



HAL
open science

Obtention rapide de sous-populations lymphocytaires de porc en grande quantité

B. Charreau, M. Olivier, L. Phan Thanh, H. Salmon, A. Paraf, B. Ruet, D. Sage

► To cite this version:

B. Charreau, M. Olivier, L. Phan Thanh, H. Salmon, A. Paraf, et al.. Obtention rapide de sous-populations lymphocytaires de porc en grande quantité. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1989, 20 (4), pp.473-483. hal-00901912

HAL Id: hal-00901912

<https://hal.science/hal-00901912>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Article original

Obtention rapide de sous-populations lymphocytaires de porc en grande quantité

B. Charreau ¹, M. Olivier ¹, L. Phan Thanh ¹, H. Salmon ¹,
A. Paraf ¹, B. Ruet ² et D. Sage ²

¹ INRA, centre de Tours, station de pathologie porcine et immunologie, et Ecole Pratique des Hautes Études, Laboratoire d'immunologie, 37380 Nouzilly;

² CNRS, université Claude-Bernard, laboratoire des matériaux plastique, 69000 Lyon, France

(reçu le 22 décembre 1988, accepté le 7 juin 1989)

Résumé — Les sous-populations lymphocytaires provenant des différents organes du porc (sang, rate, ganglion mésentérique) ont été séparées par une technique simple, rapide et peu coûteuse, qui n'utilisait que des boîtes de culture en plastique normales et ozonisées et de l'albumine bovine qu'on ajoutait au milieu de culture. Les lymphocytes SIg⁺ pouvaient ainsi être obtenus jusqu'à 95% de pureté, par adhésion préférentielle sur boîtes plastique de Corning. Les sous-populations PT4 et PT8, qui restaient dans le surnageant, étaient ensuite séparées par une autre adhésion sur des boîtes de plastique ozonisées avec une pureté de 80 à 90%. Les cellules ainsi purifiées conservaient l'activité proliférative à l'égard des lectines.

immunologie — sous-population lymphocytaire — séparation

Summary — Large scale and rapid separation of porcine lymphocyte subpopulations. Lymphocyte subpopulations derived from different pig organs (blood, spleen, mesenteric lymph nodes) were separated by a simple, rapid and cheap panning technique, using either normal or ozone treated Petri dishes with bovine serum albumin. SIg⁺ lymphocytes could thus be obtained with a purity of up to 95% by adhesion onto Corning plastic dishes. The purified cells retained their proliferative activity with regard to lectins. The subpopulation including PT4 and PT8 was then separated by another panning on ozone-treated plastic dishes with a purity of 80-90%.

immunology — lymphocyte subpopulation — separation

INTRODUCTION

De nombreuses techniques ont permis de purifier, généralement en petite quantité, les sous-populations lymphocytaires murines ou humaines. L'une des plus efficaces consiste à utiliser des anticorps antiprotéines de surface spécifiques de l'une des sous-populations (Mage *et al.*, 1977). Chez le porc, on a séparé les cellules B des cellules T par la technique de la laine de nylon (Salmon *et al.*, 1975; Binns *et al.*, 1979) permettant d'obtenir une population de 90 à 95% Fc+ ou SIg+, d'où il faut retirer les cellules T activées.

Le but de notre travail fut de mettre au point une technique permettant d'obtenir, avec le plus grand degré de pureté possible, les cellules B, les cellules T4 et les cellules T8 sans utiliser des ligands restant attachés aux cellules, ce qui a autorisé l'étude de leurs fonctions. Cette technique est fondée sur l'hypothèse que les charges des cellules sont différentes selon les sous-populations lymphocytaires. L'idée fut alors de préparer du polystyrène modifié par l'ozone (Razumonskii *et al.*, 1971), sur lequel on avait montré que les cellules non différenciées pouvaient se fixer différemment selon leur origine (Curtiss, 1983). Nous relaterons ici la séparation des cellules B, T4 et T8 qui est une variante de la technique de *panning* ne nécessitant pas l'usage d'anticorps.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation des plastiques

Des boîtes de Corning pour cultures cellulaires furent utilisées pour la séparation des cellules

B. Dans des expériences préliminaires, du polystyrène avait été traité à des températures variables et pour des temps variables par de l'ozone gazeux (Sage & Ruet, 1987; Charreau *et al.*, 1987). Dans le cas présent, des boîtes de Pétri de polystyrène furent traitées à 60 °C pendant 2 h dans l'ozone gazeux. Ces boîtes se sont révélées indispensables pour la séparation des cellules T.

Animaux

Les porcs étaient âgés de 3 à 6 mois, élevés dans des conditions conventionnelles. Les études ont été réalisées sur le sang, la rate et les ganglions mésentériques.

Préparation des suspensions cellulaires

Le sang prélevé à la veine jugulaire est immédiatement reçu sur de l'héparine puis soumis à la technique du fer carbonyle pendant 1 h à 37 °C (Abo *et al.*, 1976); le mélange est alors placé sur un gradient de Ficoll/Hypaque de 1,09 puis centrifugé à 2 000 g pendant 15 min. Les leucocytes sont collectés et lavés 3 fois en MEM 10% SVF; dans le cas où ils se montrent contaminés par des globules rouges, ils sont soumis à l'action du chlorure d'ammonium pendant 10 min à 4 °C.

Pour séparer les cellules B et T provenant du sang après traitement par le fer carbonyle qui élimine monocytes et polynucléaires, on place les cellules sur boîtes de plastique (Corning) ou boîtes ozonisées 1 h à la température du laboratoire.

En ce qui concerne les cellules spléniques, la rate est recueillie sur glace et immédiatement coupée aux ciseaux en petits fragments, ceux-ci sont passés doucement au travers d'un tamis fin en acier inoxydable et la suspension cellulaire, après passage au travers d'un filtre de gaze, est traitée comme la suspension de cellules sanguines par le fer carbonyle de façon à obtenir une population pure de lymphocytes.

En ce qui concerne les cellules mésentériques, les ganglions sont prélevés aseptique-

ment et coupés finement aux ciseaux, puis passés au travers d'une grille d'acier inoxydable. La suspension ainsi obtenue est lavée 3 fois dans un milieu MEM 10% de sérum de veau fœtal. Dans le cas où la mortalité cellulaire excède 10%, le gradient de Ficoll/Hypaque densité 1,09 est pratiqué, permettant d'obtenir une suspension de lymphocytes montrant une viabilité de 95 à 98%.

Suspension de cellules adhérentes et non adhérentes

La suspension de cellules B et T, qu'il s'agisse d'une suspension sanguine ou splénique ou d'origine mésentérique, après lavage est ajustée à 7×10^6 à 10^7 cellules/ml en milieu RPMI Hepès avec 10% SVF et versée, à raison de 5 ml, dans des boîtes de Pétri d'un diamètre de 10 cm pour culture de tissus (Corning) ou bien à raison de 1,5 ml par boîtes de Pétri de 3 cm lorsqu'il s'agissait de boîtes traitées à l'ozone, et incubées pendant 1 h à la température du laboratoire; les boîtes sont légèrement agitées toutes les 15 min. Les cellules non fixées sont alors retirées doucement par agitation et les cellules adhérentes sont lavées 8 ou 10 fois, tous les liquides de lavage étant réunis. Ces cellules seront appelées «cellules non adhérentes». Les cellules fixées au plastique sont alors retirées par un jet liquide de milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal, soit avec une seringue, soit avec une pipette, la suspension cellulaire étant appelée «cellules adhérentes». Par comparaison, des boîtes de Pétri furent recouvertes préalablement d'un sérum de mouton anti-chaîne légère d'immunoglobuline de porc et les cellules furent alors traitées par la technique de Mage *et al.* (1977). Après lavage en MEM sans sérum, les cellules non adhérentes sont alors mises en suspension en milieu MEM renfermant 0,375 mg d'albumine de sérum bovin et placées sur des boîtes ozonisées à raison de 1,5 ml d'une suspension de 10^7 cellules/ml pour des boîtes de Pétri de 3 cm de diamètre. Les boîtes sont incubées 1 h à la température du laboratoire comme précédemment.

Les réactifs pour identifier les sous-populations

Pour les cellules B, on a utilisé l'immunofluorescence avec un sérum de lapin anti-Ig de porc (RASW/FITC, Nordic). En ce qui concerne les cellules T4 et T8, elles ont été respectivement identifiées par les anticorps monoclonaux PT4 et PT8 (Pescovitz *et al.*, 1984, 1985) par sandwich avec un sérum antisouris fluorescent (Nordic). Comme test fonctionnel, on a mesuré le pouvoir mitogène comparé de la concanavaleine A (Con A), de la phytohémagglutinine (PHA), du mitogène de Pockeweed (PWM) et du lipopolysaccharide de *E. coli* (LPS).

Immunofluorescence

Pour le marquage des cellules Sig+, 1 à $1,5 \times 10^6$ cellules étaient lavées dans 5 ml de milieu MEM sans sérum; après centrifugation, on ajoute 20 μ l de sérum anti-immunoglobuline de porc et l'on maintient le mélange sur glace pendant 45 min. Dans le cas où un anticorps monoclonal est utilisé (en particulier, pour l'identification des sous-populations T), la même incubation est pratiquée puis, après 3 lavages, une seconde incubation intervient avec du FAb d'un sérum de porc anti-immunoglobuline de souris fluorescent. Les cellules sont enfin lavées 3 fois dans du milieu MEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, puis suspendues dans 0,05 ml d'un tampon phosphate glycérol pH 8,4. Les examens sont réalisés sous microscope à fluorescence sur 200 cellules au minimum.

Réponse aux mitogènes

10^5 cellules dans un volume de 100 μ l de RPMI avec 20% SVF, 1mM pyruvate de Na, 10^{-5} M bêta mercaptoéthanol 2 mM glutamine additionné de pénicilline et streptomycine sont mélangés dans chaque puits avec 50 μ l de phytohémagglutinine (PHA) (Pharmacia) dilué à 1/10, 1/50 et 1/100 ou de la concanavaleine A (Con A 10, 50, 100 μ g/ml) ou du mitogène de

Pockweed (PWM 1, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) ou du lipopolysaccharide (LPS 25, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$), avec 3 puits identiques pour chaque dilution. Après 3 jours de culture, 1 μCi de thymidine tritiée (activité spécifique 1 $\text{Ci}/\mu\text{mol}$) par puits fut ajouté pendant 18 h; toutes les cultures étaient alors recueillies au skatron et, après séchage, les papiers filtres distribués dans des tubes étaient comptés dans un scintillateur liquide Intertechnique. Pour chaque expérience, au moins 6 puits étaient réalisés en absence de lectine. Les résultats expérimentaux étaient calculés comme suit : (coups par min dans les puits expérimentaux — coups par min dans les puits contrôles)/(coups par min dans les contrôles).

RÉSULTATS

Purification et caractérisation des cellules B et T après traitement

Dans le sang

Par le fer carbonyle, le rendement selon les cas est de 40 à 70% et, durant cette

première étape, 90 à 100% des polynucléaires et 50 à 100% des monocytes, ainsi que toutes les cellules éosinophiles, ont été perdus, ce qui représente 20 à 45% de l'ensemble des leucocytes sanguins (Tableau I). On recouvre de 80 à 90% de lymphocytes originaux spécifiques d'une sous-population lymphocytaire. Après l'adhérence sur plastique Corning, la plupart, sinon toutes les cellules adhérentes (85 à 95%), sont des Slg^+ , alors que dans les cellules surnageantes le pourcentage de slg^+ tombe de 8-12% à 1-2% (Tableau II). Les 2-10% de cellules non- Slg^+ sont identifiés par les anticorps T4 et T8 montrant qu'il s'agit de cellules T.

Dans quelques expériences, nous avons réalisé 2 fois l'adhésion sur plastique Corning et, dans ce cas, on trouve moins de 1% de cellules Slg^+ dans les surnageants, mais le rendement est moins bon. Toutes les cellules Slg^+ peuvent être considérées comme adhérentes et représentent 10 à 12% des leucocytes sanguins : quand du sérum antichaîne légère est utilisé sur les boîtes Corning, les résultats sont sensiblement les mêmes (résultats non montrés).

Tableau I. Purification des lymphocytes sanguins Slg^+ .

	PMN (%)	Lymphocytes (%)	Slg^+ Lymphocytes	Monocytes (%)	Eosinophiles (%)
Sang	10-30	60-85	—	5-10	2-5
Origine					
après Ficoll	5-25	65-90	5-15	5-10	2-5
après fer carbonyle et Ficoll	0-3	96-98	5-15	0-5	—
Plastique Corning					
Cellules adhérentes	0-2	96-100	85-95	0-3	—
surnageantes	0-3	96-100	1-2	—	—

Tableau II. Antigènes de surface des sous-populations de cellules sanguines (chiffres extrêmes pour 3 expériences).

	Quantité relative	Slg+ (%)	T4 (%)	T8 (%)	Nulles (%)
Origine après Ficoll	100	8-12	20-30	30-50	10-30
Cellules adhérentes	5-12	90-98	0-2	2-10	0
Cellules surnageantes	88-95	1-2	20-30	30-50	10-35

Dans le cas où les boîtes de plastique ozonisées ont été utilisées, la contamination par les cellules T8 a été plus importante (atteignant 20%) que pour les boîtes Corning, et nous avons donc toujours utilisé les boîtes Corning pour l'isolement des cellules Slg+ dans la rate et dans les ganglions.

Nous avons alors recherché s'il était possible de séparer, selon la technique de *panning* sans anticorps, les cellules T4 des cellules T8. Tous les essais réalisés sur boîtes Corning avec du SVF ont conduit à l'échec, de même avec l'albumine de sérum bovin (ASB) purifiée. Au cours d'essais préliminaires, en remplaçant le SVF par de l'ASB, nous avons observé qu'avec des concentrations de protéines < 3 mg/ml, les cellules T8 devenaient adhérentes. En utilisant des boîtes ozonisées, nous avons observé que, si l'on met en suspension les cellules surnageantes des boîtes Corning après 2 lavages dans du milieu RPMI contenant 0,375 mg/ml de ASB, un bon enrichissement des sous-populations T est obtenu (Tableau III).

Dans la rate

La séparation des cellules Slg+ spléniques a été réalisée, comme pour le

sang, sur boîtes Corning en présence de 10% de SVF avec les mêmes résultats (Tableau IV). Comme pour les cellules sanguines, la technique de Mage *et al.* (1977) permet d'obtenir une séparation comparable.

Dans les ganglions mésentériques

La séparation des cellules Slg+ ganglionnaires a été réalisée, comme pour le sang, sur boîtes Corning en présence de 10% de SVF, et on voit que l'on obtient les mêmes résultats qu'avec le sang ou la rate (Tableau V). La suspension cellulaire non adhérente sur boîtes Corning est alors lavée 3 fois dans du milieu MEM ou RPMI sans sérum, puis remise en suspension dans du milieu RPMI additionné de ASB 0,375 mg/ml : sur le Tableau V, on voit que, parmi les cellules surnageantes, 85-90% sont PT4 tandis que, parmi les cellules adhérentes, 80-85% sont PT8.

Stimulation par les lectines

Les cellules sanguines, après séparation en cellules adhérentes et non adhérentes (sur boîtes Corning), conservent une

Tableau III. Purification des sous-populations lymphoïdes du sang (une expérience représentative).

	<i>Slg+</i> (%)	<i>PT4</i> (%)	<i>PT8</i> (%)	Nulles (%)
Origine	8	25	45	30
1 ^{re} étape				
Corning				
Adhérentes	92	3	8	—
Surnageantes	1	28	45	30
2 ^e étape				
Plastique ozonisé				
Adhérentes	0	24	85	0
Surnageantes	0	31	6	60

Tableau IV. Purification des lymphocytes spléniques *Slg+* (extrêmes de 3 expériences)

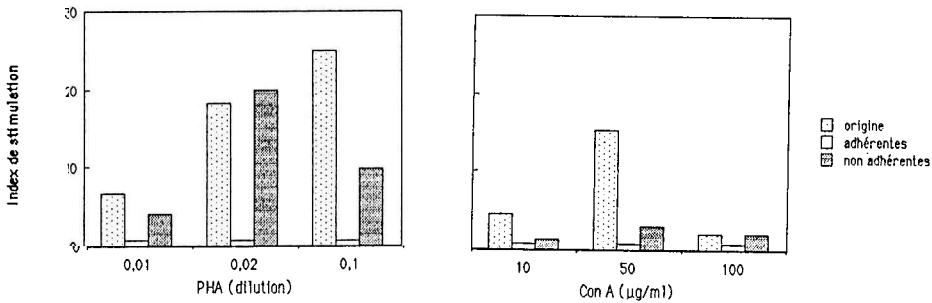
	<i>PMN</i> (%)	<i>Lymphocytes</i> (%)	<i>Slg+</i> <i>Lymphocytes</i> (%)	<i>Macrophages</i> (%)	<i>Eosinophiles</i> (%)	Rendement (%)
Origine	2-10	70-85	10-25	5-15	1-5	40-70
Après fer carbonylé	—	96-100	10-25	0-2	1-2	40-70
Plastique Corning						
Cellules						
Adhérentes	—	96-100	60-85	0-2	1-2	30-80
Surnageantes	—	96-100	2-15	—	—	85-95

Tableau V. Purification des sous-populations lymphoïdes des ganglions mésentériques (extrêmes de 3 expériences).

	<i>Proportion</i>	<i>Slg+</i> (%)	<i>PT4</i> (%)	<i>PT8</i> (%)
Origine	100	15-45	25-40	20-35
Plastique Corning				
Adhérentes	15-45	90-95	2-15	10-25
Surnageantes	55-85	2-10	30-70	20-50
Plastique ozonisé				
Adhérentes	20-30	3-20	20-35	80-85
Surnageantes	30-40	1-5	85-90	25-40

Tableau VI. Stimulation des lymphocytes sanguins par les lectines.

		Origine	Cellules adhérentes	Cellules surnageantes
PHA	1/10	x 250	0	x 100
	1/50	x 180	0	x 200
	1/100	x 70	0	x 40
Con A	100 μ g	x 20	0	x 20
	50 μ g	x 150	0	x 25
	10 μ g	x 45	0	x 10

**Fig. 1.** Stimulation des différentes sous-populations de lymphocytes sanguins par les lectines.

activité proliférative à l'égard de la PHA et de la Con A à toutes les doses : l'activité est étroitement dépendante des cellules surnageantes, les cellules adhérentes étant inactives (Tableau VI, Fig. 1); les cellules ganglionnaires après séparation montrent des fonctions identiques (sinon augmentées) à celles des cellules d'origine à l'égard du LPS et du PMW : dans le cas du LPS, l'activité est stimulée à forte dose (100 μ g) pour les cellules adhérentes et à faible dose pour les cellules surnageantes (Tableau VII); dans le cas de la PMW, on retrouve l'activité aussi bien dans les cellules adhérentes que dans les cellules surnageantes (Fig. 2).

DISCUSSION

La séparation des sous-populations de lymphocytes dans les différents organes de porc présente un grand intérêt pour en étudier les fonctions. La séparation des cellules B et T précédemment décrite à l'aide de la laine de nylon avait pour inconvénient de ne permettre qu'un faible rendement (40%) et donc aboutissait à une sélection des sous-populations parmi les cellules B, outre qu'une partie des cellules T obtenues étaient contaminées par des cellules B. La technique décrite par Kelley *et al.* (1984) consistant à tuer les cellules T par l'anticorps monoclonal

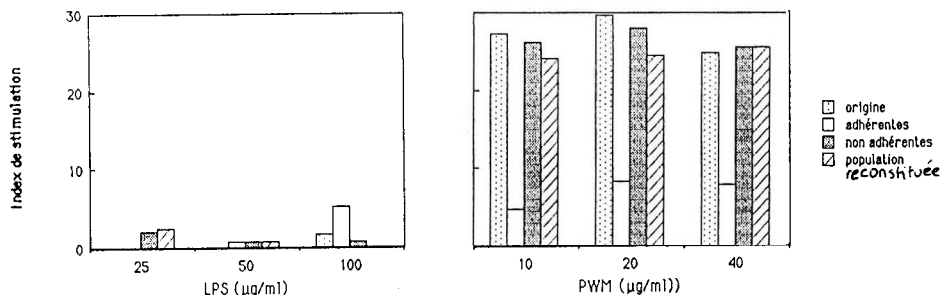


Fig. 2. Stimulation des différentes sous-populations des ganglions mésentériques par les lectines.

Tableau VII. Stimulation des lymphocytes de ganglions mésentériques.

	Origine	Cellules adhérentes	Cellules surnageantes	Adhérentes + non adhérentes
LPS (μg)				
25	0	0	x 4	x 5
50	0	0	0	0
100	x 2	x 5	0	0
PWM (μg)				
1	x 250	x 300	x 350	x 250
10	x 270	x 400	x 450	x 300
20	x 270	x 400	x 400	x 400

81B et le complément permettait d'obtenir une population intacte, mais avait pour inconvénient que chez les mêmes individus on ne pouvait travailler sur les cellules B et les cellules T. Notre but était surtout d'enrichir au mieux soit les cellules B, soit les cellules T de porc en utilisant une technique qui se résume en 3 étapes :

— *traitement par le fer carbonyle* pour éliminer monocytes et polynucléaires du sang ou macrophages de la rate. Cette étape est inutile pour les ganglions mésentériques d'où l'on obtient directement une population de lymphocytes contaminés au plus par 5% de macrophages;

— *adhésion sur plastique Corning* en présence d'une quantité importante de protéines, 10% de sérum de veau fœtal ou 18 mg/ml d'albumine de sérum bovin (ce dernier résultat n'est pas montré ici);

— *adhésion sur plastique ozonisé* en présence de 0,375 mg/ml d'albumine de sérum bovin.

Au cours de la deuxième étape, on obtient une séparation des cellules SIg+ et des cellules T quel que soit l'organe étudié. La contamination d'une population par l'autre varie à la fois pour les individus et selon l'organe d'origine : d'une façon générale, les cellules du ganglion mésentérique qui contiennent plus de cellules T activées que les cellules

sanguines aboutissent à une contamination de cellules B par les cellules T activées (présentant des immunoglobulines de membranes) variant de 5 à 20%, alors que la même opération avec les cellules sanguines n'aboutit qu'à une contamination de 2 à 5%.

Les cellules sanguines renferment une quantité importante de cellules nulles (Salmon, 1985; Salmon *et al.*, 1975) que l'on retrouve dans les cellules surnageantes après adhésion sur Corning (Tableau II). Elles se retrouvent dans les cellules surnageantes avec les cellules T4 après adhésion sur plastique ozonisé, de ce point de vue elles ressemblent aux cellules T4 (Tableau III). Comme cela a déjà été décrit (Binns *et al.* 1985), ces cellules ne sont pas recirculantes.

Les cellules Slg+ sont très bien enrichies sur boîtes Corning dans le sang, la rate et les ganglions mais on ne peut parler de réelle purification de cellules B que pour le sang (Tableau II), tandis que les cellules ganglionnaires adhérentes présentent souvent une contamination de 2 à 25% par les cellules T portant des immunoglobulines de membranes (Tableau V). Toutes les cellules Slg+ peuvent être obtenues par adhésion : cependant, dans le cas de la rate et surtout des ganglions mésentériques où nous avons rencontré jusqu'à 45% de cellules Slg+, il est nécessaire de répéter une fois l'adhésion sur plastique Corning pour éliminer totalement les Slg+ et ne pas les retrouver parmi les cellules adhérentes au plastique ozonisé (Tableau V). Il est intéressant de constater que cette technique d'adhésion directe donne les mêmes résultats que la technique de Mage *et al.* (1977) nécessitant l'utilisation d'anticorps anti-immunoglobulines.

Les cellules T se retrouvent toujours parmi les cellules surnageantes après adhésion sur boîtes Corning. Leur

séparation en T4 et T8 est réalisée aussi bien avec les cellules d'origine ganglionnaire qu'avec les cellules d'origine sanguine (nous n'avons pas réalisé cette expérience avec les cellules spléniques) par adhésion sur un plastique ozonisé, à condition que la suspension cellulaire soit très pauvre en protéines (ici 0,375 mg/ml de ABS) : alors que les cellules T8 se retrouvent en majorité parmi les cellules adhérentes, les cellules T4 se retrouvent dans le surnageant. Il est à remarquer que les cellules T4 d'origine sanguine se retrouvent avec les cellules nulles et l'on peut se demander si ces cellules nulles représentent une forme inactive de T4. Il faut noter également que si parmi les cellules sanguines adhérentes il n'y a pas ou peu de contamination par T8 (Tableau III), en revanche, cette contamination est importante avec les cellules ganglionnaires (Tableau V).

Enfin, nous avons recherché si ce type d'adhésion n'obérait pas les propriétés fonctionnelles des cellules surnageantes, et en particulier des cellules adhérentes : nous avons soumis *in vitro* les différentes sous-populations à l'action des mitogènes, en comparant l'activité des cellules d'origine à celle de chacune des sous-populations et éventuellement du mélange des cellules adhérentes et non adhérentes; on a pu montrer que la capacité à répondre aux mitogènes est bien conservée, ce qui est particulièrement satisfaisant dans le cas des cellules adhérentes (Figs. 1 et 2).

Dans le cas des cellules surnageantes, on a décrit une stimulation à l'action de la PHA après déplétion des cellules spléniques en cellules adhérentes au nylon (Muscoplat & Kim, 1977) et une diminution de l'action de la Con A : nous avons, dans les 2 cas, observé une légère baisse, plus particulièrement aux fortes doses de PHA et aux faibles doses

de Con A. Mais dans le travail cité, ces effets n'étaient perceptibles que pour des concentrations déterminées de cellules; or, nous n'avons pas étudié différentes concentrations cellulaires.

La technique que nous décrivons ici permet d'obtenir une très bonne séparation des sous-populations cellulaires SIg+, T4 et T8 : l'usage du séparateur de cellules permet d'obtenir un plus haut degré de pureté, en particulier pour les T4 et les T8 mais outre que la technique est beaucoup plus onéreuse, elle présente 2 inconvénients majeurs : elle oblige à utiliser des anticorps purifiés par chromatographie d'affinité et elle ne permet d'isoler que de faibles quantités de cellules. Nous réalisons aisément la séparation de ces 3 sous-populations à partir de $2,5 \times 10^8$ lymphocytes, ce qui nous permet d'obtenir pour les ganglions mésentériques de porc environ $2,5$ à 7×10^7 cellules SIg+ et 7 à 10×10^7 cellules T4 ou T8. Cela présente un grand intérêt pour analyser, chez les porcs histocompatibles, le rôle de ces sous-populations en ce qui concerne la physiologie du système immunitaire de l'intestin et de la mamelle.

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce au contrat du ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur (MRES) n° 86 T 0221 et au contrat de recherche de la Communauté européenne économique (CEE) n° BAP 0178 F.

Nous tenons à remercier J.M. Aynaud pour ses suggestions durant ce travail et Madame Cupi-Bellivier pour son excellent travail de secrétariat.

RÉFÉRENCES

- Abo T., Yamaguchi T., Shimizu F. & Kumagai K. (1976) Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes. 2. Characterization of a population of lymphocytes lacking surface immunoglobulins but carrying Fc receptors (SIg- Fc+ cells). *J. Immunol.* 117, 1781-1787
- Binns R.M., Vaiman H., Davies S. & Symans D.B.A. (1979) Characterization of pig lymphocyte subpopulations by adherence to nylon wool. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 58, 128-134
- Binns R.M., Pabst R. & Licence S.T. (1985) Lymphocyte emigration from lymph nodes by blood in the pig and efferent lymph in the sheep. *Immunology* 54, 105-111
- Charreau B., Phan Thanh L., Salmon H., Olivier M. & Paraf A. (1987) Purification on pig lymphocyte subpopulations using their interactions with different plastics. In : *Biotechnology Action Programme, Report 1987*, pp. 1068-1069
- Curtiss A.S.G. (1983) Adhesion of cells to polystyrene surface. *J. Cell Biol.* 97, 1500-1506
- Kelley K.W., Davis W.C., Salmon H., Aynaud J.M. & Olivier M. (1984) Monoclonal antibodies against porcine leukocyte antigens. *Fed. Proc.* 43, 1681
- Mage M.G., Mc Hugh L. & Rothstein T.L. (1977) Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin : preparative scale separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin. *J. Immunol. Meth.* 15, 47-56
- Muscoplat C. & Kim Y.B. (1977) Enhancement of phytohemagglutinin and concanavalin A responses of splenic lymphocytes by adherent cell removal. *Am. J. Vet. Res.* 38, 799-801
- Pescovitz M.D., Lunney J.K. & Sachs D.H. (1984) Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol.* 133, 368-375
- Pescovitz M.D., Lunney J.K. & Sachs D.H. (1985) Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies. Distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 134, 37-44

Razumonskii S.D., Karpukhin O.N., Kepeli A.A., Pokholok T.V. & Zaikov G.Y. (1971) The reaction of ozone with solid polystyrene. *Vysokomol Soyed A*13, 782-790

Sage D. & Ruet B. (1987) Biochemical analysis of plastic materials for lymphocytes separation. In : *Biotechnology Action Programme, Report 1987*, pp. 1071-1073

Salmon H., Riviere Y., Gouere P. & Goret P. (1975) Techniques d'identification des sous-populations lymphocytaires porcines. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 48, 199-220

Salmon H. (1985) *Biologie des sous-populations lymphocytaires dans l'espèce porcine*. Thèse Sci., Paris