



HAL
open science

Étude des facteurs humoraux spécifiques du recrutement des cellules sécrétant des immunoglobulines A (plasmocytes à IgA) dans la mamelle de truie en lactation

Claire Chevaleyre

► To cite this version:

Claire Chevaleyre. Étude des facteurs humoraux spécifiques du recrutement des cellules sécrétant des immunoglobulines A (plasmocytes à IgA) dans la mamelle de truie en lactation. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Paris, 2010. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-05074489⟩

HAL Id: tel-05074489

<https://hal.science/tel-05074489v1>

Submitted on 20 May 2025

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.



Distributed under a Creative Commons Public Domain Mark: No Known Copyright - International License



ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté par

Claire Chevaleyre

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Étude des facteurs humoraux spécifiques du recrutement des
cellules sécrétant des immunoglobulines A (plasmocytes à
IgA) dans la mamelle de truie en lactation**

soutenu le
devant le jury suivant :

-M. Stéphane Richard
-Mme Betty Gardie
-M. Pascal Rainard
-M. Bruno Canque
-M. Henri Salmon

Président
Rapporteur
Examineur
Tuteur pédagogique
Tuteur scientifique

Mémoire préparé sous la direction de :

Mr. H. Salmon
INRA UR 1282 - Infectiologie Animale et Santé Publique
Équipe : Lymphocytes et Immunité des Muqueuses
37380 Nouzilly

Et de :

Mr. B. Canque
Directeur d'Études à l'EPHE
Équipe Avenir Inserm "Molecular Control of Human Lymphopoiesis"
Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Immunopathologie de l'EPHE
Institut Universitaire d'Hématologie (IUH)
Centre Hayem, 1 avenue Claude Vellefaux
75475 Paris cedex 10



ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté par

Claire Chevaleyre

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Étude des facteurs humoraux spécifiques du recrutement des
cellules sécrétant des immunoglobulines A (plasmocytes à
IgA) dans la mamelle de truie en lactation**

soutenu le
devant le jury suivant :

-M. Stéphane Richard
-Mme Betty Gardie
-M. Pascal Rainard
-M. Bruno Canque
-M. Henri Salmon

Président
Rapporteur
Examineur
Tuteur pédagogique
Tuteur scientifique

Mémoire préparé sous la direction de :

Mr. H. Salmon
INRA UR 1282 - Infectiologie Animale et Santé Publique
Équipe : Lymphocytes et Immunité des Muqueuses
37380 Nouzilly

Et de :

Mr. B. Canque
Directeur d'Études à l'EPHE
Équipe Avenir Inserm "Molecular Control of Human Lymphopoiesis"
Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Immunopathologie de l'EPHE
Institut Universitaire d'Hématologie (IUH)
Centre Hayem, 1 avenue Claude Vellefaux
75475 Paris cedex 10

*Ce que je sais n'est pas forcément ce que tu pourrais découvrir, dit Merlin.
Le mieux est d'y aller voir.
(René Barjavel, L'Enchanteur)*

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse s'est déroulé à l'INRA de Nouzilly dans l'unité d'Infectiologie Animale et de Santé Publique, au sein de l'équipe Lymphocytes et Immunité des Muqueuses, dirigée par le docteur Henri SALMON. Cette formation diplômante a été financée par la formation nationale et locale de l'INRA ainsi que par l'unité et l'équipe dans lesquelles je travaille.

Je remercie les personnes qui sont impliquées dans ce projet :

En premier lieu, Mr Jean de Ricke, le directeur d'unité au départ du projet qui m'a encouragée dans mon engagement ainsi que Md Dominique Buzoni-Gatel, l'actuelle directrice qui m'a accordé son soutien lors de ces deux dernières années.

Je remercie le service de formation, Christine Audoux et Roseline Gautier, pour l'aide qu'elles m'ont apportée lors de toutes mes démarches, ainsi que les membres des commissions de formation nationale et locale pour avoir donné un avis favorable à ma requête.

De même, je remercie le secrétariat de l'École Pratique des Hautes Études qui toujours fait preuve de compréhension lors des inscriptions et pour la gentillesse avec laquelle on m'a toujours reçue lors de mes appels.

Je souhaite remercier Mr Bruno Canque pour avoir accepté d'être mon tuteur pédagogique, pour son enseignement en Immunologie, ses critiques constructives ainsi que son amabilité.

Je remercie particulièrement Mme Betty Gardie d'avoir consenti à être rapporteur et pour la diligence avec laquelle elle a lu mon mémoire. De même, je remercie Mr Stéphane Richard d'avoir accepté d'être président jury et de nous accueillir pour la soutenance.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Mr Henri Salmon pour m'avoir soutenue au cours de cette formation et de m'avoir fait confiance. Ces années passées à ses côtés m'auront appris la curiosité, l'enthousiasme et la persévérance. Merci pour tous les conseils, les réflexions et les connaissances qu'il m'a apportés.

Je tiens à remercier tous les membres de mon équipe, Dorothée qui a initié ce travail et qui m'a poussée à le continuer et à m'y investir et m'a apporté le goût du questionnement,

Berardo avec qui j'ai travaillé au tout début de ce projet ainsi que François et Mous pour leur aide dans la conduite du sujet et dans la rédaction de mon mémoire, Françoise pour m'avoir épaulée comme l'aurait fait une mère et Sandrine pour m'avoir supportée, aidée et accompagnée durant ma formation, merci, merci, merci. Merci à tous, pour votre dévouement !

Je remercie également Benoît, Galliano, Tim, Roselyne, Pascaline Sandrine B, Angélique, Pauline, Edwige, Aurore, Irina, Aurélie, Virginie, Roger Jessica, Mario, pour tous ces moments partagés, leur gentillesse et leur aide.

Ce travail n'a pu se faire sans toutes les personnes des installations expérimentales et des services communs: Philippe B., Rémy D., David G., Dominique M., Fabienne C., Anne, Christophe, Arnaud, Monsieur Jean, Eric V., Eric R., Jérémy, Romuald, Jacques, Patrice, Jean-Philippe, Christian, F. Paulmier, Gilles Gomot, Diana, Céline, Véronique L., Véronique O., Gérard... merci à tous pour votre travail.

Un clin d'œil à Angéline qui m'a bien des fois épaulée lors des soirées « studieuses » au court des modules et a contribué à rendre ces déplacements plus agréables ainsi que pour tous ses conseils et son aide lors de la rédaction et à Jérôme à qui je remets le flambeau : à ton tour maintenant, chacun son « bébé »!

Merci à toutes les personnes de IASP qui de près ou de loin ont contribué à faciliter mon travail.

Et enfin, je remercie mes parents et toute ma famille pour m'avoir soutenue, encouragée et avoir cru en moi. Merci à ma maman, ma sœur Véronique, ma belle sœur Stéphanie pour la correction des nombreuses fautes d'orthographe, elles ont rêvé de chimiokines la nuit, pardon !

Table des matières

Introduction	1
Revue bibliographique	3
I Généralités sur le système immunitaire.....	3
II Compartiment muqueux	3
III Domiciliation des lymphocytes	5
A Domiciliation ou « Homing ».....	5
B Le modèle de transmigration à plusieurs étapes.....	6
C Les molécules contrôlant le recrutement lymphocytaire	8
1 Les adressines vasculaires.....	8
2 Les récepteurs de domiciliation lymphocytaire.....	8
a Les sélectines.....	8
b Les intégrines.....	9
3 Les chimiokines et leurs récepteurs	9
a Les chimiokines	9
b Les récepteurs de chimiokines.....	11
c Interaction entre la chimiokine et son récepteur	12
d Conséquence de l'interaction entre la chimiokine et son récepteur	12
IV Transmission passive de l'immunité lactogène de la mère au jeune.....	13
A Généralités	13
B La glande mammaire chez la truie	13
C Le lait et ses constituants.....	14
D Les immunoglobulines de type A.....	14
E Origine des cellules sécrétrices d'IgAs	15
F Le pouvoir chimioattractant du lait	16
V La chimiokine CCL28 ou MEC (Mucosae-associated Epithelium Chemiokine)	16
A Généralités	16
B Expression de CCL28	16
1 Dans l'intestin	16
2 Dans la glande mammaire.....	17
C Régulations hormonales de la lactation.....	17
Objectifs	20
Matériels et méthodes	22
I Obtention des échantillons biologiques.....	22
A Prélèvement de lait.....	22
B Ultrafiltration du lait de truie	22
C Mise en culture des lymphocytes du MLN et de l'ILN.....	23
D Purification des lymphoblastes du MLN et de ILN.....	24
E Mise en culture de la lignée lymphoblastoïde L14.....	25
F Biopsies mammaires	25
G Culture de cellules épithéliales <i>mammaires</i> porcines.....	25
H Culture de cellules épithéliales <i>intestinales</i> porcines	26
1 Cellules jéjunales	26
2 Cellules iléales	26
3 Polarisation des cellules intestinales porcines <i>in vitro</i>	27
II Étude des activités biologiques	27

A	Activité chemoattractante des fractions du lait et de la chimiokine CCL28	27
1	Description de la chambre de migration	27
2	Remplissage des puits supérieurs et inférieurs	28
3	Révélation et lecture du filtre	28
B	Étude de la fixation de la chimiokine à son récepteur	29
1	Charge des cellules en Fluo-4	29
2	Dé-estérification	30
III	Biologie moléculaire	30
A	Extraction des ARN	30
B	Mise en évidence des transcrits par RT-PCR conventionnelle ou quantitative	31
1	Dessins des amorces	31
2	Transcription inverse	32
3	PCR conventionnelle (semi-quantitative)	33
4	PCR quantitative	34
C	Microdissection au laser	34
1	Préparation des coupes	35
2	Extraction des ARN	35
3	Transcription inverse	36
D	Clonage et production de pCCL28 recombinante	36
1	Digestion enzymatique	36
2	Ligation	36
3	Transformation du <i>coli</i>	37
4	Préparation des plasmides pour vérification	37
5	Production de la protéine recombinante CCL28	37
a	Expression de la chimiokine CCL28 recombinante	37
b	Purification de CCL28 recombinante sous conditions natives	38
c	Purification de la protéine recombinante	39
d	Mise en évidence de l'expression de la chimiokine CCL28	39
E	Étude protéomique	40
1	Western Blot	40
2	Mise en évidence de la localisation des chimiokines par immunohistologie	40
3	Marquage enzymatique	40
4	Double marquage en fluorescence	41

Résultats 42

I	Mise en évidence dans le lait de truie d'un peptide chemoattractant vis-à-vis des lymphocytes B du MLN et de l'expression de son ARNm dans la glande mammaire	42
A	Chemoattraction des fractions du lait	42
1	Vis-à-vis de cellules totales du MLN	42
2	Vis-à-vis de cellules B triées	43
B	Cinétique d'expression de l'ARNm de SAA dans la mamelle	45
II	Évolution de l'expression des chimiokines épithéliales dans la mamelle en relation avec la gestation et la lactation	46
A	Mise en évidence de l'augmentation sélective de l'ARNm de CCL28	46
B	Évolution des récepteurs lymphocytaires en relation avec la cinétique de CCL28	48
1	Analyse de l'ARNm	48
2	Localisation des lymphocytes CCR9 ⁺ et CCR10 ⁺ dans la glande mammaire	49
III	Localisation de la chimiokine CCL28 dans le tissu mammaire et détection de son ARNm dans les cellules épithéliales	50
A	Immunolocalisation de la protéine CCL28	51
1	Co-localisation de CCL28 et des cellules endothéliales par double marquage en immunofluorescence	52
2	Co-localisation de CCL28 et des cellules épithéliales	53
3	Co-localisation de CCL28 et des cellules myoépithéliales dans la mamelle	54
4	Localisation de CCL28 dans la mamelle de truie non lactante	55
5	Détection de CCL28 dans les cellules épithéliales des acini après la traite	56

B	Transcrit de CCL28 dans les cellules épithéliales isolées par microdissection laser	57
1	Extraction des cellules épithéliales	57
2	Détection du transcrit à partir des cellules extraites.....	58
C	Mise en évidence de la chimiokine CCL28 dans le lait de truie	59
IV	Production et analyse de la chimiokine recombinante CCL28 porcine.....	60
A	Production.....	60
B	Analyse fonctionnelle de la chimiokine recombinante CCL28.....	61
1	Activité chimioattractante de pCCL28r vis-à-vis des lymphoblastes B (cellules L14).....	61
2	Mise en évidence de l'interaction de CCL28 avec son récepteur cellulaire.....	62
V	Etude de la régulation de CCL28	63
A	Expression constitutive de l'ARNm de CCL28 par une lignée épithéliale mammaire porcine.....	63
B	Effet de la prolactine sur l'expression de l'ARNm de CCL28 par les cellules épithéliales	64
1	Morphologie des cellules PMEC cultivées sur Matrigel en présence de pPRL.	64
2	Expression de l'ARNm de CCL28 par les PMEC cultivées en présence de pPRL.....	65
	Discussion	66
	Références bibliographiques	70
	Annexes.....	75

Figures

Figure 1 : Modèle de migration des lymphocytes vierges d'un site inducteur vers un site effecteur du système immunitaire muqueux.	4
Figure 2 : Modèle de migration des cellules sécrétrices d'IgA et IgG dépendant de l'expression spécifique de molécules d'adhésion et récepteurs de chimiokines.	6
Figure 3 : Recrutement des lymphocytes.	7
Figure 4 : Chimiokines et leurs récepteurs.	10
Figure 5 : Facteurs impliqués dans le développement et la différenciation de la mamelle.	18
Figure 6 : Évolution des plasmocytes recrutés dans la glande mammaire.	20
Figure 7 : Étapes de purification du lait de truie.	23
Figure 8 : Activité chimioattractante des fractions du lait de <10 kDa vis-à-vis de cellules lymphoblastoïdes porcines.	43
Figure 9 : Activité chimioattractante des fractions du lait de <10 kDa (A) et des peptides de synthèse (B) vis-à-vis des fractions de lymphocytes du MLN enrichies en CD3 ou déplétées en cellules B sIg+ porcines.	44
Figure 10 : Expression des ARNm de SAA dans la GM de truie.	45
Figure 11 : Cinétique d'expression dans la GM des mRNA de SAA.	46
Figure 12 : Évolution de l'expression de l'ARNm de différentes chimiokines.	47
Figure 13 : Comparaison entre la cinétique des chimiokines CCL28 et de CCL25 et de leurs récepteurs.	48
Figure 14 : Mise en évidence des différents récepteurs CCR9 et CCR10 sur coupes de GM à 15 jours de lactation.	49
Figure 15 : Schéma de l'organisation d'un acinus (ou alvéole) de glande mammaire et d'un canal.	51
Figure 16 : Co-localisation de CCL28 et des cellules endothéliales des vaisseaux.	52
Figure 17 : Co-localisation de CCL28 et des cellules épithéliales.	53
Figure 18 : Co-localisation de CCL28 et des cellules myoépithéliales.	54
Figure 19 : Expression de CCL28 sur du tissu mammaire de truie non gestante et en gestation.	55
Figure 20 : Détection de CCL28 dans les cellules épithéliales mammaires.	56
Figure 21 : Extraction des cellules épithéliales.	58
Figure 22 : Analyse par RT-PCR des ARNm des cellules extraites après microdissection laser.	58
Figure 23 : Mise en évidence de CCL28 dans le lait de truie.	59
Figure 24 : Analyse en SDS-PAGE des différentes étapes de purification de la protéine recombinante CCL28.	60
Figure 25 : Activité chimioattractante de la protéine recombinante CCL28 vis-à-vis des lymphoblastes L14.	61
Figure 26 : Mise en évidence de la liaison de CCL28 à son récepteur cellulaire.	62
Figure 27 : Expression de CCL28 et de CCL25 des cellules épithéliales mammaires porcines en lignée (PMEC) comparées à différentes lignées épithéliales intestinales.	63
Figure 28 : Formation d'acini par les cellules épithéliales mammaires cultivées sur Matrigel.	64
Figure 29 : Effet de la prolactine sur l'expression de la chimiokine CCL28 dans la lignée épithéliale mammaire.	65

Tableaux

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées pour la quantification des transcrits d'intérêt par PCR conventionnelle.	31
Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour la quantification des transcrits d'intérêt par qPCR.	32

Annexes

Annexe 1 : Électrophorèse	75
Annexe 2 : Carte du plasmide pQE30.....	75
Annexe 3 : Purification des plasmides	76
Annexe 4 : Milieu Luria Bertani (LB)	77
Annexe 5 : Tampons de purification des protéines sous conditions natives.....	77
Annexe 6 : Solution du SDS-PAGE.....	78
Annexe 7 : Protocole détaillé de double marquage sur coupes de mamelle de porc	79
Annexe 8 : Publication n°1	85
Annexe 9 : Publication n°2	86

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
BALT	bronchus associated lymphoid tissue
BET	bromure d'éthidium
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	déoxynucléotide triphosphate
DAG	diacyl glycérol
d	densité
DO	densité optique
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
h	heure
HPLC	high performance liquid chromatography
PBS	phosphate buffer saline
GALT	gut associated lymphoid tissue
GDP	guanosine diphosphate
GM	glande mammaire
GPCR	G protein-coupled receptors
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid
HEV	high endothelium venule
Ig	immunoglobuline
IgA	immunoglobuline A
IgA-ASCs	immunoglobuline A- Antibody-Secreting Cells
IgG	immunoglobuline G
IL	interleukine
IP3	inositol triphosphate
kDa	kiloDalton
l	litre
MAdCAM	mucosal addressin cell adhesion molecule
MALT	mucosal associated lymphoid tissue
mg	milligramme(s)

microBCA	kit de dosage avec l'acide bicinchoninique
min	minute(s)
ml	millilitre(s)
MLN	ganglion mésentérique
MEC	Mucosae-associated epithelial chemokine
MS	spectrométrie de masse
NALT	nasal associated lymphoid tissue
ng	nanogramme
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
PBS	tampon phosphate (phosphate-buffered saline)
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoérythrine
pIgR	poly-Ig récepteur
PICT	plateau d'instrumentation et de compétence en transcriptomique
PIP	phosphatidylinositol phosphate
PNAd	peripheral node addressin
PMEC	porcine mammary epithelial cell
PP	plaque de Peyer
RPhLN	retropharyngeal lymph node
RNase	ribonucléase
rpm	rotation(s) par minute
RPMI	milieu de culture cellulaire (Roosevelt Park Memorial Institute)
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
BSA	bovine albumine sérum
SAA	sérum amyloïde A
SDS	sodium dodécyl sulfate
s	seconde
SVF	sérum de veau fœtal
TNF- α	tumor necrosis factor α
Tris	tri-(hydroxyméthyl)-amino méthane
U	unité
μ g	microgramme(s)
μ l	microlitre(s)
μ M	micromolaire

Introduction

Face aux agents pathogènes et aux agresseurs provenant de l'environnement, l'organisme possède un moyen de défense représenté par le système immunitaire divisé en compartiments muqueux et systémique. Les muqueuses sont l'interface entre le milieu extérieur et l'organisme et représentent les principales portes d'entrée des agents pathogènes, mais elles constituent aussi les premières lignes de défense de l'organisme. Cette protection muqueuse fait intervenir les cellules de la réponse immune cellulaire ainsi que les facteurs de la réponse humorale qui s'infiltreront dans le tissu infecté et/ou qui sont excrétés à l'extérieur (ex : lumière intestinale). Dans ce compartiment muqueux, ce sont les anticorps de type IgA (sIgA) sécrétés par les plasmocytes (appelés aussi Antibody-Secreting Cells ou cellules productrices d'anticorps IgA - IgA-ASCs) qui participent à la neutralisation des agents pathogènes (Goldblum, 1990).

A leur naissance, les animaux nouveau-nés sont vulnérables en raison de leur système immunitaire encore immature. Ils sont donc beaucoup plus sensibles que les adultes à de nombreuses maladies. Ils ne peuvent réagir à une agression que par une réponse de type primaire caractérisée par une période de latence et un taux de synthèse d'anticorps faible essentiellement d'isotype IgM. Ils ne possèdent pas encore de circuit immun capable de produire des IgA spécifiques au niveau des muqueuses. Le nouveau-né a donc besoin d'un soutien immunitaire passif d'origine maternelle pendant cette période critique. Cette transmission de l'immunité est prénatale via le placenta (surtout IgG pour la protection systémique) et/ou postnatale par le colostrum et le lait (IgG et IgA) (Salmon, 2003, Salmon, 1999).

Chez le porc, espèce d'intérêt agronomique et modèle d'étude du laboratoire, la placentation de type épithéliochorial ne permet pas le passage transplacentaire des molécules d'Ig *in utero* (Salmon *et al.*, 2009). En revanche, le colostrum et le lait maternel sont très riches en sIgA et ainsi ils assurent une immunité locale et transitoire dans le tractus gastro-intestinal des jeunes vis-à-vis des infections entériques auxquelles ils sont très sensibles (Reinert P., 1990). Des études de terrain ont montré que les porcelets nés de truies ayant été en contact avec un virus intestinal étaient protégés aussi longtemps qu'ils étaient leurs mères, d'où la notion de lien entéro-mammaire. Dans notre équipe, nous avons approfondi les mécanismes de ce lien qui pourraient reposer soit sur une excrétion des IgA dimériques du sang (d'origine intestinale) soit sur une migration des plasmocytes dans la mamelle. Après une étude des populations lymphocytaires dans la mamelle, Salmon a confirmé la présence de

plasmocytes à IgA au cours de la lactation, au contraire des lymphocytes T, si bien qu'il a favorisé l'hypothèse de la migration cellulaire. Les sIgA spécifiques des pathogènes de l'intestin seraient sécrétées dans la glande mammaire (GM) par les plasmocytes (IgA-ACS).

Les plasmocytes qui migrent dans la GM au cours de la lactation sont recrutés dans le cadre du lien immun entéro et/ou broncho-mammaire grâce à l'interaction des adressines vasculaires, des chimiokines et de leurs récepteurs respectifs (Tanneau *et al.*, 1999).

Des études effectuées à la fois chez la souris et chez le porc ont montré le rôle des chimiokines épithéliales CCL25 (TECK) et CCL28 (MEC) dans la migration et la domiciliation des plasmocytes à IgA dans les tissus muqueux intestinaux et extra-intestinaux (Wilson & Butcher, 2004). En effet, on constate qu'il y a disparition des IgA dans le lait de souris après l'administration *in vivo* d'un anticorps anti-CCL28. Les auteurs de ces études ont donc proposé l'idée que CCL28 est un régulateur d'accumulation des plasmocytes à IgA dans la glande mammaire (GM) et que de ce fait, elle contrôlerait le transfert passif des anticorps sIgA de la mère à sa progéniture.

En comprenant bien les mécanismes de recrutement, nous pourrions moduler le taux des plasmocytes à IgA dans la mamelle et donc dans le lait maternel pour, ainsi, renforcer la protection des nouveau-nés.

Mon travail a donc porté sur l'étude de l'expression de la chimiokine CCL28 et de sa régulation hormonale. Cette étude a été effectuée chez le porc comme espèce d'intérêt mais aussi comme modèle d'étude chez l'homme.

Revue bibliographique

I Généralités sur le système immunitaire

L'immunité peut se définir par la mise en œuvre des mécanismes de défense face aux agents infectieux. L'ensemble des cellules, des tissus et des molécules qui opposent une résistance aux infections composent le système immunitaire, et la réponse coordonnée de ces acteurs porte le nom de réponse immunitaire.

L'organisme met en jeu deux systèmes de défense : l'immunité innée qui est non spécifique mais immédiate, et l'immunité acquise qui, elle, est plus tardive mais spécifique et induit une mémoire.

L'immunité acquise se manifeste sous deux formes : l'immunité à médiation humorale et l'immunité à médiation cellulaire. L'immunité humorale se caractérise par l'action de protéines appelées immunoglobulines (Ig), ou anticorps sécrétés par les lymphocytes B, afin d'éliminer les microbes. L'immunité cellulaire fait intervenir plusieurs types cellulaires et notamment les cellules T, les macrophages et les cellules dendritiques qui interagissent et communiquent entre elles.

Enfin, on distingue deux compartiments : le compartiment systémique et le compartiment muqueux qui interviennent dans la protection de l'individu. Dans le compartiment systémique, on observe une réponse d'anticorps sériques circulant dans le sang qui résulte d'une stimulation antigénique importante. Celle-ci est apportée jusqu'aux principaux organes lymphoïdes primaires et secondaires (thymus, moelle osseuse, rate, ganglions lymphatiques...), entraînant aussi la circulation de lymphocytes spécifiques.

Le compartiment muqueux est celui qui, dans le cas de notre étude, nous intéresse plus particulièrement.

II Compartiment muqueux

Les muqueuses représentent les premières lignes de défense contre les pathogènes mais sont aussi des portes d'entrées. L'ensemble des muqueuses de l'organisme, des voies aériennes supérieures, du tractus digestif et du tractus uro-génital représentent une surface d'échange de plus de 400 m² chez l'homme adulte. Les muqueuses sont composées d'une couche de cellules épithéliales qui forment une barrière et d'une couche de tissu conjonctif. Le tissu épithélial est

tapissé de glycocolyx et de mucus qui contiennent entre autres des immunoglobulines de type A qui empêchent les microbes de s'attacher aux cellules de la muqueuse.

Le système immunitaire des muqueuses est composé d'un ensemble de structures lymphoïdes associées aux muqueuses appelées « mucosal associated lymphoid tissues » (MALT) réparties dans différentes localisations anatomiques : les tissus lymphoïdes associés aux bronches (brochus-associated lymphoid tissue, BALT), les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (gut-associated lymphoid tissue, GALT) et les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse nasale (nasal-associated lymphoid tissue, NALT). L'entrée d'un antigène à travers l'une de ces muqueuses entraîne sa capture. Celui-ci est dirigé vers les tissus lymphoïdes qui sont associés à la muqueuse pour y être présenté aux lymphocytes. Puis les lymphocytes sont activés et migrent dans les différents autres compartiments muqueux (ou sites effecteurs) en fonction du site inducteur (**Fig. 1**) (Butcher *et al.*, 1980).

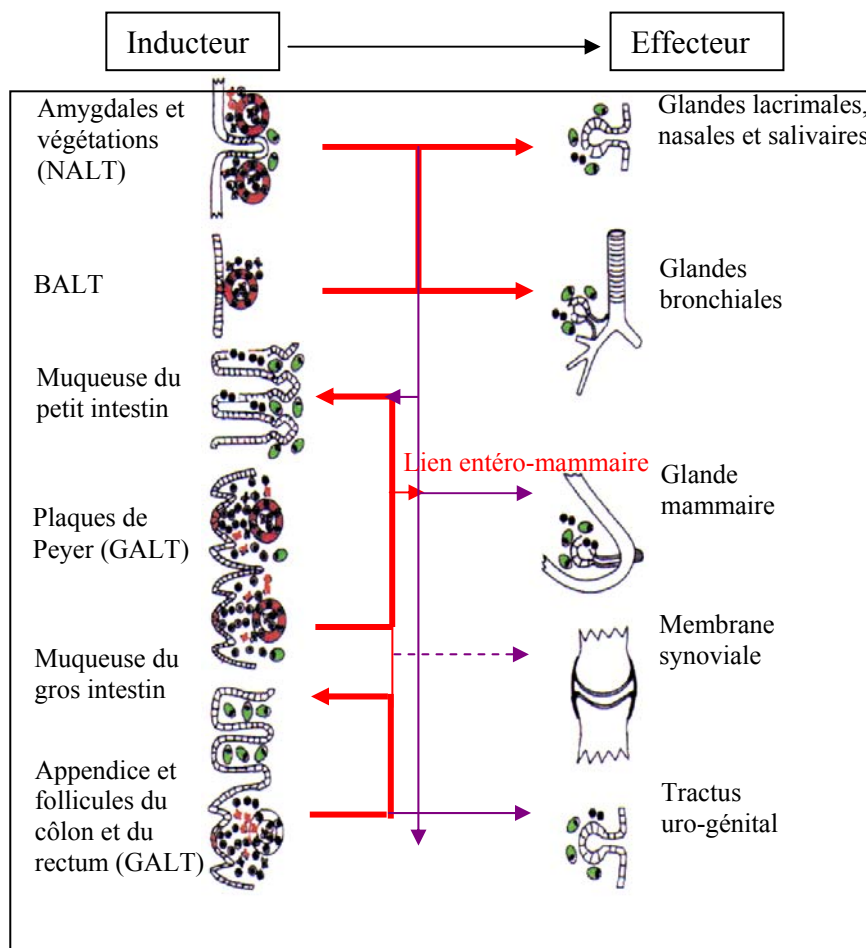


Figure 1 : Modèle de migration des lymphocytes vierges d'un site inducteur vers un site effecteur du système immunitaire muqueux. Les flèches rouges représentent les voies de migration préférentielle (d'après Brandtzaeg *et al.*, 1998).

Malgré leur dispersion anatomique dans l'organisme, les muqueuses sont interconnectées entre elles grâce au trafic des cellules lymphoïdes dans le sang, car il existe des mécanismes régulateurs communs (**Fig. 1**).

III Domiciliation des lymphocytes

A Domiciliation ou « Homing »

Plusieurs études ont démontré que les lymphocytes possèdent des propriétés de migration différentes qui dépendent de leur site d'activation (**Fig. 2**). Les lymphocytes qui par exemple migrent du GALT, c'est-à-dire du ganglion mésentérique (MLN) ou des plaques de Peyer (PP), s'implantent dans des sites effecteurs des muqueuses (tels l'intestin, le tractus uro-génital, les glandes mammaires, les glandes salivaires et le tractus respiratoire). Ces lymphocytes sont des lymphocytes B différenciés. De même, les cellules précurseurs des plasmocytes à IgA, présents dans les tissus lymphoïdes du tractus aéro-digestif supérieur (tissus incluant la cavité orale, le pharynx, le larynx, l'œsophage, les bronches et les poumons), migrent et s'implantent préférentiellement au niveau des glandes salivaires et du tractus respiratoire (Mackay *et al.*, 1992). En revanche, ces cellules montrent un faible taux de migration vers l'intestin. Les précurseurs de plasmocytes à IgG, aussi bien des ganglions lymphoïdes périphériques du GALT ou de la rate, ne sont pas capables d'accéder aux tissus muqueux mais peuvent s'implanter uniquement dans leurs tissus lymphoïdes (Picker *et al.*, 1993, Bourges *et al.*, 2007). Les cellules sécrétrices d'IgAs et d'IgGs ont donc des spécificités de migration différentes qui dépendent de leur site d'activation, des récepteurs portés par les lymphocytes et de leurs ligands (sélectines, adressines et chimiokines) (Kunkel & Butcher, 2003) (**Fig. 2**).

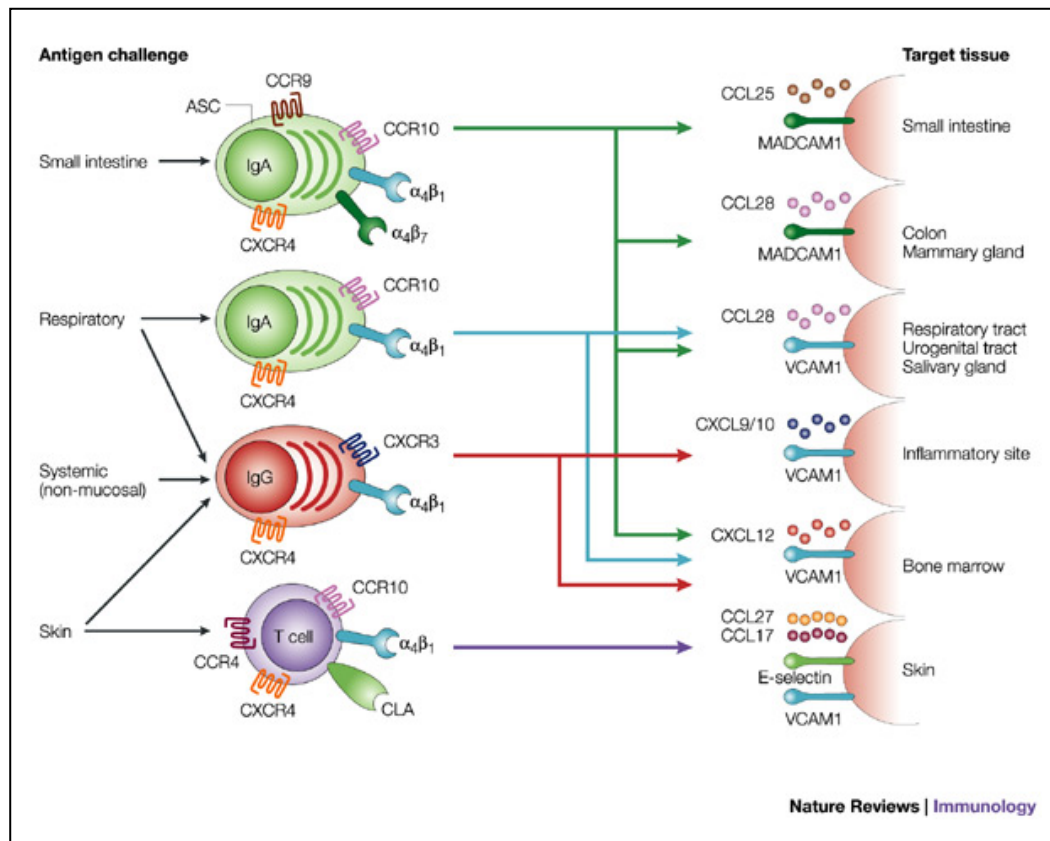


Figure 2 : Modèle de migration des cellules sécrétrices d'IgA et IgG dépendant de l'expression spécifique de molécules d'adhésion et récepteurs de chimiokines. Dans ce modèle, les cellules sécrétrices d'IgA induites dans l'intestin grêle peuvent migrer dans tous les sites muqueux, alors que celles induites par des antigènes respiratoires perdent l'expression de CCR9 et $\alpha_4\beta_7$ et ne peuvent migrer que dans les sites extra-intestinaux. Les cellules sécrétrices d'IgG expriment CXCR3 et $\alpha_4\beta_1$ et vont migrer dans les sites enflammés non muqueux et la moelle osseuse. Les lymphocytes T migrant dans la peau ont perdu l'expression de CCR9 et $\alpha_4\beta_7$ et ne peuvent entrer dans l'intestin. De même, les plasmablastes à IgA ont perdu l'expression de CLA et ne peuvent pas entrer dans la peau. (d'après Kunkel and Butcher, 2003).

B Le modèle de transmigration à plusieurs étapes

La migration des leucocytes entre les cellules endothéliales des capillaires se divise en une succession d'événements coordonnés (**Fig. 3**). Elle résulte d'un enchaînement de processus d'attachement, de roulement et d'adhésion par l'intermédiaire de molécules d'adhésion et de chimiokines (Butcher & Picker, 1996).

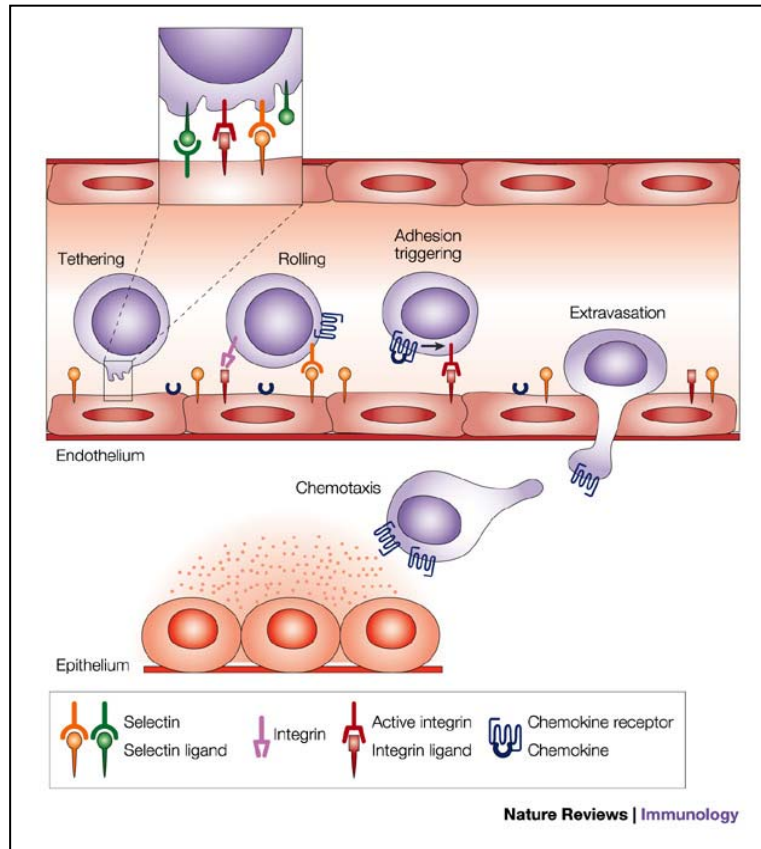


Figure 3 : Recrutement des lymphocytes. *Processus en plusieurs étapes (Kunkel & Butcher, 2003).*

On distingue quatre étapes successives :

- Une adhésion primaire transitoire, réversible, qui dure quelques secondes et un roulement du leucocyte sur la surface endothéliale. Elle est médiée surtout par les sélectines.
- Une activation leucocytaire également rapide, dépendante des chimiokines.
- Une adhésion ferme et stable à la surface endothéliale, contrôlée par les intégrines, prélude à la diapédèse.
- Une extravasation du lymphocyte à travers l'endothélium vasculaire vers les tissus.

Un recrutement préférentiel de certains leucocytes en fonction du tissu concerné et des besoins se réalise grâce aux chimiokines et à leur diversité. Les leucocytes pourront alors migrer dans les tissus selon un gradient de chimiokines. De façon imagée, on peut considérer le trio sélectines – chimiokines - intégrines comme constituant un code postal permettant à chaque sous-population leucocytaire d'être adressée vers le tissu concerné.

C Les molécules contrôlant le recrutement lymphocytaire

1 Les adressines vasculaires

Peripheral Node Addressin (PNA_d) : Présente sur la majorité des HEV (High Endothelium Venule), dans les amygdales palatines, pharyngiennes et le ganglion rétropharyngien (RetroPharyngeal Lymph Node-RPhLN). Son ligand est la L-sélectine (Baumhater *et al.*, 1993). Elle est impliquée dans la domiciliation des lymphocytes naïfs (Streeter *et al.*, 1988).

Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1 (MAdCAM-1) : Adressine vasculaire de la muqueuse digestive présente majoritairement dans la plaque de Peyer (Briskin *et al.*, 1997). Ses ligands sont l'intégrine $\beta 7$ et l'hétérodimère $\alpha 4\beta 7$ qui sont exprimés par les lymphocytes d'origine intestinale (Berlin *et al.*, 1993). Elle est exprimée dans la GM chez la souris et chez la truie (Tanneau *et al.*, 1999, Streeter *et al.*, 1988).

Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) : Elle est exprimée par différents types cellulaires tels que les cellules dendritiques folliculaires, les fibroblastes, les macrophages chez l'homme, la souris et le porc (Poerber & Cotran, 1990, Rice *et al.*, 1991). Ses ligands sont $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ (Osborn *et al.*, 1992). Son expression est induite en cas d'inflammation et jouerait un rôle dans le recrutement des lymphocytes activés mémoires (Bourges *et al.*, 2004).

2 Les récepteurs de domiciliation lymphocytaire

a Les sélectines

Ce sont des molécules caractérisées par la présence d'un domaine lectine à leur extrémité extracellulaire qui se lie fortement à des résidus sucrés. Il existe trois sélectines, une d'expression constitutive et deux qui sont inductibles (Rosen & Bertozzi, 1994) :

La L sélectine est présente sur tous les leucocytes sauf certains lymphocytes T mémoires (Berg *et al.*, 1991).

La E sélectine apparaît sur les cellules endothéliales quelques heures après leur activation par un stimulus inflammatoire (Masinovsky *et al.*, 1990).

La P sélectine est préfabriquée dans les plaquettes et les cellules endothéliales.

Les ligands des sélectines sont des structures polysaccharidiques complexes pouvant être portées par diverses protéines (Rosen & Bertozzi, 1994).

Les sélectines jouent un rôle déterminant dans la première étape d'adhésion qui vise à ralentir le lymphocyte dans le courant circulatoire en le faisant rouler à la surface de l'endothélium (Arbones *et al.*, 1994).

b Les intégrines

Les intégrines constituent une famille de plus de vingt molécules distinctes impliquées en majorité dans l'attachement de différents types cellulaires aux protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine) ou à des protéines de l'hémostase (fibrinogène) (Karecla *et al.*, 1995).

Pour exprimer leur propriété adhésive, les intégrines doivent subir une activation qui consiste en une modification de la structure tridimensionnelle de leur domaine extra-cellulaire (Butcher & Picker, 1996). Cette activation est assurée par les chimiokines.

3 Les chimiokines et leurs récepteurs

a Les chimiokines

Le terme chimiokine, contraction de « chemotactic cytokine », est utilisé pour désigner des molécules combinant des propriétés de chimioattraction et de cytokines. Les chimiokines permettent la migration des leucocytes du sang vers les tissus (Chung *et al.*, 2001a, Chung *et al.*, 2001b). Cette propriété est une réponse à un gradient de concentration qu'elles créent en s'immobilisant à la surface des cellules endothéliales. Elles aident donc à contrôler la spécificité du recrutement des lymphocytes dans les organes lymphoïdes et les tissus. Comme les cytokines, les chimiokines sont des protéines sécrétées par les leucocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les fibroblastes. Les chimiokines épithéliales interviennent dans le recrutement des lymphocytes des compartiments muqueux intestinaux et extra-intestinaux. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire, 70 à 130 acides aminés (Baggiolini, 2001). La classification des chimiokines se fait traditionnellement en fonction d'un motif d'acides aminés de l'extrémité aminotermine, incluant quatre cystéines conservées. Selon la position de ces quatre résidus cystéines conservés, quatre familles de chimiokines ont été identifiées :

- Les CXC (ou α chimiokine) dont les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé (16 membres).
- Les CC chimiokines (ou β chimiokine) dont les deux cystéines en position N-terminale sont adjacentes (28 membres).
- Les CX3C chimiokines (ou γ chimiokine) dont les deux premières cystéines sont séparées par trois acides aminés (1 membre : la fractalkine).
- Les chimiokines du groupe C (ou δ chimiokine) comprenant une seule paire de cystéines correspondant à la deuxième et quatrième cystéine (2 membres).

Une cinquantaine de chimiokines ont été décrites chez des mammifères (**Fig. 4**).

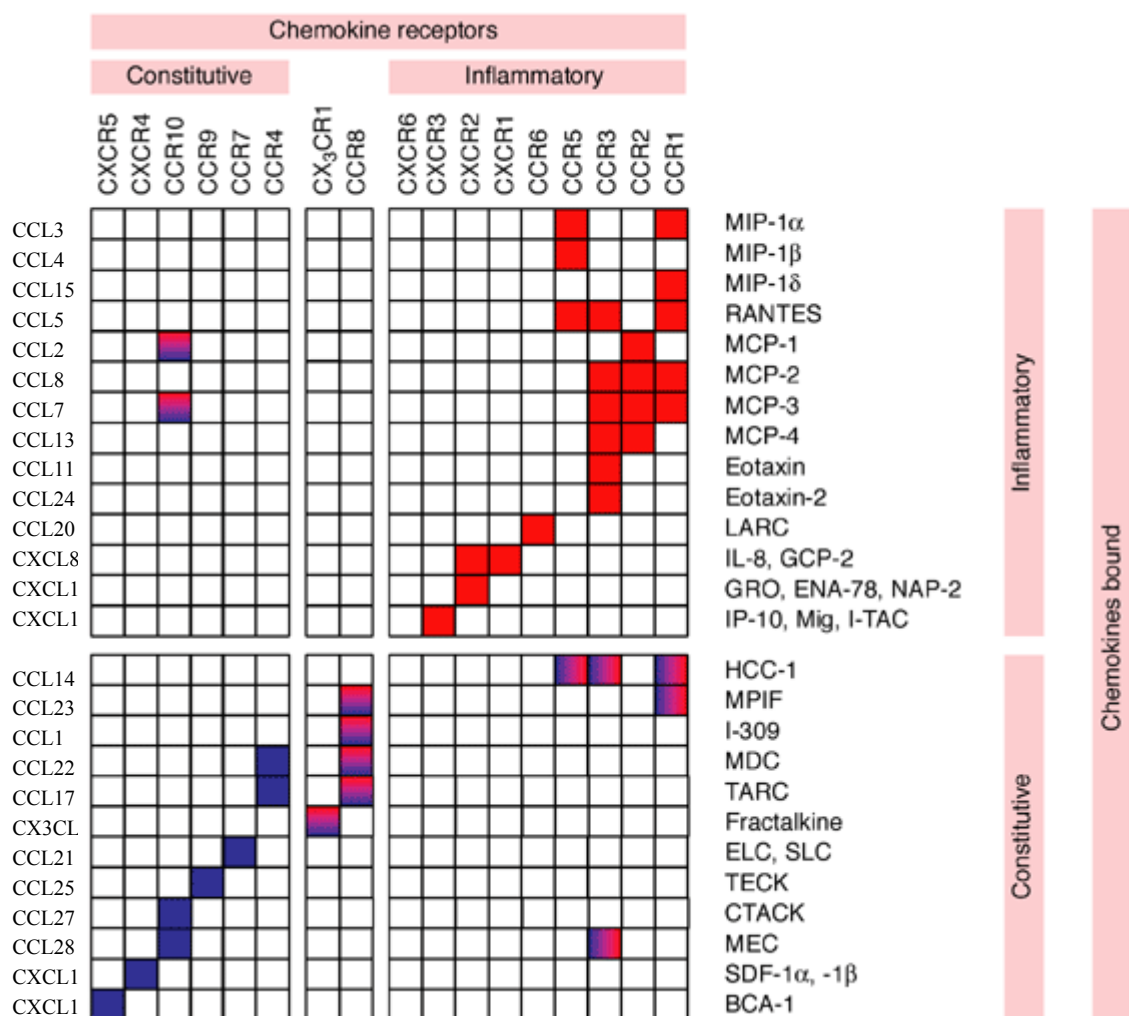


Figure 4 : Chimiokines et leurs récepteurs. Les chimiokines et leurs récepteurs sont classés par leur spécificité inflammatoire (boîte rouge) ou constitutive (boîte bleue). Quelques chimiokines ou récepteurs de chimiokines montrent une expression hétérogène (boîte rouge/bleue).

Abréviations anglaises : BCA-1, B-cell-attracting chemokine 1; CTACK, cutaneous T-cell-attracting chemokine; ELC, EBL-1-ligand chemokine; ENA, epithelial-cell-derived neutrophil attractant 78; GCP,

granulocyte chemotactic protein; GRO, growth-related oncogene; HCC, haemofiltrate CC chemokine; IL, interleukin; IP-10, interferon-inducible protein 10; I-TAC, interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant; LARC, liver- and activation-regulated chemokine; MCP, monocyte chemoattractant protein; MEC, mucosae-associated epithelial chemokine; Mig, monokine induced by interferon γ ; MIP, macrophage inflammatory protein; MPIF, myeloid progenitor inhibitory factor; NAP, neutrophil-activating peptide; RANTES, 'regulated on activation, normally T-cell-expressed and -secreted; SDF, stromal-cell-derived factor; SLC, secondary lymphoid tissue chemokine; TARC, thymus- and activation-regulated chemokine; TECK, thymus-expressed chemokine (d'après(Douglas et al., 2002).

Du point de vue fonctionnel, les chimiokines peuvent être réparties en trois catégories :

- Les chimiokines dites homéostatiques dont la production et la sécrétion sont constitutives. Celles-ci sont généralement impliquées dans le trafic lymphocytaire, la surveillance immunitaire et dans la localisation des lymphocytes avec leurs antigènes spécifiques (Fernandez & Lolis, 2002).

- Les chimiokines inflammatoires qui interviennent dans le recrutement des cellules effectrices de l'immunité au niveau des sites d'infection, d'inflammation et en cas de tumeur.

- Enfin, les chimiokines qui remplissent les deux fonctions dans l'homéostasie cellulaire et dans les phénomènes inflammatoires (Mantovani, 1999, Moser & Willmann, 2004).

Les chimiokines jouent également un rôle dans d'autres processus comme le développement embryonnaire, l'angiogenèse, l'auto-immunité et dans les phénomènes cancéreux (Godessart, 2005).

b Les récepteurs de chimiokines.

Les récepteurs de chimiokines appartiennent à la superfamille des protéines à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine GTP (GPCR). La structure des GPCR est caractérisée par la présence de l'extrémité N-terminal dans la partie extra-cellulaire. Les sept domaines transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles intracellulaires et trois boucles extra-cellulaires et la partie C-terminal intracellulaire (Horuk, 2001). Les récepteurs de chimiokines sont présents sur les leucocytes, les cellules endodermiques, mésenchymales, ectodermiques et neuro-ectodermiques.

Les chimiokines exercent leurs effets biologiques en se liant à leurs récepteurs présents sur la surface des cellules. La classification des récepteurs de chimiokines est fondée sur celle de la famille des chimiokines correspondantes. Les quatre sous-familles de récepteurs sont donc appelées

CCR, CXCR, XCR, CX₃CR. Seulement dix récepteurs CCR, six récepteurs CXCR, un récepteur CX₃CR et un récepteur XCR ont déjà été caractérisés chez l'homme (Moser & Willmann, 2004). Un récepteur peut se lier à plusieurs chimiokines de la même sous-famille et une chimiokine peut avoir plusieurs récepteurs (**Fig. 4**).

Les récepteurs de chimiokines jouent un rôle important dans la migration des leucocytes et dans les processus inflammatoires, et certains pathogènes utilisent ces récepteurs pour entrer dans l'organisme comme le virus VIH qui utilise les récepteurs CCR5 et/ou CXCR4 présents à la surface des lymphocytes T CD₄ (Springael *et al.*, 2005). Les chimiokines et leurs récepteurs sont devenus des cibles thérapeutiques potentielles face à des maladies telles que le cancer ou la maladie de Crohn (Godessart, 2005).

c Interaction entre la chimiokine et son récepteur

En l'absence de liaison à son ligand, le récepteur de chimiokine par sa partie C-terminal intracellulaire est couplé à la protéine G (sous forme GDP). Dans les tissus, les chimiokines sont liées aux macromolécules comme les glycosaminoglycanes. Ces liaisons leur permettent de garder leur activité chimiotactique et de rester confinées aux sites de leur production (Johnson *et al.*, 2005). Un modèle d'interaction entre une chimiokine et son récepteur a été proposé par Baggiolini (Baggiolini, 2001). Ainsi, les chimiokines CXC et CC ont deux sites majeurs d'interaction avec leur récepteur : un site d'ancrage qui se trouve dans la région de la boucle située après la deuxième cystéine et un site d'activation qui se situe dans la partie N-terminal de la chimiokine. Le récepteur par sa partie N-terminale reconnaît d'abord le site d'ancrage, cette interaction limite la mobilité de la chimiokine et facilite l'orientation appropriée de sa partie N-terminal qui se lie au niveau du site d'activation à la région des boucles extra-cellulaires du récepteur.

d Conséquence de l'interaction entre la chimiokine et son récepteur

Après la liaison haute affinité entre le récepteur par sa partie N-terminal et son ligand, il y a phosphorylation du GDP en GTP, puis dissociation de la protéine hétérotrimérique en sous-unités GTP α et $\beta\gamma$. Ceci conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC), qui va transformer le phosphatidylinositol diphosphate (PIP₂) en diacyl glycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP₃). Le DAG active les protéines kinases et l'IP₃ initie le flux de calcium intracellulaire. Toutes ces transductions activent la chimioattraction par modulation des mécanismes actines dépendants, mais

aussi les phénomènes de dégranulation, ce qui a pour conséquence le découplage du récepteur et de son ligand (Chensue, 2001, Moser & Willimann, 2004).

IV Transmission passive de l'immunité lactogène de la mère au jeune

A Généralités

Chez les mammifères, on distingue trois groupes d'animaux selon la placentation et la quantité d'Igs transmises (Brambell, 1970, Butler, 1974) :

- placentation hémochoriale : le transfert des IgGs se fait par ce type de placenta chez les primates, majoritairement en période prénatale. Chez les lagomorphes et les rongeurs, le placenta est semblable mais le transfert des IgGs se fait par l'intermédiaire du sac vitellin (Watson, 1980).
- placentation syndesmochoriale : ce type de placentation se retrouve chez les bovins et les caprins. L'imperméabilité aux anticorps *in utero* est due à la richesse du colostrum en IgGs essentiellement (Kraehenbuhl *et al.*, 1979).
- placentation épithéliochoriale : le groupe des porcins est caractérisé par une placentation de ce type qui est complètement hermétique, ainsi que d'un transfert des IgGs uniquement par le colostrum puis le lait.

L'immunité humorale sécrétoire est donc essentielle à la survie des nouveau-nés n'ayant pas subi de sensibilisation antigénique *in utero* comme chez le porc. En effet le tractus gastro-intestinal du nouveau-né est particulièrement sensible aux infections, avant la colonisation de l'organisme par les cellules T et les cellules sécrétrices d'anticorps. Le système immunitaire adaptatif de la mère peut apporter une protection passive au jeune au travers des anticorps ingérés présents dans le lait.

B La glande mammaire chez la truie

Le nombre de mamelles de la truie produisant du lait, parmi les 18 existantes, peut varier entre 6 et 20 (la moyenne étant de 14) en fonction du nombre de porcelets.

Le lait est synthétisé par les cellules épithéliales qui bordent les acini ou alvéoles mammaires. Ces cellules épithéliales prélèvent, dans la circulation sanguine, les éléments nécessaires à la synthèse des composants du lait. Une fois formé, le lait est sécrété dans la lumière des acini où il est conservé jusqu'au moment de la tétée. La contraction des cellules musculaires se trouvant autour de

chaque alvéole permet alors l'évacuation du lait de la lumière des acini vers les canaux, puis à l'extérieur de la mamelle.

C Le lait et ses constituants

Le lait est constitué à 90% d'eau. On y trouve également des protéines ~1% (caséines, protéines sériques), des glucides ~7% (lactose et saccharose), de la matière grasse ~4% (~150 molécules différentes mais majoritairement des triglycérides), des sels minéraux ~8% (calcium, phosphore, potassium, chlore, sodium, magnésium) et des vitamines (vitamines hydrosolubles B et C et liposolubles A, D et E).

Le lait apporte une immunité innée par ses substances antimicrobiennes et une immunité adaptative due à des molécules spécifiques que sont les anticorps (Dolan *et al.*, 1986).

L'immunité humorale systémique est transmise après la naissance par l'intermédiaire des IgGs du colostrum (qui est plus riche en IgG qu'en IgA). Chez la truie, les IgG et IgA constituent respectivement 75% et 19% du colostrum alors que dans le lait les IgA représentent 60% des Ig (Halsey *et al.*, 1982). Dans un premier temps le taux élevé d'IgG va permettre aux nouveau-nés, surtout ceux dépourvus de la transmission passive fœtale, d'acquérir un taux sérique en IgG comparable à celui de la mère. Ceci se fera par la perméabilité du tube digestif pendant les 36 premières heures qui suivent la naissance, les IgG migrent entre les cellules épithéliales. En revanche, l'immunité humorale muqueuse se transmet via les IgAs dimériques dans les sécrétions lactées. Contrairement aux IgGs, elles restent attachées *in situ* à la muqueuse de l'intestin du nouveau-né (Hanson *et al.*, 1983). Elles résistent mieux à la digestion enzymatique que les autres immunoglobulines et vont conférer une immunité passive locale au niveau du tube digestif des nouveau-nés. La protection passive des muqueuses du nouveau-né est donc dépendante de l'apport continu d'IgAs maternelles jusqu'au sevrage.

Ceci intervient de manière déterminante dans la protection du jeune vis-à-vis des infections entériques.

D Les immunoglobulines de type A

Principaux acteurs de l'immunité humorale des muqueuses, les IgA sécrétoires tapissent la paroi des muqueuses. Elles jouent un rôle essentiel dans l'exclusion des antigènes et la protection contre les infections en empêchant la fixation des bactéries et des toxines aux cellules épithéliales ainsi que l'absorption de substances étrangères. Elles constituent donc une ligne de défense contre une grande variété de pathogènes.

Les IgAs sont composées de deux monomères d'IgA reliés entre eux au niveau de leur fragment constant Fc par la chaîne de jonction J, et sont attachées à une pièce sécrétoire dont le rôle est de protéger les IgAs des enzymes protéolytiques présentes dans les sécrétions. Seules les IgA et IgM multimères, qui possèdent des chaînes J permettant la formation de complexes multimériques, peuvent se lier au récepteur poly-Ig (pIgR). Lorsque les IgA dimériques se lient à leur récepteur cellulaire, les immunoglobulines sont transportées à travers l'épithélium. Le récepteur est alors partiellement dégradé, donnant naissance à la pièce sécrétoire et libérant l'IgA sécrétée par exocytose.

L'origine des IgA du lait est double :

- transfert sélectif d'IgA sanguines dimériques (IgA-J-IgA) présentes dans la mamelle grâce à une pièce sécrétoire exprimée par les cellules épithéliales mammaires
- production locale et excrétion entre les acini de la GM d'IgAs par des plasmocytes.

E Origine des cellules sécrétrices d'IgAs

Des expériences ont montré que les sIgA du lait sont spécifiques des antigènes rencontrés dans l'intestin de la mère. En effet, la protection passive conférée par les IgA du lait est parallèle à l'environnement antigénique rencontré dans l'intestin maternel (Newburg & Walker, 2007). Ceci démontre bien l'existence du lien immun entéro-mammaire (Parmely & Manning, 1983, Roux *et al.*, 1977, Salmon *et al.*, 1984).

Ces IgA sont sécrétées par des plasmocytes à IgA dont la migration et la domiciliation vers les muqueuses dépendent à la fois des molécules d'adhésion (adressines, intégrines et sélectines) exprimées par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et des cytokines ayant une activité chimioattractante (chimiokines) présentes dans le tissu épithélial des muqueuses. Des études menées chez la souris et chez le porc ont montré que le recrutement et la domiciliation des plasmocytes à IgA dans la GM sont effectués à partir de la fin de gestation et pendant la période de lactation (Halsey *et al.*, 1982, Chabaudie *et al.*, 1993). Le recrutement de ces cellules rentre dans le cadre d'un lien immun à la fois entre le tractus digestif, le tractus respiratoire supérieur et la GM, mis en place grâce à l'interaction entre les molécules d'adhésion et les chimiokines et leurs récepteurs respectifs exprimés sur les cellules immunitaires (Tanneau *et al.*, 1999, Bourges *et al.*, 2007).

F Le pouvoir chimioattractant du lait

Dans le colostrum et dans le lait humain, on retrouve une diversité de chimiokines comme par exemple CXCL2, CCL5 et CCL2 produites par les cellules du lait mais aussi par les cellules épithéliales mammaires (Skansen-Saphir *et al.*, 1993, Michie *et al.*, 1998). Ces chimiokines participent au trafic des leucocytes du sang maternel vers le tissu parenchymateux de la mamelle.

L'activité chimiotactique au niveau de la GM a été mise en évidence par la présence dans le colostrum de lait de souris d'un facteur chimioattractant spécifiquement pour les plasmocytes à IgA (Czinn & Lamm, 1986).

V La chimiokine CCL28 ou MEC (Mucosae-associated Epithelium Chemiokine)

A Généralités

CCL28 est une chimiokine de 127 acides aminés avec un peptide signal de 22 acides aminés en N-terminal qui est exprimée principalement par les cellules épithéliales du côlon, de la glande salivaire, de la GM ou encore dans la trachée. Elle possède deux récepteurs, CCR3 et CCR10, ce dernier étant aussi le récepteur de la chimiokine CCL27 (C-TACK) exprimée essentiellement dans la peau. CCL28 exerce une activité chimioattractante vis-à-vis des cellules exprimant donc CCR3 (éosinophiles, mastocytes et granulocytes) et CCR10 exprimé notamment par les plasmocytes à IgA, les plasmablastes de la glande salivaire, de l'intestin grêle, du gros intestin, de l'appendice et des amygdales (Wang *et al.*, 2000, Pan *et al.*, 2000).

Par ailleurs il a été démontré que CCL28 exerce une activité antimicrobienne contre un ensemble de bactéries GRAM positif et négatif ainsi que des levures (Hieshima *et al.*, 2003).

B Expression de CCL28

1 Dans l'intestin

L'expression prédominante de l'ARNm de CCL28 par les cellules épithéliales du gros intestin, et à un plus faible taux au niveau de l'intestin grêle (et dans les autres tissus muqueux), rend cette chimiokine attractive pour jouer un rôle dans la localisation des plasmocytes à IgA vers ces sites (Kunkel *et al.*, 2003). En effet, des études effectuées chez la souris ont montré par immunohistochimie que les chimiokines CCL25 et CCL28 sont présentes dans l'intestin grêle et

que les plasmocytes à IgA expriment leurs récepteurs CCR9 et CCR10. Par ailleurs les cellules épithéliales du côlon expriment CCL28 et CXCL12 et les IgA ASC présentes expriment CCR10 et CXCR4.

2 Dans la glande mammaire

Des données ont montré, par hybridation *in situ*, la présence l'ARNm de CCL28 dans les cellules épithéliales acinaires humaines (Mickanin *et al.*, 2001). De plus, l'analyse en Western Blot a mis en évidence la présence de CCL28 dans le lait de la femme. D'autre part, des études menées chez la souris ont démontré que le niveau d'expression des ARNm de la chimiokine CCL28 dans la GM augmente au cours de la lactation (Wilson & Butcher, 2004, Bourges *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'étude sur la souris a montré que le traitement *in vivo* avec un anticorps anti-CCL28 bloque l'accumulation de plasmocytes à IgA dans la GM et conduit ainsi à un lait dépourvu d'IgA, se traduisant par une baisse du niveau des anticorps IgA dans les fèces de souriceaux comparé au niveau de ceux dont les mères étaient traitées par un anticorps isotypique.

Les auteurs ont donc proposé l'idée que CCL28 est un régulateur d'accumulation d'IgA-ASC dans la GM et, de ce fait, contrôle le transfert passif des anticorps sIgA de la mère à sa progéniture.

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats montre que CCL28 serait fortement impliquée dans le recrutement des plasmocytes à IgA dans la GM.

L'observation de l'augmentation de CCL28 au cours de la lactation nous conduit à penser qu'il y a peut-être une régulation hormonale de cette chimiokine, d'autant plus que l'on a démontré dans des modèles animaux que la prolactine régule l'expression du pIgR dans la GM (Kaetzel, 2005, Rincheval-Arnold *et al.*, 2002). Cette propriété de la prolactine contribue à accroître le transfert de l'immunité de la mère au petit.

C Régulations hormonales de la lactation

Pendant la grossesse et l'allaitement il y a une augmentation des niveaux d'hormones présentes dans le corps de la mère, notamment les glucocorticoïdes, hormones stéroïdes et entre autres la prolactine, hormone produite en grande quantité par l'hypophyse antérieure pendant la grossesse et l'allaitement (**Fig. 5**). Ces hormones ont en charge de nombreuses tâches cruciales, notamment le maintien de la grossesse et le remodelage des tissus mammaires, et stimulent la production du lait.

Il a été observé que certaines hormones sont responsables de modifications de la fonction immunitaire. Par exemple, en 2003, Peeva *et al.* ont démontré que la prolactine est capable d'influer

sur la survie des cellules B *in vivo* (Peeva *et al.*, 2003). Les hormones produites pendant la grossesse travaillent souvent en synergie pour augmenter l'expression des gènes (Doppler *et al.*, 1989).

Certains gènes (comme la protéine de la caséine du lait) exigent que la prolactine et le cortisol soient présents pour l'induction d'une forte expression, alors que chacun séparément ne peut induire qu'un faible niveau d'expression (Doppler *et al.*, 1989).

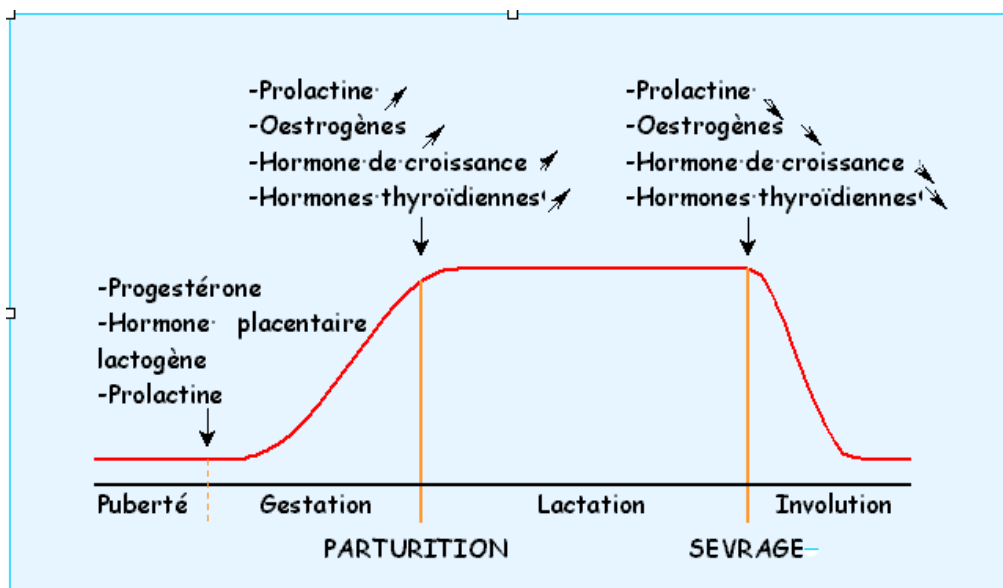


Figure 5 : Facteurs impliqués dans le développement et la différenciation de la mamelle.

(*Biology of mammary gland*: <http://mammary.nih.gov/>)

Rôle de la prolactine

Une grande partie de la prolactine présente dans le corps est produite par l'hypophyse antérieure en réponse à un certain nombre de signaux, comme l'ocytocine, la thyroïde (TRH), et d'autres hormones, dont la plupart sont produites dans l'hypothalamus (Elsholtz *et al.*, 1991).

La prolactine est normalement sous contrôle négatif par la dopamine, qui est également produite dans l'hypothalamus.

La prolactine est présente en permanence dans le sang à un faible taux. Ce taux de base augmente durant la grossesse de façon régulière. Celle-ci disparaît rapidement à la suite de la mise-bas et de la délivrance.

Vers le 3^{ème} jour de lactation, le débit sanguin augmente fortement, en particulier au niveau de la GM qui devient très productive (**Fig. 5**).

La prolactine permet la synthèse du lait dont la quantité augmente dès lors très rapidement. A chaque tétée, la stimulation des mamelles par la succion du nouveau-né provoque un pic de prolactine par rapport à son taux de base : cette prolactine va non seulement stimuler la production du lait mais aussi en devenir un des constituants.

Objectifs

Les recherches de notre équipe portent sur l'étude des mécanismes immunitaires chez le porc et surtout sur la protection des muqueuses. Au sein du laboratoire, nous avons mis en évidence un accroissement des plasmocytes à IgA à la mise en route de la lactation chez la truie de même que chez la souris (**Fig. 6**).

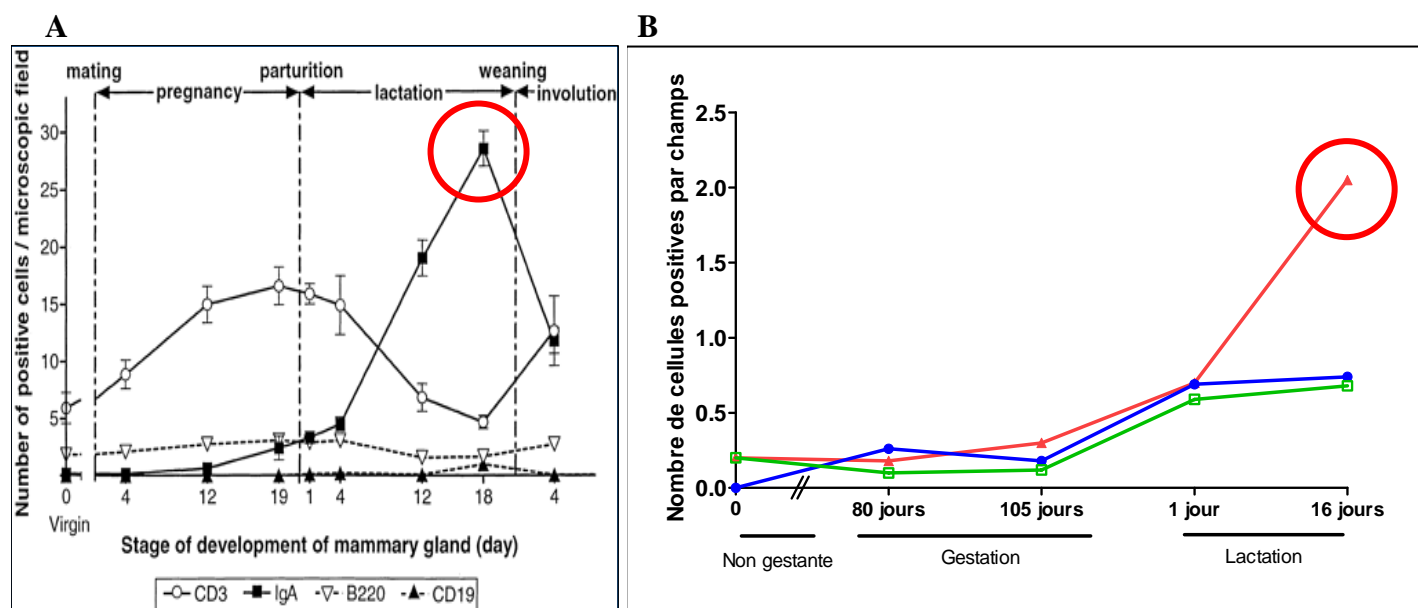


Figure 6 : Évolution des plasmocytes recrutés dans la glande mammaire. Coupes de tissu mammaire de souris (A) ou de truie (B) non gestante, gestante et en lactation. Légende souris (A) : IgA+ (■), CD3 (○), CD19 (▲), B220 (▽) (Tanneau et al., 1999), légende truie (B) : IgA+ (▲), IgG (□) et IgM+ (●) (Chabaudie et al., 1993).

Nous étudions les mécanismes de domiciliation des plasmocytes à IgA dans la GM, en vue d'augmenter les effets protecteurs du lait maternel pour la progéniture et pour la GM elle-même. Nous avons donc recherché chez la truie un facteur spécifique d'origine épithéliale qui soit sécrété dans le lait et capable d'induire la migration des plasmocytes à IgA au cours du développement de la GM. CCL28 a été décrite pour recruter les plasmocytes à IgA dans l'intestin et dans le tractus aérien supérieur chez la souris. Nous voulons poursuivre ce travail en étudiant le rôle et l'implication de la chimiokine CCL28 dans le recrutement des cellules plasmocytes à IgA et la domiciliation dans la GM de truie.

Par ailleurs, chez plusieurs espèces y compris chez le porc, la prolactine est impliquée fortement dans l'initiation et le maintien de la sécrétion lactée. Elle participe aussi à la

régulation de la transcription d'un certain nombre de gènes, ce qui fait de cette hormone une candidate potentielle qui pourrait avoir une action régulatrice sur CCL28.

L'objectif de mon travail a donc été de comparer l'évolution spatio-temporelle de la chimiokine CCL28 et de ses récepteurs dans la GM de truie, de caractériser les cellules qui sécrètent cette chimiokine dans le tissu mammaire, et enfin d'initier l'étude de sa régulation.

Matériels et méthodes

I Obtention des échantillons biologiques

Tous les prélèvements de lait, de cellules et de tissus utilisés proviennent de porcs miniatures consanguins d'une lignée histocompatible d'haplotype CMH d/d (complexe majeur d'histocompatibilité). Ces animaux présentent un grand intérêt notamment pour leur tolérance à la transplantation, et les lignées cellulaires dérivant de ces animaux ont une grande utilité grâce à leur profil d'histocompatibilité bien caractérisé. Ces porcs sont présents sur le site de l'INRA de Tours-Nouzilly depuis juin 1985 (Kaeffer *et al.*, 1990).

A Prélèvement de lait

Les échantillons de lait ont été prélevés sur des truies à 5 jours de lactation ayant reçu une injection en sous-cutané au niveau du cou de 5 ml d'ocytocine (50UI-*Rhône Mérieux*), 5 minutes (min) avant le prélèvement.

B Ultrafiltration du lait de truie

La purification des différentes fractions du lait a été effectuée en plusieurs étapes :

Dans un premier temps, nous avons procédé à un écrémage en pratiquant une première centrifugation à froid (4°C) de 2 000 g pendant 15 min. A partir du lait écrémé obtenu nous avons pratiqué ensuite une ultracentrifugation à 8 500 g pendant 1 heure (h) à 4°C de façon à décaséiner et obtenir du lactosérum. Celui-ci a été ensuite centrifugé dans des unités de filtration composées d'une membrane séparant à 10 kDa (UF10) ou à 30 kDa (UF30) (Vivaspin *Sartorius*). Ensuite, nous avons obtenu différentes fractions dans les ultrafiltrats par « reverse phase-high performance liquid chromatography » (RP-HPLC). La purification a été effectuée à l'INRA de Rennes (**Fig. 7**). L'activité chimioattractante de ces différentes fractions a été évaluée grâce à un test de migration en chambres *Neuroprobe*.

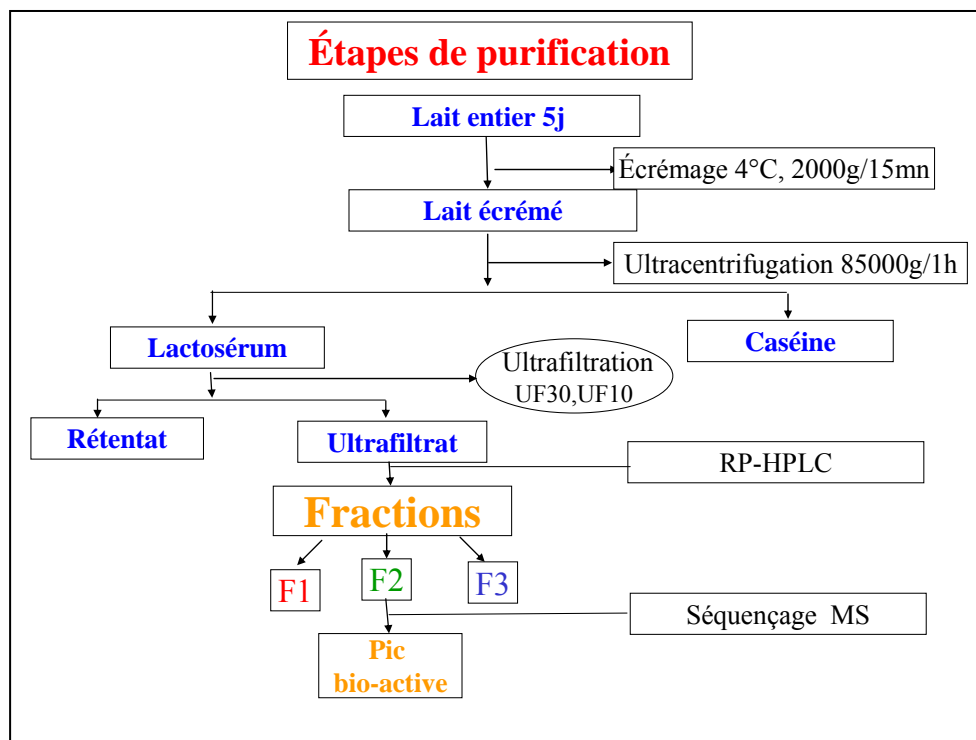


Figure 7 : Étapes de purification du lait de truie. Schéma représentant les différentes étapes effectuées successivement avant d'obtenir les fractions étudiées (d'après(de Jesus Rodriguez et al., 2009).

C Mise en culture des lymphocytes du MLN et de l'ILN

Les lymphocytes du ganglion mésentérique (MLN) ou du ganglion inguinal (ILN) ont été isolés des truies et conservés dans l'azote selon la méthode décrite par Abda (Abda *et al.*, 1998). Pour toutes les expériences, les lymphocytes du MLN et de l'ILN ont été décongelés et remis en culture toute la nuit. Brièvement, les lymphocytes ont été décongelés rapidement puis lavés dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté à 20% par du sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco), 1% de pénicilline/streptomycine, 1 mM de Pyruvate (Gibco), 2 mM de L-Glutamine (Gibco) et $5 \cdot 10^{-5}$ M de β -mercaptoéthanol. Les lymphocytes, à raison de 10^6 cellules/ml ont été cultivés pendant 18 h à 24 h à 37°C, et dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le lendemain, les cellules ont été récupérées et la surface de la flasque a été grattée pour décrocher les cellules adhérentes. Afin d'éliminer les cellules mortes, un gradient de ficoll-triosil à 14% (densité = 1,09-Pharmacia) a été effectué. Les lymphocytes ont été déposés sur le ficoll et centrifugés à 650 g pendant 15 min. Les lymphocytes ont été récupérés à l'interface entre le ficoll et le milieu de culture. La viabilité a été jugée par exclusion au bleu de trypan (Sigma).

D Purification des lymphoblastes du MLN et de ILN

Nous avons procédé à un tri cellulaire sur colonne magnétique (*Miltenyi*,) afin d'étudier la spécificité de l'activité chimioattractante vis-à-vis de différentes populations lymphocytaires.

Après avoir fait le comptage et le lavage des cellules en tampon (PBS stérile sans Ca^{++} ni Mg^{++} -PBS ss $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$), nous avons ajusté la suspension cellulaire à la concentration appropriée (10^8 cellules marquées). Les sites non spécifiques ont été bloqués en ajoutant 5 ml de sérum de porc.

Après trois lavages, le culot cellulaire a été incubé avec 5 ml du 1^{er} MAb (CD3-dilution 1/3000 (50 μl à 1.10^6 cellules), à 4°C pendant 30 min.

Ensuite, après trois autres lavages, le culot a été repris dans 1 ml de microBeads (*Miltenyi*) au 1/5 dans du tampon et incubé à 4°C pendant 30 min.

Enfin, après les trois derniers lavages, le culot de cellules a été repris dans 500 μl de tampon pour 10^8 cellules totales.

La séparation des fractions positives et négatives a été effectuée sur colonne magnétique miniMACS.

La colonne de séparation a été placée dans un aimant, puis lavée avec 500 microlitres (μl) de tampon.

Nous avons fait passer 500 μl de la suspension de cellules (10^8 cellules) dans la colonne. La suspension cellulaire qui en découle est notée comme la fraction négative.

La colonne a été lavée trois fois avec 500 μl de tampon et à chaque fois les effluents ont été collectés et ajoutés à la fraction négative.

Ensuite la colonne a été retirée de l'aimant et nous avons collecté la fraction positive en ajoutant 1 ml de tampon dans la colonne.

Note : afin d'incrémenter la pureté de la fraction positive (CD3+), les cellules éluées ont été passées à nouveau sur deux colonnes additionnelles.

Nous avons ensuite fait un contrôle au cytomètre en flux afin de déterminer le rendement et la pureté des fractions lymphocytaires triées avant et après la séparation magnétique grâce à un anti-IgG souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

E Mise en culture de la lignée lymphoblastoïde L14

Les cellules L14 sont conservées dans l'azote liquide. Pour toutes les expériences, les cellules L14 ont été utilisées en phase exponentielle (10^6 cellules/ml de milieu de culture pendant 24 h). Les cellules ont été décongelées rapidement, lavées et ajustées à 10^6 cellules par ml, dans du milieu RPMI 1640 (*Gibco*) supplémenté à 10% par SVF (*Gibco*), 1% de pénicilline/streptomycine, 1 mM de Pyruvate (*Gibco*), 2 mM de L-Glutamine (*Gibco*) et $5 \cdot 10^{-5}$ mM de β -mercaptoéthanol (*Sigma*). Les cellules ont été cultivées pendant 24 h à 5% CO₂, à 37°C. La viabilité des cellules a été jugée par le test d'exclusion au bleu trypan (*Sigma*).

F Biopsies mammaires

Les truies ont été anesthésiées à l'isoflurane (*Belamont*) 3% avec un flux d'1 litre d'oxygène par min. Les truies ainsi anesthésiées ont été placées en décubitus latéral. La peau a été lavée avec une solution aseptique et incisée sur 3 cm près d'un trayon. Après le prélèvement biopsique, nous avons appliqué un spray d'antibiotique (orospray-Sulfamide/Chlortétracycline/Parahydroxybenzoate de méthyl -*Vétéquinol*) sur la zone d'intervention et refermé l'incision avec des agrafes chirurgicales. L'intervention s'est déroulée dans les règles d'asepsie requises. Les biopsies de mamelle obtenues avec un punch biopsique ont été congelées enrobées dans un cryopréservateur (*tissuteck-OCT*) grâce à de l'isopentane à -70°C (*Carlo Erba*). L'isopentane a été descendu et maintenu à cette température grâce à de l'azote liquide. Cette technique permet de congeler les tissus de façon douce sans léser la structure et tout en gardant l'intégrité des ARNm.

Ensuite, les biopsies ainsi protégées ont été stockées à -70°C, emballées dans du papier d'aluminium.

G Culture de cellules épithéliales mammaires porcines

Les cellules épithéliales mammaires de porc (Porcine Mammary Epithelial Cell-PMEC) ont été obtenues auprès de l'Institut de Technologie Animale de Taiwan (*Sun et al.*, 2006). Après une décongélation rapide, les cellules ont été lavées et cultivées dans du milieu de

culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium/HAMF12 (DMEM-F12-*Lonza*) supplémenté avec 10% de SVF, 10 µg/ml d'insuline (*sigma*), 1 µg/ml d'Hydrocortisone (*sigma*). Les cellules ont été maintenues en flasque de 75 cm² avec un entretien bi-hebdomadaire. Pour différencier ces cellules en cellules épithéliales, elles ont été cultivées dans des plaques six puits (*Falcon*) sur une matrice de Matrigel (*BD Biosciences*) dilué au tiers en milieu sans SVF. Les cellules ont étéensemencées dans les puits à la concentration de 3.10⁵ cellules dans 4 ml de milieu avec ou sans prolactine porcine 5 µg/ml.

H Culture de cellules épithéliales intestinales porcines

1 Cellules jéjunales

Les cellules épithéliales intestinales porcines « intestinal porcine epithelial cell-1 » (IPEC-1) sont des cellules jéjunales de porcelet spontanément transformées ainsi que les cellules IPEC-J2 (Gonzalez-Vallina *et al.*, 1996). Elles ont été cultivées en présence du milieu de culture DMEM-F12 (*Lonza*) supplémenté avec 5% de SVF (*Gibco*), 2 mM de L-Glutamine (*Gibco*), 10 µg/ml d'insuline de pancréas bovin (*Sigma-Aldrich*), 5 µg/ml de transferrine (*Sigma-Aldrich*), 5ng/ml de sélénite de sodium (*Sigma-Aldrich*), 5 ng/ml d'epidermal growth factor (*Sigma-Aldrich*), et 100 unités internationales (UI)/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (*Sigma-Aldrich*). La culture a été effectuée dans des flasques de culture de 175 cm² (*Nunc*) avec un entretien par trypsinisation bi-hebdomadaire.

2 Cellules iléales

Les cellules épithéliales intestinales porcines IPI-2I ont été obtenues à l'INRA de Tours. Ces cellules de type iléal ont été immortalisées à partir de cellules primaires isolées d'un porc histocompatible d/d par le vecteur sv40 (Kaeffer *et al.*, 1993). Elles ont été cultivées en présence du milieu de culture DMEM 4,5 g de glucose supplémenté avec 10% de SVF (*Gibco*), 4 mM de L-Glutamine (*Gibco*), 1 µg/ml d'insuline de pancréas bovin (*Sigma-Aldrich*) et 100 unités internationales (UI)/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (*Sigma-Aldrich*). Pour l'entretien, la culture a été maintenue dans des flasques de culture de 175 cm² (*Nunc*) avec un entretien par trypsinisation bi-hebdomadaire.

Pour les études d'expression des chimiokines, les lignées cellulaires ont été cultivées en plaque six puits, soit sur plastique soit sur inserts pour les IPEC-1 et IPEC-J2.

3 Polarisation des cellules intestinales porcines *in vitro*

La différenciation et la polarisation des cellules ont été effectuées sur inserts microporeux de 0,4 µm de diamètre en polyéthylène téréphtalate (PET) (*BD Biosciences*) placés sur des plaques de six puits (*BD Biosciences*). Après remise en suspension des cellules, $3,5 \cdot 10^5$ cellules ont été placées dans chaque insert selon le même protocole que lors d'un passage. Les cellules ont été maintenues dans le milieu de culture DMEM-F12 supplémenté durant les deux jours nécessaires à la formation d'une monocouche confluente. Le milieu a alors été remplacé par un milieu de différenciation dans lequel, par rapport au milieu DMEM-F12 supplémenté, le SVF a été supprimé et une hormone, la dexaméthasone (*Sigma-Aldrich*), a été ajoutée à la concentration finale de 10^{-7} M. Cette hormone facilite et accélère la différenciation. Le milieu de culture a été remplacé trois fois par semaine. Après dix jours en présence de milieu de différenciation, la polarisation des cellules a été contrôlée par mesure de la résistance trans-épithéliale. Ces mesures ont été effectuées avec un voltmètre-ohmmètre (*Millicell-ERS, Millipore*).

II Étude des activités biologiques

A Activité chimioattractante des fractions du lait et de la chimiokine CCL28

L'activité chimioattractante du lait de truie ainsi que des différentes fractions obtenues par ultrafiltration et purification par HPLC a été testée dans une chambre de migration de chimiotactisme (*Neur probe*).

1 Description de la chambre de migration

La chambre de migration est constituée de deux plaques sur lesquelles se trouve un ensemble de puits. La plaque du fond en acrylique est creusée de 48 puits d'une contenance de 25 µl qui exposent une surface de 8 mm² chacun.

Au-dessus de la plaque inférieure est disposé un filtre de polycarbonate dont le diamètre des pores est de 8 µM.

Un joint de silicone perforé au niveau des puits est déposé sur le filtre. Ce dernier a pour rôle d'assurer l'étanchéité de la chambre.

La plaque supérieure, en acrylique également, est percée de 48 trous dont la disposition correspond à celle des puits de la plaque inférieure. Ces trous, qui forment des puits dont le fond est délimité par le filtre, peuvent recevoir 48 μ l de milieu contenant les cellules. Pour l'assemblage de ces éléments, on dispose de six vis réparties de façon équilibrée sur le pourtour de la chambre.

2 Remplissage des puits supérieurs et inférieurs

Remplissage des puits inférieurs

Il a été déposé 28 μ l de solution à tester dans les puits de la plaque inférieure de manière à former des ménisques positifs.

Le filtre de polycarbonate a été à son tour mis en place sur les puits après avoir été trempé dans du RPMI puis séché sur un papier absorbant. Ensuite le joint de silicone a été apposé ainsi que la plaque supérieure. Les vis ont été mises en place de façon légère au départ, puis fortement par un serrage simultané des vis diamétralement opposées.

Afin d'obtenir un équilibre thermique entre les différents composés « chimiotactiques », la chambre de migration a été placée dans une étuve à 37°C pendant 10 min.

Remplissage des puits supérieurs

Nous avons déposé 48 μ l de suspension cellulaire dont les concentrations désirées ont été ajustées avec du RPMI.

La chambre a été ensuite placée dans une étuve à CO₂ (37°C, 95% d'hygrométrie et 5% de CO₂) pendant une heure durant laquelle la migration s'est faite.

Afin de stopper la migration, la chambre a été retournée, dévissée puis désassemblée. Le filtre a été délicatement retiré avec des pinces.

3 Révélation et lecture du filtre

La face supérieure du filtre a été lavée dans du RPMI 1640 médium puis raclée le long d'un dispositif en caoutchouc pour enlever les cellules n'ayant pas migré. Le filtre a été alors plongé 1 min dans du méthanol pur pour fixer les cellules migratrices, puis séché à l'air ambiant sur une lame de verre.

La coloration a été faite par un contact de 4 min à l'hématoxyline, suivie d'une décoloration (rapide) dans de l'eau distillée. Le filtre a été séché à l'air libre.

Une fois sec, un « template » (film plastique percé de 48 trous qui, une fois mis en place, permet de repérer l'emplacement des puits sur le filtre) a été appliqué sur le filtre. Le comptage a été fait après dépôt d'huile au grossissement x 400 avec un microscope équipé d'objectifs à immersion, et ce, sur 16 champs microscopiques (High Power Fields-HPF).

Pour calculer la différence statistique nous avons utilisé un test *t*.

B Étude de la fixation de la chimiokine à son récepteur

Les récepteurs aux chimiokines étant des récepteurs à protéines G, nous avons voulu savoir si l'activité chimiotactique était corrélée à un flux calcique. Le Fluo-4 AM (*Invitrogen*) a la propriété de traverser la membrane externe des cellules (grâce à son groupement ester lipophile et au pluronic (F-127-*Molecular Probes*)) et de se fixer au calcium libre présent dans le cytosol. Une fois fixé au calcium, le fluorochrome a une excitation maximale à 494 nm et une émission maximale à 516 nm.

La fixation des peptides sur leurs récepteurs membranaires induit une cascade réactionnelle aboutissant à la synthèse de IP3 et à la libération intracellulaire de calcium (contenu dans le réticulum endoplasmique). Les ions calcium ainsi libérés se lient alors au Fluo-4 AM présent dans le cytosol ce qui modifie la longueur d'onde du rayon émis.

Les cellules L14 ont été divisées la veille des tests pour les utiliser en phase exponentielle.

Dans un premier temps, nous avons préparé une solution stock de fluo-4 AM (5 mM), puis une autre solution dite de charge (Fluo-4 à 2,5 mM) qui a été ensuite diluée avec du PBS ss $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ au 1/500 (soit 5 μM de Fluo 4 et 0,02% de pluronic final).

Pour le test, les cellules ont été centrifugées 350 g, 20°C, 15 min puis le culot a été repris dans 50 mL de milieu contenant : PBS ss $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ (2 fois).

Puis les cellules ont été numérées sur cellule de Malassez.

1 Charge des cellules en Fluo-4

Les cellules ont ensuite été reprises dans 2 ml de milieu de charge (préparé ci-dessus) afin d'obtenir une concentration de 1.10^7 cellules/ml. Puis elles ont incubé 45 min à 37°C (incubateur CO_2) avec le Fluo-4 AM.

2 Dé-estérification

Les cellules ont ensuite été reprises dans 30 mL de PBS ssCa⁺⁺Mg⁺⁺ et centrifugées 350 g, 20°C, 10 min (1 fois) en tube de 5 ml. Elles ont été reprises dans le même volume utilisé pour charger les cellules afin d'obtenir une concentration de 1.10^7 cellules/ml et 2 ml par ligand étudié, en RPMI 1640, 20 mM HEPES, 1 mg/mL BSA et incubées 30 min à température ambiante pour la dé-estérification.

Les cellules et les solutions sont gardées à 37°C (dans un bain-marie) et à l'abri de la lumière durant les acquisitions.

Le test de flux calcique a été effectué en ajoutant les molécules chimioattractantes (20 µl pour obtenir une dilution au 1/100) à la suspension cellulaire à l'intérieur du spectrofluorimètre (*PTI QuantaMaster C60*).

III Biologie moléculaire

A Extraction des ARN

Nous avons réalisé des extractions d'ARN à partir des cellules ou de biopsies conservées en Trizol (*Invitrogen*) à -80°C. Concernant les tissus, avant l'extraction, les échantillons ont subi une étape de lyse. Pour cela, les prélèvements ont été découpés au scalpel en trois morceaux (~10 mm³) représentatifs de la structure du tissu (épaisseur complète). Ils ont été placés dans des tubes du kit Precellys CK28 (*Bertin technologies*) auxquels on ajoute 1 ml de Trizol (*Invitrogen*). Ces tubes contiennent des billes de céramiques qui permettent la destruction mécanique des tissus. En effet l'utilisation du système *Fastprep* (*GMI*) qui combine une centrifugation et une agitation permet, via la présence des billes à l'intérieur des tubes, une destruction complète des tissus. Ensuite les échantillons ont été incubés pendant 5 min à température ambiante afin de permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques puis 200 µl de chloroforme (*Carlo Erba*) ont été ajoutés. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. A l'issue de la centrifugation, la phase aqueuse du chloroforme/phénol a été récupérée au-dessus de l'interface (anneau de protéines) et reprise dans 500 µl d'isopropanol (*Carlo Erba*). Après une incubation de 5 min, elle a été transférée dans les mini-colonnes du « Rneasy Minikit » (*Qiagen*). Enfin, après une série de lavages, nous avons récupéré les ARN dans 40 µl d'eau indemne de RNase (RNase free).

La concentration et la pureté des échantillons des ARN ont été ensuite contrôlées au *nanodrop* (spectromètre-*Thermo Scientific*) et pour certains au *bioanalyzer* (*Agilent*).

Pour la mise en évidence des transcrits d'ARN des chimiokines, nous avons utilisé deux techniques différentes : la PCR conventionnelle et la PCR quantitative (la RT restant commune aux deux techniques).

B Mise en évidence des transcrits par RT-PCR conventionnelle ou quantitative

Nous avons utilisé deux types de PCR pour mettre en évidence les transcrits d'intérêt.

1 Dessins des amorces

L'ensemble des amorces utilisées (**Tableau 1 et 2**) a été dessiné en utilisant le logiciel Clone Manager 9 (*Sci-Ed Software*, Cary, États-Unis) sur base d'*Expressed Sequence Tag* (EST). Toutes les amorces sont obtenues chez *Eurogentec*. Pour valider les paires d'amorces, l'efficacité et le coefficient de corrélation de chaque paire ont été calculés grâce à une PCR réalisée sur une gamme de dilution d'un mélange d'ADNc de référence.

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées pour la quantification des transcrits d'intérêt par PCR conventionnelle.

Amorce	Séquence 5'-3'	Tm	Nombre de cycles	Taille attendue
Cyclophiline (pCyclo)	(S) TAA CCC CAC CGT CTT CTT (AS) TGC CAT CCA ACC ACT CAG	58°C	30	369pb
Sérum Amyoïde (pSSA)	(S) TCT GAC ATG AGA GAG GCC AAC TAC (AS) GTC AGG CAG GCC ACG AGG TCT	55°C	35	270pb
CCL19 (pMIP3b)	(S) GGC ATC CTA TGC AGT CAC AC (AS) AAT GAG CAG GTA GCG AAA GG	60°C	35	157pb
CCL21 (pSLC)	(S) GAG CCG TCC ACT TCA CTC A (AS) TGG GGG TCT CAG TCC TCT TA	60°C	35	419pb
CXCL14 (pBRAK)	(S) AGC GAG TGG AGC CAG GAG (AS) CTG ATC GGT GTG ACG TTT TC	59°C	40	458pb
CXCL12 (pSDF1)	(S) CAG TGT CCC CAG TGT GTC AG (AS) CCT TCC CTC AGC AGA AGG TT	60°C	35	446pb
CCL28 (pMEC)	(S) ATG CAG CAG AGA GGA CTT GC (AS) CAA GTC ACA ATC CCC ATC C	55°C	35	180pb
CCL25 (pTECK)	(S) AGG GAC CCA GTA GGC TTT GT (AS) CGC ACA CCA TCT TGT CTT TC	60°C	35	284pb

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour la quantification des transcrits d'intérêt par qPCR. Chaque paire d'amorces possède une température d'hybridation adéquate. Les séquences d'origine ayant permis la conception des amorces et la taille attendue des amplicons sont indiquées. L'ensemble des paires d'amorces dispose d'une efficacité supérieure à 90% et d'un coefficient de corrélation proche de 1.

Amorce	Séquence 5'-3'	Température d'hybridation (°C) de la paire d'amorces	Taille de l'amplicon (pb)	N° d'accèsion NCBI, PEDE blast ou EST
RPL-19 <i>Ribosomal protein L19</i>	(S) AAC TCC CGT CAG CAG ATC C (AS) AGT ACC CTT CCG CTT ACC G	60°C	147pb	AF435591
HPRT-1 <i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	(S) GGA CTT GAA TCA TGT TTG TG (AS) CAG ATG TTT CCA AAC TCA AC	55°C	91pb	DQ845175
TBP-1 <i>TATA box binding protein</i>	(S) AAC AGT TCA GTA GTT ATG AGC CAG A (AS) AGA TGT TCT CAA ACG CTT CG	60°C	153pb	Nygaard et al. 2007
CCL28 (pMEC)	(S) CTG CTG CAC TGA GGT TTC AC (AS) CAG CAG CCA AGT CAC AAT CC	55°C	101pb	NM_001024695
CCL25 (pTECK)	(S) ACC TGC CTG CTG TGA TAT TC (AS) TCC GAT TGT CCA GGA TCT TC	60°C	105pb	NM_001025214

2 Transcription inverse

La transcription inverse (Reverse Transcriptase-RT) s'est déroulée en deux étapes : un traitement à la DNase de l'ARN qui permet de prévenir d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique, puis la transcription inverse.

Pour la première étape, nous avons ajouté à 2 µg d'ARN, 1 µl de DNase Amp grade 1 U/µl (*Invitrogen*) et 0,9 µl de 10X DNase I reaction Buffer (*Invitrogen*). Nous avons complété par de l'eau "RNase free" pour un volume final de 9 µl.

Après 15 min à température ambiante, la réaction a été stoppée par l'ajout de 1 µl d'EDTA 25 mM et une incubation de 10 min à 65°C.

Pour synthétiser de l'ADNc, 1,3 µl d'Oligo dT (*Eurogentec*) a été ajouté avant d'être incubé 10 min à 65°C.

Ensuite 4 µl de tampon 5X, 2 µl de dNTP 20 mM (*Eurogentec*), 1,9 µl d'eau milliQ et 0,8 µl d'enzymes MuMLV 25 U/µl (*Eurogentec*) ont été mélangés ; 8,7 µl de ce « mix » ont été répartis dans les échantillons.

Ensuite, le tout a été incubé 90 min à 37°C pour la polymérisation, puis une incubation de 10 min à 93°C a été effectuée pour inactiver l'enzyme à la fin de la réaction. Les ADNc ont été ensuite stockés au congélateur (-20°C).

3 PCR conventionnelle (semi-quantitative)

La réaction PCR est réalisée dans un volume final de 25 µl contenant les composés suivants :

-H ₂ O	qsp 25 µl
-tampon PCR (10x)	2,5 µl
-dNTP mix	0,2 mM de chaque
-amorces sens	1 µM
-amorces anti-sens	1 µM
-polymérase	2 unités ou 0,2 µl
-matrice ADN	50 à 100 ng

L'amplification est faite dans un thermocycleur (*Mastercycler–Eppendorf*). Les températures sont choisies pour optimiser la température de dénaturation de la matrice et la température optimale pour l'activité de la polymérase (pfu polymérase de *Promega*). Le programme utilisé comprend :

- une première dénaturation à 94°C – 5 min
- 35 cycles comprenant chacun : une dénaturation à 94°C – 30 s, une hybridation à 62°C – 1 min, une élongation à 72°C-1 min
- une élongation finale à 72°C-7 min

Les produits de PCR ont ensuite été analysés en gel d'agarose à 1,5% contenant 0,5 µg de BET par ml de gel (**Annexe 1**). La migration se fait à 120 V dans la solution de migration TBE 0,5x. La visualisation des acides nucléiques se fait sous rayons U.V. au Fluorchem 8900 (filtre 2-*Alpha Innotech*).

4 PCR quantitative

Cette variation de la PCR conventionnelle donne une mesure quantitative de l'ADN amplifié. C'est un agent intercalant, le SYBR green (*Eurogentec*) qui permet la quantification. Dans les puits d'une plaque 96 puits (*Biorad*) nous avons déposé 2 µl d'ADNc dilué au dixième puis 6,25 µl de SYBR Green Super Mix contenant Taq polymérase, fluorochrome, dNTP (*Eurogentec*), 0,25 µl de chaque amorce et 3,75 µl d'eau "RNase free".

La plaque a été scellée avec un film approprié (*Biorad*) avant d'être brièvement centrifugée. L'amplification et les mesures ont été effectuées dans l'appareil *Chromo 4* (*Biorad*), selon le programme suivant : une première étape de dénaturation de 30 s à 98°C suivie de quarante cycles. Chacun est composé de 15 s de dénaturation à 95°C tandis que l'hybridation et l'élongation sont réunies dans une seule étape de 30 s à la température d'hybridation optimale pour une paire d'amorces, enfin une lecture de la fluorescence a été effectuée par le thermocycler *Chromo 4* (*Biorad*). Pour finir, l'appareil réalise une courbe de fusion faisant passer les échantillons de 55 à 95°C par tranches de 1°C. Cette courbe permet de vérifier la spécificité de chaque PCR par observation de la température de dénaturation des amplicons.

Les données ont été ensuite recueillies et analysées par le logiciel *Opticon Monitor 3* (*Biorad*).

Les résultats sont exprimés en données relatives les unes aux autres par rapport aux gènes de référence de chacun des échantillons.

C Microdissection au laser

La technologie « LCM », pour Laser Capture Microdissection, utilise un laser infrarouge de basse énergie permettant d'activer un film thermosensible se trouvant au-dessus des cellules ou du tissu d'intérêt.

Les cellules sont capturées grâce à des capsules recouvertes du film qui se trouve alors au-dessus des zones d'intérêt. L'appareil dirige le laser à travers la capsule pour activer le film sur les cellules d'intérêt. Ces cellules adhèrent alors au film lorsque la capsule est soulevée du tissu. Les cellules d'intérêt sont ensuite microdisséquées instantanément alors que le tissu environnant reste intact sur la lame.

La capsule est placée directement dans un microtube contenant la solution de lyse pour en extraire l'ARN. Le laser n'altère pas l'échantillon tissulaire, la qualité des acides nucléiques et des protéines est conservée ainsi que la morphologie des tissus.

1 Préparation des coupes

La température du Cryomicrotome s'élevait à -24°C pour la chambre de coupe et de -22°C pour le spécimen, et les coupes ont été effectuées à une épaisseur de 8 microns.

Ensuite les lames ont été mises dans de l'alcool à 70% à -20°C pour commencer la déshydratation qui comporte plusieurs bains successifs et précis :

- Alcool 50%	20 s pour la fixation	
- Crésyl violet	20 s pour la coloration	
- Alcool 75%	5 s	} Lavages
- Alcool 95%	1 min	
- Alcool 95%	1 min	
- Alcool 100%	1 min	} Déshydratation
- Alcool 100%	1 min	
- Xylène	5 min	
- Xylène	5 min	

Les lames ont été séchées à l'argon et mises sous vide en attendant la microdissection.

Après microdissection, le tampon d'extraction du kit (*Pico Pure RNA Isolation Kit – Ambion*) a été appliqué sur la capsule (caps) et la lame afin de récupérer les cellules, ensuite les échantillons ont été incubés 42°C pendant 30 min puis stockés à -20°C .

2 Extraction des ARN

Dans un premier temps, les colonnes de purification (*PicoPure RNA Kit*) ont été "pré-conditionnées" 5 min avec 250 μL de tampon de conditionnement (CB) déposés sur les membranes des colonnes. Ensuite une centrifugation à 16 000 g pendant 1 min a été pratiquée.

Les échantillons dans lesquels ont été ajoutés 50 μL d'éthanol à 70% ont été déposés sur les membranes des colonnes. Celles-ci ont été centrifugées 2 min à 100 g pour fixer les ARN sur les membranes puis à nouveau centrifugées 30 s pour extraire le filtrat.

Ensuite, après un lavage des colonnes avec 100 μL Wash Buffer suivi d'une centrifugation d'1 min à 8 000 g, une étape de DNase a été faite. 40 μL DNase du mix préparé selon la notice du kit ont été déposés sur les membranes, et incubés pendant 15 min.

Plusieurs lavages suivis de centrifugation ont ensuite été effectués.

Enfin, le tampon d'éluion (13 μ L pour les caps et 30 μ L pour les lames) a été déposé sur les membranes pendant 1 min. Les colonnes ont été ensuite centrifugées 1 min à 16 000 g pour éluer l'ARN. Après analyse des ARN sur puce Agilent pico, ceux-ci ont été stockés à -80°C avant la RT. Toute la purification a été faite à température ambiante.

3 Transcription inverse

La microdissection laser nous ayant donné des quantités très faibles d'ARN (de l'ordre de 2 pg/ μ l pour les caps et 40 pg/ μ l pour les lames), nous avons utilisé la Superscript III pour faire la RT.

D Clonage et production de pCCL28 recombinante

1 Digestion enzymatique

Le plasmide d'expression procaryote pQE-30 de *Qiagen* et l'ADN porcin de CCL28-P (avec peptide signal-P) sont chacun digérés par les enzymes de restriction BamHI et HindIII. Carte du plasmide : (**Annexe 2**).

Le milieu réactionnel été composé de :

- ADN	3 μ g (plasmide)/48 μ l (produit PCR)
- Enzyme de restriction 1	2 μ l
- Enzyme de restriction 2	2 μ l
- Tampon 10x	6 μ l
- H ₂ O milliQ	q.s.p. 60 μ l

La digestion a été effectuée pendant 1 h à 37°C. Après digestion, les ADN ont été purifiés suivant le Kit *QIAprep Spin Miniprep* de *QIAGEN* (**Annexe 3**).

2 Ligation

Pour la ligation, le milieu réactionnel utilisé était composé de:

- Plasmide	~ 100 ng
- Insert	~100 ng
- Tampon 10x	2 μ l
- T4 ligase	1 μ l
- H ₂ O milliQ	q.s.p. 20 μ l

La ligation a été faite à 15°C pendant une nuit.

3 Transformation du *coli*

Le plasmide utilisé possède une séquence de résistance à l'ampicilline. Nous avons utilisé la méthode de transformation par choc thermique. La bactérie compétente utilisée était l'*E. coli* TG1. Les bactéries compétentes TG1 sont stockées à -80°C , 50 ng de plasmide recombinant contenus dans 5 μl ont été ajoutés aux bactéries décongelées et maintenues pendant 20 min dans la glace. Puis ce mélange a été mis au bain-marie à 42°C pendant 90 s et remis brusquement dans la glace. Ensuite 1 ml de milieu Luria Bertani (LB) (**Annexe 4**) a été ajouté et le mélange a été incubé 1 h à 37°C sur agitation (130 rpm). La culture a été centrifugée pendant 2 min à 18 000 g et le culot a été repris dans 100 μl de milieu LB et ensemencé dans des boîtes LB/ampicilline (LB/amp) (**Annexe 4**) à raison de 20 μl et 80 μl dans chaque boîte. Après une incubation d'une nuit à 37°C , les colonies isolées (vérifiées positives -CCL28⁺- par PCR) ont été ensemencées dans du milieu LB/amp et incubées une nuit à 37°C sur agitation (170 rpm).

Les souches bactériennes ainsi obtenues ont été stockées volume à volume avec 25% de glycérol à -80°C .

4 Préparation des plasmides pour vérification

Pour la préparation de plasmide, le milieu LB/amp a été ensemencé avec la préculture d'une nuit (ci-dessus) à raison de 1/500 à 1/1 000 puis incubé pendant 12-16 h à 37°C sous forte agitation. La culture a alors été centrifugée et le culot gardé pour la purification des plasmides. La purification des plasmides a été effectuée suivant le protocole de *QIAGEN*. (**Annexe 3**).

Les plasmides obtenus ont été envoyés chez *GenomeExpress* ($\sim 6 \mu\text{g}$ d'ADN) pour vérifier la présence de l'insert (CCL28).

5 Production de la protéine recombinante CCL28

a Expression de la chimiokine CCL28 recombinante

La production de protéine recombinante a été faite par induction de la culture de bactéries transformées. La répression de la traduction au niveau de l'opéron LAC est levée par l'addition dans le milieu de culture de l'inducteur l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG).

Une préculture de bactéries d'une nuit a étéensemencée au 1/20 dans du milieu LB/amp puis incubée à 37°C sur agitation. Quand la D.O. de la culture a atteint 0,5 à 0,7, l'IPTG a été ajouté à une concentration finale de 1 mM.

La culture a été de nouveau incubée à 37°C sur agitation pendant 5 h, puis elle a été centrifugée à 4 000 g pendant 20 min. Le culot a été gardé à -20°C jusqu'à la purification de la protéine.

b Purification de CCL28 recombinante sous conditions natives

Principe de la colonne Ni-NTA Agarose

La protéine recombinante produite par le plasmide recombiné pQE-30-MEC est une protéine présentant une queue 6xHistidine dans sa partie N-terminale (6xHis Tag). La purification des protéines recombinantes a été réalisée suivant le protocole de *Qiagen* sur une colonne de Ni-NTA Agarose (Nitriloacetic acid couplé au nickel). Cette dernière est composée de Ni-NTA couplé au Sepharose CL-6B et offre une grande capacité de liaison et un minimum de liaisons non spécifiques. L'élution de la protéine recombinante a été effectuée sur un gradient croissant d'imidazole qui va se lier d'une manière compétitive à la matrice.

Préparation de lysat de bactérie

Le culot de culture bactérienne induite a été placé dans de la glace pendant 15 min et repris dans du tampon de lyse à 10 mM d'imidazole (**Annexe 5**) à raison de 4 ml de tampon de lyse pour un culot de 50 ml de culture. Les membranes bactériennes ont été alors cassées par congélation dans de la carboglace et par décongélation dans de l'eau froide. Ensuite, la suspension a été traitée avec du lysosyme à une concentration finale de 1 mg/ml et incubée dans la glace pendant 30 min. La suspension a été soniquée plusieurs fois pendant 10 s par intervalles de 10 s jusqu'à obtention d'une suspension claire. Le lysat obtenu a été centrifugé à 8 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été séparé du culot lui-même repris dans du tampon de lyse. Cette étape permet de savoir si la protéine induite se retrouve dans le culot ou le surnageant.

Des extraits de culot et de surnageant ont été analysés sur un gel de polyacrylamide en conditions SDS-PAGE pour mettre en évidence la présence ou l'absence de la protéine induite.

c Purification de la protéine recombinante

Dans un premier temps, un volume de Ni-NTA Agarose a été mélangé avec quatre volumes de surnageant, puis le mélange a été agité doucement à 4°C pendant 1 h 40. Le mélange a été déposé dans une colonne *Qiagen*, puis la fraction non fixée a été recueillie. La colonne a été lavée quatre fois avec le tampon de lavage à 20 mM d'imidazole (**Annexe 5**) et les fractions de lavages ont été récupérées (W20). Ensuite, la colonne a été lavée une seconde fois avec le tampon de lavage à 50 mM d'imidazole (**Annexe 5**) (W50). Les protéines ont été finalement éluées avec le tampon d'éluion à 250 mM d'imidazole (**Annexe 5**) par fraction de 0,5 ml et gardées à 4°C. Les fractions éluées ont été analysées sur gel SDS-PAGE pour estimer le degré de pureté après la purification. Les fractions représentatives de la protéine ont été stockées à 4°C en présence de PMSF (phénylméthylsulfonyl fluoride) à 1 mM.

d Mise en évidence de l'expression de la chimiokine CCL28

Afin de mettre en évidence l'expression de CCL28, nous avons fait une électrophorèse SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) en condition dénaturante.

Deux gels d'acrylamide ont été préparés : un gel de tassement à 5% d'acrylamide/bisacrylamide de pH=6,8 et un gel de séparation à 15% d'acrylamide/bisacrylamide de pH=8,8.

Les compositions des gels, du tampon de charge, du tampon de migration sont données à l'**annexe 6**.

Les extraits à faire migrer ont été mélangés volume à volume avec le tampon de charge SDS-PAGE. Le mélange a été porté au bain-marie bouillant pendant 10 min.

Un indicateur de poids moléculaire a été déposé afin d'estimer la taille des protéines révélées.

A l'issue de la migration, le gel a été coloré avec le mélange méthanol/acide acétique/eau 40:50:10 à 0,2% de *Coomassie Blue Brilliant* pendant 2-3 h puis décoloré avec le mélange méthanol/acide acétique/eau 25:65:10. Les bandes de protéines apparaissent colorées en bleu.

E Étude protéomique

1 Western Blot

Nous avons vérifié la présence de la chimiokine CCL28 dans le lait de truie ainsi que la production de la protéine recombinante.

Après avoir été délipidés, les échantillons ont été dénaturés par chauffage et chargés en tampon SDS, avant d'être déposés dans des puits d'un gel de polyacrylamide 15%. Après une migration par électrophorèse (90V-110V), un transfert sur une membrane de nitrocellulose a été effectué durant 1 h à 110 mA. La membrane de nitrocellulose a été colorée au rouge ponceau pour contrôler l'efficacité du transfert des protéines. Après décoloration, la membrane a été saturée toute la nuit à 4°C dans du tampon PBS-BSA. Le lendemain, après un lavage dans du tampon PBS-Tween, la membrane a été incubée avec un premier anticorps de chèvre anti-CCL28 humaine (0,2 µg/ml-*R&D*) pendant 1 h 30. La révélation a été effectuée avec un anticorps secondaire anti-chèvre biotinylé (0,2 µg/ml-*Dako*) suivie d'un complexe streptavidine couplé à de la peroxydase (174 ng/ml-*Dako*). Quatre lavages des membranes de 15 min chacun ont été pratiqués entre chaque incubation.

Après incubation avec le Supersignal (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate de *PIERCE* composé de Luminol et de peroxyde), la lecture des membranes de nitrocellulose a été effectuée avec un appareil muni d'une caméra sensible à la chimiluminescence (*Fluorchem 8900*).

Les compositions des diverses solutions et tampons sont présentées en **annexe 6**.

2 Mise en évidence de la localisation des chimiokines par immunohistologie

Nous avons réalisé des marquages sur coupes de biopsie mammaire pour localiser la chimiokine CCL28.

Les coupes ont été réalisées à -30°C à une épaisseur de 5 µm. Elles ont ensuite été fixées 10 min dans de l'acétone à -20°C, séchées et stockées emballées à -80°C.

3 Marquage enzymatique

Dans un premier temps, après la réhydratation des coupes, nous avons bloqué les sites non spécifiques avec du sérum de porc, bloqué la peroxydase endogène avec l'eau oxygénée ainsi que la biotine endogène par un complexe avidine/biotine de chez *Dako*.

L'anticorps de chèvre anti-CCL28 humain biotinylé (10 µg/ml -R&D) ainsi que son contrôle isotypique ont été incubés pendant 45 min. Après trois lavages en PBS, la révélation du marquage a été effectuée avec le complexe Streptavidine/péroxydase (10 ng/ml-Dako). Puis le substrat enzymatique (AEC) a été déposé pendant 5 à 8 min en fonction des contrôles. Ensuite une contre-coloration a été réalisée à l'hématoxyline pendant 10 min, suivie d'un montage entre lame et lamelle avec un milieu aqueux (Faramout-Dako). Entre chaque incubation, trois lavages en PBS ont été effectués. Tous les marquages ont été réalisés à température ambiante.

Les photos des coupes ont été réalisées avec le logiciel Analysis couplé à une caméra *Olympus* fixée à un microscope (*Olympus*).

4 Double marquage en fluorescence

Les mêmes blocages que précédemment ont été effectués. Le protocole détaillé est présenté en **annexe 7**.

Puis les anticorps fluorescents (FITC-vert ou RPE-rouge) primaires (anti-CCL28, anti-cytokératine 18, anti-myosine, anti-cellules endothéliales ou les contrôles isotypiques) ont été déposés et incubés pendant 45 min. Les deuxièmes anticorps suivant le double marquage désiré ont également été incubés 45 min. Les lames ont été montées en milieu adapté à la fluorescence (*Dako*). Entre chaque incubation trois lavages en PBS ont été effectués. Tous les marquages ont été réalisés à température ambiante.

Les photos des coupes ont été réalisées avec le logiciel AnalySis couplé à une caméra *Olympus* fixée à un microscope (*Olympus*).

Résultats

I Mise en évidence dans le lait de truie d'un peptide chimioattractant vis-à-vis des lymphocytes B du MLN et de l'expression de son ARNm dans la glande mammaire

Des études antérieures effectuées dans l'équipe, à la fois chez la souris et le porc, ont montré un accroissement des plasmocytes à IgA lors de la mise en route de la lactation. Cette accumulation étant contemporaine de la production de lait, nous avons réalisé des tests de chimioattraction à partir de fraction du lait afin de vérifier s'il existe un facteur chimioattractant dans le lait, ce qui permettrait son isolement en quantité utilisable à des fins opérationnelles, tant *in vitro* (tests biologiques) qu'*in vivo* (injection sous la peau pour attirer les plasmocytes).

A Chimioattraction des fractions du lait

1 Vis-à-vis de cellules totales du MLN

Des tests de chimioattraction ont été réalisés à partir de lait de truie et avec la fraction récoltée après ultrafiltration (10 kDa). Ces tests ont été effectués à la fois vis-à-vis d'une lignée lymphoblastoïde, les cellules L14 obtenues au laboratoire à partir de mini-porc histocompatibles SLA d/d, des lymphocytes extraits à partir du ganglion mésentérique (MLN) ainsi que de ceux extraits du ganglion inguinal (ILN).

Les tests de chimiotactisme mettent en évidence une activité chimioattractante sur la lignée de cellules B avec les ultrafiltrats de <10 kDa (**Fig. 8**). Nous avons alors purifié par RP-HPLC les peptides présents dans cette fraction. Deux peptides ont été identifiés par HPLC en phase reverse et par spectrométrie de masse, ayant respectivement une masse moléculaire de 2,7 kDa (DMREANYKNSDKYFHARGNYDAA) et de 1 kDa (RPPGLPDKY) et ayant une activité chimioattractante qui appartient à la famille des protéines du sérum amyloïde A mammaire (analyse BLAST).

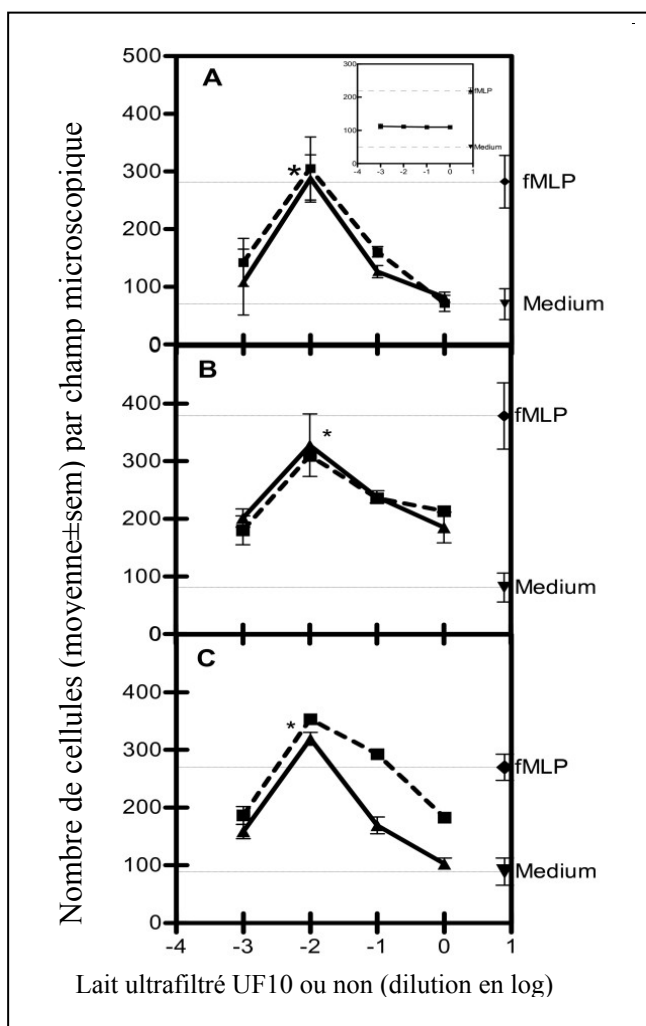


Figure 8 : Activité chimioattractante des fractions du lait de <10 kDa vis-à-vis de cellules lymphoblastoïdes porcines. Chimioattraction du lait avant (▲-▲) et après ultrafiltration (■-■). Lignée lymphoblastique (A), lymphocytes issus du MLN (B) ou lymphoblastes issus de l'ILN (C). Dans l'encadré, chimioattraction du retenta sur la lignée cellulaire. La migration spontanée et celle induite par le fMLP (10^{-6} M) sont indiquées par les lignes horizontales. Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules adhérentes pour quatre champs microscopiques dans trois tests indépendants, excepté pour l'ILN ($n=6$), chacun a été effectué en triplicata. * $p < 0.05$ en comparaison avec la migration spontanée (de Jesus Rodriguez et al., 2009).

2 Vis-à-vis de cellules B triées

Afin de vérifier leur spécificité de recrutement vis-à-vis des lymphoblastes, nous avons trié la population de cellules CD3⁺ (représentant les cellules T) ainsi que les cellules B (**Fig. 9**) et utilisé pour ce test les ultrafiltrats <10 kDa ainsi que deux peptides de synthèse correspondant aux séquences des peptides identifiés par HPLC.

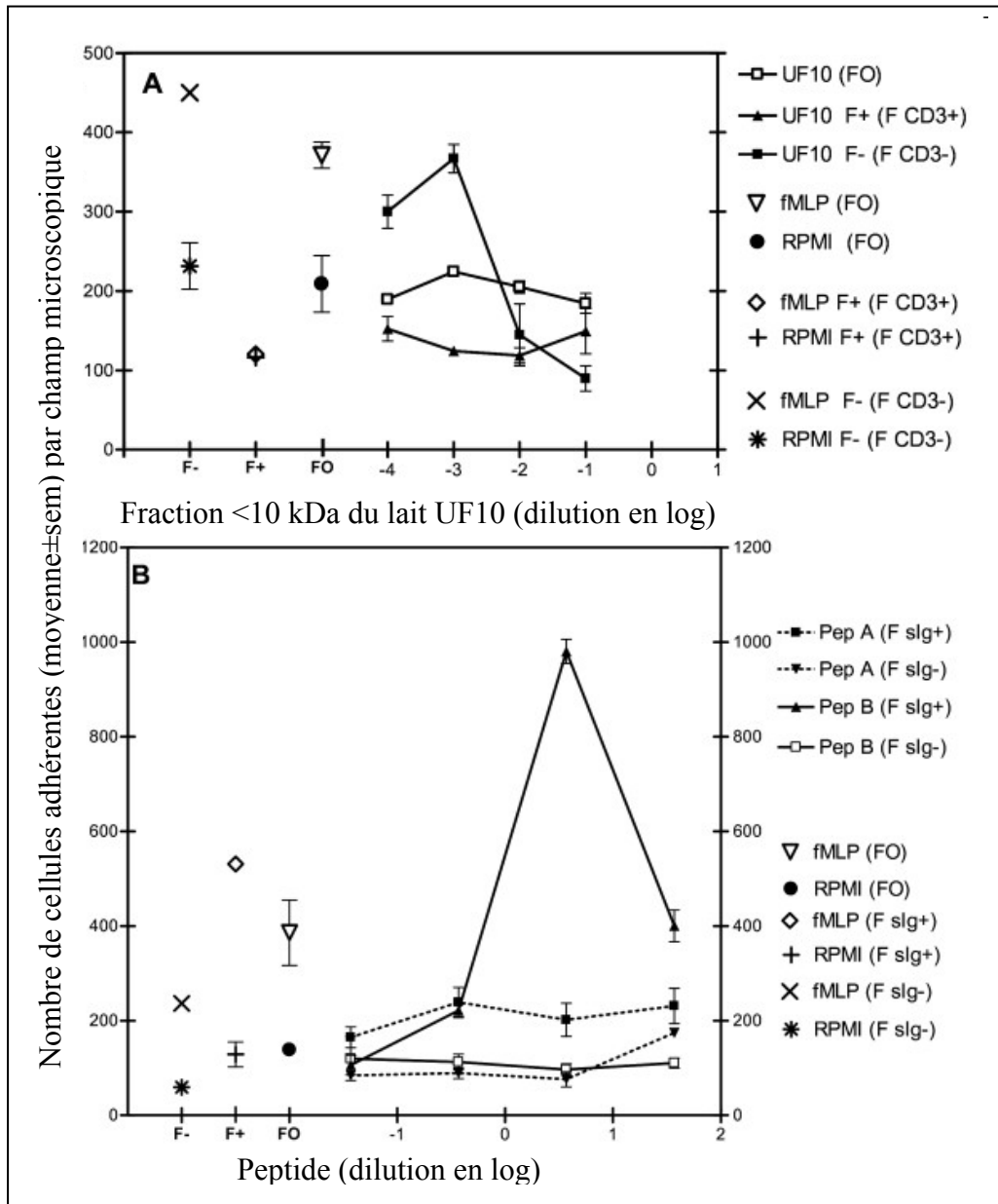


Figure 9 : Activité chimioattractante des fractions du lait de <10 kDa (A) et des peptides de synthèse (B) vis-à-vis des fractions de lymphocytes du MLN enrichies en CD3 ou déplétées en cellules B sIg+ porcines. A) Activité chimioattractante de la fraction <10kDa du lait (UF10), du témoin chimioattractant (fMLP 10^{-6} M) et migration spontanée (RPMI) vis-à-vis des fractions CD3+ (F+), CD3- (F-) et des cellules avant tri (FO). B) Activité chimioattractante du peptide de synthèse de 1042 Da (PepA) ou de celui de 2735 Da (PepB) vis-à-vis des fractions enrichies en cellules B sIg+ (F sIg+) ou de la fraction déplétée des cellules B sIg+ (F sIg-). Migrations contrôles correspondantes (fMLP 10^{-6} M et RPMI). Les résultats sont exprimés en moyennes de cellules adhérentes \pm SEM pour quatre champs microscopiques.

Les résultats montrent une forte activité chimioattractante du peptide B de 2735 Da vis-à-vis de la fraction de cellules enrichies en lymphocytes B (de Jesus Rodriguez et al., 2009).

Les résultats obtenus avec ce test montrent une forte activité du peptide B sur les cellules IgA+.

Ce peptide présentant une forte homologie de séquence avec une partie de la protéine du sérum amyloïde (SAA), nous avons alors vérifié la présence de l'ARNm de cette protéine dans la mamelle.

B Cinétique d'expression de l'ARNm de SAA dans la mamelle

La cinétique d'expression de l'ARNm de la SAA a été réalisée sur des prélèvements effectués par biopsie sur la GM de truie à différents temps pendant la gestation et pendant la lactation. Cette expression a été comparée à un gène de référence (la cyclophiline) (**Fig. 10**). Puis une analyse semi-quantitative a été réalisée.

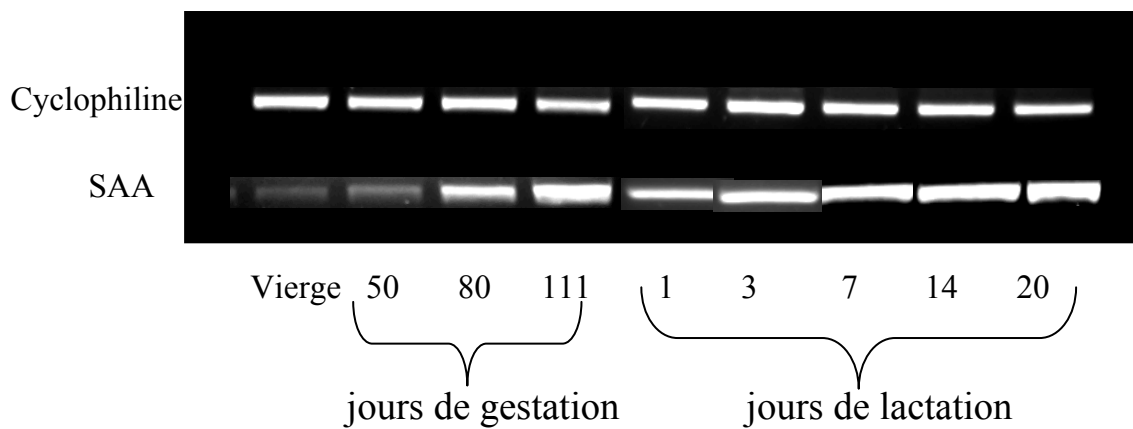


Figure 10 : Expression des ARNm de SAA dans la GM de truie. Biopsies de GM de truie durant la gestation et la lactation (expression déterminée par RT-PCR semi-quantitative).

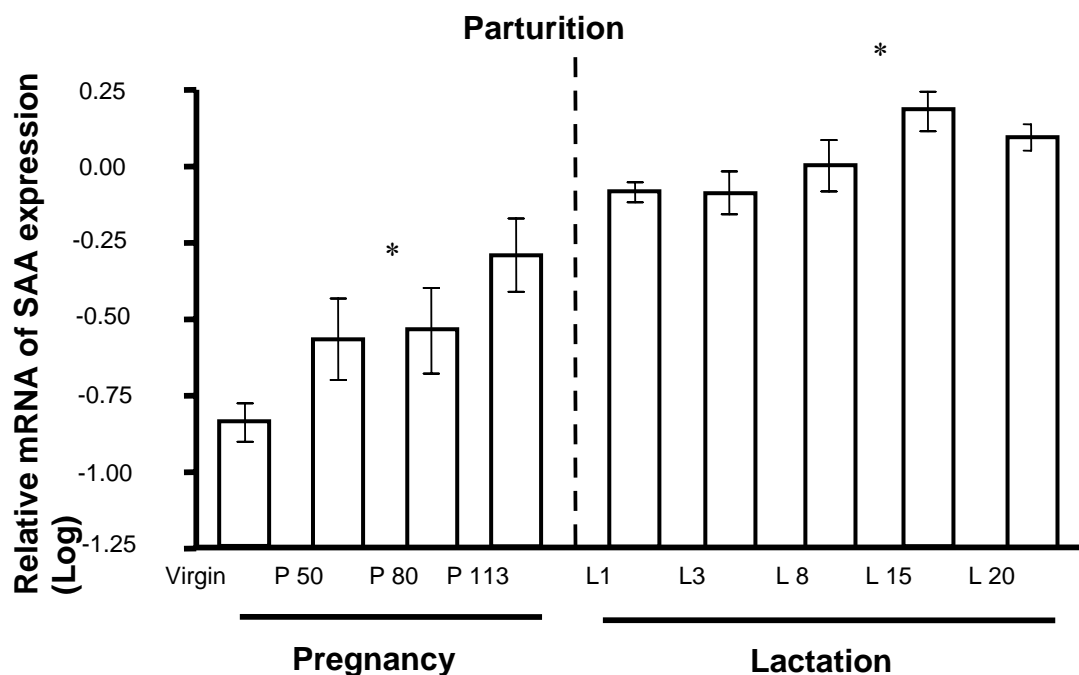


Figure 11 : Cinétique d'expression dans la GM des mRNA de SAA. Biopsie de GM des truies non gestantes, en gestation ou en lactation. Après migration sur gel, l'intensité relative est obtenue après une normalisation du signal de la cyclophiline (moyenne \pm sem de 2-3 animaux). (*) Entre le jour 80 de gestation et le jour 15 de lactation: $p < 0.05$ par test t (de Jesus Rodriguez et al., 2009).

Le niveau d'expression des ARNm de la SAA s'accroît de façon significative pour atteindre un maximum au 15^{ème} jour de lactation (**Fig. 11**). Les ARNm de SAA n'étant pas uniquement présents en lactation comme pour la cinétique des plasmocytes, nous nous sommes alors intéressés à d'autres molécules connues pour leur activité chimioattractante et plus particulièrement aux chimiokines produites par les cellules épithéliales. En revanche, nous envisageons l'implication de SAA dans le recrutement de lymphoblastes B dans le tractus intestinal des nouveau-nés qui l'ingèrent lors de la tétée. Cela concernerait d'autres études que nous n'avons pas faites.

II Évolution de l'expression des chimiokines épithéliales dans la mamelle en relation avec la gestation et la lactation

A Mise en évidence de l'augmentation sélective de l'ARNm de CCL28

Afin de déterminer si une chimiokine serait susceptible d'agir plus spécifiquement sur les lymphoblastes entrant dans le tissu mammaire pendant la lactation, nous avons étudié

l'expression de plusieurs chimiokines épithéliales impliquées dans le recrutement des lymphocytes.

Cette étude a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative sur des biopsies de GM de truies non gestantes, gestantes, en lactation et trois jours après le sevrage.

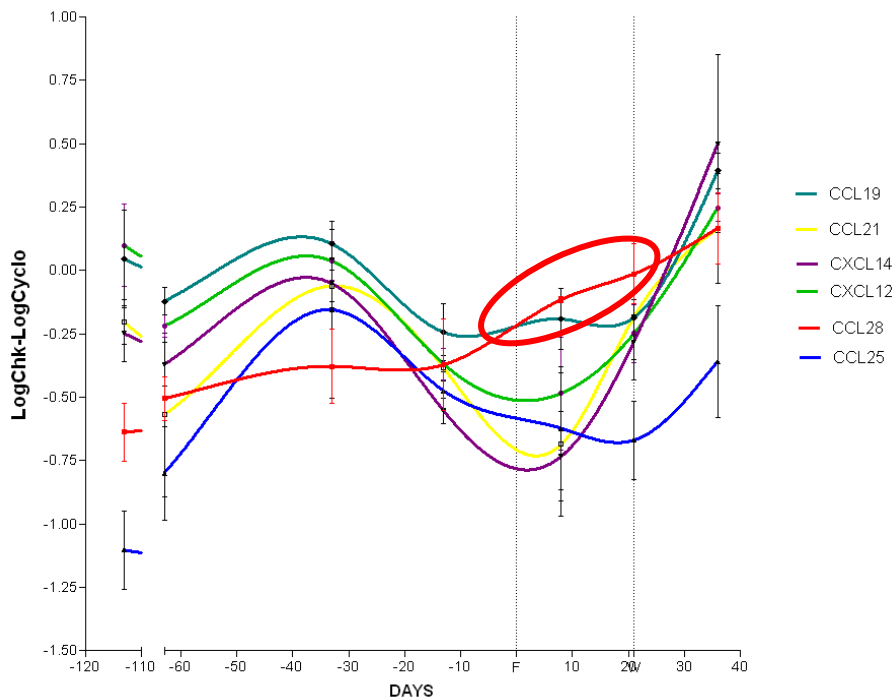


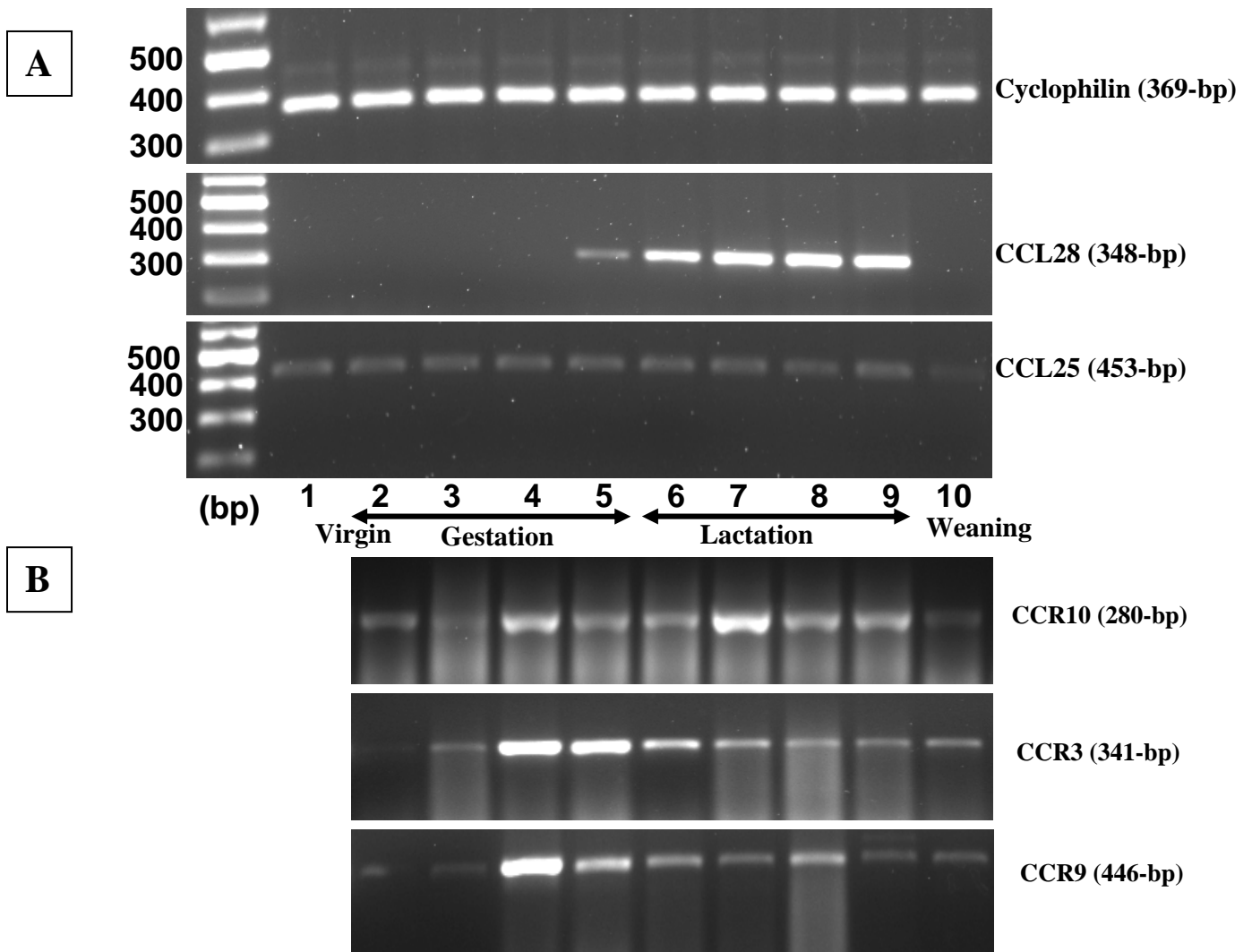
Figure 12 : Évolution de l'expression de l'ARNm de différentes chimiokines. Mise en évidence par RT-PCR sur des biopsies de mamelle de truie durant la gestation et la lactation (MB-Mise-Bas, S-Sevrage)(Bourges et al., 2008).

Les résultats obtenus montrent que, parmi les chimiokines épithéliales, CCL19 (MIP3- β), CCL21 (SLC), CXCL14 (BRAK), CXCL12 (SDF-1), CCL25 (TECK), seule CCL28 a un profil d'expression augmentant en lactation parallèlement à l'accroissement du nombre de lymphoblastes à IgA (**Fig. 12-dans l'ellipse- et Fig. 13-A**). Afin de conforter notre choix d'étudier plus spécifiquement CCL28, nous avons alors regardé l'expression de ses récepteurs lymphocytaires.

B Évolution des récepteurs lymphocytaires en relation avec la cinétique de CCL28

1 Analyse de l'ARNm

Nous avons étudié les cinétiques d'expression des récepteurs de CCL28 (CCR10 et CCR3 sur les lymphocytes) comparativement à celui de CCL25 (CCR9), chimiokine épithéliale impliquée dans le recrutement des lymphocytes dans l'intestin. Cette étude est réalisée par RT-PCR conventionnelle après extraction d'ARN sur des prélèvements de mamelle de truie à différents stades de la gestation et de la lactation (**Fig. 13-B**).



1 : truie vierge; 2 : 50 jours G; 3 : 83 jours G; 4 : 105 jours G; 5 : 113 jours G; 6 : 3 jours L; 7 : 9 jours L; 8 : 16 jours L ; 9 : 20 jours L ; 10 : 3 jours après le sevrage.

Figure 13 : Comparaison entre la cinétique des chimiokines CCL28 et de CCL25 et de leurs récepteurs.

A. Analyse, par RT-PCR, de l'expression des chimiokines pCCL28 et pCCL25. B. Analyse, par RT-PCR, de l'expression des récepteurs lymphocytaires CCR10 (CCR3 et CCR9) (Berri et al., 2008).

Les résultats montrent (**Fig. 13-B**) que CCR10 (l'un des récepteurs de CCL28) est plus fortement exprimé en fin de gestation et au cours de la lactation alors que CCR3 (l'autre récepteur de CCL28) et CCR9 (récepteur CCCL25) seraient exprimés en fin de gestation et faiblement en lactation.

La cinétique de CCR10 correspond donc bien à CCL28 ainsi qu'à celle des lymphocytes IgA⁺ trouvée antérieurement en lactation. Néanmoins, on observe la présence de l'ARNm de ce récepteur en gestation, suggérant la présence de cette chimiokine.

2 Localisation des lymphocytes CCR9⁺ et CCR10⁺ dans la glande mammaire

Nous avons réalisé des coupes à partir de biopsies afin de faire des marquages immunohistochimiques pour voir quelles sont les cellules portant ces récepteurs.

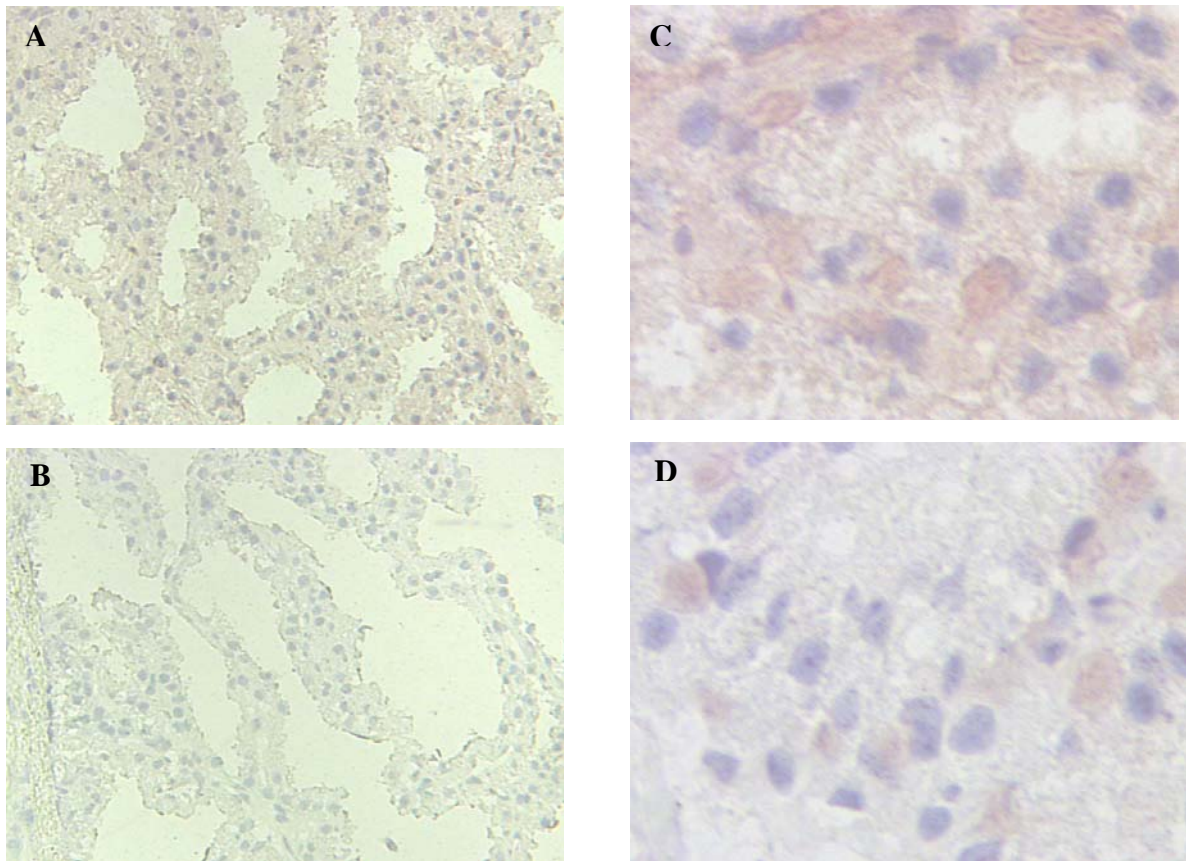


Figure 14 : Mise en évidence des différents récepteurs CCR9 et CCR10 sur coupes de GM à 15 jours de lactation.

(Marquage immunohistochimique) A : CCR9 ; B : Contrôle isotypique de CCR9 ; C : CCR10 ; D : contrôle isotypique de CCR10.

Nous avons testé plusieurs anticorps anti-CCR10 et anti-CCR9 (anticorps anti-humain) qui ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants (**Fig. 14-A**). Le marquage est diffus et difficile à interpréter et les concentrations à utiliser sont tellement fortes que les contrôles isotopiques sont légèrement marqués non spécifiquement (4 µg/ml -*Abcam*- pour le CCR9 et 20 µg/ml -*Santa Cruz*-pour le CCR10) (**Fig. 14-B**). Nous avons donc un problème d'outils, n'ayant pas d'anticorps anti-CCR9, CCR10 et CCR3 spécifiques porcins. Nous pensons faire produire des anticorps polyclonaux par immunisation chez la poule (les séquences sont très conservées chez les mammifères et donc la vaccination entre eux est peu immunogène). Une autre solution serait de produire une protéine recombinante CCL28 possédant à son extrémité la partie Fc des immunoglobulines.

III Localisation de la chimiokine CCL28 dans le tissu mammaire et détection de son ARNm dans les cellules épithéliales

CCL28 étant décrite comme présente dans le lait, nous avons voulu confirmer qu'elle était synthétisée dans les cellules épithéliales mammaires. Les chimiokines sont des peptides de faible poids moléculaire très conservés entre espèces et le taux d'homologie de séquence entre la protéine porcine et humaine est de 84% ce qui offre l'avantage de pouvoir utiliser l'anticorps anti-humain.

Sequence 1: gi|67010007|ref|NP_001019866.1 127 aa
Sequence 2: gi|46854771|gb|AAH69532.1|_CCL 127 aa

Sequences (1:2) Aligned. Score: 84.252%

Sus scrofa	MQHTGLALVALAACVALHHSEAILPIASSCCTEVSHHISRLLERVNTCR
Homo sapiens	MQQRGLAIVALAVCAALHASEAILPIASSCCTEVSHHISRLLERVNMCR
	** : *** : *** . * . *** ***** **

Sus scrofa	LQRADGDCDLAAVILHVKRRRRCVSPHNHLIKQWMKEQAAKKDAKGNICH
Homo sapiens	IQRADGDCDLAAVILHVKRRRRCVSPHNHTVKQWMKVQAAKKNGKGNVCH
	: ***** : ***** ***** : *** : **

Sus scrofa	KKKHHSKRNSKGAHQEKHETHGHKTPY
Homo sapiens	RKKHHGKRNSNRAHQKHEHYGHKTPY
	: **** . ***** : *** ***** : *****

Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW

Nous avons considéré les zones de la mamelle comprenant les acini d'une part et les canaux d'autre part (**Fig. 15**).

A Immunolocalisation de la protéine CCL28

La localisation de l'expression de la chimiokine a été faite en immunohistochimie sur des coupes de mamelle. Nous avons donc réalisé des doubles marquages en immunofluorescence pour vérifier la co-localisation du marquage de CCL28 avec celle des marqueurs spécifiques des cellules épithéliales, et ce afin de vérifier la production de CCL28 par ces cellules.

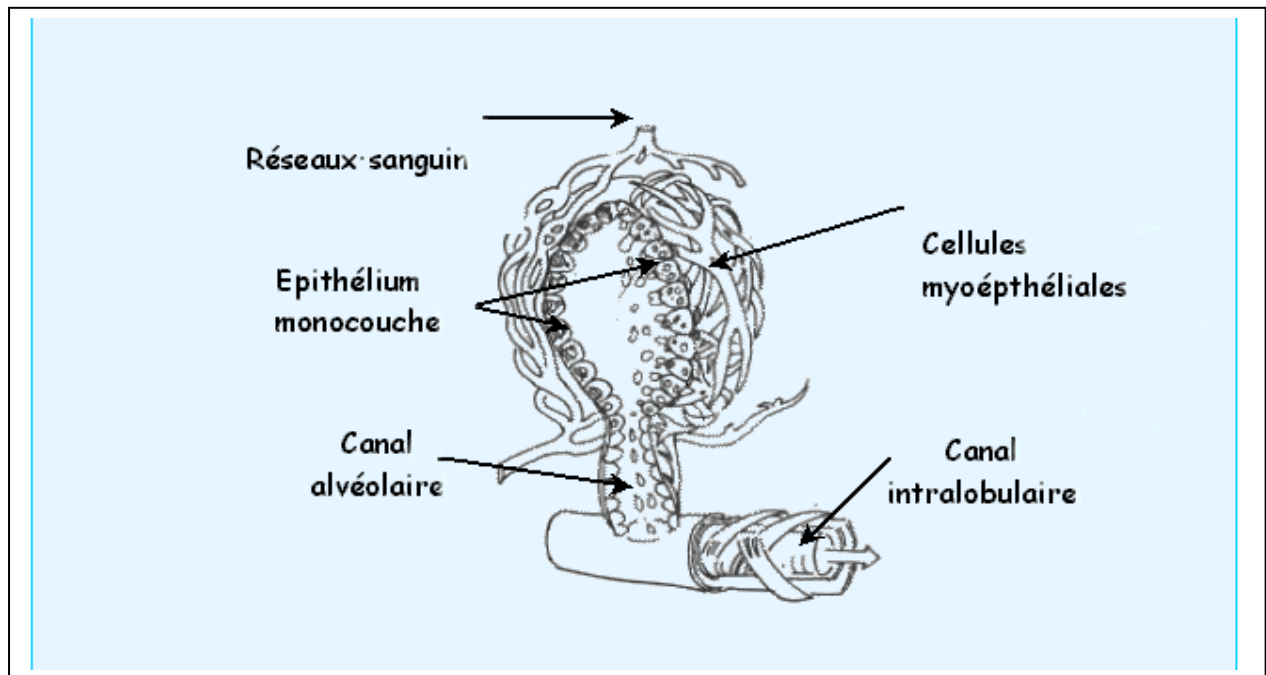


Figure 15 : Schéma de l'organisation d'un acinus (ou alvéole) de glande mammaire et d'un canal.

(*Biology of the mammary gland* : <http://mammary.nih.gov/>)

http://www.unilim.fr/theses/2003/sciences/2003limo0033/these_body.html

1 Co-localisation de CCL28 et des cellules endothéliales par double marquage en immunofluorescence

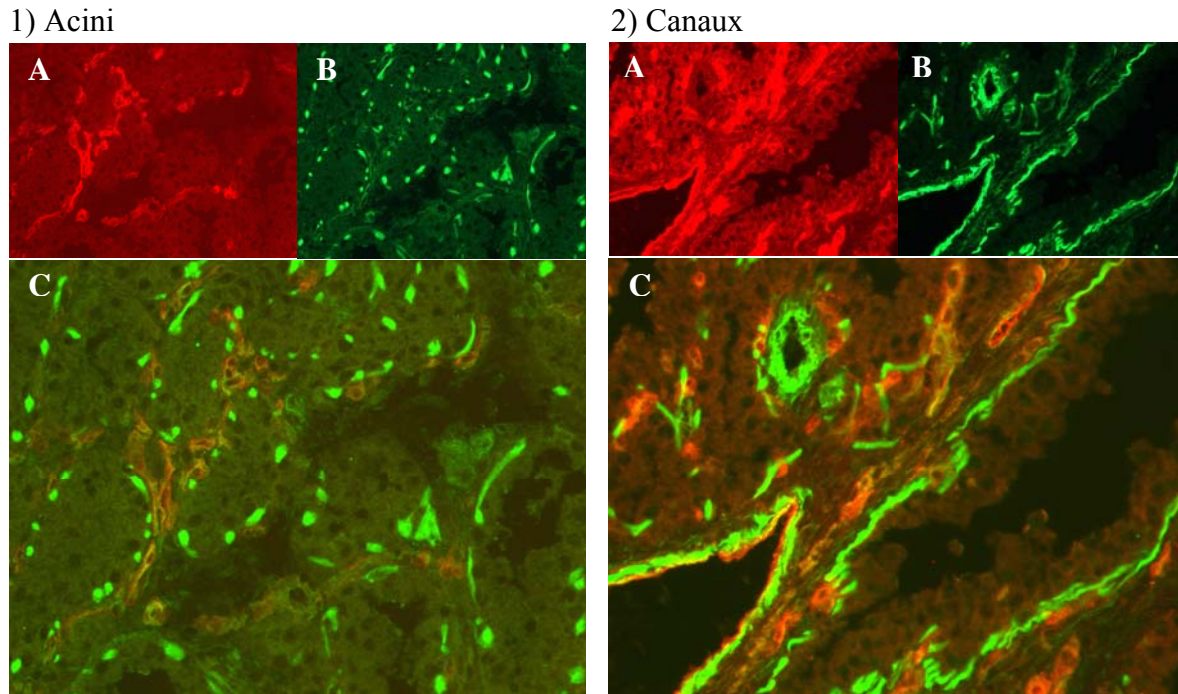


Figure 16 : Co-localisation de CCL28 et des cellules endothéliales des vaisseaux. *Pour chacun des panneaux, 1 (acini), 2 (canaux) : A et B : marquage simple des cellules endothéliales des vaisseaux (MIL 11) en rouge et de CCL28 (anticorps anti-CCL28 humain) en vert. C : superposition des photos A et B de simple marquage, montrant en jaune la présence ou l'absence de cellules doublement colorées (co-localisation).*

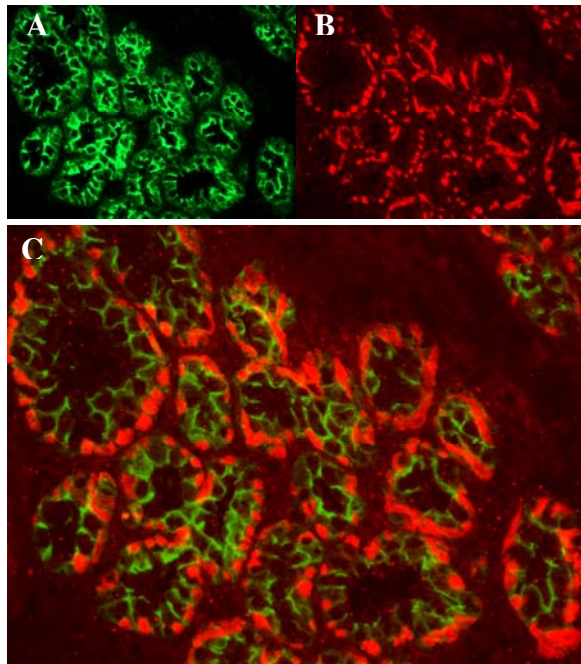
Concernant les acini (panel 1), la localisation du marquage de Mill 11 (cellules endothéliales) est sur les vaisseaux péri-alvéolaires, alors que CCL28 se situe en bordure des cellules épithéliales des acini sous forme de flaque contre la membrane basale des cellules épithéliales.

En conclusion, comme la superposition des deux images montre deux marquages distincts l'un de l'autre, on peut conclure que CCL28 ne se trouve pas dans les cellules endothéliales des vaisseaux.

L'aspect concernant les canaux (panel 2) : le marquage de CCL28 (vert) est continu (non fragmenté) et non superposé aux cellules endothéliales (en rouge) (**Fig. 16-1C**).

2 Co-localisation de CCL28 et des cellules épithéliales

1) Acini vides



2) Acini pleins (dilatés)

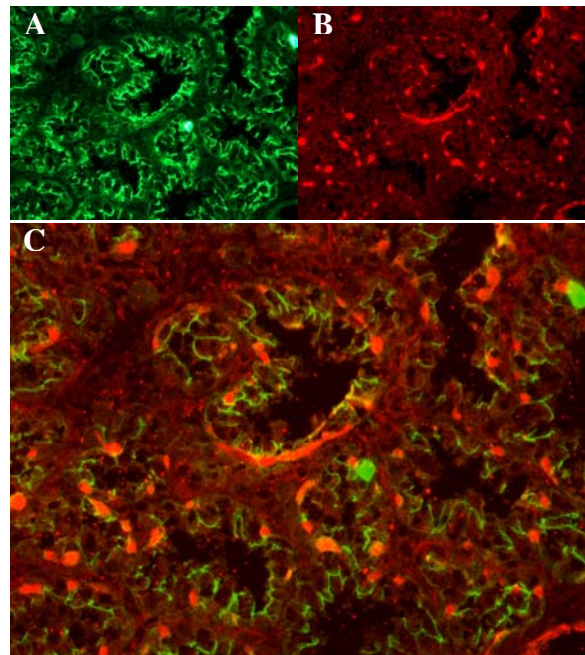
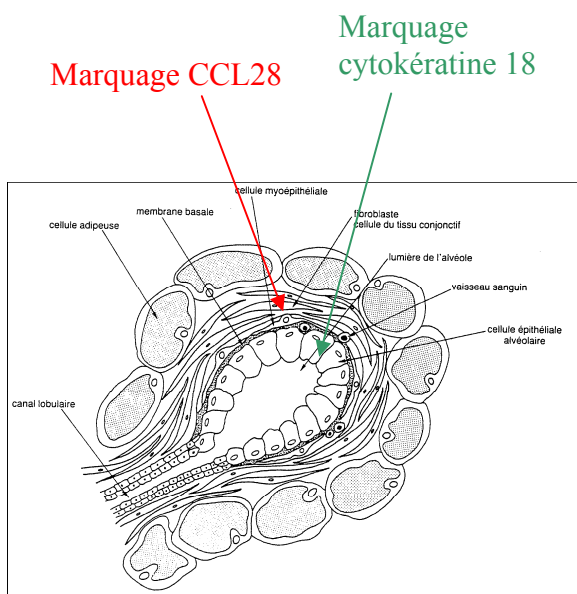
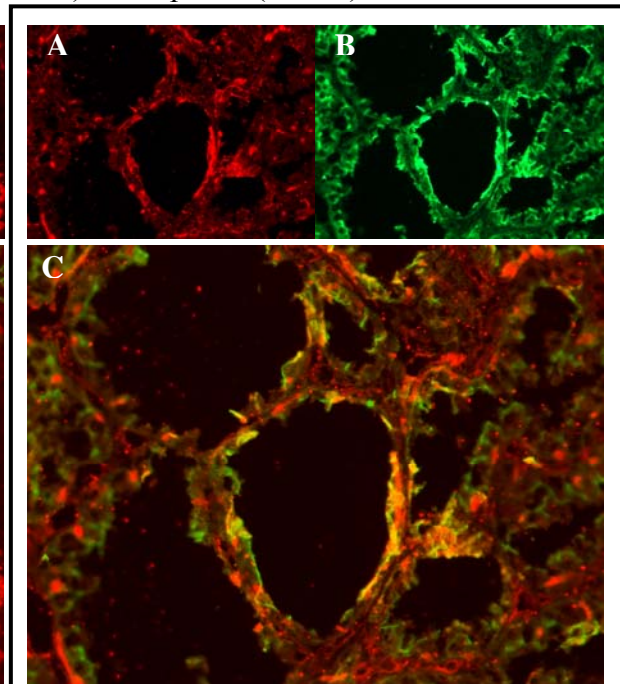


Figure 17 : Co-localisation de CCL28 et des cellules épithéliales. *A et B : marquage simple de CCL28 en rouge et des cellules épithéliales des acini en vert. C : superposition des photos A et B de simple marquage, montrant en jaune la présence ou l'absence de cellules doublement colorées (co-localisation).*

Les photos (**Fig. 17**) confirment que lorsque l'on voit CCL28 (rouge), c'est en dehors de la cellule cytokératine 18⁺ (vert) car la superposition des deux images ne donne pas un marquage jaune.

3 Co-localisation de CCL28 et des cellules myoépithéliales dans la mamelle

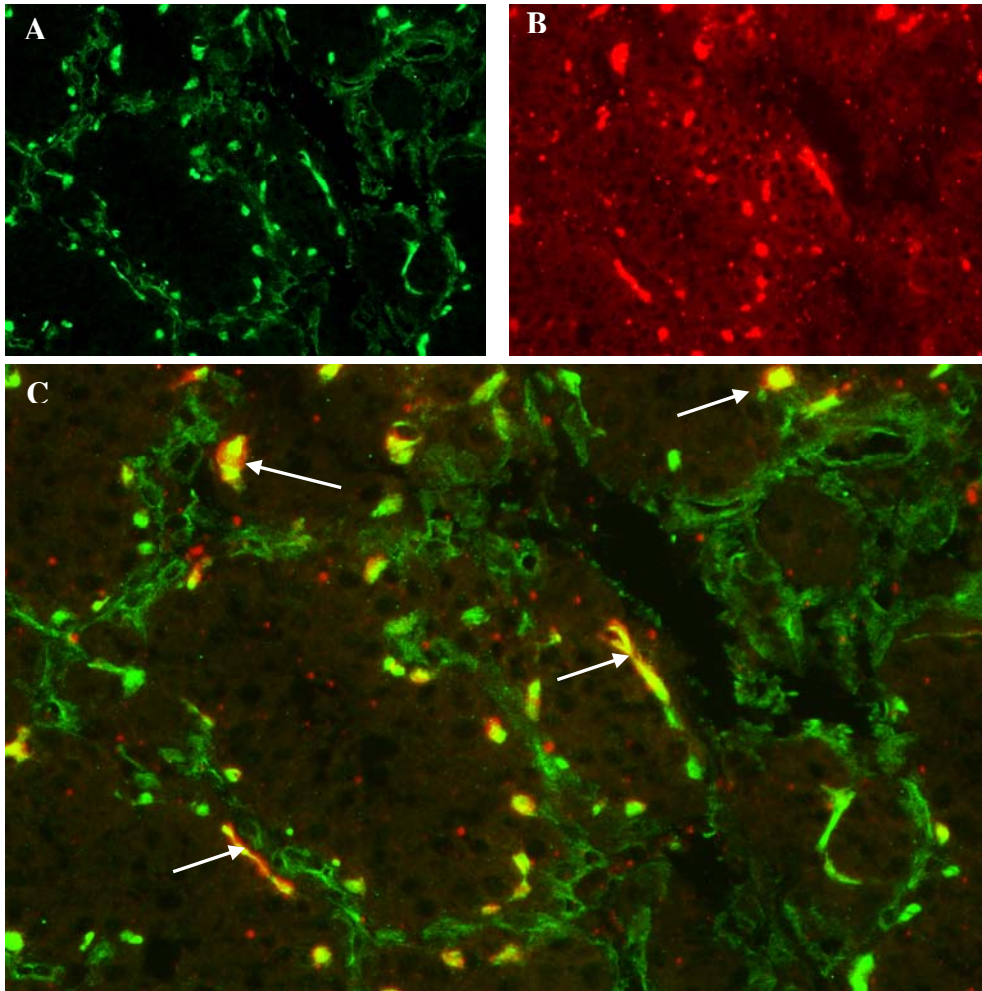


Figure 18 : Co-localisation de CCL28 et des cellules myoépithéliales. Photo A et B : marquage simple de CCL28 en vert et des cellules myoépithéliales des acini en rouge. Photo C : superposition des photos A et B de simple marquage, montrant en jaune la présence ou l'absence de cellules doublement colorées (co-localisation). Flèche : Co-localisation.

Nous observons un marquage en « flaque » lorsque la cellule myoépithéliale est coupée dans le sens transversal et en « coup d'angle » lorsque celle-ci est coupée dans le sens longitudinal (**Fig. 18-A**). Les résultats montreraient que CCL28 est présente dans les cellules myoépithéliales.

Le marquage CCL28 est différent de celui des vaisseaux (Mill 11-marquant les cellules endothéliales-**Fig. 16**) et est différent de celui de la cytokératine 18 (cellules épithéliales-**Fig. 17**). En revanche le marquage de CCL28 est superposé au marquage de la myosine (cellules myoépithéliales). L'aspect du marquage de MEC correspond bien à la morphologie des cellules myoépithéliales.

Les photos (**Fig. 18-C**) montrent la superposition des marquages (zone jaunâtre) indiquant que CCL28 est exprimée là où il y a la myosine (cellules myoépithéliales).

En conclusion, on ne trouve donc pas de CCL28 dans les cellules épithéliales ni quand il y a présence de marquage jaune (marquage de MEC et de cytokératine). Il semblerait que ce soit dû à une concentration (acini distendus) du marquage diffus de cytokératine qui marque aussi les cellules myoépithéliales (Caselitz *et al.*, 1986).

4 Localisation de CCL28 dans la mamelle de truie non lactante

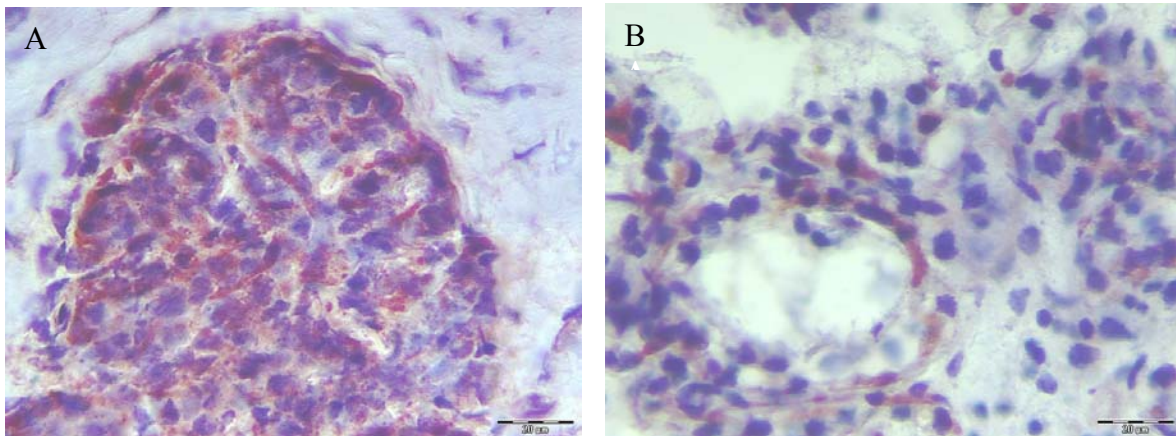


Figure 19 : Expression de CCL28 sur du tissu mammaire de truie non gestante et en gestation. *Photo A : tissu parenchymateux mammaire de truie non gestante (entre deux gestations). Photo B : tissu parenchymateux mammaire de truie à 114 jours de gestation.*

A titre de cinétique nous avons fait des simples marquages de CCL28 avant la gestation et pendant la gestation.

Les photos montrent un marquage de CCL28 sur du tissu mammaire de truie non gestante (mais ayant déjà eu une gestation) et pendant la gestation apparemment uniquement sur les cellules myoépithéliales (**Fig. 19**). Ces résultats ne concordent pas avec les analyses de RT-PCR conventionnelle qui ne détectaient pas d'ARNm de CCL28 (**Fig. 13-A**). Dans la discussion, je signalerai des résultats plus récents qui aujourd'hui confirment ces marquages.

5 Détection de CCL28 dans les cellules épithéliales des acini après la traite

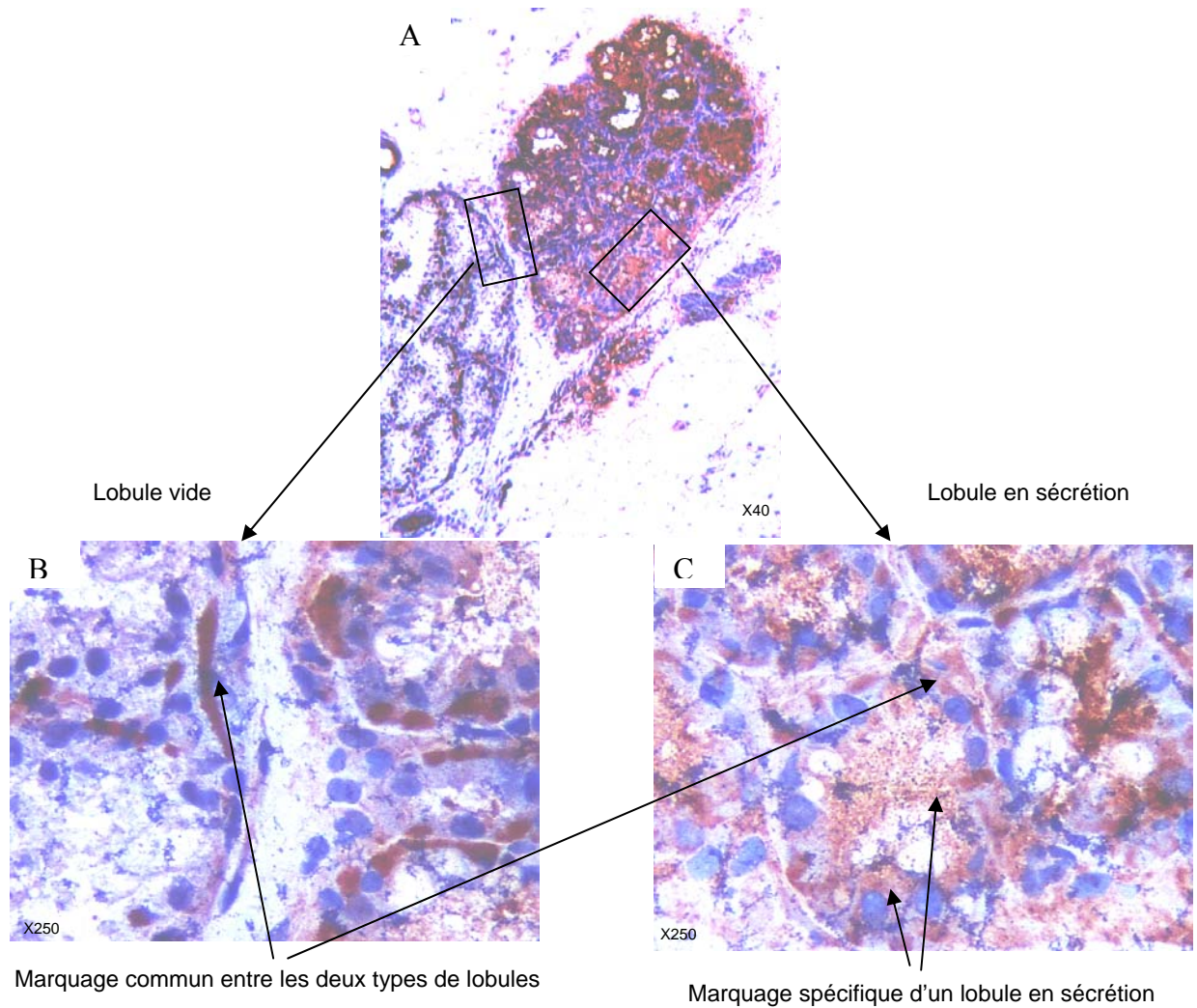


Figure 20 : Détection de CCL28 dans les cellules épithéliales mammaires. *Simple marquage en histochimie : Photo A : Deux lobules sont photographiés – l'un dont les acini sont vides et l'autre dont les acini sont pleins de lait. Photo B : grossissement de la photo A- vue sur les deux lobules. Photo C : grossissement de la photo A - vue sur un acinus du lobule en sécrétion (Berri et al., 2008).*

Nous avons remarqué que lorsque les biopsies étaient pratiquées sans traire au préalable les truies, nous n'observions pas de marquage de CCL28 dans les cellules épithéliales mais

uniquement dans les cellules myoépithéliales comme sur les **figures 16, 17 et 18**. C'est pourquoi nous avons changé notre protocole de prélèvement au cours de l'étude.

Les marquages que nous avons obtenus montrent bien une localisation dans le cytoplasme des cellules épithéliales - ce qui est en accord avec la littérature (Mickanin et al., 2001) - mais aussi dans les cellules de type myoépithélial. Sur la photo (**Fig. 20-A**), on distingue des marquages différents suivant les lobules considérés. Certains acini présentent un marquage à la fois sur les cellules épithéliales et les cellules myoépithéliales et d'autres ne présentent qu'un marquage myoépithélial très dense. Il se pourrait que l'absence de marquage des cellules épithéliales dans certains lobules soit due à une vidange de la cellule épithéliale par la traite ou à un arrêt de la synthèse des ARNm par les cellules épithéliales quand l'acinus est plein.

En conclusion, les résultats suggèrent que les cellules épithéliales sécrètent CCL28 et que les cellules myoépithéliales expriment la protéine ou bien l'accumulent dans leur cytoplasme, ceci afin de la libérer graduellement. Pour vérifier cette hypothèse, je développerai dans les perspectives un projet de différenciation cellulaire dans la discussion.

B Transcrit de CCL28 dans les cellules épithéliales isolées par microdissection laser

Comme nous nous attendions à avoir uniquement un marquage des cellules épithéliales, nous avons voulu savoir si celles-ci produisaient bien le transcrit de CCL28. Nous avons donc réalisé une étude par RT-PCR sur des ARNm de cellules épithéliales extraites par technique de microdissection au laser. Nous avons pris contact avec la plateforme INRA, PICT (Plateau d'Instrumentation et de Compétence en Transcriptomique) de Jouy-en-Josas pour définir une technique de prélèvement des biopsies qui préserve l'ARN et la morphologie des tissus.

1 Extraction des cellules épithéliales

Les coupes ont été effectuées sur des biopsies de truies à 12 jours de lactation après que celles-ci ont nourri leurs petits (retirés au préalable durant trois heures) et qui ont ensuite été traitées manuellement.

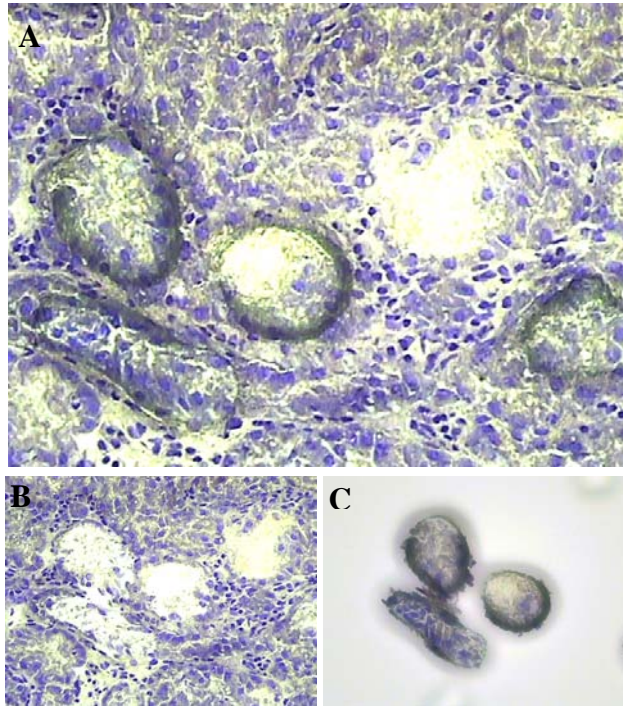


Figure 21 : Extraction des cellules épithéliales. *A : Parenchyme mammaire après extraction des cellules épithéliales. B : Parenchyme mammaire sans cellules épithéliales extraites. C : Cellules extraites.*

2 Détection du transcrit à partir des cellules extraites

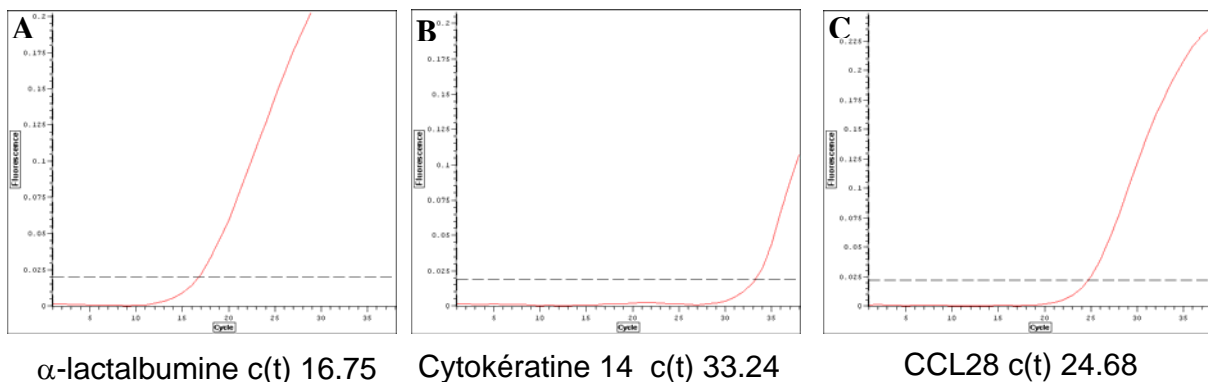


Figure 22 : Analyse par RT-PCR des ARNm des cellules extraites après microdissection laser. *Courbe A : expression de l' α -lactalbumine. Courbe B : expression de la cytokératine 14. Courbe C : expression de CCL28. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un nombre de cycles "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Abscisse : c(t) – Ordonnée : intensité de fluorescence des sondes fluorescentes qui se fixent sur l'ADN double brin néoformé.*

Nous avons utilisé les amorces de l'ARNm l' α -lactalbumine afin de caractériser les cellules épithéliales mammaires et celles de la cytokératine 14 pour caractériser les cellules

myoépithéliales. Les résultats obtenus ne permettent pas de dire si les échantillons contenant les cellules épithéliales sont indemnes de matériel provenant des cellules myoépithéliales. En effet, nous notons une légère contamination par ces dernières. L' α -lactalbumine étant spécifique des cellules épithéliales mammaires, nous confirmons tout de même la forte présence de ces cellules. Même si nous ne pouvons pas affirmer que cet échantillon est pur, nous observons quand même que CCL28 est exprimée de façon significative alors que la cytokératine 14 est estimée comme étant quasiment négative à cause du nombre élevé de threshold cycle ($c(t)>30$) (**Fig. 22**).

La microdissection laser montre que dans les échantillons extraits il y a présence des ARNm de la chimiokine mais la technique de microdissection laser ne nous permet pas d'être sûrs de n'avoir que des cellules épithéliales. En effet les cellules myoépithéliales sont collées aux cellules épithéliales. Nous ne pouvons donc pas vérifier de façon certaine si ce n'est que les cellules épithéliales qui expriment la protéine.

C Mise en évidence de la chimiokine CCL28 dans le lait de truie

Nous avons réalisé un Western Blot dans le lait de truie pour s'assurer de l'excrétion de la protéine. L'anticorps utilisé étant un anticorps anti-CCL28 humain, nous avons donc utilisé du lait humain comme contrôle positif.

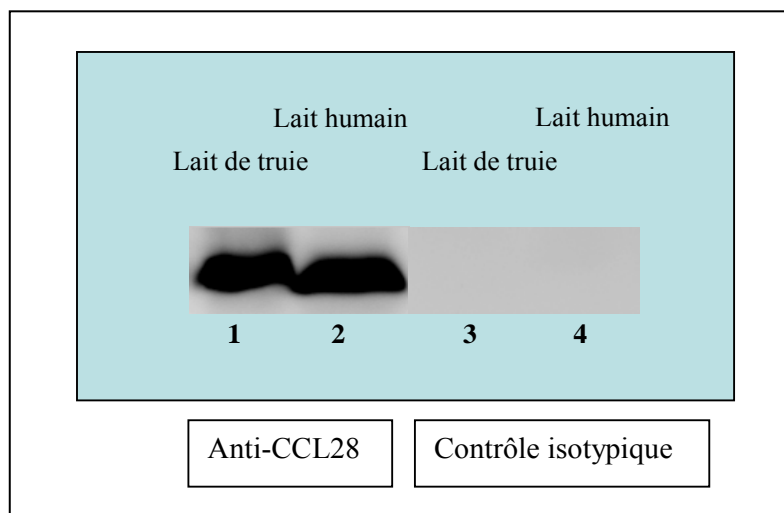


Figure 23 : Mise en évidence de CCL28 dans le lait de truie. Les échantillons de lait ont été traités dans des conditions réductrices, analysés en SDS-PAGE et révélés avec l'anticorps monoclonal anti-CCL28 humaine (1 et 2) ou avec le contrôle isotypique (3 et 4). Nous observons bien la présence de la chimiokine CCL28 dans le lait au même poids moléculaire que la protéine humaine.

Nous observons une bande de précipité de 14 kDa correspondant au poids moléculaire de CCL28 mettant en évidence la présence de la chimiokine dans le lait (**Fig. 23**) en quantité comparable à celle contenue dans le lait humain.

IV Production et analyse de la chimiokine recombinante CCL28 porcine

A Production

Ne disposant pas sur le marché de la protéine porcine et n'ayant pu la purifier du lait de truie, nous avons donc produit celle-ci en utilisant un vecteur d'expression (pQE.30) transfecté dans des *E. coli*. Après avoir fait une ligation dans le plasmide de la séquence de CCL28, la production a été induite par de IPTG.

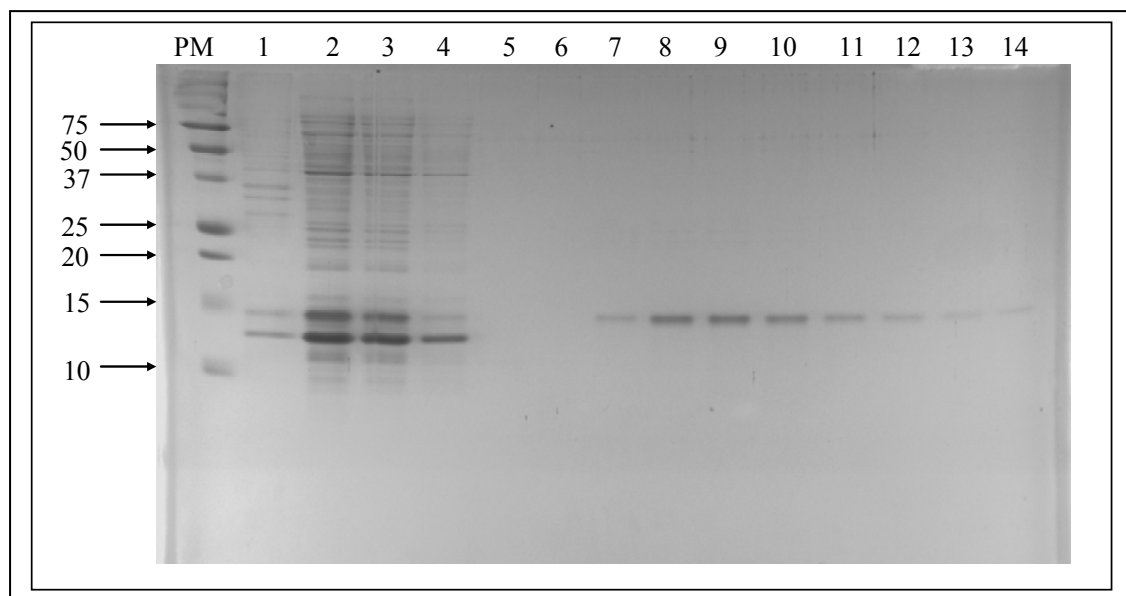


Figure 24 : Analyse en SDS-PAGE des différentes étapes de purification de la protéine recombinante CCL28. *PM*: indicateur de poids moléculaire; *1*: culot insoluble après centrifugation du lysat bactérien; *2*: surnageant du lysat bactérien ; *3*: fraction non retenue par la colonne; *4*: lavage avec 20 mM d'imidazole; *5*: lavage avec 50 mM d'imidazole; *6* à *14*: différentes fractions éluées à 250 mM.

Nous avons réalisé un Western Blot pour voir si CCL28 est produite et excrétée par les *E. coli* (**Fig. 24**). Nous constatons la présence d'une protéine majoritaire au poids moléculaire attendu (14 kDa). Après un dosage de la protéine par MicroBCA, la concentration de la protéine obtenue a été estimée de 30 à 40 µg/ml, soit un rendement de 1 à 1,5 mg par litre de culture (10^9 à 10^{10} bactéries par litre).

B Analyse fonctionnelle de la chimiokine recombinante CCL28

Nous avons effectué deux types de tests pour étudier la fonctionnalité de la chimiokine produite : un test de chimioattraction définissant son activité chimioattractante et un test de flux calcique mettant en évidence sa liaison avec l'un de ces récepteurs (GPCR).

1 Activité chimioattractante de pCCL28r vis-à-vis des lymphoblastes B (cellules L14)

Nous avons voulu étudier la fonctionnalité de CCL28 que nous avons produite. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests de migration afin d'étudier son pouvoir chimioattractant vis-à-vis des lymphoblastes de la lignée lymphoblastoïde porcine L14.

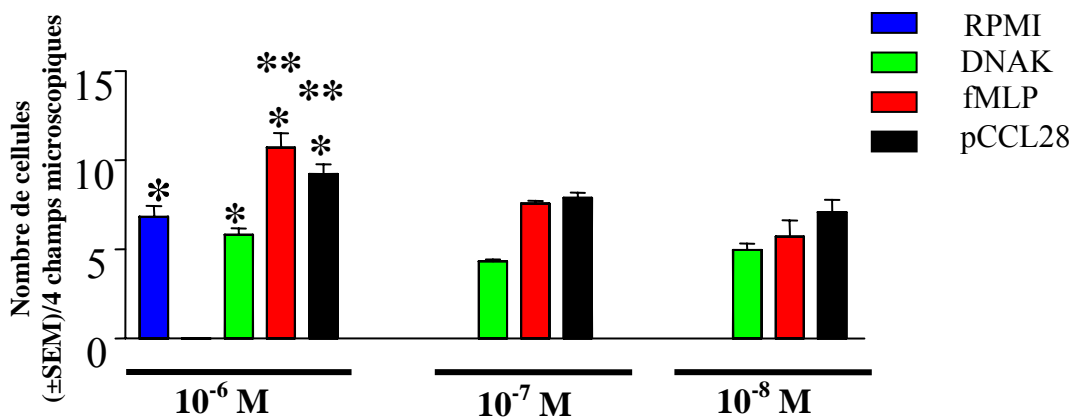


Figure 25 : Activité chimioattractante de la protéine recombinante CCL28 vis-à-vis des lymphoblastes L14. Migration spontanée (milieu RPMI) et migration induite avec fMLP ou la protéine pCCL28 à différentes concentrations (10⁻⁶, 10⁻⁷ et 10⁻⁸ M). La protéine DNAK a été utilisée comme témoin négatif. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de cellules adhérentes (±SEM). $p^* < 0,05$ par rapport à la migration spontanée, $p^{**} < 0,05$ par rapport à la migration induite par DNAK en utilisant un t-test de Student.

Nous observons que la CCL28 porcine exerce bien un pouvoir chimioattractant vis-à-vis des lymphoblastes B (L14) (**Fig. 25**).

2 Mise en évidence de l'interaction de CCL28 avec son récepteur cellulaire

Lorsque les chimiokines se couplent à leurs récepteurs, elles induisent un flux calcique. En effet, ces récepteurs sont des protéines transmembranaires qui induisent une cascade de signalisation via la protéine G. Pour éprouver la fixation de la protéine recombinante à son récepteur, nous avons effectué des analyses de flux de calcium avec la lignée lymphoblastoïde porcine L14 en utilisant les protéines recombinantes CCL28 et CCL25, ainsi que des fractions de lait de porc. La présence, dans les cellules L14, des ARNm des récepteurs CCR3, CCR10 et CCR9 a été testée auparavant par PCR conventionnelle. Nous avons détecté la présence des ARNm de CCR10 (récepteur de CCL28) et CCR9 (récepteur de CCL25) principalement.

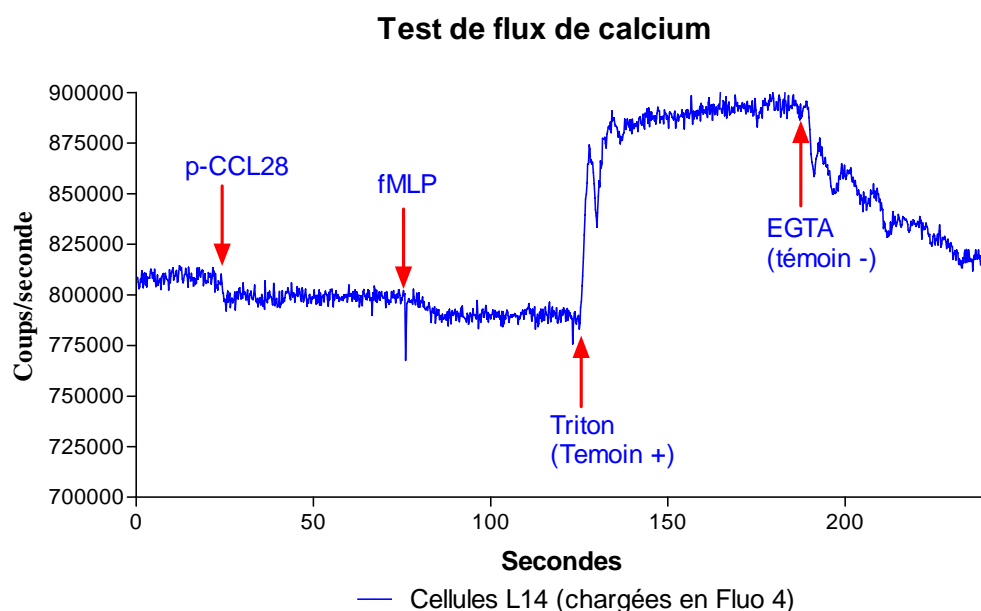


Figure 26 : Mise en évidence de la liaison de CCL28 à son récepteur cellulaire.

Les cellules L14 ont été incubées successivement avec p-CCL2 puis fMLP et enfin perméabilisées au Triton : L'EGTA fixant le calcium cellulaire a été introduit comme contrôle négatif. Le calcium une fois qu'il a pénétré dans la cellule se lie au Fluo4 qui émet une fluorescence dont on mesure l'intensité en coups/seconde par un spectrofluorimètre.

Nous n'avons jamais observé de flux calcique, que ce soit avec la protéine recombinante porcine ou bien la protéine humaine CCL28 (**Fig. 26**), ni avec CCL25 ou avec les fractions de lait (données non montrées). De même notre témoin positif, le fMLP, n'induit pas de flux calcique, suggérant que les cellules que nous avons utilisées ne libèrent pas de calcium intracellulaire. En revanche le test est validé par la réaction au Triton qui perméabilise les cellules et laisse donc entrer le calcium provenant du milieu. Cette lignée cellulaire

immortalisée a été obtenue après exposition à la 5-azacytidine à partir de cellules provenant d'un porc infecté par un rétrovirus (Kaeffer, 1994). La lignée L14 a peut-être des réactions spécifiques de cellules transformées.

V Etude de la régulation de CCL28

A Expression constitutive de l'ARNm de CCL28 par une lignée épithéliale mammaire porcine

Nous avons obtenu une lignée de cellules épithéliales mammaires porcines (Porcine mammary epithelial cell-PMEC) sur lesquelles nous avons étudié l'effet de la prolactine sur l'expression de la chimiokine CCL28. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'expression de l'ARNm de CCL28 dans les PMEC non différenciées par rapport à d'autres lignées cellulaires (épithéliales intestinales) afin de connaître l'expression consécutive de CCL28.

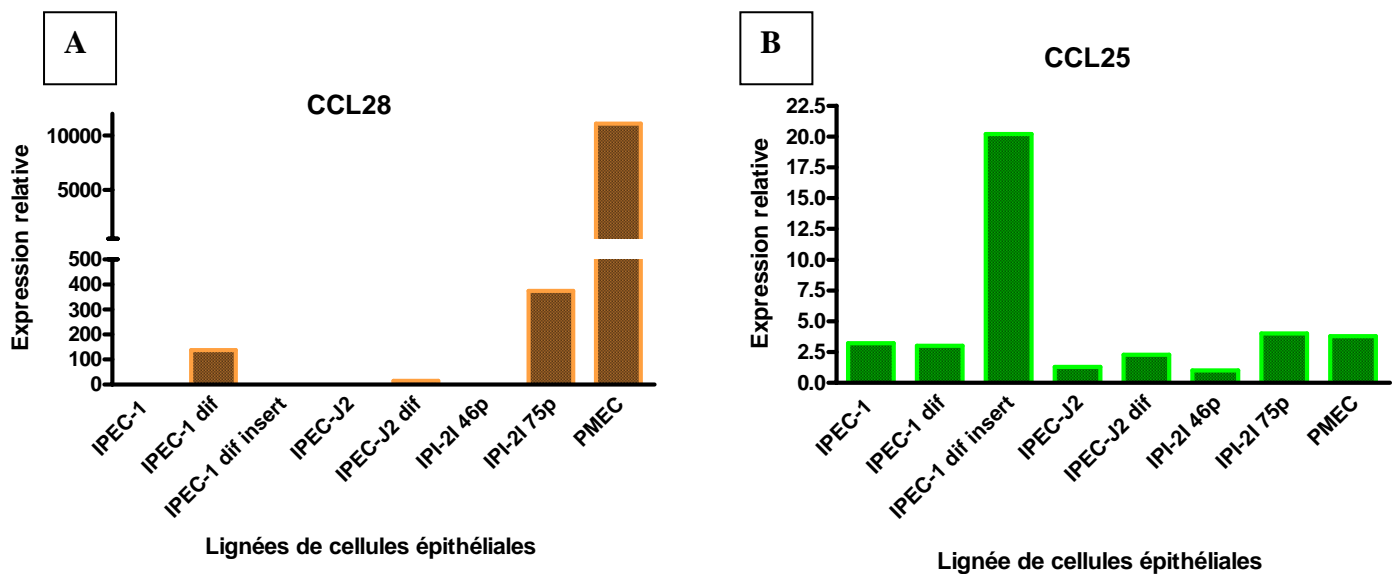


Figure 27 : Expression de CCL28 et de CCL25 des cellules épithéliales mammaires porcines en lignée (PMEC) comparées à différentes lignées épithéliales intestinales.

Graphique A : Expression du transcrite de CCL28 sur différentes lignées épithéliales cultivées de différentes façons. IPEC-1 et IPEC-J2 : cellules intestinales de jéjunum – dif : différenciées après 8 jours de culture en présence de dexaméthasone – difinsert : différenciées et cultivées sur insert. IPI-21 : cellules d'iléum à différents passage 46 et 75. Graphique B : Expression du transcrite de CCL25 sur les mêmes lignées cellulaires.

L'expression relative est déterminée par rapport aux gènes ubiquitaires (3) et réduite à 1 représentant l'expression minimale.

Les résultats montrent que CCL28 est fortement exprimée par les cellules PMEC comparées aux lignées de cellules intestinales (**Fig. 27**). En revanche CCL25 est bien exprimée par une lignée de cellules épithéliales intestinales très différenciées (IPEC-1 cultivées sur insert et polarisées en présence de dexaméthasone) confirmant les données de la littérature.

Nous avons ensuite mesuré l'expression dans les PMEC cultivées sur Matrigel en présence de prolactine porcine (pPRL) (**Fig. 27**). En effet, l'article de Y. Sun fait état de la différenciation de ces cellules cultivées dans ces conditions (Sun et al., 2006).

B Effet de la prolactine sur l'expression de l'ARNm de CCL28 par les cellules épithéliales

1 Morphologie des cellules PMEC cultivées sur Matrigel en présence de pPRL.

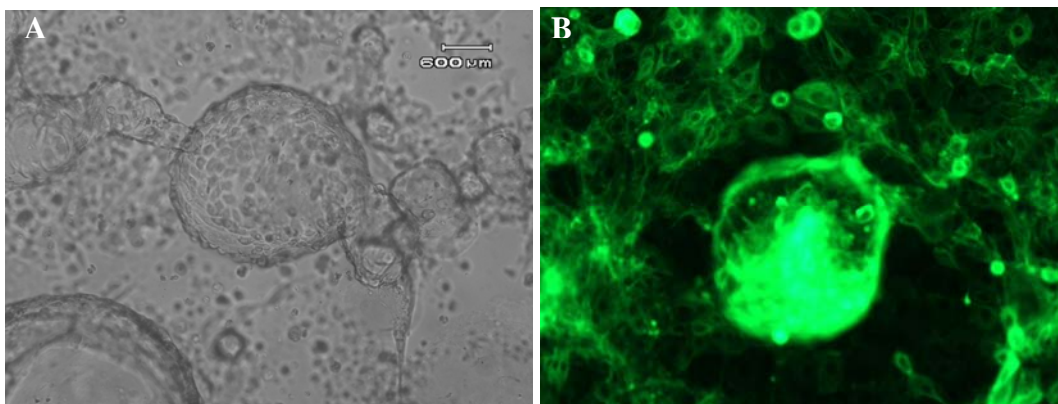


Figure 28 : Formation d'acini par les cellules épithéliales mammaires cultivées sur Matrigel. *A : Structure tridimensionnelle en acinus. B : Marquage en immunofluorescence de la cytokératine 18.*

La culture sur Matrigel en présence de pPRL induit un changement de morphologie des cellules (**Fig. 28**). Elles prennent une structure tridimensionnelle caractéristique ressemblant à des acini. Le marquage en immunofluorescence par la cytokératine 18, marqueur de membrane des cellules épithéliales, confirme le caractère épithélial de ces cellules.

2 Expression de l'ARNm de CCL28 par les PMEC cultivées en présence de pPRL

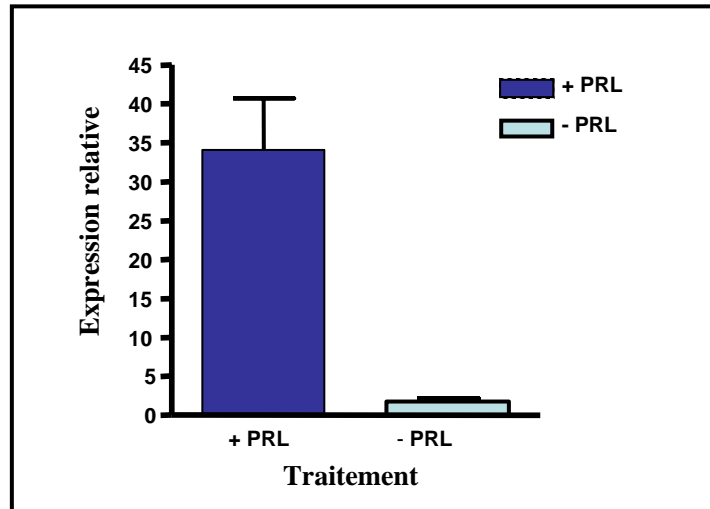


Figure 29 : Effet de la prolactine sur l'expression de la chimiokine CCL28 dans la lignée épithéliale mammaire. Cellules cultivées sur un support de Matrigel en présence de la prolactine porcine (pPRL) à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ (+PRL) et en absence (-PRL).

Les résultats montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm CCL28 dans les cellules PMEC en présence de prolactine et cultivées sur Matrigel (**Fig 29**) par rapport aux mêmes cellules cultivées sur Matrigel mais sans pPRL. La prolactine serait donc une hormone qui stimulerait l'expression constitutive de CCL28.

Discussion

L'objectif de mon travail a été de rechercher une corrélation spatiale et temporelle entre l'accumulation des lymphoblastes à IgA dans la mamelle en lactation (en supposant qu'ils ne se multiplient pas localement) et l'augmentation d'un ou plusieurs facteurs humoraux au cours de cette même période.

Dans l'hypothèse où un facteur chimioattractant se retrouve dans le lait, nous avons commencé par chercher dans le lait de truie si ce facteur existe pour en définir ensuite son ARNm et analyser sa cinétique lors du développement de la mamelle.

Dans la première partie de mon travail, j'ai contribué à l'identification dans le lait de truie d'un facteur chimioattractant pour les lymphocytes B. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans laquelle la discussion a déjà été relatée (**Annexe 8**). Ce facteur humoral est un peptide dérivé de la SAA que l'on retrouve dans le lait mais son expression transcriptomique commence en fin de gestation et augmente en lactation (**Fig. 11**), ce qui ne répond pas à la constatation de l'augmentation des plasmocytes à IgA au cours de la lactation.

Parallèlement, j'ai effectué une étude de la cinétique des ARNm de plusieurs chimiokines épithéliales qui a mis en évidence une présence et une augmentation de CCL28 en lactation (**Fig. 12**). Celle-ci n'a été détectée qu'en lactation par analyse en PCR conventionnelle (semi-quantitative) (**Fig. 13**). J'ai donc plus particulièrement axé mes recherches sur la localisation et la régulation de la protéine CCL28 puisqu'elle est prédominante en lactation (ARNm) et qu'on la retrouve dans le lait (protéine) (**Fig. 22**). Une preuve du rôle direct de CCL28 dans l'accumulation des plasmocytes à IgA aurait pu être faite en administrant un anticorps anti-CCL28 chez le porc, comme cela a déjà été fait chez la souris (Wilson & Butcher, 2004). Mais les doses nécessaires pour reproduire cette expérimentation sont trop élevées pour l'envisager.

Nous avons utilisé deux types de techniques pour mettre en évidence CCL28. D'une part la RT-PCR conventionnelle puis quantitative qui nous permet de mettre en évidence les ARNm et d'autre part la technique d'immunohistochimie qui met en évidence la localisation des protéines traduites à partir de ces ARNm.

Localisation de CCL28

J'ai alors voulu savoir quel était le type cellulaire qui la synthétise car nous savons qu'elle est également présente dans la salive en dehors de tout effet de la lactation.

Dans cette optique, j'ai réalisé des marquages immunohistochimiques afin de détecter la chimiokine et de caractériser les cellules l'exprimant. Nous nous attendions donc à confirmer les résultats des transcrits faits par RT-PCR et, en plus, à montrer la localisation de la protéine (**Annexe 9**).

Alors que nous n'avons pas détecté par RT-PCR semi-quantitative d'ARNm de CCL28 dans la GM en gestation, nous avons observé un marquage des cellules myoépithéliales en périphérie des cellules épithéliales des acini. Ce marquage est aussi présent en lactation alors que la détection de la chimiokine dans les cellules épithéliales apparaît uniquement à ce stade. La constatation de la présence de la protéine CCL28 dans les cellules épithéliales durant la lactation est conforme aux analyses transcriptomiques, tandis que sa présence lors de la gestation dans les cellules myoépithéliales se heurte à l'absence de détection de l'ARNm correspondant à ce stade. Pourquoi ne détecte-t-on pas d'ARNm en gestation alors qu'il y a présence d'un marquage sur coupes attestant de la présence de la protéine ?

Nous pourrions formuler alors deux hypothèses pour expliquer la présence de la protéine dans les cellules myoépithéliales de la GM en gestation alors qu'on ne détecte pas son ARNm ; soit l'anticorps anti-CCL28 utilisé qui marque bien CCL28 (confirmé par le marquage sur lait humain et de truie) marque aussi une autre protéine synthétisée par les cellules myoépithéliales, soit les cellules myoépithéliales ne synthétisent pas la protéine mais serviraient de réservoir à la chimiokine sécrétée par la cellule épithéliale lorsque celle-ci arrête toute synthèse quand l'acinus est rempli de lait.

D'autre part, il se pourrait que l'ARNm de CCL28 dans les cellules myoépithéliales ait une durée de vie plus courte que celle de la protéine CCL28 dans les cellules épithéliales. Dans cette hypothèse, CCL28 serait présente durant le développement mammaire dans les cellules myoépithéliales quel que soit le stade de développement, et la synthèse de la chimiokine CCL28 n'apparaîtrait dans les cellules épithéliales que lors de la mise en route de la lactation.

Contrairement à nous, d'autres auteurs ont mentionné la présence d'ARNm de CCL28 utilisant une technique (PCR en temps réel) et des amorces différentes des nôtres (Meurens *et al.*, 2006). Il peut s'agir dans ce cas d'une sensibilité plus grande qui permettrait de pouvoir détecter les ARNm des cellules myoépithéliales même noyées dans tout le parenchyme mammaire. En effet l'absence de détection en gestation pourrait être due à un manque de sensibilité de la PCR conventionnelle, mais lorsque j'ai réalisé cette première étude sur la cinétique de prélèvement de tissu mammaire, nous ne disposions pas d'appareil de PCR en temps réel.

Pour répondre à ces questions nous avons décidé de faire notre étude transcriptomique sur les cellules épithéliales mammaires en lactation obtenues après microdissection laser.

Nos résultats montrent que l'expression transcriptomique de CCL28 est présente dans les cellules épithéliales en lactation, confirmant bien la spécificité du marquage à l'égard des cellules épithéliales pour autant que la technique enrichisse uniquement en cellules épithéliales.

En revanche, la microdissection laser ne nous a pas permis de faire une analyse de l'ARNm de CCL28 sur les cellules myoépithéliales. En effet, ces cellules sont accolées aux cellules épithéliales qu'elles bordent. Les résultats de qPCR obtenus concernant l'expression de CCL28 dans les cellules épithéliales pourraient alors être attribués à la contamination par l'ARN des cellules myoépithéliales, dans l'hypothèse où elles contiendraient plus d'ARN de cette protéine que les cellules épithéliales. Aucune donnée dans la littérature ne permet à l'heure actuelle d'étayer cette hypothèse, nous pensons donc que les cellules épithéliales sont les principales pourvoyeuses de CCL28. D'autant plus que nous avons détecté CCL28 dans le lait de truie qui est synthétisé par les cellules épithéliales.

Caractérisation fonctionnelle de CCL28

Alors que j'ai mis en évidence une activité chimioattractante de la protéine recombinante CCL28 porcine que nous avons produite sur des lymphoblastes en lignée -les cellules L14- je n'ai pas observé de flux calcique traduisant la fixation de la protéine à son récepteur.

Cette absence de flux calcique pourrait s'expliquer soit par l'absence des récepteurs de CCL28 (CCR10) ainsi que celui du fMLP (rfMLP 1et 2), soit par la présence des récepteurs, mais sans la machinerie permettant l'entrée du calcium. Bien que nous ayons trouvé de l'ARNm de CCR10 dans les lymphoblastes de la lignée L14, ils peuvent très bien ne pas être traduits en protéines ou être en quantité trop faible pour être efficaces ; pour pallier ce problème, nous avons entrepris de construire une molécule chimérique CCL28-Fc humaine sur la base de notre étude de CCL28 recombinante porcine pour détecter le récepteur (travaux en cours). D'autre part, le test devra être confirmé sur des lymphoblastes « normaux » qui, eux, sont attirés par CCL28. La disposition de suspension cellulaire enrichie en cellules CCR10⁺, en nombre important, nécessite des manipulations supplémentaires qui sortent du cadre de mon étude.

Induction de CCL28

Nos résultats sur l'induction de CCL28 par la prolactine porcine sur les cellules mammaires en culture favorisent l'hypothèse de mise en route par une hormone et donc de dépendance suivant le stade physiologique. Alors que dans un autre modèle (injection de prolactine chez la souris) il n'y avait pas eu constatation d'augmentation de CCL28 dans la GM, nous avons pu mettre en évidence une forte surexpression des ARNm de CCL28 par une technique très sensible en présence de pPRL (Hyde, 2007). L'utilisation de cette lignée est donc prometteuse.

Nos travaux vont alors se poursuivre en utilisant cette lignée. Je vais dans un premier temps voir s'il y a une influence de la prolactine. Par exemple : corrélérer l'expression des ARNm par rapport à l'excrétion de CCL28 dans le milieu de culture dans lequel elles sont cultivées. Nous avons mis au point un test ELISA pour détecter et quantifier CCL28 que je souhaite utiliser. Puis, je pourrais vérifier sa fonctionnalité chimioattractante vis-à-vis de lymphocytes du MLN. Enfin, nous souhaitons vérifier les voies de signalisation induite par la prolactine. Par exemple, en étudiant les « *Signal transducer and activator of transcription* » (STAT) comme Jak2/Stat5a.

De plus, la possibilité de différencier ces cellules en cellules myoépithéliales nous permettrait de répondre à nos interrogations quant à la synthèse de CCL28 par les myoépithéliales. En effet, certains modèles d'étude relatent l'utilisation des différents milieux de culture capables d'induire cette différenciation (Pechoux *et al.*, 1999). Cela conclurait les travaux que j'ai effectués et qui seraient susceptibles d'être publiés.

Comprendre la régulation de CCL28 est importante. En effet, outre l'intérêt agronomique de cette thématique, le porc étant très proche de l'homme, il représente un bon modèle biomédical (thérapie génique) et préclinique (xénogreffe, induction de tolérance...) pour l'Homme. Cette chimiokine intervient dans de nombreux types d'inflammation dermique comme le psoriasis mais aussi dans certains cancers comme celui du côlon (Luster *et al.*, 2005) et pourrait moduler la réponse dans les infections au HIV (Castelletti *et al.*, 2007).

Références bibliographiques

- Abda, R., C. Chevaleyre & H. Salmon, (1998) Effect of cryopreservation on chemotaxis of lymphocytes. *Cryobiology* **36**: 184-193.
- Arbones, M. L., D. C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard-Curry, G. Otten, D. J. Capon & T. F. Tedder, (1994) Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*. **1**: 247-260.
- Baggiolini, M., (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J.Intern.Med.* **250**: 91-104.
- Baumhater, S., M. S. Singer, W. Henzel, S. Hemmerich, M. Renz, S. D. Rosen & L. A. Lasky, (1993) Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* **262**: 436-438.
- Berg, E. L., M. K. Robinson, R. A. Warnock & E. C. Butcher, (1991) The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J.Cell Biol.* **114**: 343-349.
- Berlin, C., E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann & E. C. Butcher, (1993) Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**: 185-185.
- Berri, M., F. Meurens, F. Lefevre, C. Chevaleyre, G. Zanello, V. Gerds & H. Salmon, (2008) Molecular cloning and functional characterization of porcine CCL28: possible involvement in homing of IgA antibody secreting cells into the mammary gland. *Mol Immunol* **45**: 271-277.
- Bourges, D., C. Chevaleyre, C. Wang, M. Berri, X. Zhang, L. Nicaise, F. Meurens & H. Salmon, (2007) Differential expression of adhesion molecules and chemokines between nasal and small intestinal mucosae: implications for T- and sIgA+ B-lymphocyte recruitment. *Immunology* **122**: 551-561.
- Bourges, D., F. Meurens, M. Berri, C. Chevaleyre, G. Zanello, B. Levast, S. Melo, V. Gerds & H. Salmon, (2008) New insights into the dual recruitment of IgA+ B cells in the developing mammary gland. *Mol Immunol* **45**: 3354-3362.
- Bourges, D., C. H. Wang, C. Chevaleyre & H. Salmon, (2004) T and IgA B lymphocytes of the pharyngeal and palatine tonsils: differential expression of adhesion molecules and chemokines. *Scand.J.Immunol.* **60**: 338-350.
- Brambell, F. W. R., (1970) The transfer of passive immunity from mother to young. *In a Newberger, EL Tatum (eds) : frontiers of biology.North Holland, Amsterdam* **18**: 1-385.
- Briskin, M., D. Winsor-Hines, A. Shyjan, N. Cochran, S. Bloom, J. Wilson, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, N. Kassam, C. R. Mackay, W. Newman & D. J. Ringler, (1997) Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am.J.Pathol.* **151**: 97-110.
- Butcher, E. C. & L. J. Picker, (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**: 60-66.
- Butcher, E. C., R. G. Scollay & I. L. Weissman, (1980) Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol* **10**: 556-561.
- Butler, J. E., (1974) Immunoglobulins of the mammary secretions. *In BL Larson, VR Smith (eds) : Lactation.Academic Press, New York* **3**: 217-255.
- Caselitz, J., B. Walther, J. Wustrow, G. Seifert, K. Weber & M. Osborn, (1986) A monoclonal antibody that detects myoepithelial cells in exocrine glands, basal cells in other

- epithelia and basal and suprabasal cells in certain hyperplastic tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **409**: 725-738.
- Castelletti, E., S. Lo Caputo, L. Kuhn, M. Borelli, J. Gajardo, M. Sinkala, D. Trabattoni, C. Kankasa, E. Lauri, A. Clivio, L. Piacentini, D. H. Bray, G. M. Aldrovandi, D. M. Thea, F. Veas, M. Nebuloni, F. Mazzotta & M. Clerici, (2007) The mucosae-associated epithelial chemokine (MEC/CCL28) modulates immunity in HIV infection. *PLoS One* **2**: e969.
- Chabaudie, N., C. Le Jan, M. Olivier & H. Salmon, (1993) Lymphocyte subsets in the mammary gland of sows. *Res.Vet.Sci.* **55**: 351-355.
- Chensue, S. W., (2001) Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev* **14**: 821-835, table of contents.
- Chung, C. Y., S. Funamoto & R. A. Firtel, (2001a) Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem.Sci.* **26**: 557-566.
- Chung, C. Y., G. Potikyan & R. A. Firtel, (2001b) Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol.Cell* **7**: 937-947.
- Czinn, S. J. & M. E. Lamm, (1986) Selective chemotaxis of subsets of B lymphocytes from gut-associated lymphoid tissue and its implications for the recruitment of mucosal plasma cells. *J.Immunol.* **136**: 3607-3611.
- de Jesus Rodriguez, B., C. Chevalyre, G. Henry, D. Molle, I. Virlogeux-Payant, M. Berri, F. Boulay, J. Leonil, F. Meurens & H. Salmon, (2009) Identification in milk of a serum amyloid A peptide chemoattractant for B lymphoblasts. *BMC Immunol* **10**: 4.
- Dolan, S. A., M. Boesman-Finkelstein & R. A. Finkelstein, (1986) Antimicrobial activity of human milk against pediatric pathogens. *J Infect Dis* **154**: 722-725.
- Doppler, W., B. Groner & R. K. Ball, (1989) Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 104-108.
- Douglas, M. R., K. E. Morrison, M. Salmon & C. D. Buckley, (2002) Why does inflammation persist: a dominant role for the stromal microenvironment? *Expert Rev Mol Med* **4**: 1-18.
- Elsholtz, H. P., A. M. Lew, P. R. Albert & V. C. Sundmark, (1991) Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem* **266**: 22919-22925.
- Fernandez, E. J. & E. Lolis, (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 469-499.
- Godessart, N., (2005) Chemokine receptors: attractive targets for drug discovery. *Ann N Y Acad Sci* **1051**: 647-657.
- Goldblum, R. M., (1990) The role of IgA in local immune protection. *J Clin Immunol* **10**: 64S-70S; discussion 70S-71S.
- Gonzalez-Vallina, R., H. Wang, R. Zhan, H. M. Berschneider, R. M. Lee, N. O. Davidson & D. D. Black, (1996) Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). *Am J Physiol* **271**: G249-259.
- Halsey, J. F., C. Mitchell, R. Meyer & J. J. Cebra, (1982) Metabolism of immunoglobulin A in lactating mice: origins of immunoglobulin A in milk. *Eur.J.Immunol.* **12**: 107-112.
- Hanson, L. A., S. Ahlstedt, B. Andersson, B. Carlsson, M. F. Cole, J. R. Cruz, U. Dahlgren, T. H. Ericsson, F. Jalil, S. R. Khan, L. Mellander, R. Schneerson, C. S. Eden, T. Soderstrom & C. Wadsworth, (1983) Mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci* **409**: 1-21.
- Hieshima, K., H. Ohtani, M. Shibano, D. Izawa, T. Nakayama, Y. Kawasaki, F. Shiba, M. Shiota, F. Katou, T. Saito & O. Yoshie, (2003) CCL28 has dual roles in mucosal

- immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J.Immunol.* **170**: 1452-1461.
- Horuk, R., (2001) Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 313-335.
- Hyde, J., (2007) The role of the prolactin in regulating CCL28 expression. In: faculty of Brigham Young University. Brigham: Brigham Young University, pp. 40.
- Johnson, Z., A. E. Proudfoot & T. M. Handel, (2005) Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 625-636.
- Kaeffer, B., (1994) Immortal porcine lymphoblastoid cell lines: interest for veterinary and medical research 402. *Vet.Res.* **25**: 425-441.
- Kaeffer, B., E. Bottreau, T. L. Phan, M. Olivier & H. Salmon, (1990) Histocompatible miniature, boar model: selection of transformed cell lines of B and T lineages producing retrovirus. *Int.J.Cancer* **46**: 481-488.
- Kaeffer, B., E. Bottreau, P. Velge & P. Pardon, (1993) Epithelioid and fibroblastic cell lines derived from the ileum of an adult histocompatible miniature boar (d/d haplotype) and immortalized by SV40 plasmid 407. *Eur.J.Cell Biol.* **62**: 152-162.
- Kaetzl, C. S., (2005) The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* **206**: 83-99.
- Karecla, P. I., S. J. Bowden, S. J. Green & P. J. Kilshaw, (1995) Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 (alpha E beta 7). *Eur J Immunol* **25**: 852-856.
- Kraehenbuhl, J. P., C. Bron & B. Sordat, (1979) Transfer of humoral secretory and cellular immunity from mother to offspring. *Curr.Top.Pathol.* **66:105-57**: 105-157.
- Kunkel, E. J. & E. C. Butcher, (2003) Plasma-cell homing. *Nature Reviews. Immunology* **3**: 822-829.
- Kunkel, E. J., D. J. Campbell & E. C. Butcher, (2003) Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity 7. *Microcirculation.* **10**: 313-323.
- Luster, A. D., R. Alon & U. H. von Andrian, (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* **6**: 1182-1190.
- Mackay, C. R., W. L. Marston, L. Dudler, O. Spertini, T. F. Tedder & W. R. Hein, (1992) Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. *Eur.J.Immunol.* **22**: 887-895.
- Mantovani, A., (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol.Today* **20**: 254-257.
- Masinovsky, B., D. Urdal & W. M. Gallatin, (1990) IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol* **145**: 2886-2895.
- Meurens, F., M. Berri, J. Whale, T. Dybvig, S. Strom, D. Thompson, R. Brownlie, H. G. Townsend, H. Salmon & V. Gerds, (2006) Expression of TECK/CCL25 and MEC/CCL28 chemokines and their respective receptors CCR9 and CCR10 in porcine mucosal tissues. *Vet Immunol Immunopathol* **113**: 313-327.
- Michie, C. A., E. Tantscher, T. Schall & A. Rot, (1998) Physiological secretion of chemokines in human breast milk. *Eur.Cytokine Netw.* **9**: 123-129.
- Mickanin, C. S., U. Bhatia & M. Labow, (2001) Identification of a novel beta-chemokine, MEC, down-regulated in primary breast tumors. *Int.J.Oncol.* **18**: 939-944.
- Moser, B. & K. Willmann, (2004) Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* **63 Suppl 2**: ii84-ii89.
- Newburg, D. S. & W. A. Walker, (2007) Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric Research* **61**: 2-8.

- Osborn, L., C. Vassallo & C. D. Benjamin, (1992) Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J.Exp.Med.* **176**: 99-107.
- Pan, J., E. J. Kunkel, U. Gossler, N. Lazarus, P. Langdon, K. Broadwell, M. A. Vierra, M. C. Genovese, E. C. Butcher & D. Soler, (2000) A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J.Immunol.* **165**: 2943-2949.
- Parmely, M. J. & L. S. Manning, (1983) Cellular determinants of mammary cell-mediated immunity in the rat: kinetics of lymphocyte subset accumulation in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **409**: 517-533.
- Pechoux, C., T. Gudjonsson, L. Ronnov-Jessen, M. J. Bissell & O. W. Petersen, (1999) Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol* **206**: 88-99.
- Peeva, E., D. Michael, J. Cleary, J. Rice, X. Chen & B. Diamond, (2003) Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest* **111**: 275-283.
- Picker, L. J., J. R. Treer, B. Ferguson-Darnell, P. A. Collins, P. R. Bergstresser & L. W. Terstappen, (1993) Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J.Immunol.* **150**: 1122-1136.
- Pober, J. S. & R. S. Cotran, (1990) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* **50**: 537-544.
- Reinert P., R. C., (1990) Apport maternel à la protection du nouveau-né. In: Immunologie de la reproduction. Flammarion (ed). Paris: Voisin G.A., Edelman P., Genetet N., Bach J-F., Sureau C, pp. 439-445.
- Rice, G. E., J. M. Munro, C. Corless & M. P. Bevilacqua, (1991) Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am.J.Pathol.* **138**: 385-393.
- Rincheval-Arnold, A., L. Belair & J. Djiane, (2002) Developmental expression of pIgR gene in sheep mammary gland and hormonal regulation. *J Dairy Res* **69**: 13-26.
- Rosen, S. D. & C. R. Bertozzi, (1994) The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 663-673.
- Roux, M. E., M. McWilliams, J. M. Phillips-Quagliata, C. P. Weisz & M. E. Lamm, (1977) Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J.Exp.Med.* **146**: 1311-1322.
- Salmon, H., (1999) The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **72**: 143-155.
- Salmon, H., (2003) Immunophysiology of the mammary gland and transmission of immunity to the young. *Reprod.Nutr.Dev.* **43**: 471-475.
- Salmon, H., M. Berri, V. Gerds & F. Meurens, (2009) Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol* **33**: 384-393.
- Salmon, H., M. Olivier, C. Delouis, J. Paly & J. Fevre, (1984) A study of lymphocyte migration into the mammary gland of pregnant sows by in vivo labelling of lymph nodes. In *PJ Quinn (ed) : Cell mediated immunity.Seminar CEE*: 216-223.
- Skansen-Saphir, U., A. Lindfors & U. Andersson, (1993) Cytokine production in mononuclear cells of human milk studied at the single-cell level. *Pediatr Res* **34**: 213-216.
- Springael, J. Y., E. Urizar & M. Parmentier, (2005) Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 611-623.
- Streeter, P. R., E. L. Berg, B. T. Rouse, R. F. Bargatze & E. C. Butcher, (1988) A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* **331**: 41-46.

- Sun, Y. L., C. S. Lin & Y. C. Chou, (2006) Establishment and characterization of a spontaneously immortalized porcine mammary epithelial cell line. *Cell Biol Int* **30**: 970-976.
- Tanneau, G. M., O. L. Hibrand-Saint, C. C. Chevaleyre & H. P. Salmon, (1999) Differential recruitment of T- and IgA B-lymphocytes in the developing mammary gland in relation to homing receptors and vascular addressins. *J.Histochem.Cytochem.* **47**: 1581-1592.
- Wang, W., H. Soto, E. R. Oldham, M. E. Buchanan, B. Homey, D. Catron, N. Jenkins, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. Nguyen, J. Abrams, D. Kershenovich, K. Smith, T. McClanahan, A. P. Vicari & A. Zlotnik, (2000) Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J.Biol.Chem.* **275**: 22313-22323.
- Watson, D. L., (1980) Immunological functions of the mammary gland and its secretion--comparative review. *Austr.J.Biol.Sc.:* 403-422.
- Wilson, E. & E. C. Butcher, (2004) CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate. *J Exp Med* **200**: 805-809.

Annexes

Annexe 1 : Électrophorèse

Gel d'agarose 1,5 %

Tampon TBE 10x

Tris (hydroxyméthyl) aminométhane	108 g
Acide borique	55 g
EDTA, 2H ₂ O	7,44 g
H ₂ O q.s.p.	1 l

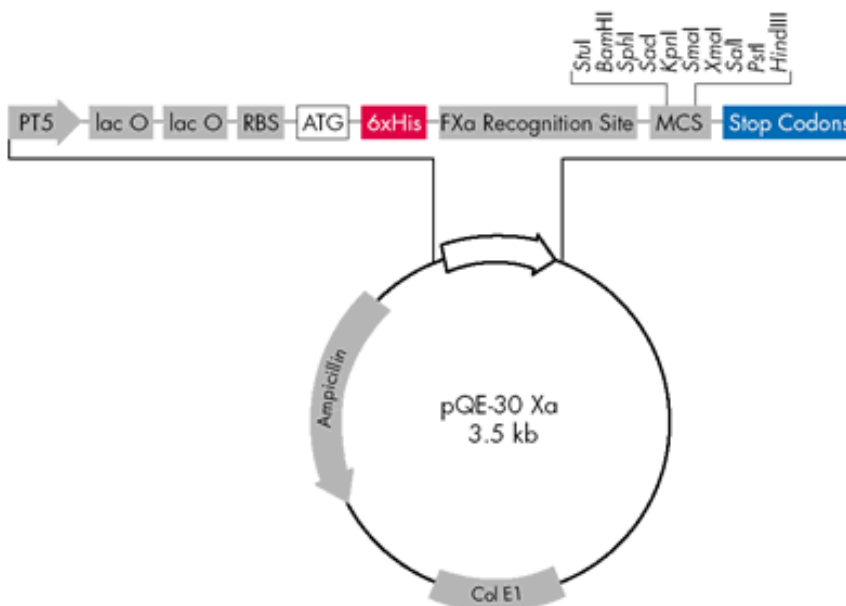
Tampon TBE 0,5x : TBE 10x dilué au 1/20 dans de l'H₂O

Gel d'agarose 1,5 %

Agarose (pour électrophorèse)	1,5 g
Bromure d'éthyidium (0,1 mg/ml)	0,5 ml (*)
TBE 0,5x (q.s.p.)	100 ml

(*) à ajouter après dissolution de l'agarose par chauffage dans le TBE 0,5x

Annexe 2 : Carte du plasmide pQE30. (Qiagen)



pQE-30 Vectors	Positions des éléments en bases	pQE-30
PT5: T5 promoter	Vector size (bp)	3461
lac O: lac operator	Start of numbering at <i>Xh oI</i> (CTCGAG)	1–6
RBS: Ribosome-binding site	T5 promoter/lac operator element	7–87
ATG: Start codon	T5 transcription start	61
6xHis: 6xHis tag sequence	6xHis-tag coding sequence	127–144
FXa Recognition Site: Factor Xa	Multiple cloning site	145–192
Protease recognition site	Lambda <i>t0</i> transcriptional termination region	208–302
MCS: Multiple cloning site	<i>rrnB</i> T1 transcriptional termination region	1064–1162
Stop Codons: In all 3 reading frames	ColE1 origin of replication	1638
Col E1: Col E1 origin of replication	®-lactamase coding sequence	3256–2396
Ampicillin: Ampicillin resistance gene		

Annexe 3 : Purification des plasmides

1. QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol using a microcentrifuge (QIAprep Miniprep Handbook)

C'est un protocole utilisé pour la purification d'ADN plasmidique jusqu'à 20 µg d'une culture d'une nuit de 1-5 ml.

Mode opératoire :

- 1/ Reprendre le culot bactérien dans 250 µl de tampon P1 et le transférer dans un tube eppendorff.
- 2/ Ajouter 250 µl du tampon P2 et agiter doucement le mélange en inversant le tube 4-6 fois.
- 3/ Ajouter 350 µl du tampon N3 et inverser immédiatement et doucement le tube 4-6 fois.
- 4/ Centrifuger pendant 10 min à 17 900 g.
- 5/ Séparer le surnageant et le déposer sur la colonne QIAprep Spin.
- 6/ Centrifuger 30-60 s. Jeter l'éluat.
- 7/ Laver la colonne QIAprep Spin en déposant 0,5 ml de tampon PB et centrifuger 30-60 s. Jeter l'éluat.
- 8/ Laver la colonne QIAprep Spin en déposant 0,75 ml de tampon PE et centrifuger pendant 30-60 s.
- 9/ Jeter l'éluat et centrifuger une seconde fois pendant 60 s pour éliminer le tampon de lavage résiduel.
- 10/ Mettre la colonne sur un tube neuf. Pour éluer l'ADN, déposer 50 µl du tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH8,5) ou de l'eau au centre de la colonne, laisser pendant 1 min puis centrifuger 1 min.

2. Plasmid DNA purification Using QIAGEN Plasmid Mega Kits

C'est le protocole utilisé pour la préparation de plasmide jusqu'à 2,5 mg utilisant le « QIAGEN Plasmid Mega Kit » à partir d'une culture de 500 ml.

Mode opératoire :

- 1/ Reprendre le culot bactérien avec 50 ml de tampon P1.
- 2/ Ajouter 50 ml de tampon P2, mélanger doucement en inversant le tube 4-6 fois. Incuber à température ambiante pendant 5 min.
- 3/ Ajouter 50 ml de tampon P3 refroidi, mélanger immédiatement et doucement en inversant le tube 4-6 fois et incuber dans la glace pendant 30 min.
- 4/ Centrifuger à plus de 20 000 g pendant 30 min à 4°C. Séparer rapidement le surnageant contenant l'ADN plasmidique du culot.
- 5/ Centrifuger encore une fois le surnageant à plus de 20 000 g pendant 15 min à 4°C. Séparer rapidement le surnageant du culot.
- 6/ Equilibrer le QIAGEN-tip 2500 en déposant 35 ml de tampon QBT et laisser la colonne se vider par gravité.
- 7/ Déposer le surnageant (de l'étape 5) sur la QIAGEN-tip et le laisser passer à travers la résine par gravité.
- 8/ Laver la QIAGEN-tip avec un volume total de 200 ml de tampon QC.
- 9/ Eluer l'ADN avec 35 ml de tampon QF.
- 10/ Précipiter l'ADN en ajoutant 24,5 ml (0,7 volume) d'isopropanol à température ambiante à l'ADN élué. Mélanger et centrifuger immédiatement à 15 000 g pendant 30 min à 4°C. Séparer doucement le surnageant.
- 11/ Laver le culot d'ADN avec 7 ml d'éthanol 70% à température ambiante et centrifuger à plus 15 000 g pendant 10 min. Séparer doucement le surnageant.
- 12/ Laisser le culot d'ADN sécher à l'air pendant 10-20 min et le reprendre dans le volume voulu de tampon (e.g. : tampon TE, pH8,0, ou 10 mM Tris-Cl, pH 8,5).

Annexe 4 : Milieu Luria Bertani (LB)

1. Milieu LB liquide (g/l)

Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	10

2. Milieu LB/ampicilline (LB/amp) : LB liquide + ampicilline à une concentration finale de 100µg/l

3. LB agar : LB liquide + agar 15g/l

4. Boîte LB/amp : LB agar + ampicilline à une concentration finale de 100µg/l.

Annexe 5 : Tampons de purification des protéines sous conditions natives

1. Tampon de lyse (1 l)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O (MW 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
10 mM imidazole	0,68 g imidazole (MW 68,08 g/mol)
pH ajusté à 8,0 par NaOH.	

2. Tampon de lavage 20 mM imidazole (1 l)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O (MW 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
20 mM imidazole	1,36 g imidazole (MW 68,08 g/mol)

pH ajusté à 8,0 par NaOH.

3. Tampon de lavage 50 mM imidazole (1 l)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O (MW 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
50 mM imidazole	3,4 g imidazole (MW 68,08 g/mol)

pH ajusté à 8,0 par NaOH.

4. Tampon d'éluion à 250 mM d'imidazole (1 l)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O (MW 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
250 mM imidazole	17,00 g imidazole (MW 68,08 g/mol)

pH ajusté à 8,0 par NaOH.

Annexe 6 : Solution du SDS-PAGE

1. Acrylamide/Bis : 30% Acrylamide : N,N'-Methylene-bis-acrylamide solutions 37,5 : 1 mixture (30%T, 2,67%C)- BIORAD

2. 10% (w/v) SDS : Dissoudre 10 g de SDS dans 90 ml d'eau déionisée en agitant doucement. Ramener à 100 ml avec de l'eau déionisée.

3. 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Tris base	27,23 g
Eau déionisée	80 ml

Ajuster à pH 8,8 avec du HCl 6N. Ramener à un volume final de 150 ml avec de l'eau déionisée. Garder à 4°C.

4. 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Tris base	6 g
Eau déionisée	60 ml

Ajuster à pH 6,8 avec du HCl 6N. Ramener à un volume final de 100 ml avec de l'eau déionisée. Garder à 4°C

5. Tampon de charge : « SDS reducing buffer »

eau déionisée	3,55 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
glycerol	2,5 ml
10%(w/v) SDS	2,0 ml
0,5%(w/v) bromophenol blue	0,2 ml
Volume total	= 9,5 ml

Garder à température ambiante.

Avant chaque utilisation, ajouter 50 µl de β-Mercaptoethanol à 950 µl de tampon de charge. Diluer l'extrait à migrer à ½ dans le tampon de charge, porter à 95°C pendant 10 min.

6. Tampon de migration 10x (10x electrode running buffer), pH 8,3

Tris base	30,3 g
Glycine	144,0 g
SDS	10,0 g

Dissoudre pour un volume final de 1 l avec de l'eau déionisée. Ne pas ajuster le pH avec de l'acide ou de la base. Garder à 4°C.

Diluer au 1/10 avant chaque utilisation.

7. 10% APS

Ammonium persulfate 100 mg

Dissoudre dans 1 ml d'eau déionisée. A préparer avant chaque utilisation.

8. Gel de séparation (« resolving gel ») 15% (10 ml)

H ₂ O	2,3 ml
30% Acrylamide mix	5,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

9. Gel de tassement (« stacking gel ») 5% (3 ml)

H ₂ O	2.1 ml
30% Acrylamide mix	0,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	0,38 ml
10% SDS	0,03 ml
10% APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

10. Solution colorante du gel

Méthanol / eau / acide acétique 40 : 50 : 10 à 0,2% de Bleu Brillant de Coomassie

11. Solution décolorante du gel

Méthanol / eau / acide acétique 25 : 65 : 10

Annexe 7 : Protocole détaillé de double marquage sur coupes de mamelle de porc

Matériels et méthodes

Coupes : mamelle en lactation de porc hc

Les organes prélevés sont congelés en azote liquide et stockés à -70°C.

Coupes fixées 10 min à l'acétone à -20°C.

Dilution (en RPMI) des anticorps monoclonaux :

Anticorps primaires

-Contrôle isotypique	IgG 1 (ref: MAB002- <i>R&D</i>)	500 mg/ml	dil 1/50 =10 mg/ml
-Contrôle isotypique	IgG2b (ref: X0944- <i>Dako</i>)	87 mg/ml	dil 1/10
-Souris anti humain CCL 28	IgG1 (ref: MAB 7171- <i>R&D</i>)	500 mg/ml	dil 1/50 =10 mg/ml

-Souris anti cell endothéliale	IgE (clone: Mill11)	dil 1/10
-Souris anti cytokeratin18/FITC	IgG1(ref: F4772- <i>Sigma</i>)2200mg/ml	dil 1/200=11mg/ml
-Souris anti myosine	IgG2b (clone: MF20-DSHB)	dil 1/10

Sérum pour bloquer le non spécifique

-Sérum de porc F adulte N° 46048 C-		dil ½ ou 1/10
-Sérum de chèvre adulte N° 51815 C-		dil 1/10
-Sérum de rat adulte		dil 1/10
-Sérum de souris adulte		dil ½
-Lapin anti souris IgG (H+L) (ref: 315-007-003) Frag Fab 1000mg/ml (<i>Jackson Immuno Research</i>)		dil 1/100=10mg/ml

Anticorps secondaires

-Rat anti souris IgE/biotine dil 1/100 + 10% serum de porc et 10% serum de rat	(ref: 13-5992- <i>eBioscience</i>)
-Chèvre anti souris IgG1/FITC dil 1/300 + 10% serum de porc et 10% serum de chèvre	(ref: 1070-02- <i>S.Biotech.Ass</i>)
- Chèvre anti souris IG/biotine dil 1/250 + 10% serum de porc et 10% serum de chèvre	(ref: E 0433- <i>Dako</i>)
- Chèvre anti souris IgG2b/RPE dil 1/300 + 10% serum de porc et 10% serum de chèvre	(ref: 1090-09- <i>S.Biotech.Ass</i>)

Complexe Enzyme/Fluorochromes

-Streptavidine/RPE dil 1/100 en PBS 1% BSA	(ref: R 0438- <i>Dako</i>)
-Streptavidine/Rhodamine dil 1/200 en PBS 1% BSA	(ref: S000-00- <i>Rockland</i>)

PBS 1 (*maison*)

PBS 2 (ssCa⁺⁺,Mg⁺⁺/1% BSA/0.05% Tween-*maison*)

Technique

Entourer la coupe de PAPpen

1. Réhydratation 5 minutes en PBS (*maison*)
2. Incubation 10 min Avidine
3. Bain de 5 min de PBS
4. Incubation de 10 min Biotine
5. Bain de 5 min de PBS
6. Incubation du Sérum de Porc au ½, 30 min
7. Bain de 5 min de PBS
8. Incubation (45 min, t° amb et humide, 50 ml par coupe).

Contrôle isotypique	isotype IgG1
Contrôle isotypique	isotype IgG2b

PBS	Nous n'avons pas de contrôle isotypique IgE
Souris anti cell endothéliale	Isotype IgE
Souris anti humain CCL28	Isotype IgG1
Souris anti cytokérotin/FITC	Isotype IgG1
Souris anti myosine	Isotype IgG2b

Suivant le plan -> voir feuille annexée « coupes cryotome »
9. 3 bains de 5 min en PBS 2

10. Incubation (45 min, t° amb et humide, 50 ml par coupe)

Pour CCL28 et son contrôle
-chèvre anti souris IgG1 FITC (en double avec Mil11) ou chèvre anti souris IgG/Biotine (en double avec la cytokérotine)

Pour le Mill 11

-rat anti souris IgE biotinylé

Pour la Myosine

-chèvre anti souris IgG2b/RPE

11. 3 bains de 5 min en PBS 2

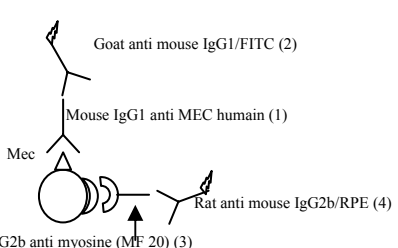
12. Incubation (45 min, t° amb et humide, 50 ml par coupe)

Pour Mil11 (en double avec Mec) et MEC (en double avec la cytokérotine)
-Streptavidine/Rhodamine

13. 3 bains de 5 min en PBS.

14. Montage en milieu adapté IF (*Dako*).

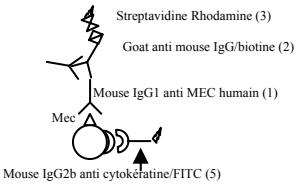
Double marquage CCL28 et myosine

Séparé			Combiné		Simultanément
					
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Schéma du double marquage Mec et Myosine</div>					
PBS 1 5' Avidine 10' PBS 1 5' Biotine 10' PBS 1 5' Sérum de porc 30' PBS 1 5'					
1 ^{er} Anticorps					
Contrôle – IgG2b	Myosine IgG2b	Ctrl IgG1	Mec IgG1	Mec IgG1	Mec + Myosine IgG1 IgG2b
			PBS 2 3X5'		
Goat anti mouse IgG2bRPE	Goat anti mouse IgG2bRPE	Goat anti mouse IgG1/FITC	Goat anti mouse IgG1/FITC	Goat anti mouse IgG1/FITC	Goat anti mouse IgG1/FITC + Goat anti mouse IgG2b/RPE
PBS 2 3X5'					
2 ^{ème} Anticorps					
		Myosine IgG2b 45'	Contrôle – IgG2b 45'	Myosine IgG2b 45'	
PBS 2 3X5'					
			Complexes		
		Goat anti mouse IgG2b/RPE	Goat anti mouse IgG2b/RPE	Goat anti mouse IgG2b/RPE	
			PBS 2 3X5'		

Double marquage MEC et Mil11

	Séparé			Combiné	Simultanément	
				PBS 1 5' Avidine 10' PBS 1 5' Biotine 10' PBS 1 5' Sérum de porc 30' PBS 1 5'		
1 ^{er} Anticorps						
Contrôle – IgG1	Anti hMec IgG1	Mil 11 IgE	Ctrl IgG1	Mec IgG1	Ctrl + mil 11 IgG1 IgE	Mec + mil 11 IgG1 IgE
PBS 2 3X5'						
2 ^{ème} Anticorps						
Goat anti mouse IgG1/FITC	Goat anti mouse IgG1/FITC	Rat anti mouse IgE/biotine	Goat anti mouse IgG1/FITC	Goat anti mouse IgG1/FITC	Goat anti mouse IgG1/FITC + Rat anti mouse IgE/biotine	Goat anti mouse IgG1/FITC + Rat anti mouse IgE/biotine
PBS 2 3X5'						
Complexes						
		Streptavidine Rhodamine	Mil 11 IσF	Mil 11 IσF	Streptavidine Rhodamine	Streptavidine Rhodamine
PBS 2 3X5'						
			Rat anti mouse IgE/biotine	Rat anti mouse IgE/biotine		
PBS 2 3X5'						
			Streptavidine Rhodamine	Streptavidine Rhodamine		
PBS 2 3X5'						

Double marquage Mec et Cytokératine

scénario	Combiné		
 <p>Streptavidine Rhodamine (3) Goat anti mouse IgG/biotine (2) Mouse IgG1 anti MEC humain (1) Mec Mouse IgG2b anti cytokératine/FITC (5)</p> <p style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content; margin: 5px auto;">Schéma du double marquage Mec et cytokératine</p>	PBS 1 5' Avidine 10' PBS 1 5' Biotine 10' PBS 1 5' Serum de porc 30' PBS 1 5'		
1 ^{er} Anticorps			
Cytokératine IgG1/FITC - 45'	Ctrl -IgG1 45'	Ctrl -IgG1 45'	Anti hMec IgG1 - 45'
PBS 2 3X5'			
2 ^{ème} secondaire			
	Goat anti mouse IgG/Biotine	Goat anti mouse IgG1/FITC	Goat anti mouse IgG/Biotine
PBS 2 3X5'			
	Serum de souris au1/2	Serum de souris au1/2	Serum de souris au1/2
PBS 2 3X5'			
	Complexes	ou	Anticorps
	Streptavidine Rhodamine - 45'	Anti hMec IgG1 - 45'	Streptavidine Rhodamine - 45'
PBS 2			
	Cytokératine IgG1/FITC - 45'	Goat anti mouse IgG/Biotine - 45'	Cytokératine IgG1/FITC - 45'
PBS 2 3X5'			
		Streptavidin	
PBS 2 3X5'			

Annexe 8 : Publication n°1

Identification in milk of a serum amyloid A peptide chemoattractant for B lymphoblasts

Berardo de Jesus Rodriguez†, Claire Chevaleyre†, Gwénaële Henry, Daniel Mollé, Isabelle Virlogeux-Payant, Mustapha Berri, François Boulay, Joëlle Léonil, François Meurens and Henri Salmon

†Equal contributors

BMC Immunol **10**: 4 (2009)

Annexe 9 : Publication n°2

**Molecular cloning and functional characterization of porcine CCL28:
Possible involvement in homing of IgA antibody secreting cells into
the mammary gland**

Mustapha Berri, Francis Meurens, Francis Lefevre, Claire Chevaleyre, Galliano Zanello,
Volker Gerds, Henri Salmon
Mol Immunol **45**: 271-277 (2008)

Étude des facteurs humoraux spécifiques du recrutement des cellules sécrétant des immunoglobulines (plasmocytes à IgA) dans la mamelle en lactation

Chez les espèces de mammifères pour lesquelles il n'y a pas de transfert d'anticorps de la mère au fœtus au cours de la gestation, le nouveau-né a besoin pour sa survie de recevoir une couverture immunitaire venant de sa mère ; cette couverture consiste en colostrum qui confère une immunité systémique et en lait qui non seulement apporte les nutriments pour la survie du nouveau-né mais également une protection locale. Chez les artiodactyles non ruminants, le lait apporte sa protection immunitaire via les IgA. Ceux-ci dérivent de la production locale dans la GM par les plasmocytes à IgA. Ces plasmocytes ont pour origine soit l'intestin, soit le tractus aérien supérieur ainsi qu'ont pu le suggérer les études d'immunisation maternelle par des virus à tropisme aéro-digestif. La démonstration des liens entre ces muqueuses et la mamelle revient à caractériser les molécules d'adhésion et les facteurs humoraux qui président à la domiciliation des plasmablastes à IgA du tractus aérien supérieur ou de l'intestin.

Mon étude s'inscrit dans la continuité de l'objectif de l'équipe qui consiste à accroître la concentration des IgA dans le lait, ce qui nécessite la connaissance des facteurs de domiciliation des plasmocytes dans la mamelle. Après avoir déterminé les molécules d'adhésion endothéliale, je me suis préoccupée de caractériser les facteurs humoraux. J'ai donc commencé à chercher la présence de tels facteurs dans le lait puisque les plasmocytes à IgA s'accumulent en lactation.

Mon travail a consisté à purifier des facteurs humoraux du lait en fonction de leur capacité chimioattractante sur les lymphocytes B et j'ai procédé de même pour les chimiokines épithéliales.

J'ai contribué à mettre en évidence un peptide chimioattractant dérivé de la Serum Amyloid A qui s'est révélé être présent également en gestation, ce qui donc ne satisfaisait pas à la condition de la présence uniquement en lactation.

J'ai également mis en évidence que la chimiokine CCL28 était la seule qui augmentait pendant la lactation, qu'elle était présente dans la cellule épithéliale et qu'elle se retrouvait dans le lait. J'ai alors caractérisé le type cellulaire en cause pour démontrer que la cellule myoépithéliale pourrait également contribuer à sa synthèse, se surajoutant à la production de la cellule épithéliale mammaire.

Pour répondre à la question de la production maximale de chimiokine CCL28 en lactation, j'ai suspecté une origine hormonale, et montré que la prolactine avait une activité stimulante sur l'expression des transcrits des cellules épithéliales mammaires en culture.

L'ensemble de ces résultats s'intègre dans la vision générale de la production des IgA dans la GM et suggère de nouveaux moyens pour augmenter cette production afin d'assurer une meilleure protection des muqueuses du nouveau-né.

Mots clés : Immunité-lait-chimiokines-plasmocytes-Imunoglobulines A-recrutement