sont toujours là et une fraction r d'entre elles ont donné une descendance d'une molécule. Ceci correspond à :

$$X_1 = X_o + rX_o$$
$$= X_o\ (1+r)$$

Après plusieurs cycles, cette relation correspond à : $Xn = X_o\ (1+r)^n$

La croissance de la quantité des produits de l'amplification n'est observée que pendant les premiers cycles. Après un certain temps, la croissance se ralentit et la quantité des produits tend vers une limite. C'est le plateau de l'amplification. La quantification est possible dans la phase de croissance exponentielle grâce à la formule :

$$\text{Log}\ (Xn) = \text{Log}\ (X_o) + n\ \text{Log}\ (1+r)$$ (Peccoud, 1993).

1) La PCR quantitative utilisant un standard externe.

Dans cette technique, la PCR de l'échantillon à analyser est réalisée simultanément à la PCR d'un standard externe. Le standard externe est utilisé comme référence, sa quantité avant PCR est connue. La PCR du standard externe est réalisée dans un tube différent du tube dans lequel se réalise la PCR de l'ADN cible. Ceci provoque une efficience de l'amplification de l'ADN cible différente de l'efficience d'amplification du standard externe.

La détection se réalise grâce à un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium.

La quantification de l'ADN cible se fait suite à la comparaison de l'intensité fluorescente des bandes du standard externe en quantité connue et de l'ADN cible.

Cette technique permet une évaluation grossière de la quantité d'ADN cible. Elle est utile pour le suivi d'un traitement thérapeutique.

2) La PCR quantitative utilisant un standard interne.

Lors d'une PCR quantitative utilisant un standard interne, une seconde séquence, soit Y, est amplifiée dans les mêmes conditions que la première séquence X. Grâce à la réaction décrite auparavant, nous supposons que le taux d'amplification de Y est égal à celui de X.

Ceci donne : $X_n / Y_n = X_o / Y_o$

Le rapport des 2 quantités reste donc constant au cours de l'amplification. Si Y_o est connu (quantité de standard interne au départ), il est possible d'en déduire X_o sans connaître le taux d'amplification (Peccoud, 1993).

La technique utilisant un standard interne implique l'amplification de la séquence d'intérêt et d'une séquence contrôle ou standard interne dans les mêmes conditions. La quantification du cible est alors faite en comparant l'intensité des 2 produits. Cette méthode donne de bons résultats uniquement si le cible et le standard interne sont amplifiés avec la même efficience. Sachant que l'efficience d'amplification varie de manière plus importante en fin de réaction PCR, il est nécessaire d'analyser les produits durant leur phase exponentielle.

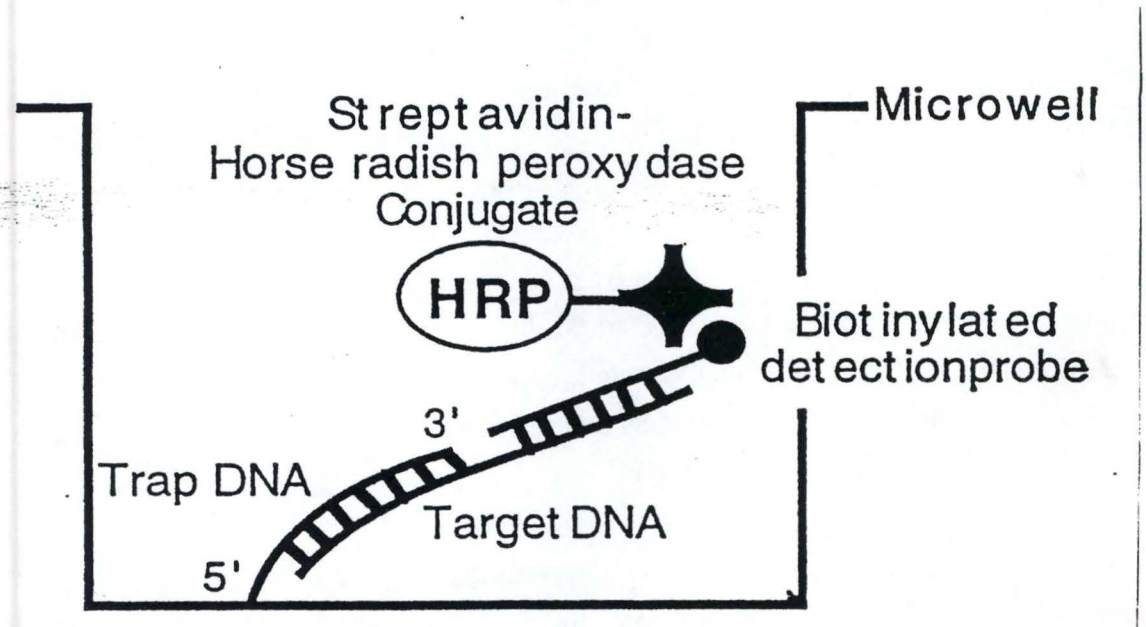


Fig. I 7. Schéma de l'hybridation sandwich

L'ADN amplifié par PCR est dénaturé et s'hybride au trappeur spécifique immobilisé dans le fond des multipuits en polystyrène. La sonde biotinylée et spécifique de cet ADN cible s'hybride également sur ce dernier. Le conjugué streptavidine/ Horse Radish Peroxydase est ajouté et se lie à la biotine portée par la sonde. L'activité de la péroxydase est mesurée suite à l'ajout de TMB car la péroxydase oxyde le TMB en présence de H_2O_2; il y a alors formation d'un produit bleu. La solution "stop" est ajoutée et le produit prend une coloration jaune; la densité optique sera alors mesurée sous 450 nm. L'IL 4 murin sera alors quantifié.

Afin de quantifier l'interleukine 4, une amplification préalable par PCR est nécessaire. La PCR assurant l'amplification de l'ARNm de l'IL 4 peut se faire en réalisant simultanément l'amplification d'un standard interne.

Le standard interne peut correspondre à un gène de référence et notamment au gène de la béta-actine. Ce gène sera amplifié simultanément à l'IL 4 dans un même tube mais aussi en utilisant les mêmes amorces.

Les produits obtenus suite à la PCR sont séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide de 5 à 15 % et ils sont visualisés grâce à une autoradiographie.

Par cette méthode, le taux d'ARNm de l'IL 4 est quantifié suite à une comparaison avec le taux d'expression de l'ARNm de la béta-actine. (Ochi et al. , 1996)

Dans ce cas, la séparation par électrophorèse sur gel se fait sur base de la taille différente du cible et du standard interne. Cependant on doit utiliser un standard interne le plus proche possible du cible afin d'obtenir une efficience d'amplification semblable. Dans cette technique, les deux produits d'amplification diffèrent par leur taille, leur poucentage en G-C ainsi que les primers permettant leur amplification.

La quantification de l'IL 4 peut être réalisée suite à l'amplification d'un standard interne. Le standard interne ainsi que le cible sont de même taille, ils comportent le même pourcentage de G-C et sont amplifiés grâce aux mêmes sets d'amorces.

Une des amorces porte une amine libre et pourra s'immobiliser grâce à une réaction chimique sur une fonction carboxylique fixée sur un puits.

La révélation se fait suite à la fixation d'une sonde biotinylée spécifique soit du cible, soit du standard interne et cette sonde sera détectée par un test ELISA. (Taniguchi et al. , 1993)

Dans ce cas, l'immobilisation est peu spécifique et a des rendements très faibles. La capture sera non spécifique car les amorces libres entrent en compétition avec les amplicons pour cette immobilisation.

La PCR compétitive que nous proposons pour la quantification d'un brin cible d'IL 4 combine l'avantage de l'amplification par PCR à une hybridation sandwich.

Le standard interne utilisé dans cette quantification est construit de façon à être amplifié par les mêmes amorces que l'ADN cible.

Ils sont tous deux de même longueur, la composition du standard interne est identique à celle du cible sauf sur une courte séquence. Cette séquence est constituée du même pourcentage de G-C mais dans un ordre différent. Elle est destinée à la reconnaissance d'une sonde spécifique du standard interne lors de la détection. Grâce à ces propriétés, l'efficience de la PCR est identique pour les deux élèments.

Sachant que l'ADN cible et le standard interne ont la même longueur, il est impossible de les détecter séparément sur un gel d'agarose. Ces deux élèments seront détectés grâce à une hybridation sandwich suive d'une révélation en colorimétrie.

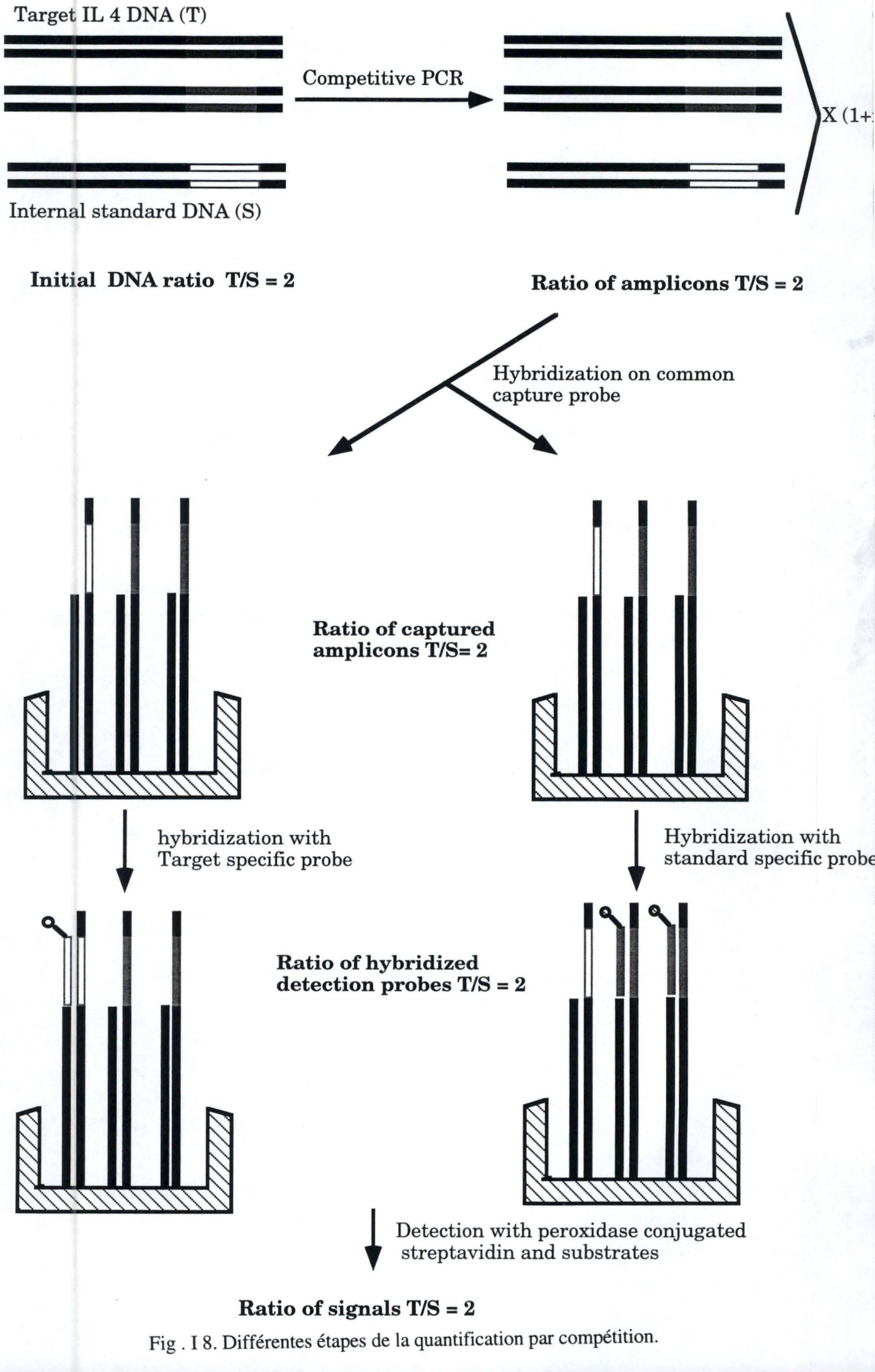


Fig . I 8. Différentes étapes de la quantification par compétition.

Lors de l'hybridation sandwich, les produits obtenus suite à la PCR sont d'abord capturés par un trappeur fixé dans des micropuits. Suite à la fixation des brins complémentaires sur le trappeur, la sonde biotinylée et spécifique de l'ADN cible est ajoutée dans un des puits alors que la sonde biotinylée et spécifique du standard interne est ajoutée dans le deuxième puits.
La sonde biotinylée est alors reconnue par la streptavidine du conjugué streptavidine/ Horse Radish Peroxydase. L'activité de la péroxydase "fixée" à présent dans les puits est mesurée grâce à l'ajout de TMB (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine) car la péroxydase oxyde le TMB en présence de H_2O_2. Après 10 minutes de réaction, la solution "stop" composée de H_2SO_4 est ajoutée et la densité optique est alors mesurée sous 450 nm. On peut alors mesurer le signal émis suite à la réaction entre la streptavidine fixée sur la sonde biotinylée de l'ADN cible et le TMB. Ce signal sera comparé au signal émis dans le deuxième puits par la réaction entre la straptavidine fixée sur la sonde biotinylée du standard interne en quantité connue et le TMB (Fig. I. 7).

Le rapport entre la quantité de standard interne et la quantité de cible reste semblable tout au long du processus de détection. Si nous considérons l'exemple de la figure I. 8, la quantité de cible est 2 X plus importante que celle du standard au départ. Ce rapport de 2 est maintenu après l'étape d'amplification. Lors de la capture des amplicons par le trappeur, il y a également 2 X plus d'amplicons cibles qui se fixent par rapport aux amplicons du standard interne. Les sondes de détection spécifiques de chacun des brins sont ajoutées en quantité égale mais il y a 2 X plus de sondes spécifiques du cible qui s'hybrident puisqu'il y a 2 X plus de cibles fixés sur le trappeur. Le signal émis sera donc 2 X plus important pour le cible. Etant donné que la quantité de standard interne est connue au départ de ce processus, il est aisé de quantifier le cible suite à la comparaison des signaux émis par chacun des élèments.

La PCR compétitive permet une évaluation précise de la quantité d'ADN cible. Elle est utile pour le suivi d'un traitement thérapeutique dans lequel de faibles variations du taux d'ADN cible s'opèrent au cours du temps.

OBJECTIF DU TRAVAIL.

L'interleukine 4 joue un rôle important au niveau de la réaction allergique, il est donc utile de pouvoir la détecter chez un patient soupçonné d'allergie mais également de pouvoir la quantifier chez un patient allergique afin d'évaluer l'efficacité du traitement. Sachant que le gène de l'IL 4 est exprimé uniquement suite à un stimulus et en quantité relativement faible et, que le nombre de cellules provenant d'échantillons cliniques est peu élevé, une méthode de détection quantitative et sensible de l'ARNm de l'IL 4 est proposée dans ce travail. Cette méthode combine la propriété d'amplification que donne la technique de PCR avec la détection spécifique permise par l'hybridation sandwich. Elle utilise un standard interne qui sera amplifié conjointement à l'ADN (ou ARN) et permettra sa quantification. Une grosse partie de ce travail sera consacrée à la construction du standard interne.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES

2.1.1 Souches bactériennes.

E.*coli* XL1 - blue.

Cette souche est, au niveau de son épisome F', partiellement délétée de 93 bp à l'extrêmité N terminale du gène Lac Z. Ce dernier codant pour la β-galactosidase (opéron lactose) est donc incapable de métaboliser le lactose. Cette particularité permet la complémentation du gène Lac Z (défectif) de la cellule hôte par le gène Lac Z' au sein d'un plasmide codant pour le peptide α nécessaire à l'activité de la β-galactosidase. Lorsque le gène Lac Z' du plasmide est interrompu par l'insertion d'un fragment d'ADN, la β-galactosidase ne peut être complémentée et est dès lors inactive (montrant un phénotype bleu). Les cellules transformées par des plasmides ne comportant pas d'insert, donc où la β-galactosidase est active, montrent un phénotype blanc. Cette sélection ne fût pas réalisée lors de notre travail mais, ces bactéries furent utilisées suite à leur rapidité de croissance mais également suite à leur sensibilité vis-à-vis de l'ampicilline.

2.1.2 Plasmides bactériens.

pSP64 poly(A).

Le pSP64 poly(A) (Proméga) est un vecteur de clonage. Il contient en 3', une séquence de 30 résidus A:T et possède en amont du site multiple de clonage, le promoteur de l'ARN

Description: The pSP64, pSP65 and pSP64 Poly(A) Vectors can be used as standard cloning vectors and also can be used for *in vitro* transcription from the SP6 promoter. The pSP64/pSP65 Vectors are nearly identical except for the orientation of their multiple cloning site regions. The pSP64 Poly(A) Vector can be used to generate poly(A)+ transcripts *in vitro*.

Storage Conditions: Store vector at –20°C.

GenBank®/EMBL Accession Number: X65328.

Additional Information Available	**Lit.#**
Sequence & Map	TB052

Vector Map Notes:

1. Sequence reference points:

a. SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	1
b. SP6 RNA Polymerase promoter	3017-6
c. multiple cloning sites	7-91
d. *lacZ* start codon	105
e. *lac* operon sequences	91-320
f. *lac* operator	125-141
g. β-lactamase (Amp^r) coding region	1262-2122

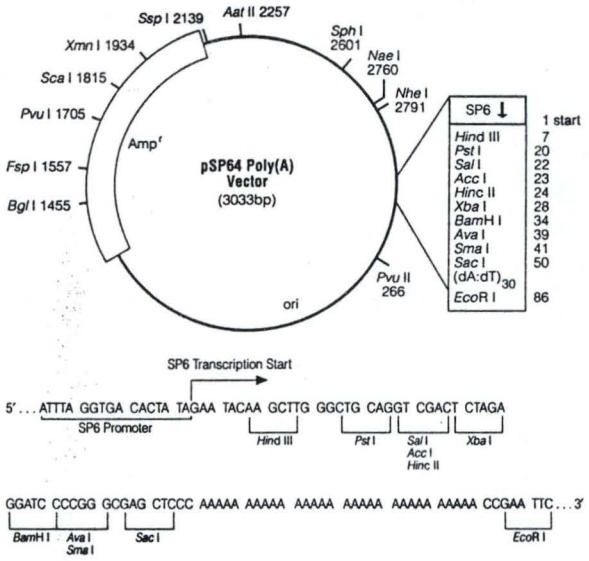


Fig. II 1. Le plasmide pSP 64 poly (A) (Catalogue Proméga, 1997).

polymérase du phage SP 6 permettant la transcription in vitro. Ce vecteur possède comme marqueur de sélection, la résistance à l'ampicilline (Figure II. 1).

pWT IL 4.

Le pWT IL 4 (R&D System) est un pUC 18 (vecteur de clonage) contenant entre les sites Hind III et Eco R1, le cDNA complet du gène de l'interleukine de souris. Ce plasmide possède également comme marqueur de sélection la résistance à l'ampicilline.

2.2. PREPARATION DE CELLULES $CaCL_2$ COMPETENTES

Le principe de la transformation au $CaCl_2$ est basé sur la perméabilisation des parois bactériennes . La formation de pores dans la paroi est réalisée par incubations successives des cellules dans une solution de $CaCl_2$ de faible force ionique et par un choc thermique.

2.2.1 Bactéries $CaCl_2$ compétentes.

- Inoculer 1 colonie de souche E.*coli* dans 50 ml de milieu de culture LB (milieu Luria Bertani) additionné ou non d'antibiotique (Tét. pour XL1 -*Blue* et Tét. pour *Sure*). Incuber une nuit à 37°C sous agitation modérée.
- Inoculer 400 ml de LB (avec ou sans antibiotique) avec 4 ml de préculture. Laisser pousser à 37°C sous agitation modérée jusqu'à ce que la densité optique de la culture à 590 nm ait atteint 0,375 (Phase de croissance exponentielle). Au delà de 0,4, les cellules obtenues ont une compétence moindre.
- Aliquoter 100 ml dans 4 cylindres stériles et laisser sur glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger 7 minutes à 3000 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14) à 4°C.
- Resuspendre chacun des culots dans 20 ml d'une solution de $CaCl_2$ stérile froide (4°C).

Solution de $CaCl_2$:

- 60 mM $CaCl_2$ (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 15 % glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne)

- 10 mM PIPES (ph 7) (Sigma, St Louis, USA)
autoclaver

2.2.2 Choc thermique.

- Dégeler sur glace un aliquot de 100 µl de bactéries $CaCl_2$ compétentes.
- Ajouter 100 ng d'ADN (plasmide, mélange de ligation) aux bactéries et mélanger délicatement.
- Placer sur glace durant 10 minutes.
- Réaliser le choc thermique.
- Laisser reposer 5 minutes sur glace.
- Ajouter 800 µl de milieu LB froid à la suspension bactérienne.
- Incuber durant 30 minutes dans un bain à 37°C.
- Etaler 500 µl sur milieu solide et incuber durant une nuit à 37°C.

2.3. PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

2.3.1 Le milieu Luria Bertani (LB) (Difco, USA).

Composition : pour 1 litre de milieu LB:
- extraits de levure : 5 g (Difco, USA)
- tryptone: 10 g (Difco, USA)
- NaCl : 5g (Difco, USA)

- Ajouter 8 g LB dans un volume de 400 ml d'eau.
- Autoclaver 15 minutes à 120°C.
- Le milieu LB liquide est stocké à 4°C.

2.3.2 Le milieu LB solide.

- Ajouter 8 g LB + 6 g Agar (Difco, USA) dans un volume de 400 ml d'eau.
-Autoclaver 15 minutes à 120°C.
- Après refroidissement, ajouter ou non l'antibiotique.
- Couler sur boîtes de Pétri et laisser solidifier.
- Laisser sécher environ 30 minutes.

2.3.3 Le milieu LB liquide avec antibiotique.

Les plasmides utilisés possèdent le gène de résistance à l'ampicilline. La sélection des cellules ayant intégré un plasmide se fait par adjonction d'ampicilline (Sigma, St Louis, USA) dans le milieu de culture à une concentration finale variant de 50 µg à 100 µg/ml.

2.4. MISE EN CULTURE

2.4.1Milieu solide (boîte de Pétri).

- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile un aliquot de souche bactérienne provenant d'un stock en glycérol à -70°C.
- Etaler et isoler sur milieu LB solide.
- Incuber une nuit à 37°C.

2.4.2 Mini-culture (liquide).

- Ensemencer dans 2 ml de milieu liquide (LB + Amp.) une colonie isolée issue d'une culture en milieu solide.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous une agitation de 200 rpm.

2.4.3 Maxi-culture (200 ml LB).

- Ensemencer 200 ml de milieu liquide (LB + Amp.) avec 2 ml de préculture issue de la mini-culture.
- Incuber une nuit à 37°C sous une agitation de 130 rpm.

2.5. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE

2.5.1 Maxi-préparation d'ADN plasmidique.

Cette opération est constituée de plusieurs étapes :

- la lyse alcaline des bactéries
- la liaison de l'ADN plasmidique sur une résine échangeuse d'anions
- la purification de l'ADN plasmidique et donc l'élimination de l'ARN, des protéines et des impuretés de faible poids moléculaire
- l'élution de l'ADN
- la précipitation de l'ADN plasmidique par l'isopropanol
- la resuspension de l'ADN

Protocole

Cette technique nécessite l'utilisation du kit " Qiagen Plasmid" (Westburg, leusden, Pays-Bas).

- Centrifuger la culture liquide de 200 ml à 4000 rpm durant 20 minutes à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-14).
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 10 ml de P1 contenant la RNase.
- Ajouter 10 ml de P2 et incuber durant 5 minutes à température ambiante. Ce tampon assure la lyse des bactéries car il est constitué de NaOH/SDS. Le SDS solubilise les phospholipides et les protéines de la menmbrane cellulaire tandis que le NaOH dénature l'ADN plasmidique et chromosomial.
- Ajouter 10 ml de P3 et agiter faiblement, ensuite, incuber durant 20 minutes sur glace. Le tampon P3 est constitué d'acétate de potassium. Cette concentration élevée en sels provoque la précipitation du SDS et les protéines dénaturées, l'ADN chromosomial ainsi

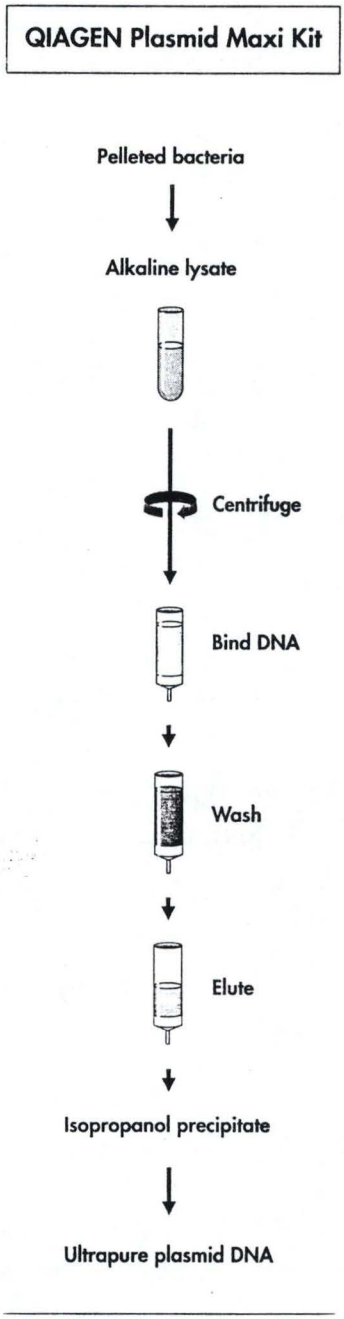


Fig. II 2. Principe d'extraction des plasmides (Catalogue Qiagen, 1996).

que les débris cellulaires sont trappés dans ce complexe de sels. L'ADN plasmidique étant plus petit, se renature correctement et reste en solution.

- Centrifuger durant 30 minutes sous 12000 rpm et à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-20).
- Récupérer le surnageant.
- Centrifuger durant 15 minutes sous 12000 rpm et à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-20).
- Répéter si nécessaire cette étape afin d'éliminer les dernières particules en suspension.
- Equilibrer la colonne Quiagen 500 avec 10 ml de QBT.
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée et laisser pénétrer.
- Laver la colonne avec 2x30 ml de QC. Le tampon QC contient 1 M NaCl qui enlève complètement les contaminants encore présents tels que les traces d'ARN et de protéines, sans affecter la laison de l'ADN plasmidique.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 15 ml de QF.
- Précipiter l'ADN avec 0,7 volumes d'isopropanol à température ambiante. La précipitation permet le désalement et la concentration de l'ADN.
- Centrifuger durant 30 minutes sous 12000 rpm et à 4°C (Beckman J-21B, rotor JA-20).
- Vider le surnageant.
- Laver l'ADN avec 5 ml d'éthanol 70%.
- Vider le surnageant et laisser sécher à l'air libre.
- Resuspendre l'ADN dans 100 µl d'eau stérile.
- Stocker à -20°C. (Figure II.2).

<u>Composition des tampons.</u>

- Tampon P1 :
    - 50 mM Tris-HCl, pH 8
    - 10mM EDTA
    - 100 µg/ml RNase A
- Tampon P2 :
    - 200 mM NaOH
    - 1% SDS
- Tampon P3 :
    - 3 M acétate de potassium pH 5,5
- Tampon QBT :
    - 750 mM NaCl
    - 50 mM MOPS pH 7
    - 15% éthanol
    - 0,15% Triton X-100

- Tampon QC :
    - 1 M NaCl
    - 50 mM MOPS pH 7
    - 15% éthanol
- Tampon QF :
    - 1,25 M NaCl
    - 50 mM Tris-HCl pH 8,5
    - 15% éthanol

2.5.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique.

La mini-préparation est un processus simplifié de la maxi-préparation. Son prinicipe de base est identique.

Protocole

Utilisation du kit " Quiaprep-spin Plasmid Miniprep" (Westburg, Leusden, Pays-Bas).
Toutes les centrifugations sont réalisées par la centrifugeuse "Heraeus Sepatech, Biofuge 13).

- Centrifuger la culture liquide de 2 ml à 15000 rpm durant 1 minute.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 250 µl de P1 contenant la Rnase.
- Ajouter 250 µl de tampon P2 contenant du NaOH/SDS.
- Ajouter 350 µl de tampon N3.
- Centrifuger durant 10 minutes sous 13000 rpm.
- Placer le surnageant sur les Quiaprep Spin Columns posées dans un eppendorff.
- Centrifuger l'ensemble (colonne + eppendorff) durant 1 minute et sous 13000 rpm.
- Laver les colonnes en ajoutant 750 µl de tampon PE qui enlève les sels.
- Centrifuger durant 1 minute sous 13000 rpm.
- Centrifuger une nouvelle fois sous 13000 rpm durant 1 minute afin d'éliminer toutes las traces de tampon PE.
- Placer un nouvel eppendorff collecteur sous chaque colonne.
- Eluer l'ADN en ajoutant 50 µl de Tris-HCl 10 mM à pH 8,5 et centrifuger 1 minute sous 13000 rpm.
- Récolter la solution qui contient l'ADN plasmidique.
- Stocker à -20°C.

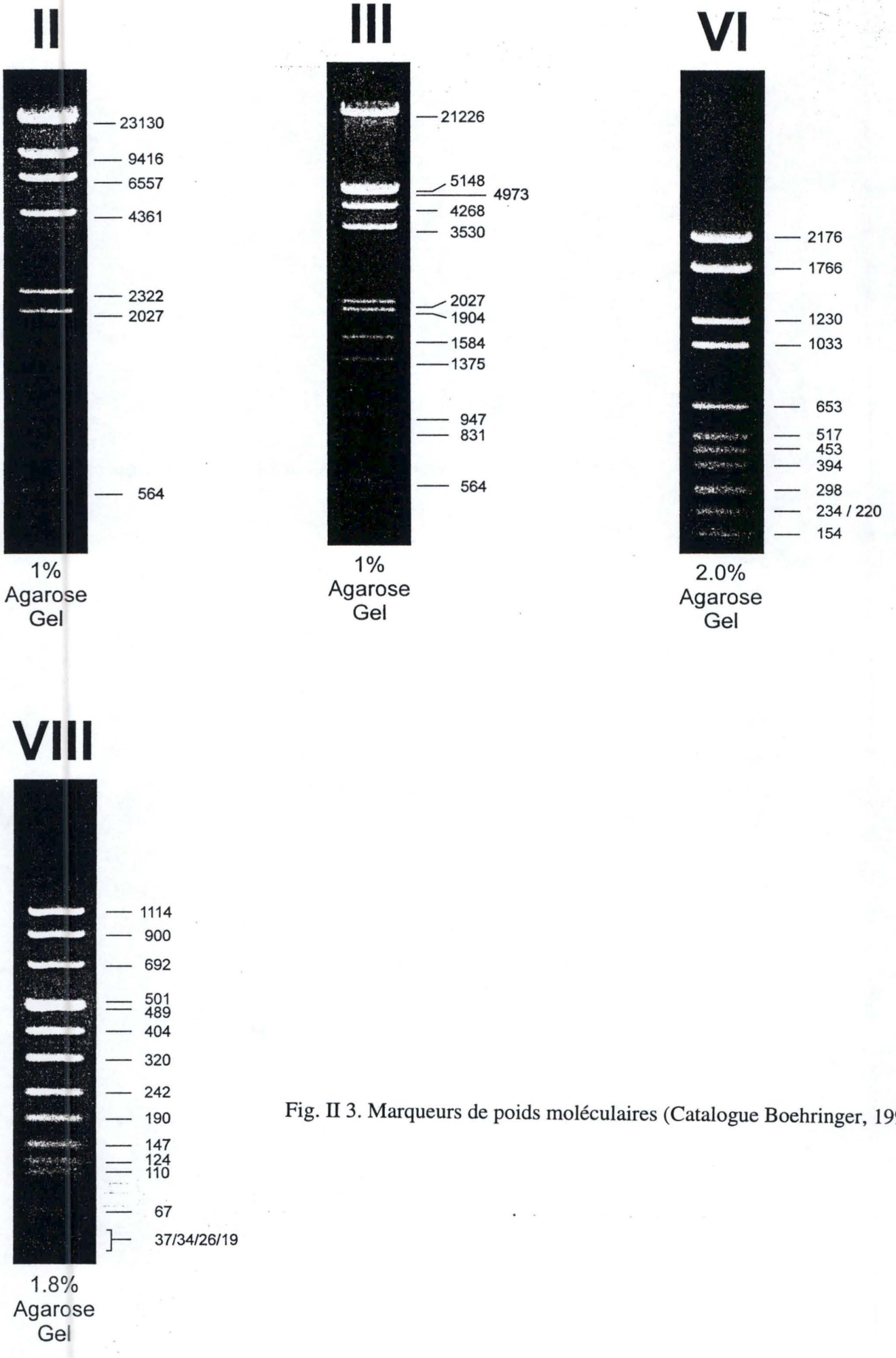


Fig. II 3. Marqueurs de poids moléculaires (Catalogue Boehringer, 1997).

2.6. RESTRICTION D'ADN

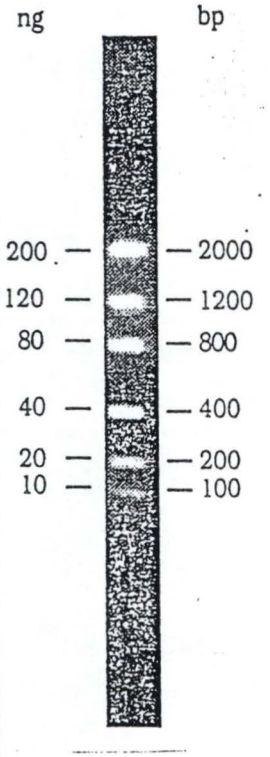
La restriction de l'ADN est réalisée par des endonucléases qui coupent de manière spécifique une courte séquence de cet ADN. Une unité enzymatique correspond à l'activité de l'enzyme lorsque celui-ci clive 1 µg de λDNA en 1 heure à 37°C dans un volume total de 50 µl.

Mélange de restriction.

- ADN à restreindre
- Tampon de restriction : 1/10 du volume final du mélange de restriction (Boehringer Mannheim, Allemagne).
- Eau stérile
- 1 (ou les) enzymes de restriction : au maximum 1/10 du volume final du mélange de restriction (Boehringer Mannheim, Allemagne).
- Incuber le mélange de restriction dans un bain à 37°C durant 2 heures.

2.7. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Cette technique permet la séparation de fragments de taille différente au cours de leur migration. Les fragments seront visibles grâce au bromure d'éthidium, présent dans le gel, qui s'intercale au niveau des doubles brins d'ADN. L'ADN est alors visible sous UV. Le pourcentage en agarose peut varier d'un gel à l'autre. Un pourcentage élevé en agarose (2%) permet une bonne visualisation des petits fragments tandis qu'un pourcentage plus faible en agarose (1%) assure la visualisation de fragments plus grands. Afin d'estimer la taille des fragments, on utilise des marqueurs de poids moléculaire qui servent de référence.(Figure II.3).
On peut également estimer la quantité d'ADN en fonction de l'intensité lumineuse émise et ceci, en la comparant à des marqueurs de poids molécualires semi-quantitatifs. (Figure II.4).



Fragment Size	Volume of DNA Mass Ladder 2µl	4µl	8µl
2000 bp	100ng	200ng	400ng
1200 bp	60ng	120ng	240ng
800 bp	40ng	80ng	160ng
400 bp	20ng	40ng	80ng
200 bp	10ng	20ng	40ng
100 bp	5ng	10ng	20ng

Fig. II 4. Tableau de quantification par le Mass Ladder (Life Technologies).

Protocole.

- Ajouter l'agarose (BioRad, High strenght analytical grade agarose), en quantité requise pour le pourcentage du gel, à 80 ml de TBE 1x.
- Chauffer le mélange jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.
- Après un faible refroidissement, ajouter le bromure d'éthidium (Sigma, St Louis, USA).
- Couler le gel et placer les peignes.
- Placer le support + gel dans la cuve d'électrophorèse (Gibco BRL Life Technologies INC) préalablement remplie de TBE 1x.
- Déposer les échantillons dans les puits. Ces échantillons sont additionnés de bleu de bromophénol afin de permettre le maintien des échantillons dans les puits.
- Laisser migrer durant 1 heure sous 100 volts.
- Visualiser le gel sous UV.

Composition des solutions.

- TBE 10x : (pour 2 litres) :
    - 216 g Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - 110 g acide borique (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - 15 g EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Bromure d'éthidium (Sigma, St Louis, USA) sous concentration stock de 500 µg/ml.
- Bleu de bromophénol :
    - glycérol 50% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - Na_2 EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - SDS 1% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
    - Bleu de bromophénol 0,1% (Janssen, Belgique)
- Marqueurs de poids moléculaire :
    - marqueur III, marqueur VI, marqueur VIII (Boehringer Mannheim, Allemagne)
    - Low DNA Mass Ladder (Gibco, Grande-Bretagne) : marqueur à 2000,1200, 800, 400, 200 et 100 pb).

2.8. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE

Cette réaction permet l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN de manière exponentielle.

2.8.1 Mélange réactionnel.

- Tampon de la Taq polymérase (Dynazyme, Finlande) concentré 10 X
- dNTP (Boehringer, Mannheim, Allemagne) à une concentration finale de 200 µM
- primer sens et antisens (Eurogentec, Seraing, Belgique) à une concentration finale de 100 pmoles
- ajouter de l'eau stérile pour atteindre un volume final de 100 µl
- Taq polymérase (Dynazyme, Finlande) à raison de 2 unités par réaction
- ADN cible (de 1000000 à 1 copies) pWT IL 4 et pSI IL 4

2.8.2 Amplification des cycles PCR

Utilisation du GeneAmp PCR System 9600 de Perkin Elmer.

1er type :

- dénaturation durant 3 minutes à 94°C
- 3 cycles comprenant : dénaturation à 94°C pendant 1 minute
  hybridation 30 secondes à 55°C
  élongation 30 secondes à 72°C
- 31 cycles comprenant : dénaturation 30 secondes à 94°C
  hybridation 30 secondes à 55°C
  élongation 30 secondes à 72°C
- élongation 10 minutes à 72°C
- neutralisation à 4°C

2ème type :

- dénaturation 1 minute à 94°C
- 3 cycles comprenant : dénaturation 1 minute à 94°C
  hybridation 30 secondes à 65°C
  élongation 30 secondes à 72°C
- 31 cycles comprenant : dénaturation 30 secondes à 94°C

hybridation 30 secondes à 65°C
élongation 30 secondes à 72°C

- élongation 10 minutes à 72°C
- neutralisation à 4°C

2.9. PURIFICATION DES PRODUITS PCR

Le kit "Wizard PCR Preps DNA Purification System" (Proméga, Madison, USA) est utilisé pour cette purification.

Protocole

- Placer dans un eppendorff, 30 à 300 µl de produits PCR mais également 100 µl de Direct Purification Buffer.
- Vortexer le mélange.
- Ajouter 1 ml de résine et vortexer durant 1 minute.
- Placer une seringue de 2 ml sur le sommet de la colonne Wizard.
- Placer le mix sur une minicolonne Wizard. La solution traversera la colonne grâce à la pression exercée par la seringue sur le liquide.
- Laver la colonne en ajoutant 2 ml d'isopropanol 80%.
- Sécher la colonne grâce à une centrifugation de 20 secondes sous 10000 rpm (Heraeus Sepatech,Biofuge 13).
- Placer 50 µl d'eau stérile directement dans la colonne et attendre 1 minute.
- Centrifuger durant 30 secondes sous 10000 rpm afin d'éluer les fragments d'ADN (Heraeus Sepatech, Biofuge 13).
- Stocker à 4°C ou à -20°C.

Composition des solutions

- Direct Purification Buffer : - 50 mM Kcl
  - 10 mM Tris-HCl sous pH 8,8
  - 1,5 mM $MgCl_2$

- 0,1% Triton X-100

2. 10. PURIFICATION PAR LE PHENOL-CHLOROFORME

Cette technique est utilisée afin de purifier et concentrer des préparations d'ADN. La solution d'ADN est d'abord extraite par une mixture de phénol/chloroforme/isoamyl alcool qui dénature et élimine les protéines contaminantes. L'ADN est ensuite précipité en présence d'éthanol 100 % et de sel NaCl (150 mM) et lavé avec de l'éthanol 70 % qui élimine les sels et les petites molécules organiques.

Protocole

- Ajouter 1 volume de phénol-chloroforme (Sigma, St Louis, USA) à la solution à purifier dans un eppendorff.
- Vortexer rigoureusement pendant 10 secondes.
- Centrifuger 5 minutes à température ambiante sous 12000 rpm.
- Enlever la phase supérieure contenant l'ADN et la transférer dans un nouveau tube.
- Ajouter 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M à pH = 5,2 et bien mélanger.
- Laisser précipiter une nuit à -70°C.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C sous 12000 rpm.
- Enlever le surnageant.
- Laver avec 500 µl d'éthanol 95 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) afin d'éliminer le phénol.
- Centrifuger 10 minutes à 4°C sous 12000 rpm.
- Enlever l'éthanol.
- Lyophiliser (Hétovaq, High Technology of Scandinavia)

Les centrifugations sont réalisées par la centrifugeuse Heraeus Sepatech Biofuge 17 RS.

2.11. REACTION DE LIGATION

L'enzyme ADN ligase du phage T4 assure la liaison de fragment(s) d'ADN. Cet enzyme catalyse la formation de liens phosphodiesters entre l'hydroxyle 3' et le phosphate 5' d'ADN.

Protocole

- Dans un eppendorff, placer les deux fragments d'ADN à lier (en général, on travaille avec un excès d'insert).
- Ajouter 1/10 du volume final de tampon de ligation (Boehringer, Mannheim, Allemagne).
- Ajouter de l'eau stérile afin d'atteindre le volume final.
- Finalement, ajouter la T4 DNA ligase (Boehringer, Mannheim, Allemagne).
- Incuber le mélange durant une nuit dans un bain à 15°C.

2.12. EXTRACTION D'ADN D'UN GEL D'AGAROSE

Un fragment d'ADN peut être extrait d'un gel d'agarose et purifié grâce à l'utilisation du kit "Wizard PCR Preps DNA Purification " (Proméga, Madison, USA).

Protocole

2.12.1 Utilisation d'un gel TAE agarose.

Le TAE 1X provient d'une solution stock TAE 50X contenant :

- 242 g Tris
- 57,1 ml acide acétique glacial
- 37,2 g Na_2 EDTA 2 H_2O

- Porter ensuite le volume final à 1 litre en ajoutant de l'eau.
- Ajouter 1,6 g Agarose (BioRad, High Strenght analytical grade agarose) aux 80 ml de TAE 1X pour obtenir un gel d'agarose 2%.
- Faire chauffer la solution afin de dissoudre complètement l'agarose.
- Après refroidissement, ajouter du bromure d'éthidium sous concentration finale de 5 µl/ 80 ml (Sigma, St Louis, USA) et couler le gel.
- Laisser solidifier.

2.12.2 Extraction et purification des fragments d'ADN.

- Exciser le fragment d'ADN recherché présent dans le gel à l'aide d'une lame stérile.
- Placer dans un eppendorff et ajouter 1 ml de résine.
- Incuber dans un bain à 65°C durant 5 minutesafin de faire fondre l'agarose.
- Placer une seringue de 2 ml sur le sommet de la colonne Wizard.
- Ajouter la solution sur la mini-colonne Wizard. La solution traversera la colonne grâce à la pression exercée par la seringue sur le liquide.
- Laver la colonne avec 2 ml d'isopropanol 80%.
- Centrifuger la mini-colonne durant 20 secondes à 12000 rpm.
- Ajouter 50 µl d'eau sur la colonne et attendre 1 minute afin que la répartition de l'eau soit équilibrée.
- Centifuger 20 secondes sous 12000 rpm afin d'éluer le fragment d'ADN.
- Stocker à 4°C ou à -20°C.

Les centrifugations sont réalisées par la centrifugeuse Hepateus Sepatech Biofuge 13.

2.13. LE SEQUENCAGE

La technique utilisée est un séquençage à fluorescence par PCR avec le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer, Branchburg, USA). Le fragment à séquencer subit une réaction PCR en présence d'une seule amorce.

Le mélange PCR contient un pourcentage adéquat de didéoxynucléotides fluorescents inhibant ainsi l'élongation par des nucléotides non marqués. Suite à la réaction PCR, on obtient des amplicons de taille variable et terminés par un nucléotide marqué.

Ces amplicons sont placés sur un gel de polyacrylamide et migrent suivant leur taille. Un laser passe sur le banc de migration et excite les marqueurs fluorescents. Ceux-ci réémettent sous une autre longueur d'onde qui leur est propre. La succession des rayonnements émis est analysée et donne la séquence du fragment analysé.

Protocole.

2.13.1 La réaction PCR.

- Placer dans le tube PCR :
  - 1,5 à 2,5 µl (0,2µg/µl) si ADN double brin
  - 3 à 6 µl (10 -30 ng/µl) si produits PCR
- Ajouter l'amorce sens ou antisens (3,2 pmoles).
- Mettre 4 µl de Terminator Ready Reaction Mix.
- Ajouter de l'eau pour atteindre le volume final de 10 µl.

La réaction PCR est réalisée par le GeneAmp PCR System 2400 sous un programme correspondant à :

- une dénaturation 10 secondes à 96°C
- une hybridation 5 secondes à 50°C
- une élongation 4 minutes à 60°C

ce cycle est répété 25X.

2.13.2 Purification des produits résultant de la PCR.

- Pour chaque réaction de séquençage, préparer un eppendorff avec 2 µl d'acétate de sodium pH 5,2 (Merck, Darmstadt, Allemagne) et 50 µl d'éthanol 95% (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Ajouter les 10 µl de la réaction PCR.
- Vortexer et placer 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 30 minutes sous 13000 rpm (Hepateus Sepatech, Biofuge 13).
- Eliminer le surnageant.
- Rincer le culot en ajoutant 250 µl d'éthanol 70% (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm (Hepateus Sepatech, Biofuge 13).
- Eliminer le surnageant.
- Sécher le culot sous vide (Hétovaq).

Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel d'acrylamide 4% et la lecture de la séquence est réalisée par l'appariel ABI.PRISM.

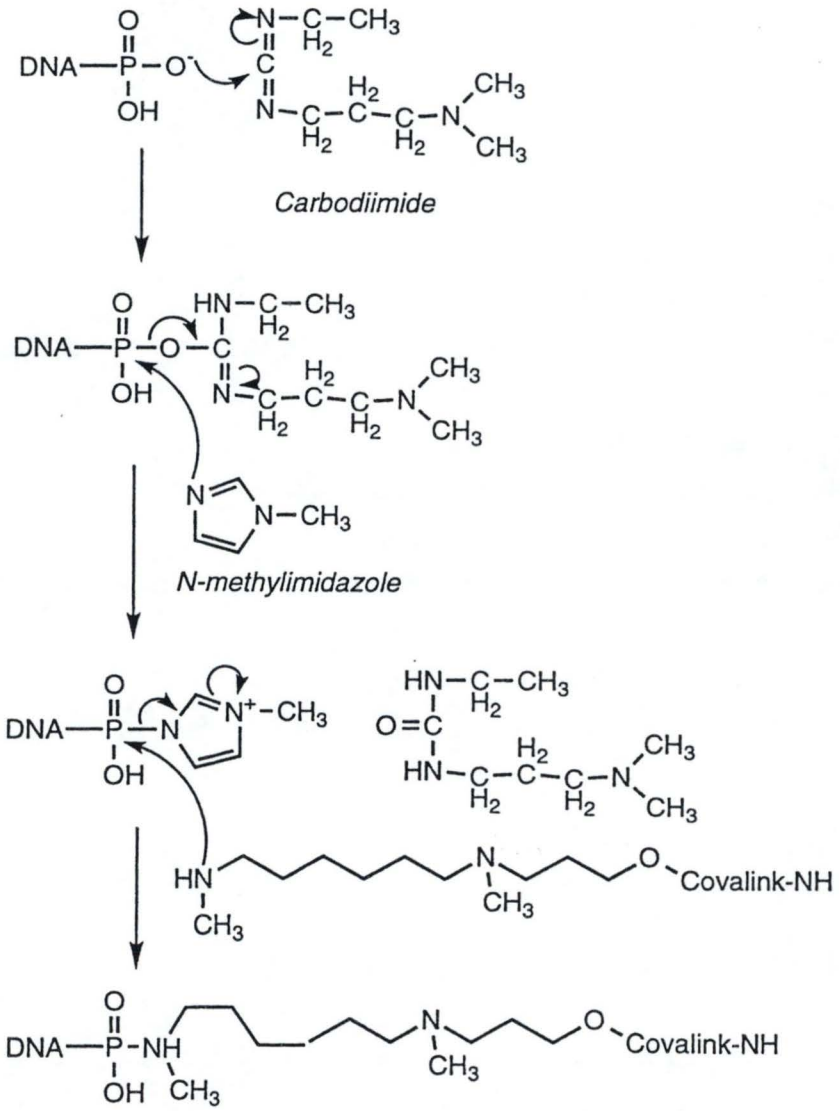


Fig. II 5. Réaction chimique assurant la fixation du trappeur sur des amines greffées sur un support.

2.14. FIXATION DU TRAPPEUR

L'ADN trappeur se fixe sur des plaques multipuits. Le support est constitué de polystyrène sur lequel sont greffées des amines secondaires. La fixation est une réaction chimique permettant la liaison covalente de l'ADN dans les puits. Cette réaction correspond à des attaques nucléophiles entre le phosphate 5' de l'ADN, la carbodiimide (un agent couplant), et l'amine secondaire greffée sur le support (Figure II. 5).

Protocole.

2.14.1 Calcul du pourcentage de fixation en radioactivité.

Le trappeur fût préalablement produit lors d'une PCR réalisée sur le plasmide pWT IL 4 en utilisant les amorces 2 et 3 (cfr. 2. 8 -1er type).

* Marquage du trappeur

- Purifier le trappeur au préalable grâce à des Spin Columns correspondant à des G 25 Séphadex (Boehringer, Mannheim, Allemagne).
- Préparation du mélange réactionnel :
  - 16 µl trappeur (2,48 pmoles)
  - 2 µl Tampon T4 Kinase (Boehringer, Mannheim, Allemagne).
  - 1 µl d'ATP radioactif marqué au phosphore 32 (Amersham, Little Chalfort, Angleterre).
  - 1 µl T4 polynucléotide kinase (Boehringer, Mannheim, Allemagne)
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Purification du trappeur marqué sur Spin Columns.
- Préparation d'un gel d'agarose 2% (cfr. 2.7 : Electrophorèse sur gel d'agarose).
- Placer l'échantillon contenant :
  - 1 µl trappeur marqué
  - 2 µl bleu bromophénol
  - 10 µl eau

dans les puits et laisser migrer durant 1 heure sous 100 volts.

- Suite à la migration, le gel est emballé et placé dans le lecteur de l'Instant Imager

(Packard, Downers Grove, USA).
Cette étape prouve le marquage ou non du trappeur.

* Fixation du trappeur.

- Dilution du trappeur afin d'atteindre une concentration de 200 ng/ 65 µl.
- Dénaturer le trappeur 10 minutes à 100°C et le placer directement sur glace pendant 5 minutes.
- Déposer dans chaque puits : 65 µl trappeur, 10 µl MEIM (Methylimidazol) 0,1M et 25 µl EDC (1-éthyl-3(-3diméthylaminopropyl) carbodiimide) 0,04M.
- Recouvrir les puits d'un plastique autocollant et incuber 5 heures à 50°C. ce temps d'incubation a été testé et il apparaît qu'une durée de 5 heures soit optimale pour la fixation. Néanmoins, une incubation d'une nuit donne un résultat équivalent.
- Préchauffer les solutions de lavage (NaOH 0,4N-Tween 0,25%).
- Prélever le surnageant.
- Laver les puits avec 200 µl de NaOH 0,4N-Tween 0,25% pendant 5 minutes à température ambiante.
- Prélever le surnageant.
- Répéter ce lavage et placer la plaque à 50°C pendant 5 minutes.
- Prélever le surnageant.
- Laver une dernière fois les puits avec cette même solution et incuber la plaque 5 minutes à température ambiante.
- Prélever le surnageant.
- Rincer les puits avec 200 µl d'eau préchauffée à 50°C.
- Prélever le surnageant.
- Sécher la plaque en étuve à 50°C.
- Ajouter 5 ml d'Aqualuma (Lumac, Pays-Bas) à chaque prélèvement ainsi qu'aux puits.
- Mesurer la radioactivité émise grâce au compteur à scintillation (Beckman LS 1801).

Matériel.

- Plaques 96 puits COVALINK-NH NUNC.
- Tampon méthylimidazol (MEIM) 0,1 M pH 7,5 filtré stérilement et conservé à -20°C (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).
- EDC = 1-éthyl-3(-3 diméthylaminopropyl) carbodiimide (Sigma, St Louis, USA).
- NaOH (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate ou Tween 20 (Sigma, St Louis, USA).

2.14.2 Fixation du trappeur phosphaté.

- Purifier le trappeur phosphaté par Centricon-3 concentrator (Amicon, Beverly, USA).

*Mode opératoire :

- Equilibrer le filtre en ajoutant 50 µl d'eau.
- Centrifuger 1 minute sous 5000 rpm.
- Ajouter 2 ml maximum de trappeur et cenrifuger 15 minutes à 5000 rpm.
- Renverser le filtre et son contenu dans un flacon collecteur et centrifuger 5 minutes à 5000 rpm.

Les centrifugations sont réalisées par la centrifugeuse Beckman J-21B, rotor JA- 20.

- Fixer le trappeur selon le mode opératoire décrit au point 2.14.1, mais incuber les plaques multipuits durant une nuit à 50°C.

2.15. HYBRIDATION D'ADN SUR SUPPORT SOLIDE

L'hybridation est définie par l'association de 2 brins d'ADN ou d'ARN. Ce type de réaction est initié par une augmentation de la température et comprend 2 étapes. La première étape est la nucléation; elle correspond à la liaison entre de courtes séquences de bases complémentaires suite à des collisions au hasard. La deuxième étape correspond à l'appariement rapide de bases adjacentes par une réaction de type « fermeture éclair » avec formation d'une double hélice (Remacle et al. , 1994). De nombreux facteurs déterminent la vitesse d'hybridation. La détection de fragments d'ADN peut être réalisée suite à une technique d'hybridation sandwich explicitée au point 1.3.4 de l'introduction.

Matériel.

- Plaques multipuits COVALINK sur lesquelles est fixé le trappeur de 261 bp.

Protocole.

- Dénaturer la sonde, l'ADN de sperme de saumon ainsi que l'ADN cible à 100°C pendant 10 minutes.
- Placer 10 minutes sur glace.
- Laver la plaque multipuits avec 200 µl/puits NaOH 0,2N pendant 5 minutes à température ambiante afin d'assurer la dénaturation du trappeur.
- Enlever le NaOH.
- Laver sur glace en ajoutant 200 µl/puits de Buffer 1X. Incuber 5 minutes.
- Enlever le surnageant.
- Placer:
    - 70 µl solution d'hybridation
    - 10 µl sonde biotinylée dénaturée
    - 1 µl ADN sperme de saumon dénaturé
    - 20 µl ADN cible dénaturé
- Incuber durant 2 heures à 65°C après avoir recouvert d'un plastique autocollant.
- Enlever le surnageant.
- Laver 4 X avec 200 µl de Washing Buffer 0,1X/puits pendant 30 secondes à température ambiante et enlever le surnageant en renversant la plaque..
-Ajouter 100 µl/puits de conjugué.
- Incuber durant 45 minutes à température ambiante.
- Enlever le surnageant.
- Laver 5 X les puits avec 200 µl de Washing Buffer 0,1X/puits durant 30 secondes à température ambiante et enlever le surnageant en renversant la plaque.
- Ajouter 100 µl de solution de révélation (TMB).
- Protéger de la lumière et incuber durant 10 minutes à température ambiante.
- Stopper la réaction en ajoutant 100 µl de solution stop.
- Lire les résultats grâce au Bio-Rad Model 3550 Microplate Reader.

Composition des solutions.

- Solution d'hybridation : 1 fiole est utilisée pour 16 puits. Cette fiole est préalablement resuspendue dans 1,4 ml d'eau stérile (Lambdatech, Namur, Belgique). Cette solution est composée de 100 µl de SSC 20 X et de 100 µl de Denhart 50 X pour un volume final de 1 ml.
- Conjugué streptavidine Horse-Radish-Peroxydase est dilué 2000X dans le Blocking Buffer juste avant l'utilisation (Lambdatech, Namur, Belgique).
- Solution de révélation TMB : TMB dans tampon acétate-citrate 0,2 M pH 7,5 (Lambdatech, Namur, Belgique).

- Solution Stopping : 0,22 ml H_2SO_4 1,2 M (Lambdatech, Namur, Belgique).
- NaOH 0,2N provenant d'un stock de NaOH 10N fraîchement préparé (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Buffer 1X composé de :
  - 5,8 g acide maléique (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - 4,39 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)

  dans un volume final de 500 ml.
- Washing Buffer composé de :
  - 45 µl Tween 20 (Sigma, St Louis, USA)
  - 15 ml Buffer 1X

  pour 16 puits

Ce tampon est dilué 10 X avant utilisation.
- Blocking Reagent composé de :
  - 25 mg lait en poudre Gloria (S.A. Nestlé, Bruxelles, Belgique)
  - 25 ml Buffer 1X
- SSC 20 X : - NaCl 3 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Citrate de sodium 0,3 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - mis à pH 7,5 avec HCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Denhart 50 X : - 1 g de polyvinylpyrrolidone (Sigma, St Louis, USA)
  - 1 g de ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Suède)
  - 1 g de Albumin bovin fraction V (A-6793) (Sigma, St Louis, USA)

3. RESULTATS ET DISCUSSION.

Nous avons vu dans l'introduction que la meilleure méthode pour la quantification d'un ADN ou ARN en PCR est l'utilisation d'un standard interne. Comme celui-ci est à la base de cette quantification, nous avonc commencé ce travail par sa construction. Le standard interne sera prévu de manière à être amplifié par les mêmes amorces que l'ADN cible. Le standard et le cible sont de même composition sauf sur une courte séquence. Cette courte séquence est constituée du même pourcentage de G-C mais dans un ordre différent. Elle est destinée à la reconnaissance d'une sonde spécifique du standard interne lors de la détection.

3.1 CONSTRUCTION DU STANDARD INTERNE.

3.1.1. RECHERCHE DE SEQUENCES SPECIFIQUES DE L'IL 4 MURIN.

La technique de quantification de l'IL 4 murin par PCR compétitive nécessite l'utilisation de séquences spécifiques (amorces) de l'IL 4 murin. Ces amorces permettront l'amplification d'un fragment de l'IL 4 murin (325 bp) mais également la synthèse du trappeur (261 bp) à partir d'un plasmide comprenant le gène sauvage de l'IL 4 murin (pWT IL4) (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom).

Les amorces permettant l'amplification de la séquence cible de l'IL 4 murin sont :

- primer 1 : 5' GTC TCA ACC CCC AGC TAG TTG TC 3' (23 bp)
  (Suzumura et al. , 1994).
- primer 3 : 5' ATG AAT CCA GGC ATC GAA AAG C 3' (22 bp)
  (Reiner et al. , 1993).

Les amorces utilisées pour la synthèse du trappeur sont :

- primer 2 : 5' CGG ATG CGA CAA AAA TCA CTT GAG 3' (24 bp)

Ce primer 2 est situé à 40-50 bp du primer 1 car cette séquence d'une quarantaine de bases est destinée à la reconnaissance d'un sonde spécifique.

La position de ces amorces sur la standard est indiquée à la figure III. 1.

Toutes ces amorces ont été testées par le programme informatique BLAST NCBI afin de vérifier si elles sont bien spécifiques de l'IL 4 murin. Elles ont également été étudiées par le programme Oligo 4 qui permet de calculer les températures de fusion des amorces mais aussi de prédire la formation ou non de structures secondaires et de dimères d'amorces lors de leur utilisation dans une PCR.

La méthodologie suivie pour la construction est la suivante. Le standard interne a été construit à partir d'une séquence de 261 bp contenant le trappeur et d'une séquence de 64 bp contenant une séquence aléatoire de 31 bases. La séquence aléatoire est bordée par le primer 1 (23 bp) pour permettre la PCR de détection et comprend à l'autre extêmité, le site de restriction Xba I (10 bp) permettant la ligation au trappeur. La séquence aléatoire de 31 bases ainsi que le site de restriction Xba I constituent la sonde spécifique du standard interne.

La séquence contenant le trappeur comprend le primer 3 qui intervient lors de la PCR de détection, une séquence de 215 bp qui est spécifique de l'IL 4 murin et le primer 2 (24 bp) qui, avec le primer 3, permet la synthèse de cette séquence.(Fig. III. 1).

La première étape de cette construction fût la synthèse de la séquence contenant le trappeur. Celle-ci fût construite grâce à l'utilisation du primer 2 lié au site de restriction Xba I et du primer 3 lié au site de restriction Bam HI, lors d'une PCR réalisée sur le plasmide pWT IL4. Les oligos sens et antisens de la séquence de 64 bp furent commandés et hybridés, et par la suite, liés au trappeur au niveau du site de restriction Xba I. Cette construction fût alors insérée dans le plasmide pSP64 poly(A) préalablement restreint sur Eco RI et Bam HI.

3.1.2 CARACTERISATION DU PLASMIDE pSP64 POLY(A).

Etant donné que la production du standard interne sera assurée par un plasmide, il est indispensable de vérifier l'authenticité de ce plasmide. Le plasmide avec lequel nous travaillerons est le plasmide pSP64 poly(A). Nous vérifions que le plasmide obtenu suite à une extraction plasmidique opérée sur les cultures bactériennes est bien le plasmide pSP64 poly(A) grâce à une restriction.

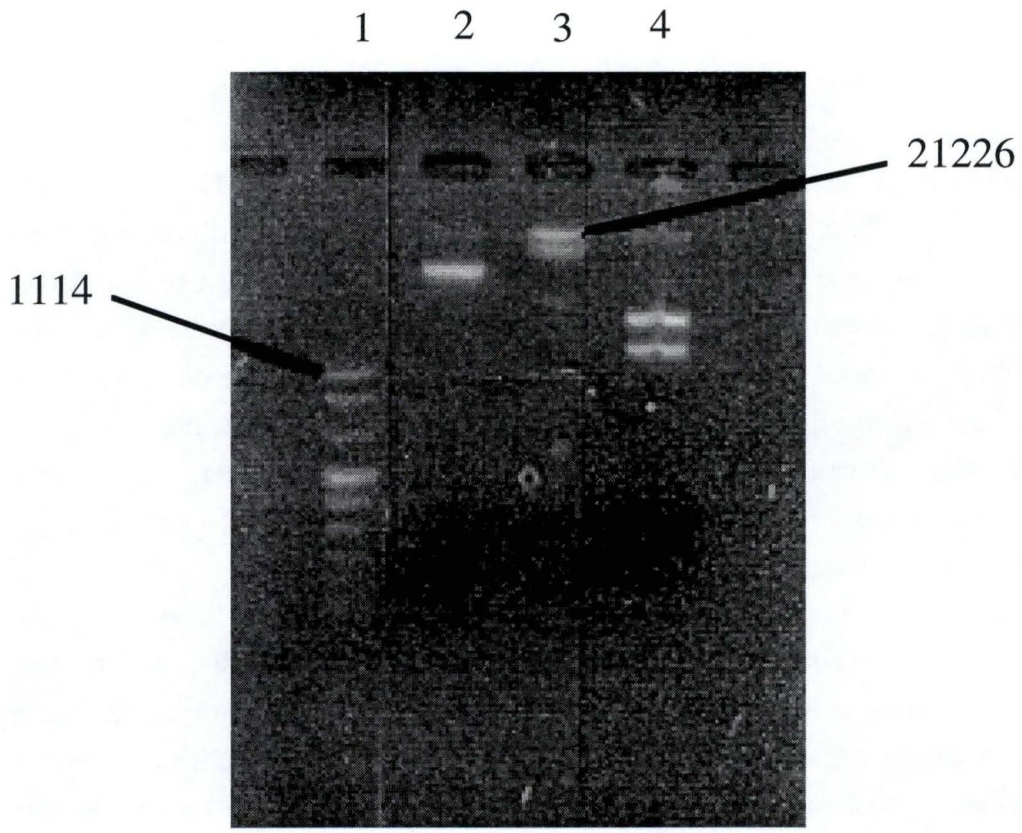


Fig. III 2. Caractérisation du plasmide pSP 64 poly(A). La piste 4 correspondant au produit de restriction par Eco R1 et Sca 1 présente 2 bandes : 1729 bp et 1304 bp. Le plasmide pSP 64 poly(A) produit est le plasmide attendu.
piste 1 : marqueur VIII
piste 2 : produit de restriction par Bam H1 et Eco R1
piste 3 : marqueur III
piste 4 : produit de restriction par Eco R1 et Sca 1

Description de l'expérience réalisée.

Afin de caractériser le plasmide, nous réalisons une restriction au niveau des sites :

- Bam HI et Eco RI
- Eco RI et Sca I

Lors de la restriction sur les sites Bam HI et Eco RI, nous devons obtenir des fragments de 2981 et 52 bp. La restriction sur les sites Eco RI et Sca I doit donner des fragments de 1729 et 1304 bp (cfr. Fig. II. 1).

Observations.

La piste 4 correspond au produit de restriction par Sca I et Eco RI, on observe 2 bandes. On remarque une seule bande au niveau de la piste 2, produit de la restriction par Eco RI et Bam HI; (on remarque également que les diverses séquences contenues dans le marqueur III ne se sont pas bien séparées) (Fig. III. 2).

Conclusions.

Les bandes présentes dans la piste 4 correspondent à 1729 bp et 1304 bp en comparaison aux bandes des marqueurs de poids moléculaire. Au niveau de la piste 2, il semble que la seule bande visible correspond à 29811 bp. La bande de 52 bp ne peut être visible sur ce type de gel.
Etant donné que les fragments obtenus suite à la restriction par Sca I et Eco RI sont les fragments attendus, on en conclut que le plasmide produit est bien le plasmide pSP64 poly(A).

3.1.3 VERIFICATION DE L'EFFICACITE DES PRIMERS 1 ET 3.

Il est important de tester la spécificité des primers 1 et 3, ainsi que la présence de l'IL 4 murin dans le plasmide commandé car ces primers sont la base du processus de détection par PCR.

Description de l'expérience réalisée.

La réaction PCR se prépare dans 2 pièces différentes afin d'éviter les contaminations. Nous préparons le mix PCR dans la pièce PCR 1.

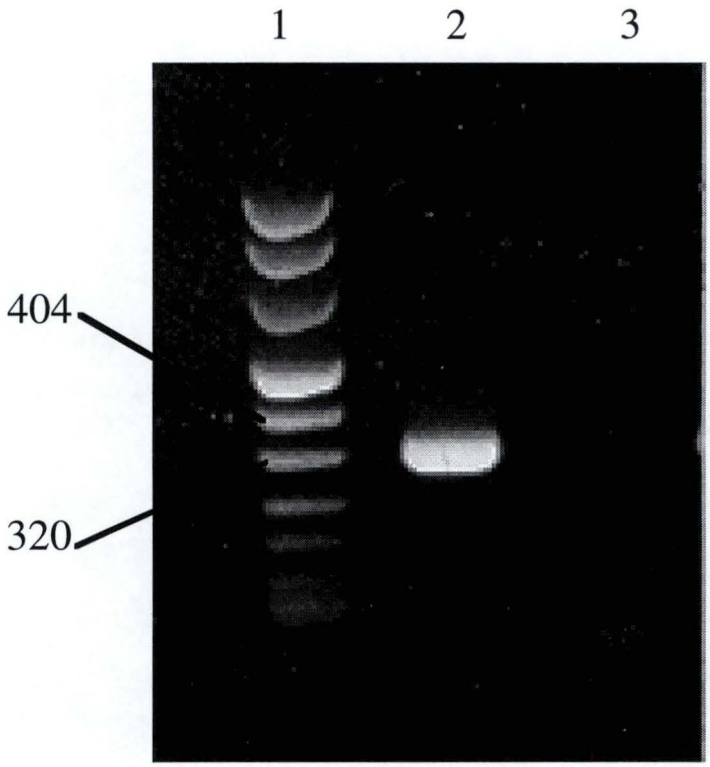


Fig. III 3. Résultat de la PCR sur le plasmide contenant l'insert de l'IL 4.
piste 1 : marqueur VIII
piste 2 : produit PCR de taille 325 bp
piste 3 : blanc PCR

Ce mix comprend le tampon de la Taq polymérase, les dNTP, les primers 1 et 3, l'eau stérile ainsi que la Taq polymérase.
L'ADN plasmidique cible correspondant à l'IL 4 murin sous une concentration de 1 ng/ 5 µl est ajouté dans la pièce PCR 2.

Observations.

Nous pouvons observer sur gel d'agarose la présence du fragment de 325 bp. La piste 3 correspond au contrôle négatif (Fig. III. 3).

Conclusions.

Les primers 1 et 3 sont spécifiques et permettent bien l'amplification d'un fragment de 325 bp. Le plasmide pUC 18 comprend donc le gène de l'IL 4 murin (pWT IL4).

3.1.4 SYNTHESE DU TRAPPEUR COMPRENANT 2 SITES DE RESTRICTION.

Le trappeur comprenant 2 sites de restriction (Xba I et Bam HI) (281 bp) est synthétisé en grande quantité par réaction PCR. Le site Xba I assurera la laison à la sonde du standard interne tandis que le site Bam HI permettra l'insertion du standard interne dans le vecteur pSP 64 poly(A).

Description de l'expérience réalisée.

La synthèse du trappeur sera possible grâce à l'utilisation du primer 2 lié au site Xba I et du primer 3 lié au site Bam HI, lors de la réaction PCR. L'ADN cible plasmidique correspond à l'IL 4 murin sous une concentration de 1 ng/ 5µl. La composition du mix PCR ainsi que le programme utilisé sont décrits au point 2.8 (premier type de réaction PCR). Le trappeur comprenant deux sites de restriction possède une taille de 281 bp.

Observations.

Nous observons dans la piste 2, correspondant aux produits PCR, une seule bande située entre 320 et 242 bp.

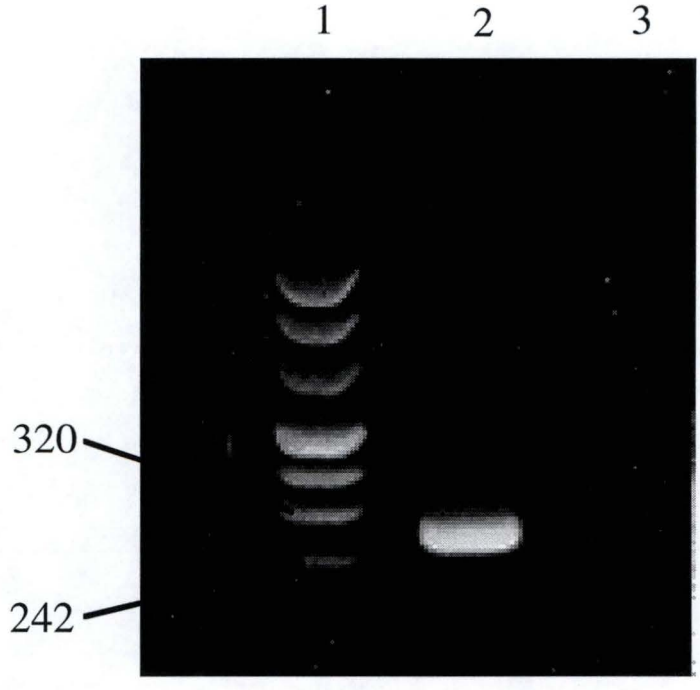


Fig. III 4. Résultat d'une PCR générant le trappeur lié à ses 2 sites de restriction.
piste 1 : marqueur VIII
piste 2 : produit PCR
piste 3 : blanc PCR

La piste 1 correspond au marqueur de poids moléculaire de type VIII. La piste 3 correspond au contrôle négatif de la réaction PCR (5 µl d'eau remplace les 5 µl d'ADN cible ajoutés en pièce PCR 2) (Fig. III. 4).

Conclusions.

Sachant que le fragment attendu est de 281 bp, on conclut que la bande visible sur le gel correspond à cette taille. Le trappeur peut donc être synthétisé en grande quantité par réaction PCR, il pourra par la suite être lié à la sonde en vue de construire le standard interne.

3.1.5 HYBRIDATION DES 2 OLIGONUCLEOTIDES FORMANT LA SONDE SPÉCIFIQUE DU STANDARD INTERNE.

Le standard interne comprend une séquence spécifique appelée sonde spécifique du standard interne. Les oligonucléotides sens et antisens de cette séquence de 64 bp ont été commandés et seront hybridés entre eux afin de permettre sa ligation au trappeur.

Description de l'expérience réalisée.

Les oligonucléotides IL 4-64 sens et IL 4-64 antisens (Eurogentec, Seraing, Belgique) sont en concentration équivalente (4,5 µg/µl) afin de réaliser leur hybridation. Ces séquences sont d'abord dénaturées durant 10 minutes à 100°C puis refroidies sur glace. Elles s'hybrident ensuite pendant 2 heures à 70°C ainsi qu'une heure à température ambiante dans la solution d'hybridation. La réaction se fait dans un volume de 100 µl en présence de 10 µl de chacun des 2 oligonucléotides et de 5 µl de SSC 20 X.
Composition du SSC :

- NaCl 3 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Citrate de sodium 0,3 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- mis à pH 7,5 avec HCl (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Observations.

Le produit d'hybridation est ensuite déposé sur gel, nous observons une seule bande de 64 bp. (Résultat non montré).

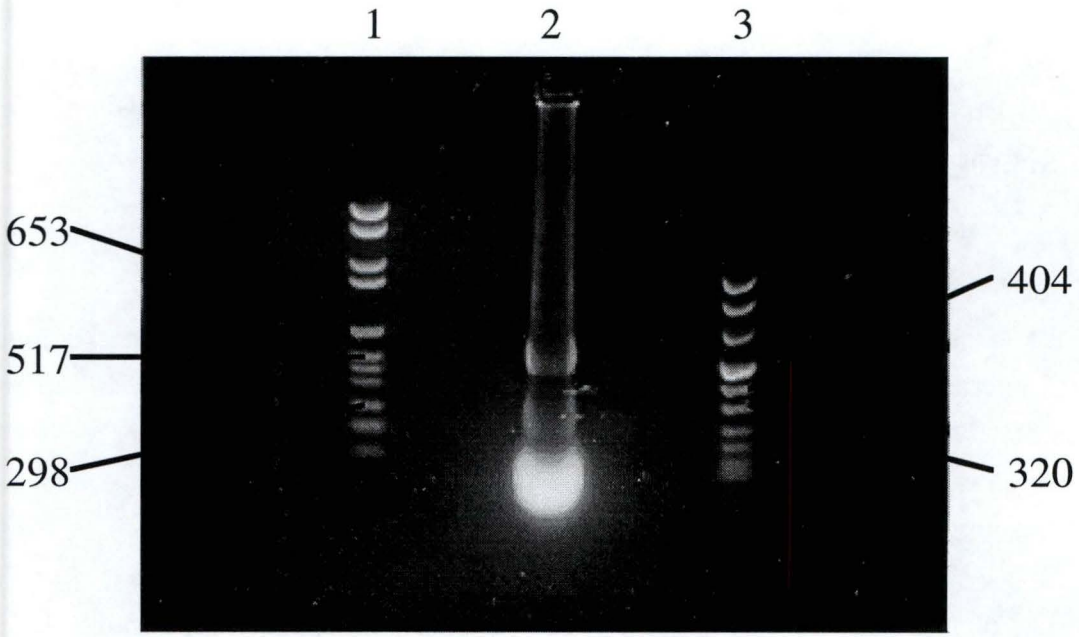


Fig. III 5. Résultats obtenus suite à la ligation de la sonde (64 bp) et du trappeur (261 bp) sur le site Xba 1.
piste 1 : marqueur VI
piste 2 : produit obtenu suite à la ligation
piste 3 : marqueur VIII

Conclusions.

La sonde commandée possède bien la taille attendue de 64 bp. Elle sera restreinte au niveau d'un site Xba I afin de permettre sa ligation au trappeur sur ce même site. Elle possède un site de restriction Eco RI sur l'extrêmité 5' afin d'assurer l'insertion du standard interne dans le pSP 64 poly(A). (cfr. Fig. III. 1).

3.1.6 LIGATION DE LA SONDE ET DU TRAPPEUR RESTREINTS PAR Xba I.

La sonde et le trappeur restreints par Xba I sont préalablement purifiés et quantifiés avant de subir une réaction de ligation. Le trappeur ainsi que la sonde sont en quantités équivalentes lors de cette réaction. Suite à cette étape de ligation, nous obtenons le standard interne composé de sa sonde spécifique et du trappeur.

Description de l'expérience réalisée.

La sonde restreinte par Xba I est purifiée par la méthode du phénol-chloroforme tandis que le trappeur également restreint est purifié grâce au kit «Wizard ». Ces 2 élèments sont quantifiés approximativement par comparaison à un marqueur de poids moléculaire de type Mass Ladder. La concentration du trappeur est estimée à 100 ng/ µl et celle de la sonde à 15 ng/ µl; ces concentrations étant trop faibles pour permettre la ligation, le trappeur et la sonde sont lyophilisés afin d'être concentrés. Ils seront ensuite resuspendus de manière à obtenir une concentration de 3 µg/ 6 µl pour le trappeur et 1 µg/ 12 µl pour la sonde.
La solution de ligation est composée de :

- 6 µl de trappeur
- 11 µl de sonde
- 2 µl de tampon de ligation
- 1 µl de T4 DNA Ligase.

Le tout est incubé dans un bain à 15 °C durant une nuit. Le produit obtenu sera mis sur gel (TAE 1 X + agarose 2%) afin de vérifier que la bande obtenue correspond à la taille du produit de ligation attendue (325 bp) (Fig. III. 5). Cette bande est extraite du gel d'agarose et purifiée par Wizard. Le produit de ligation ainsi obtenu (standard interne) a servi de modèle pour une amplification PCR utilisant les amorces 1 et 3.

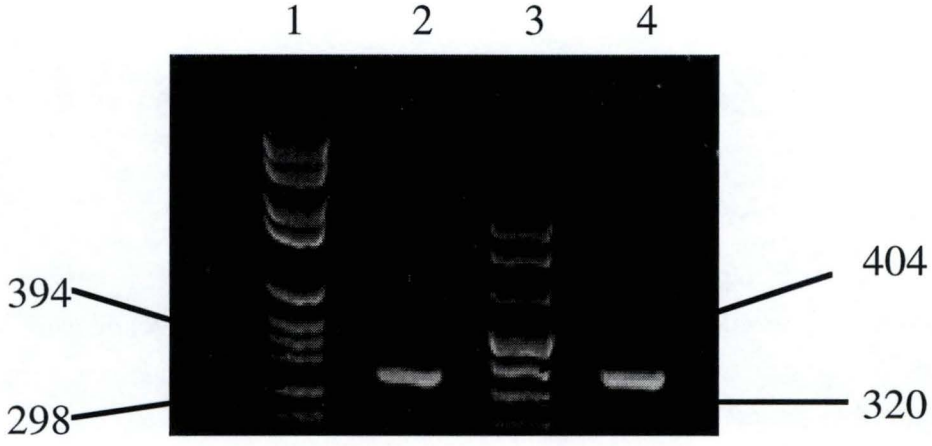


Fig. III. 6. Résultats obtenus suite à l'amplification par PCR d'une partie du produit de ligation extrait dans le gel d'agarose.
piste 1 : marqueur VI
piste 3 : marqueur VIII
pistes 2 et 4 : résultats de la PCR

Observations.

A la figure III. 5 piste 2, nous observons pour le produit de ligation, un profil de 3 bandes de taille différente. Elles correspondent respectivement à la ligation de 2 trappeurs, d'une sonde et d'un trappeur et de 2 sondes. La deuxième bande possède une taille comprise entre 394 et 320 bp correspondant donc à la ligation sonde-trappeur. Après extraction de cette bande, nous avons réalisé une PCR sur cet ADN grâce aux amorces 1 et 3.
Le produit obtenu suite à l'amplification PCR est déposé sur gel d'agarose, les pistes 2 et 4 montrent les amplicons obtenus par PCR, la bande obtenue possédant une taille comprise entre 394 et 320 bp. (Fig. III. 6).

Conclusions.

La stratégie suivie pour la construction du standard interne s'est révélée être fructueuse. Nous avons bien obtenu un fragment d'ADN de taille attendue (325 bp) que nous appelons standard interne.Celui-ci (325 bp) a été amplifié par PCR afin d'être inséré dans le plasmide pSP64 poly(A).

3.1.7 INSERTION DU STANDARD INTERNE DANS LE pSP64 POLY(A).

Le plasmide pSP 64 poly(A) et le standard interne sont restreints au niveau des sites Eco RI et Bam HI. Ces élèments sont ensuite purifiés par « Wizard » et quantifiés afin de réaliser la réaction de ligation entre le plasmide et le standard interne. Le plasmide recombinant ainsi obtenu est introduit dans les cellules (E. Coli) compétentes afin d'y être amplifié.

Description de l'expérience réalisée.

Le plasmide pSP 64 poly(A) ainsi que le standard interne sont restreints par Eco RI et Bam HI. Le plasmide restreint doit fournir des fragments de 2981 et 52 bp tandis que le standard interne ne donne qu'un seul grand fragment. La taille de ces 2 élèments est estimée par comparaison à un marqueur de poids moléculaire de type Mass Ladder.
La concentration du standard interne est de 400 ng/ 5 µl et celle du plasmide pSP64 poly(A) est de 10 ng/ 5µl (Figure III. 7). Le plasmide sera lyophilisé afin de le concentrer et permettre la ligation entre celui-ci et le standard interne.

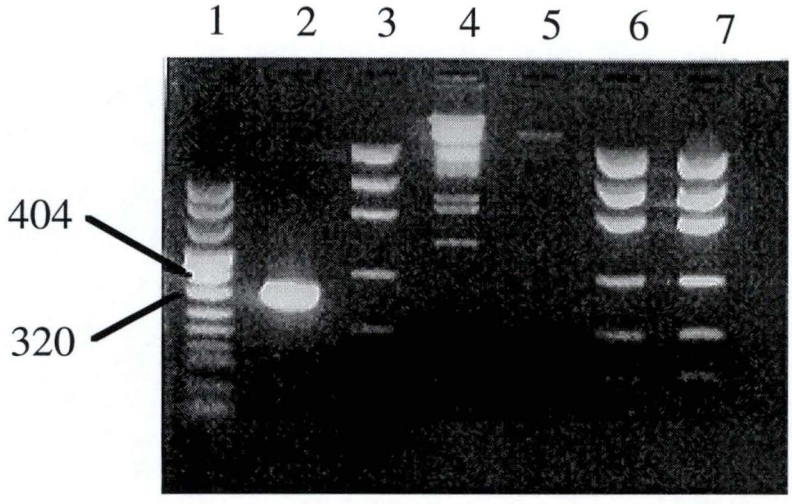


Fig. III 7. Ligation du vecteur pSP64 poly(A) et du standard interne. Les pistes 3, 6 et 7 comprennent des concentrations différentes en Mass Ladder afin de pouvoir quantifier le standard interne ainsi que le vecteur pSP64 poly(A) avant leur ligation. La concentration du standard interne est estimée à 400 ng/ 5 µl et celle du plasmide à 10 ng/ 5 µl.
piste 1 : marqueur VIII
piste 2 : produit de restriction du standard interne par Eco R1 et Bam H1
pistes 3, 6 et 7 : Mass Ladder 2, 4 et 8 µl
piste 4 : marqueur III
piste 5 : produit de restriction du plasmide pSP64 poly(A) par Eco R1 et Bam H1

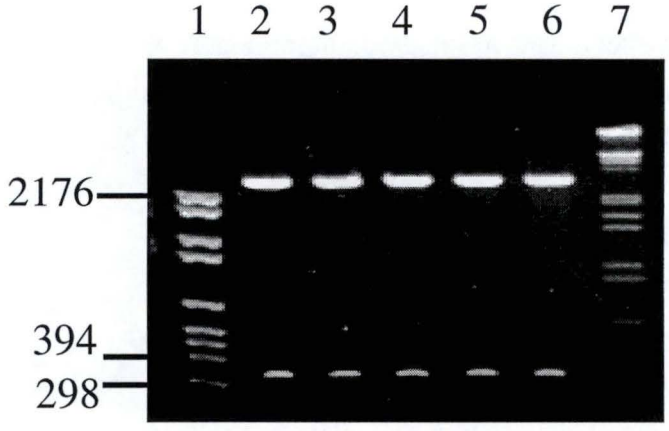


Fig. III 8. Restriction des recombinants du plasmide.
Les 5 clones étudiés contiennent un plasmide avec insert.
piste 1 : marqueur VI
pistes 2 à 6 : produit de restriction par Eco R1 et Bam H1 des 5 clones
piste 7 : marqueur III

La solution de ligation est composée de :

- 13 µl plasmide pSP64 poly(A) (80 ng/ 13 µl)
- 4 µl standard interne
- 2 µl tampon de ligation
- 1 µl T4 DNA ligase

Le tout est incubé durant une nuit à 15 °C.

La construction est alors introduite dans des cellules compétentes, étalées sur un milieu solide (LB + Agar) additionné d'ampicilline. Seules les cellules ayant intégré un plasmide résisteront à cet antibiotique car, ce plasmide comprend le gène de résistance à l'ampicilline. Ensuite, une dizaine de colonies résistantes seront propagées dans un milieu liquide LB-Amp. soit 2 ml, soit 200 ml. Les plasmides seront ensuite isolés comme décrit précédemment dans Matériel et méthodes. Ceux-ci seront restreints afin de vérifier l'intégration du standard interne.

Observations.

Sur la figure III. 7; les pistes 3, 6 et 7 correspondent respectivement à 2, 4 et 8 µl de Mass Ladder. La piste 2 est le produit de restriction du standard interne de départ par Eco RI et Bam HI, une seule bande (325 bp) y est visible tandis que la piste 5 présente une bande d'une taille égale à 2981 bp; cette bande correspond au produit de restriction par Eco RI et Bam HI du plasmide pSP64 poly(A).
La figure III. 8 nous montre le profil de migration des plasmides recombinants obtenus et restreints par Eco RI et Bam HI. Dans chaque piste, on distingue 2 bandes; l'une à 2981 bp et l'autre à 325 bp.

Conclusions.

Pour les 5 clones testés, le plasmide pSP64 poly(A) a donc bien intégré le standard interne. Il nous faut maintenant le séquencer afin de vérifier sa séquence.

3.1.8 REACTION DE SEQUENCAGE.

La séquence du standard interne est donc intégrée dans le plasmide pSP64 poly(A). Afin de commander la sonde spécifique de 41 bp de ce standard, il est nécessaire de vérifier sa séquence par séquençage. Si celui-ci correspond, nous pourrons dés lors commander la sonde.
La séquence de la sonde est : 5' GCT CTA GAG CAT AGC TGT AGC ATC TGA ACC TGG AAG TCT AT 3'

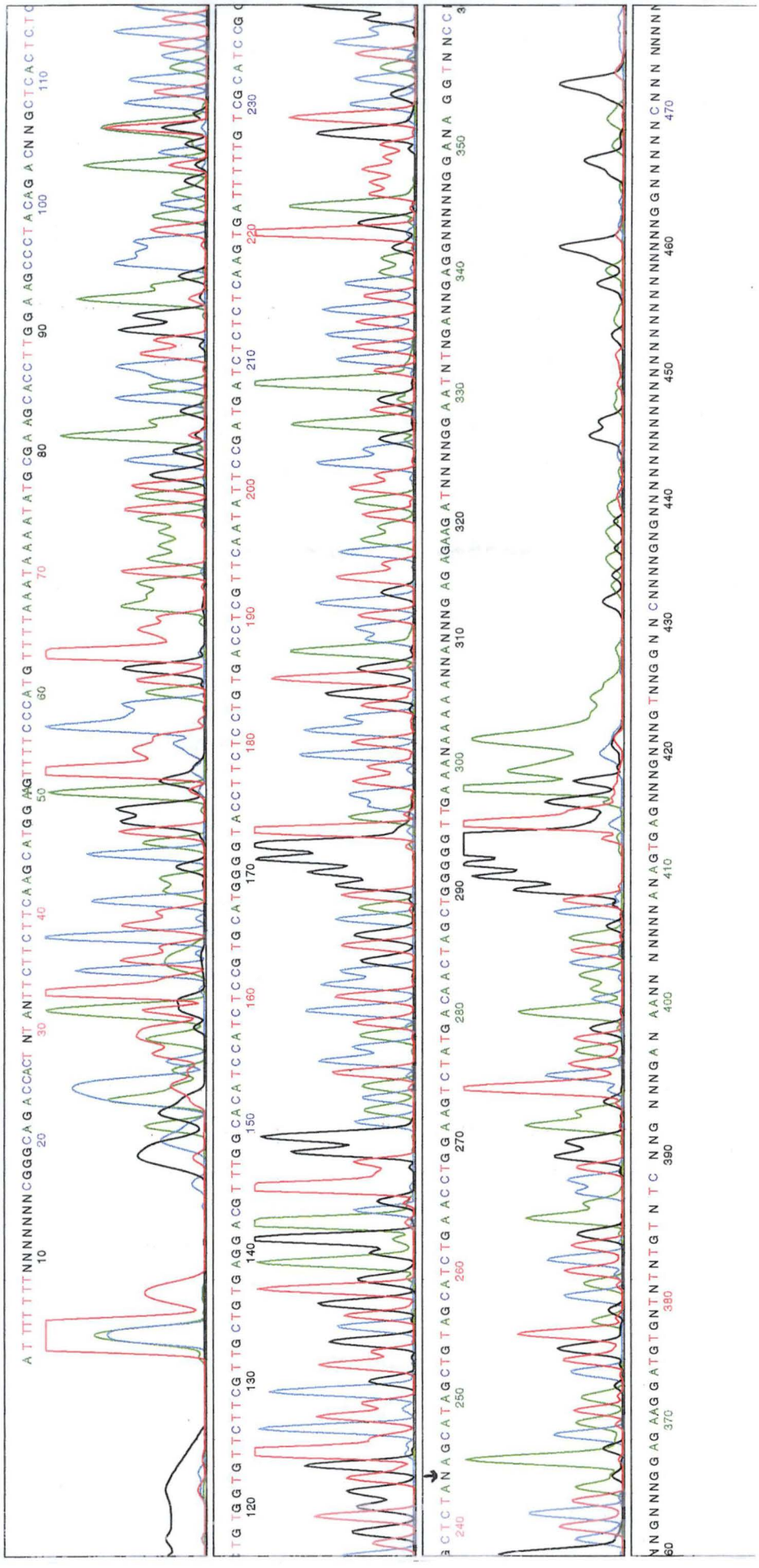


Fig. III 9. Résultats obtenus suite à la réaction de séquençage. Seule la 7ème base à partir de l'extrêmité 5' (N fléché) ne fût pas déterminée.

Description de l'expérience réalisée.

Le fragment à séquencer subit une PCR en présence d'une seule amorce située en amont de ce fragment. Dans notre cas, cette amorce correspond au primer 1 sens situé en amont de la sonde à séquencer. Il est également possible d'utiliser l'amorce 3 antisens pour confirmer les résultats obtenus lors du premier séquençage. Le séquençage a été réalisé suivant le protocole décrit au point 2. 13 de Matériel et méthodes.

Observations.

Les résultats obtenus confirment la composition de la sonde spécifique du standard interne. La 7 ième base à partir de l'extrêmité 5' de la sonde du standard ne fût pas déterminée par la réaction de séquençage (Fig. III. 9).

Conclusions.

La séquence nucléotidique de la sonde du standard interne vérifiée par séquençage, nous pouvons dés lors la commander. Lors des hybridations, cette sonde devrait se fixer parfaitement et de manière spécifique sur le standard interne sans réaction croisée avec le cible IL 4 murin.
Le standard interne construit sera alors quantifié et estimé en nombre de copies. Il sera alors possible de réaliser des PCR compétitives et des hybridations d'une concentration fixe de standard interne pour une concentration croissante en cible IL 4 murin. Le plasmide pWT IL4 a également été amplifié.

3.2 FIXATION DU TRAPPEUR.

L'hybridation suivie de la détection en colorimétrie est possible si une séquence anti-complémentaire du cible IL 4 murin et du standard interne est fixée dans les puits d'hybridation. Cette séquence est constituée de l'amorce 2, d'une séquence de 215 bp et de l'amorce 3 phosphorylée en 5' afin de pouvoir la fixer sur les puits de polystyrène; c'est le trappeur (Fig. III. 1).

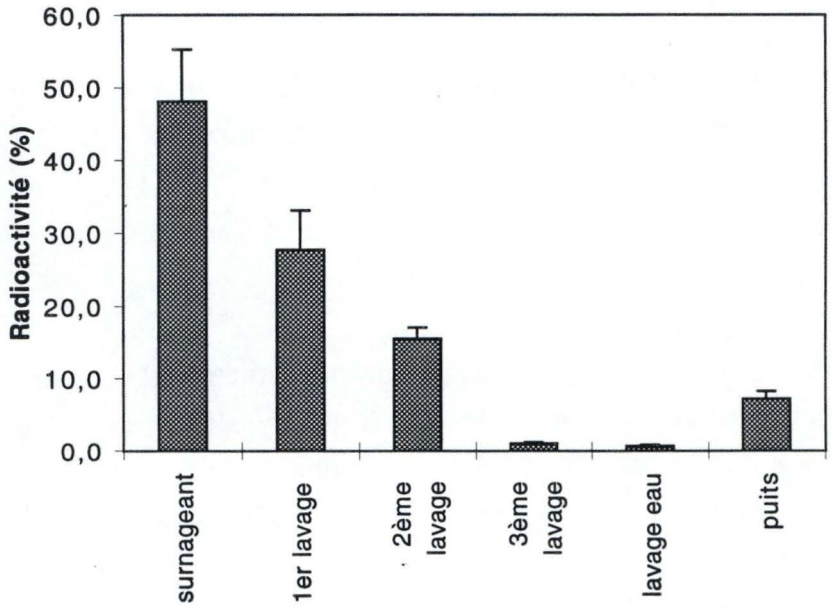


Fig. III 10. Fixation du trappeur en radioactivité. Seuls 7,2 % de la quantité de départ de trappeur s'est fixée dans le fond des puits.

3.2.1 FIXATION DU TRAPPEUR EN RADIOACTIVITE.

Ce dosage est nécessaire afin de pouvoir estimer le pourcentage de trappeur fixé dans les puits. Le mélange réactionnel comprend de l' ATP radioactif marqué au phosphore 32 qui se place au niveau de l'extrêmité phosphorylée du trappeur.

Description de l'expérience réalisée.

Le trappeur est marqué au ^{32} P par une polynucléotide kinase transférant un groupement phosphate marqué à l'extrêmité 5' de la séquence nucléotidique. Le trappeur (2,5 pmoles) ainsi marqué est ensuite fixé par son extrêmité 5' au niveau du polystyrène de manière covalente (cfr. Point 2.14). Toutes les solutions de lavage des puits sont prélevées et placées dans des fioles de comptage. La radioactivité émise par chacune d'elles est mesurée grâce au compteur à scintillation. Ainsi, en fonction de la radioactivité totale et de la radioactivité présente dans les puits, il est possible de déterminer le pourcentage de fixation du trappeur.

Observations.

D'après les résultats obtenus, nous déduisons que, à partir de 2,5 pmoles de trappeur, seuls 7,2 % se fixent dans le fond des puits, ce qui correspond à 180 fmoles (Fig. III 10).

Conclusions.

La fixation du trappeur marqué nous a permis d'estimer la quantité de trappeur se fixant dans les puits. Celle-ci est faible mais représente encore 0,18 pmoles de trappeur par puits. Nous pouvons à présent fixer le trappeur de manière non radioactive afin de pouvoir réaliser les hybridations par la suite.

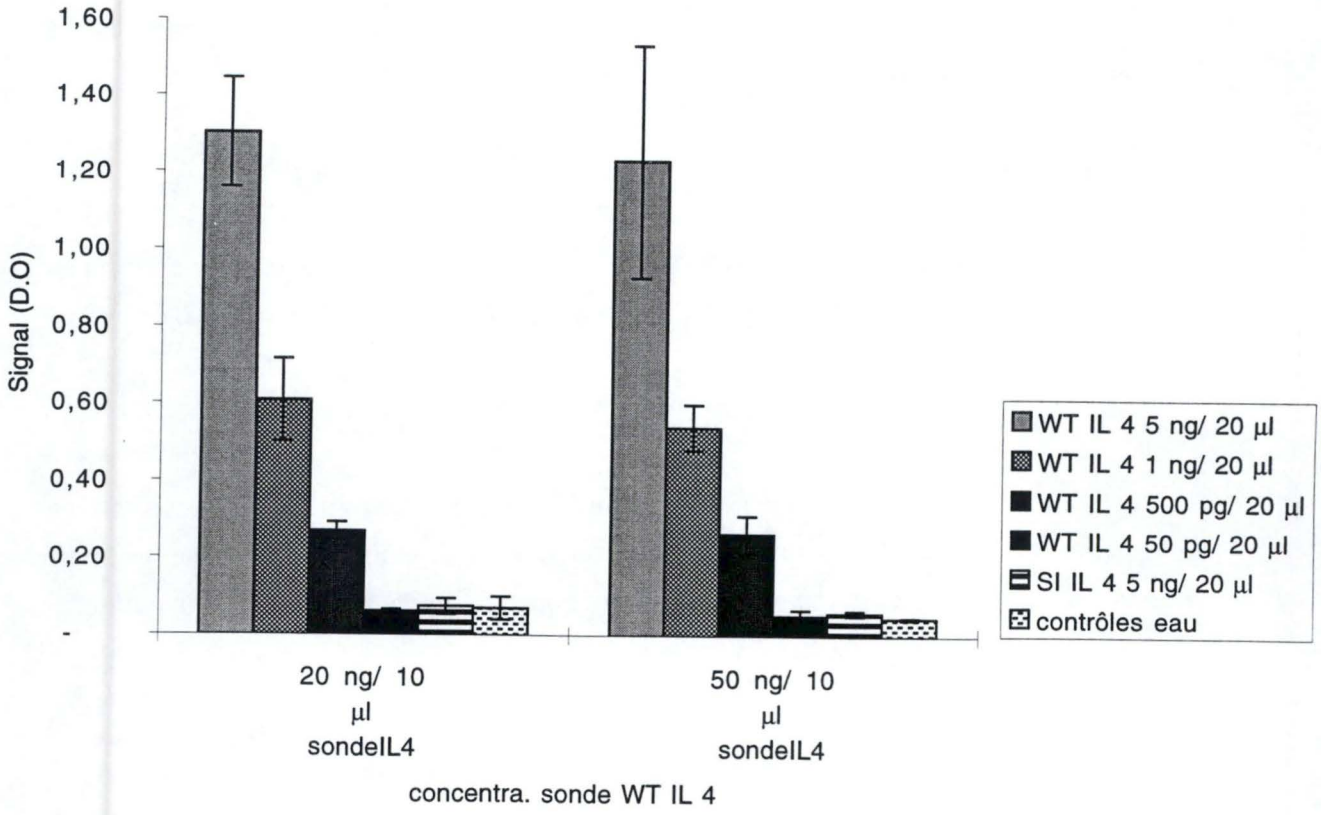


Fig. III 11. Comparaison de l'efficacité d'hybridation sous différentes concentrations en sondes. Ces hybridations sous concentrations différentes en sonde furent testées sur des produits venant d'une PCR réalisée sur différentes concentrations en plasmide contenant le gène de l'IL 4 murin (WT IL 4), mais également sur le plasmide pSP64 poly(A) contenant le standard interne (SI IL4) sous une concentration de 5 ng/ 20 µl.

3.3 OPTIMALISATION DE L'HYBRIDATION.

La détection de l'IL 4 murin sera réalisée grâce à une technique d'hybridation sandwich. Lors de cette étape, nous utiliserons 2 types de sondes : l'une spécifique de l'IL 4 murin cible, l'autre spécifique du standard interne.

De nombreux facteurs peuvent influencer la réaction d'hybridation; nous pouvons citer la température d'hybridation, la concentration en sels dans la solution d'hybridation mais également dans les solutions de lavage et la durée d'hybridation.

3.3.1 SPECIFICITE DE LA SONDE DE L'IL 4 MURIN.

Il est important de tester la spécificité de la sonde de l'IL 4 murin afin de vérifier si elle se fixe uniquement sur l'IL 4 et non de manière aspécifique sur le standard interne. Il est également intéressant de tester l'hybridation sous des concentrations différentes en sonde afin d'éviter une diminution de l'efficacité d'hybridation suite à une concentration en sonde limitante.

Description de l'expérience réalisée.

Nous testons 2 concentrations différentes en sonde : 20 ng/ 10 µl et 50 ng/ 10 µl. Ce test est réalisé en triple : 3 strips possèdent une concentration en sonde égale à 20 ng/ 10 µl tandis que les 3 suivants ont une concentration en sonde égale à 50 ng/ 10 µl. Chaque strip comprend des concentrations différentes en amplicons d' IL 4 murin cible et en standard interne allant de 5 ng à 0.

Observations.

Comme le montre la figure III. 11, la sonde IL 4 murin est bien spécifique de l'IL 4 murin et ne se fixe pas de manière aspécifique sur le standard interne. Nous remarquons également qu'une concentration en sonde plus élevée ne provoque pas une efficacité d'hybridation plus importante. Cette observation est sans doute dûe au fait que les sondes sont en large excès par rapport à la quantité de sondes qui s'hybrident sur le trappeur. On peut également remarquer que plus la quantité d'IL 4 augmente dans les puits et plus le signal de

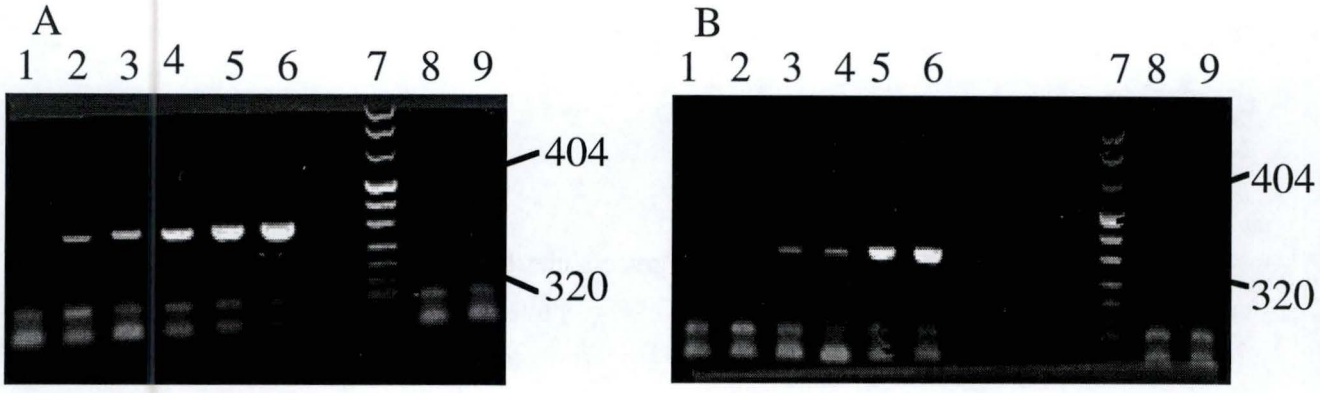


Fig. III 12. Vérification sur gel des produits venant d'une PCR réalisée sur des concentrations croissantes soit A) pSI IL 4 soit B) pWT IL 4
piste 1 : 10 copies au départ
piste 2 : 100
piste 3 : 1000
piste 4 : 10000
piste 5 : 100000
piste 6 : 1000000
piste 7 : marqueur VIII
piste 8 : blanc pièce PCR 1
piste 9 : blanc pièce PCR 2

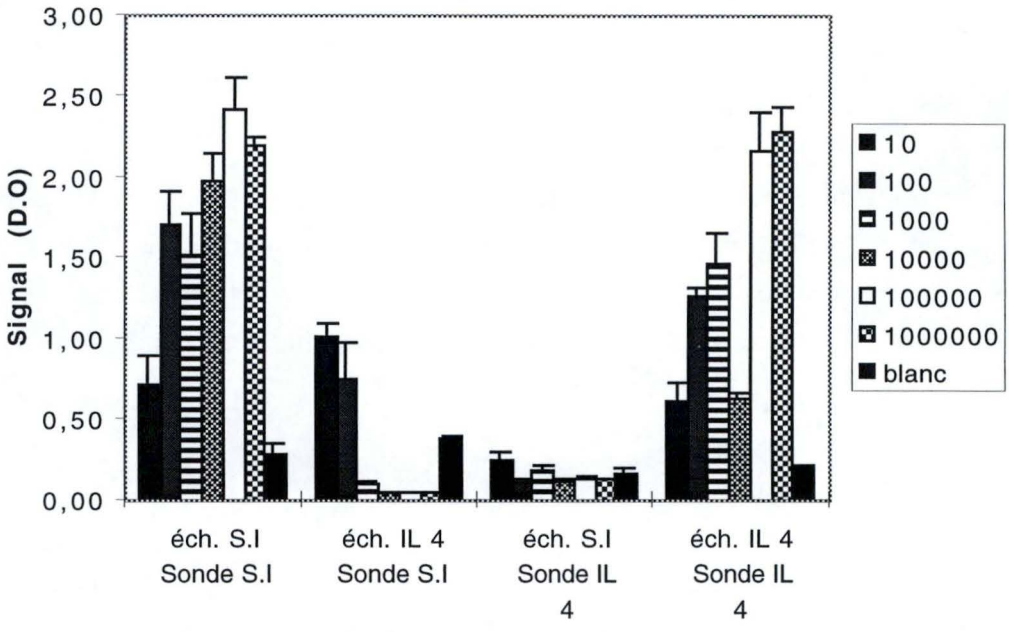


Fig. III 13. Résultats obtenus suite à l'hybridation de la sonde spécifique du standard interne et de la sonde du cible IL 4 sur des produits venant de PCRs réalisées sur les plasmides pWT IL4et pSI IL4 allant de 10 à 1000000 copies au départ.

détection est grand. La concentration de 50 pg par test donne un signal qui est semblable aux contrôles et représente donc une limite inférieure qu'on ne parvient plus à détecter.

Conclusions.

La sonde IL 4 murin s'hybride de manière spécifique dans les conditions d'hybridation utilisées. Etant donné qu'une faible concentration en sonde donne les mêmes résultats qu'une concentration plus élevée, nous travaillerons par la suite avec une concentration en sonde égale à 20 ng/ 10 µl.

3.3.2 SPECIFICITE DE LA SONDE DU STANDARD INTERNE.

Après avoir étudié l'hybridation de la sonde de l'IL 4 murin, nous allons étudier la spécificité de la sonde du standard interne. Dans cette expérience, les résultats sont exprimés en fonction du nombre de copies en cible et en standard interne variant de 10 à 1000000 avant amplification par PCR.

Description de l'expérience réalisée.

Un nombre croissant de copies de plasmides de standard interne et d' IL 4 murin sont préalablement amplifiés par une réaction PCR (34 cycles cfr 2. 8) (Fig. III. 12). La réaction d'hybridation est alors réalisée dans les conditions décrites au point 2.15; la concentration des 2 sondes étant de 20 ng/ 10 µl.

Observations.

Si nous comparons les résultats obtenus suite à la détection par hybridation (Fig. III. 13) aux résultats visibles sur gel d'agarose après amplification; nous montrons clairement que la détection par hybridation sandwich est plus sensible et précise que la détection obtenue suite à la migration sur gel d'agarose. En effet, il est possible d'obtenir un signal détectable jusque 10 copies par la détection par hybridation, que ce soit pour le cible ou pour le standard interne. Sur le gel d'agarose, il est impossible de détecter 10 copies de standard interne ni 10 ou 100 copies d'IL 4 murin. Nous pouvons également constater que les valeurs obtenues pour les contrôles négatifs de la PCR sont trop élevés; ceci pourrait être dû à un problème de contamination lors de la préparation du mix PCR. Notons aussi que ces contaminations ne sont pas visibles sur le gel d'agarose.

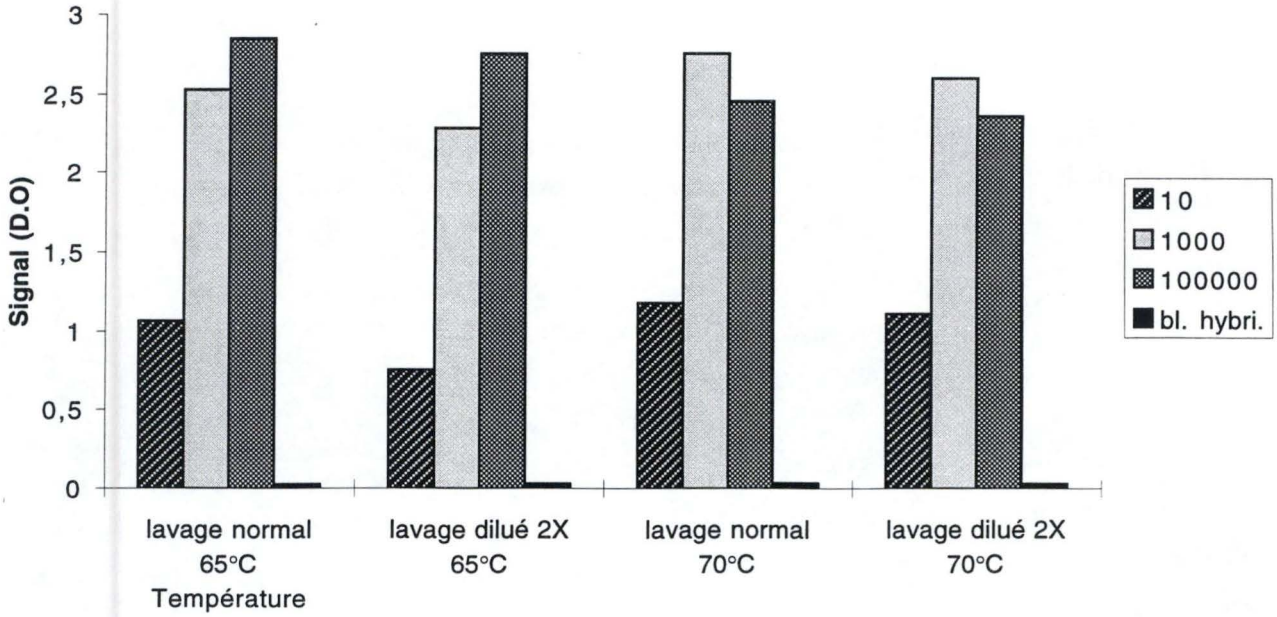


Fig. III 14. Influence de la température d'hybridation et de la concentration en sels des solutions de lavage. Il s'agit d'une hybridation de la sonde du standard interne sur des produits provenant d'une PCR réalisée sur le plasmide pSI IL 4 allant de 10 à 100000 copies au départ.

Nous remarquons que la sonde du standard interne se fixe aussi dans les puits contenant l'IL 4 en faible quantité. Ceci pourrait être dû à un problème de contamination lors de la préparation du Mix PCR.

Nous avons également envisagé un problème de reconnaissance de cette sonde vis-à-vis du cible IL 4 mais, une telle hybridation serait dite croisée et la sonde de l'IL 4 s'hybriderait alors sur le standard interne. Il a été démontré au point 3.3.1 que cette sonde était bien spécifique de l'IL 4. De plus cette fixation est moins forte ou quasi nulle aux fortes concentrations en ADN cible.

Le signal émis atteint un plateau pour le nombre élevé de copies que ce soit pour le standard interne ou l'IL 4 murin. Lorsque tous les trappeurs fixés dans les puits sont hybridés à ces brins, il est inutile d'ajouter un excès de brins d'ADN car, ne pouvant s'hybrider au trappeur, ils se réhybrident entre eux et sont éliminés lors des lavages.

Il existe un effet "plateau"de la PCR lorsque l'on réalise la PCR avec de grands nombres de copies au départ.

Le graphe III. 13 nous montre qu'il existe un problème au niveau du signal émis par 1000 copies de standard interne et 10000 copies d'IL 4; ceci est sans doute dû à un "non-démarrage" de la réaction PCR dans ces tubes.

Conclusions.

La spécificité des sondes de l'IL 4 murin et du standard interne est donc confirmée, Nous étudierons à présent les différents paramètres influençant l'efficacité d'hybridation afin d'en améliorer le rendement et de diminuer les fixations non spécifiques.

3.3.3 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA CONCENTRATION EN SELS DES SOLUTIONS DE LAVAGE.

La stringence est définie par un ensemble des facteurs intervenant au moment de l'hybridation et favorisant ou non l'association des 2 chaînes d'ADN. Une stringence élevée correspond à des conditions défavorables pour l'hybridation mais elle permet une plus grande spécificité. Une diminution de la concentration en sels permet également une augmentation de la stringence. La température est un facteur intéressant lorsque l'on désire diminuer des fixations aspécifiques. En effet, une température relativement élevée empêche la formation des ponts hydrogènes et diminue donc la vitesse de réassociation.

Description de l'expérience réalisée.

Chaque puits reçoit la solution d'hybridation, l'ADN de sperme de saumon, la sonde spécifique du standard interne ainsi que les amplicons IL 4 murin en quantité croissante. Ces puits seront incubés durant 2 heures à 65°C ou à 70°C. Après incubation, ces puits seront lavés en présence de soit la solution de lavage en concentration normale (90 µl Tween 20 + 30 ml B1, le tout dilué 10 X) soit cette même solution diluée 2 X.

Observations.

Au vu de la figure III. 14, nous remarquons qu'un changement de température n'altère pas l'efficacité d'hybridation.
En ce qui concerne la concentration des solutions de lavage, nous observons une légère diminution du signal lorsque ces solutions sont diluées. Cette diminution de concentration en sels provoque apparemment un détachement des brins hybridés.

Conclusions.

Nous travaillerons donc, par la suite, à une température de 65°C et avec des solutions de lavage non diluées. Une température de 70°C et la dilution de la solution de lavage n'améliorent en rien l'hybridation.

3.3.4 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELS DE LA SOLUTION D'HYBRIDATION.

La solution d'hybridation est composée de SSC 2 X, de Denhart 5 X, d'eau distillée et d'ADN de sperme de saumon. Nous allons étudier l'influence de cette solution en réalisant des hybridations sous concentrations différentes en solution d'hybridation.

Description de l'expérience réalisée.

Nous avons testé 4 concentrations différentes en solution d'hybridation: concentration 1 X (SSC 2X, Denhart 5X, eau distillée et ADN de sperme de saumon); solution diluée 2X, 4X et 8X. Chacune de ces hybridations est réalisée à 65°C et durant 2 heures.

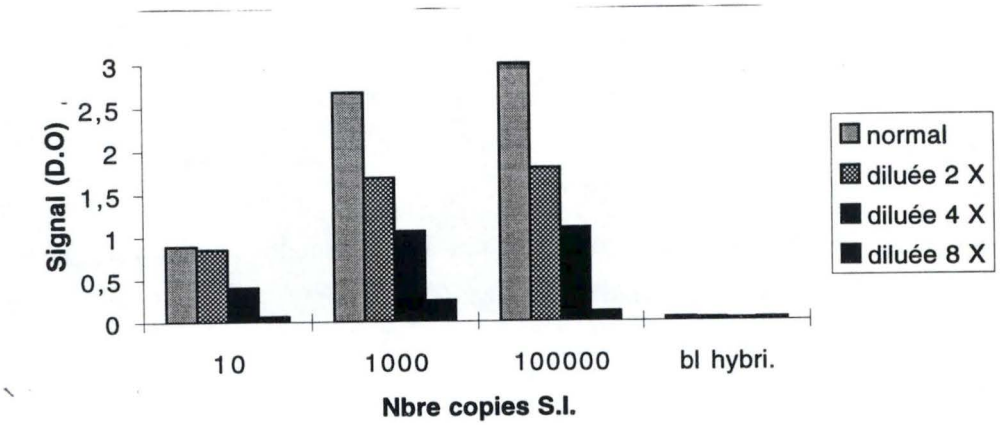


Fig. III 15. Influence de la concentration en sels de la solution d'hybridation lors d'une hybridation de la sonde spécifique de standard interne sur des produits issus d'une PCR réalisée sur le plasmide pSI IL 4 allant de 10 à 100000 copies avant réaction PCR.

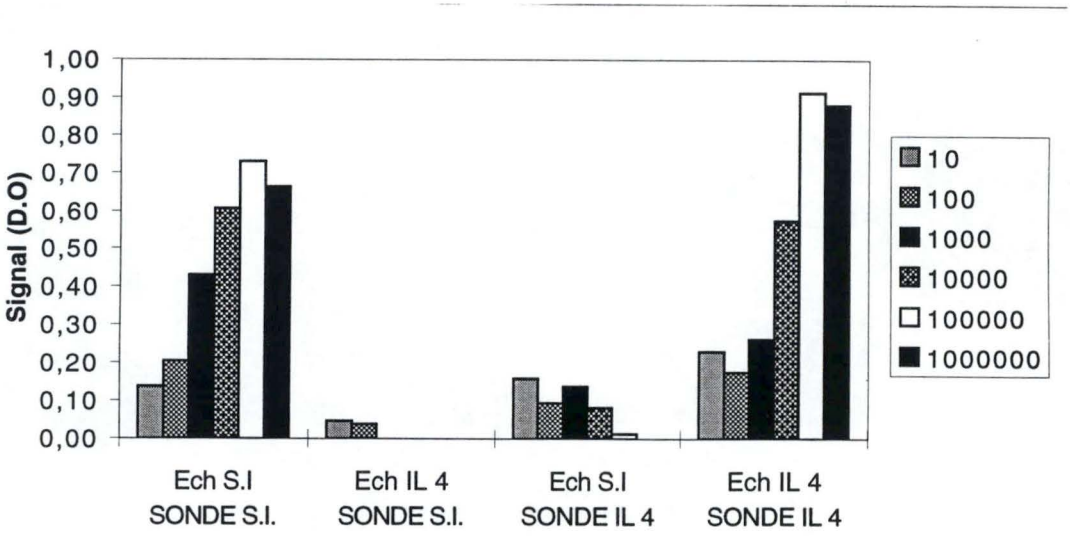


Fig. III 16. Résultats obtenus suite à l'hybridation de la sonde spécifique du standard interne et de la sonde spécifique du cible sur des produits obtenus suite à 1 PCR réalisée sur les plasmides pSI IL 4 et pWT IL 4 allant de 10 à 1000000 copies avant réaction PCR. Cette PCR fût réalisée à partir d'une nouvelle production de plasmide pSI IL 4.

Observations.

Nous pouvons observer que des dilutions de plus en plus importantes de la solution d'hybridation diminuent nettement l'efficacité d'hybridation (Fig. III. 15).

Conclusions.

Cette solution d'hybridation ne sera pas diluée par la suite afin de maintenir des signaux relativement élevés.

3.4. INFLUENCE DE LA CONTAMINATION.

3.4.1 UTILISATION D'UN NOUVEAU PLASMIDE.

Sachant que la sonde spécifique du standard interne se fixe sur les échantillons d'IL 4 en faible nombre de copies, il est possible que le plasmide pWT IL4 (commandé chez R&D System) soit contaminé par le plasmide pSI IL4. L'expérience suivante sera réalisée en utilisant une nouvelle préparation du plasmide pWT IL4 (cfr. point 2.5).

Description de l'expérience réalisée.

Après avoir quantifié ce nouveau plasmide, nous le diluons afin d'obtenir des quantités croissantes de 10 à 1000000 copies de ce plasmide. Il subit alors une réction PCR tout comme le plasmide pSI IL4. Nous réalisons alors une hybridation dans les conditions décrites au point 2. 15.

Observations.

Si nous comparons les résultats obtenus aux résultats de la figure III. 13, nous pouvons remarquer sur la figure III. 16 que le signal obtenu suite à l'hybridation de la sonde du standard interne sur le standard augmente en fonction du nombre croissant de copies de standard interne jusqu'à la phase plateau. De plus, les problèmes de reconnaissance de la sonde du standard vis-

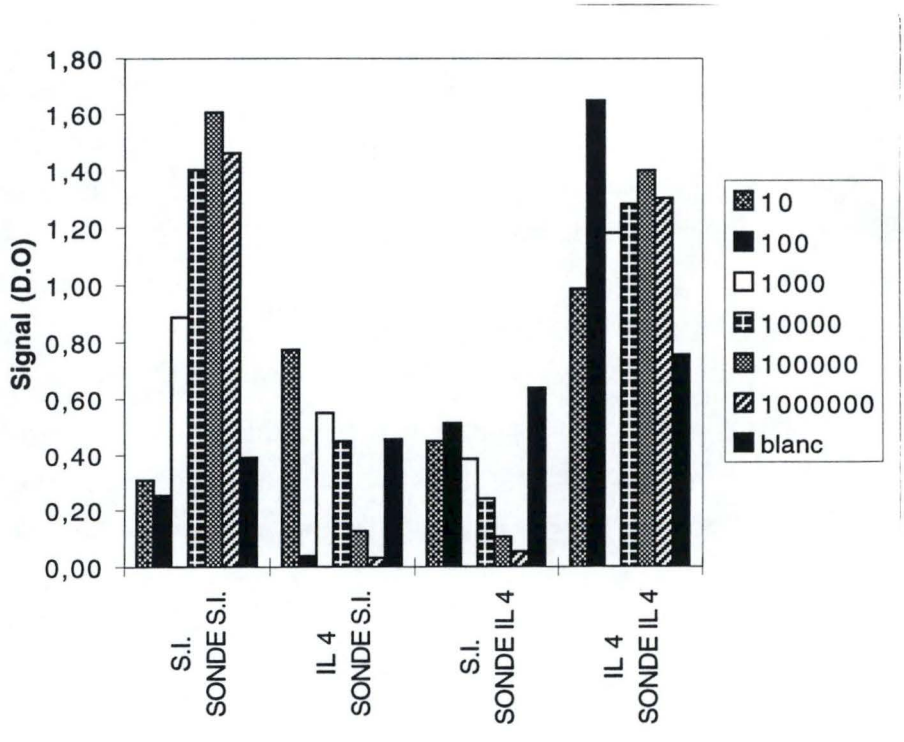


Fig. III 17. Résultats obtenus suite à l'hybridation de la sonde spécifique du standard interne et de la sonde spécifique du cible sur des produits obtenus suite à 1 PCR réalisée sur des plasmides pSI IL 4 et pWT IL 4 allant de 10 à 1000000 copies avant PCR. Cette PCR fût réalisée à partir d'un nouveau set d'amorces 1 et 3.

à-vis du cible sont atténués mais ce même problème apparaît au niveau de la sonde IL 4 qui reconnaît à présent le standard interne. Nous pouvons également constater un signal trop important au niveau de l'hybridation de la sonde du cible sur l'IL 4 en nombre de 10 copies avant amplification.

Conclusions.

Les signaux obtenus suite aux hybridations respectives de la sonde du cible sur l'IL 4 et de la sonde du standard sur le standard interne sont relativement élevés; les conditions d'hybridation paraissent adéquates.
Mais, il subsiste toujours un problème de reconnaissance aspécifique et, cette fois, de la sonde du cible vis-à-vis du standard interne, il semble que ce soit toujours dû à un problème de contamination. Il est donc essentiel d'essayer d'éliminer cette contamination PCR.

3.4.2 UTILISATION DE NOUVELLES AMORCES.

Les amorces 1 et 3, utilisées pour l'amplification par PCR du standard interne et du cible IL 4 murin, sont susceptibles de contamination lors de leur resuspension. Nous allons donc utiliser de nouvelles amorces lors de cette expérience.

Description de l'expérience réalisée.

De nouvelles amorces (1 et 3) furent utilisées lors de cette expérience. De plus, nous avons réalisé le Mix PCR dans un autre laboratoire en utilisant un autre matériel afin d'éviter toute contamination PCR. L'amplification par PCR fût réalisée en double ainsi que l'hybridation.

Observations.

La figure III. 17 nous montre qu'il existe toujours un problème de contamination relativement important si nous considérons les signaux obtenus par les blancs PCR. Nous pouvons également remarquer une évolution abérrante des signaux au niveau de l'hybridation de la sonde cible sur l'IL 4. Les signaux correspondant à l'hybridation de la sonde du standard interne sur le standard sont plus représentatifs des résultats à obtenir.

Conclusions.

Les problèmes de contamination semblent s'être agravés dans cette expérience malgré la préparation de la réaction PCR dans un autre environnement. Nous ne pouvons rien conclure vis-à-vis des résultats obtenus lorsque l'hybridation est réalisée entre la sonde du cible sur le standard ou lors de la fixation de la sonde du standard interne sur l'IL 4 suite à la contamination élevée des blancs PCR.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Nous avons tenté, lors de ce travail, de réaliser la mise au point d'une technique de quantification de l'ARN m de l'interleukine 4 murin. Cette quantification est basée sur une PCR compétitive suivie d'une hybridation en colorimétrie, ce processus fût élaboré au laboratoire de biochimie et biologie cellulaire.

Cette technique nécessite la construction d'un standard interne qui sera amplifié par les mêmes amorces que le cible IL 4 murin. Après avoir effectué la recherche d'amorces spécifiques de l'IL 4, nous avons construit le standard interne et ceci, en plusieurs étapes. Nous avons préalablement synthétisé le trappeur (261 bp) grâce à une PCR réalisée sur le plasmide pUC 18 contenant le gène sauvage de l'IL 4 murin. Ce trappeur doit posséder à ses extrêmités les sites de restriction Xba 1 et Bam H1 afin de permettre respectivement la ligation à la sonde spécifique du standard interne et l'insertion du standard interne dans le plasmide pSP 64 poly(A) vecteur.
La sonde spécifique du standard interne (64 bp) fût commandée telle quelle et après hybridation de ses 2 brins anti-comlémentaires, elle fût liée au trappeur grâce au site de restriction Xba 1. Le standard interne fût alors inséré dans le plasmide. La construction du standard interne fût relativement rapide et ne présenta aucun problème.

Lors de la seconde partie du travail, nous avons préalablement testé plusieurs paramètres de la réaction d'hybridation tels que la température d'hybridation et la concentration en sels des solutions de lavage ainsi que des solutions d'hybridation. Nous avons alors démontré qu'une température de 65°C était une température optimale pour l'hybridation et qu'une augmentation de cette température n'améliorait pas l'efficacité de l'hybridation. Nous avons également conclu qu'une concentration en sels plus faible à l'intérieur des solutions de lavage provoquait un détachement important des brins déjà hybridés; ceci diminue l'aspécificité d'une sonde vis-à-vis d'un brin d'ADN mais diminue également les signaux mesurés. Nous avons pu remarquer le même effet lors d'une dilution de plus en plus importante de la solution d'hybridation. Dans ce cas, la diminution de concentration en sels provoque une augmentation de la stringence et donc des conditions défavorables pour l'hybridation. Nous avons donc réalisé les hybridations sous les concentrations préalablement établies au laboratoire.

La spécificité de la sonde du cible IL 4 fût démontrée rapidement, mais, en ce qui concerne la sonde du standard interne, nous n'avons pas pu mettre en évidence sa spécificité suite aux nombreux problèmes de contamination rencontrés. En effet, les signaux émis par les blancs PCR sont trop élevés et le demeurent malgré l'utilisation d'un nouveau plasmide pSP 64 poly(A) contenant le standard interne, de nouvelles amorces ainsi qu'un matériel n'ayant eu aucun contact préalable avec l'IL 4 ou le standard interne.

A l'heure actuelle, ces problèmes de contamination persistent toujours. Afin de vérifier si le plasmide contenant l'IL 4 sauvage est contaminé par le plasmide pSP 64 contenant le standard interne, on pourra réaliser une restriction sur les produits obtenus après amplification par PCR. Cette restriction sera réalisée au niveau du site Xba 1 présent uniquement dans le standard interne. Une contamination du cible par le standard interne indiquerait 3 bandes sur gel au lieu d'une seule.

Lorsque l'origine de la contamination sera déterminée, il faudra terminer le travail. Les prochaines étapes du dosage sont l'optimalisation de la PCR compétitive du standard interne et du cible IL 4 murin et, par la suite, la réalisation d'une RT-PCR afin de quantifier l'ARNm de l'IL 4 murin et non plus l'ADN.

5. BIBLIOGRAPHIE

- Alms W. J. , Atamas S. P. , Yurovsky V. V. and White B. (1996) " Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing." Mol. Immunol. **33**, 361-370.

- Bach J. F. and Lesavre P. (1981) "Immunologie » (Flammarion).

- Björksten B., Borres M. P. and Einarsson R. (1995) « Interleukin-4, soluble CD 23 and interferon-gamma levels in serum during the first 18 months of life. » Int. Arch. Allergy Immunol. **107**, 34-36.

- Ebtekar M. and Khansari N. (1996) « Differential antigenic stimulation influences cytokine production patterns in T cells and CD 4+ subpopulations. » Scand. J. Immunol. **43**, 391-397.

- Janeway C. A. and Travers P. (1996) « Immunobiology » (London : Current Biology Ltd).

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

- Ochi H. , Tanaka T. , Katada Y. , Naka T. , Aitani M. , Hashimoto S. , Maeda K. , Toyoshima K. , Igarashi T. , Suemura M. and Kishimoto T. (1996) « Functional disturbance of naive T lymphocytes in very high IgE producers : Depletion of interleukin-4 induced interleukin-4 producing cells. » Int. Arch. Allergy Immunol. **109**, 236-242.

- Ouyang Y. L. , Azcona-Olivera J. I. and Pestka J. J. (1995) « Effects of trichothecene structure on cytokine secretion and gene expression in murine Dc 4+ T-cells. » Toxicology **104**, 187-202.

- Peccoud J. (1993) « La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale. » Médecine/ sciences **9**, 1378-1385.

- Pène J. , Rivier A. , Lagier B. , Becker W. M. , Michel F. B. and Bousquet J. (1994) « Differences in IL-4 release by PBMC are related with heterogeneity of atopy. » Immunology **81**, 58-64.

- Raychandhuri S. P. and Raychandhuri S. K. (1995) « Revisit to Kaposi's varicelliform eruption; Role of IL-4. » Int. Journal of Dermatology **34**, 854-856.

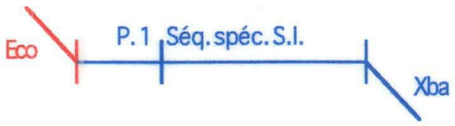
- Roitt I. , Brostoff J. and Male D. (1985) « Immunologie fondamentale et appliquée. » (MEDSI)

- Sutherland M. , Blaser K. and Pène J. (1993) « Effects of interleukin-4 and interferon-gamma on the secretion of IgG4 from human peripheral blood mononuclear cell. » Allergy **48**, 504-510.

-Tanigushi A. , Hitoshi K. and Carson D. A. (1994) « Competitive RT-PCR ELISA : a rapid, sensitive and non-radioactive method to quantitate cytokine mRNA. » Journal of Immunological Methods **169**, 101-109.

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

Sonde de départ. (64 bp)



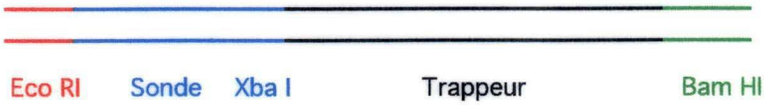
Les 2 brins de cette sonde furent synthétisés chimiquement puis hybridés.

Séquence contenant le trappeur (261 bp)



Le trappeur est construit grâce à une PCR réalisée sur le plasmide pUC 18 contenant le gène sauvage de l'IL 4 murin.

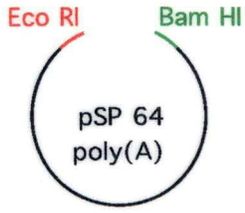
Ligation sonde - trappeur



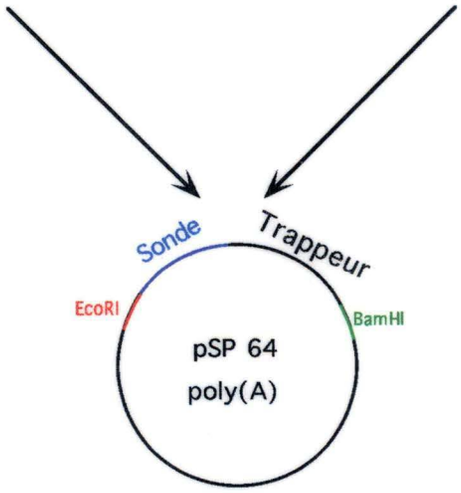
Ligation standard - plasmide pSP 64



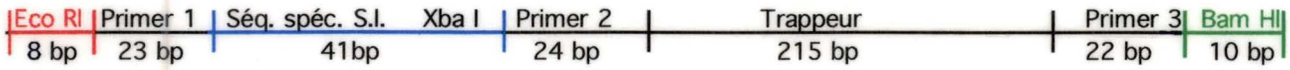
Standard interne

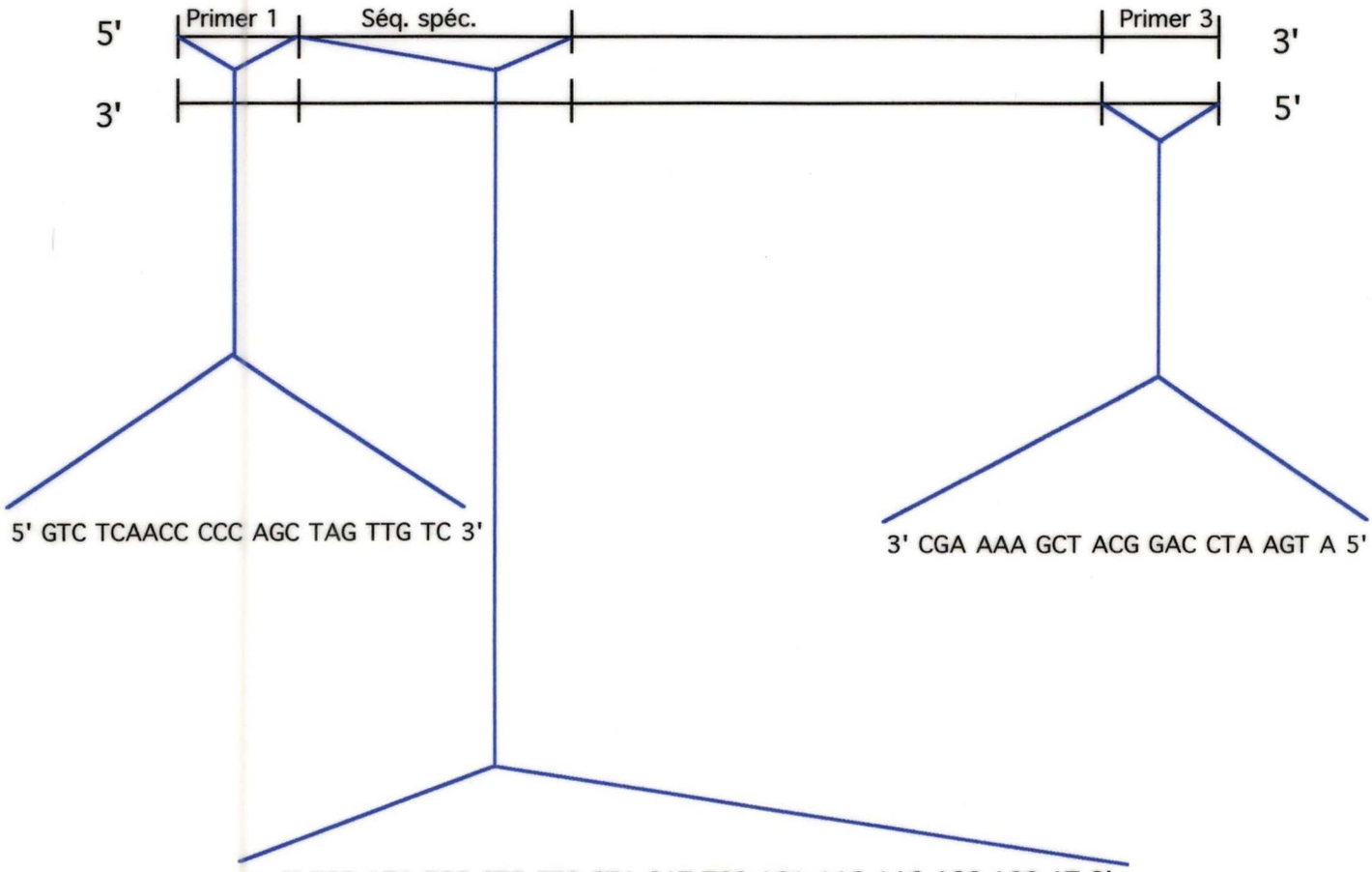


Plasmide restreint sur Eco RI et Bam HI



Standard interne à obtenir





A. 5' TGG ATA TGG CTC CTG GTA CAT TCG AGA AAG AAG AGC AGG AT 3'

Sonde spécifique WT IL 4

B. 5' GCT CTA GAG CAT AGC TGT AGC ATC TGA ACC TGG AAG TCT AT 3'

Sonde spécifique S.I IL 4