

**ISABEL CHÂTEAUNEUF**

**CULTURE *IN VITRO* DE LYMPHOCYTES B HUMAINS:  
ASPECTS CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES**

**Mémoire  
présenté  
à la Faculté des Études Supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)**

**Département de biochimie et de microbiologie  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL**

**MARS 1999**

**© Isabel Châteauneuf, 1999**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-43799-X

Canada



## **RÉSUMÉ**

Au début des années 1990, Banchereau et coll. ont élaboré un système permettant la culture *in vitro* de lymphocytes B normaux. Dans cette étude, nous avons caractérisé un système de culture dérivé du système initial de Banchereau, le système de culture CD40L dans le but de 1) comprendre les paramètres influençant la prolifération des cellules B normaux et 2) produire des anticorps polyclonaux humains *in vitro*. Nos résultats montrent que le système CD40L permet la prolifération des cellules B isolées du sang périphérique mais permet également l'enclenchement partiel du processus de différenciation. Cette différenciation est mesurable par une sécrétion d'anticorps, une perte de viabilité (caractéristique des cellules B différenciées) et une modification dans l'expression de marqueurs de surface. Nos résultats suggèrent que la sensibilité à l'apoptose observée chez les cellules différenciées dans le système CD40L correspond entre autres choses à une baisse de production de protéine Bcl-X<sub>L</sub>. Nous avons par la suite mis au point un système de culture (anti-CD27) qui favorise la différenciation ; nos résultats démontrent qu'on peut accroître considérablement la sécrétion d'anticorps polyclonaux humains à l'aide d'un tel système.

## **AVANT - PROPOS**

Je tiens d'abord à remercier sincèrement ma directrice de recherche Mme Renée Bazin pour son accueil, sa confiance, ses conseils et sa grande disponibilité. Je ne pourrais passer sous silence la collaboration et l'amitié de chacun des membres de l'équipe du laboratoire de recherche que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ces deux années. Évidemment, je remercie l'organisme Héma-Québec pour les moyens techniques et financiers mis à ma disposition pour la réalisation de ce projet.

Je voudrais remercier mes parents pour leurs encouragements constants au cours de mes études. Je leur suis reconnaissante de m'avoir permis d'accomplir ce qui me tenait à cœur et de m'avoir soutenue dans mes moments d'incertitude.

# **TABLE DES MATIÈRES**

<b>RÉSUMÉ</b>	<b>3</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
1- Génération des lymphocytes B <i>in vivo</i>	14
2- Activation, prolifération et différenciation des lymphocytes B	19
2.1- Activation	19
2.1.1- <i>In vivo</i>	19
2.1.2- <i>In vitro</i>	20
2.1.2.1- Principes du système de culture CD40L	20
2.1.2.2- Applications du système de culture CD40L	23
2.2- Prolifération	24
2.2.1- <i>In vivo</i>	24
2.2.2- <i>In vitro</i>	24
2.3- Différenciation	25
2.3.1- <i>In vivo</i>	25

2.3.2- <i>In vitro</i>	26
3 - La mort cellulaire	29
3.1- La nécrose	29
3.2- L'apoptose	29
3.3- Gènes reliés à l'apoptose	31
3.3.1- Bcl-2	33
3.3.2- Bcl-X <sub>L</sub>	34
3.3.3- Mcl-1	36
3.3.4- A1	37
3.3.5- Bad	37
3.3.6- Bak	38
3.3.7- Bax	39
3.3.8- Bag-1	40
4- Objectifs du projet	41
<b>CHAPITRE II : MATÉRIEL &amp; MÉTHODES</b>	<b>43</b>
1- Aspects cellulaires	43
1.1 - Lignées cellulaires	43
1.2 - Lymphocytes B	44
1.2.1- Isolement des lymphocytes B	44
1.2.2- Système de culture CD40L	44
1.2.3- Système de culture anti-CD27	45
1.3- Viabilité	46
1.3.1- Évaluation de la viabilité	46
1.3.2- Induction de l'apoptose : Traitement à la cycloheximide	46
1.3.3- Détection de l'apoptose	46
1.4- Analyse de l'expression des marqueurs de surface	47
1.5- Production d'anticorps	48
1.5.1- Évaluation de la sécrétion d'anticorps	48
1.5.2- Étude de la polyclonalité des anticorps	49

<b>2- Aspects moléculaires : analyse de l'expression des gènes reliés à l'apoptose</b>	<b>50</b>
2.1- Extraction des ARN	50
2.2- Analyses de type Northern blot	50
2.3- Préparation des extraits protéiques	51
2.4- Analyses de type Western blot	51
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS</b>	<b>53</b>
1 - Évaluation de la prolifération des lymphocytes B dans le système de culture CD40L	53
2- Analyse de la différenciation des lymphocytes B dans le système de culture CD40L	56
2.1- Analyse de la sécrétion d'anticorps	56
2.2- Analyse de l'expression des marqueurs de surface	57
2.3- Analyse de la susceptibilité à l'apoptose	60
2.3.1 - Étude de la viabilité cellulaire	60
2.3.2 - Analyse de la mortalité préférentielle des plasmocytes	62
3 - Analyse de l'expression des gènes de la famille Bcl-2 chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L	64
3.1 - Analyse de la synthèse de la protéine anti-apoptotique A1	65
3.2 - Analyse de la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-2	65
3.3 - Analyse de la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-X <sub>L</sub>	69
3.4 - Analyse de l'expression du gène anti-apoptotique Bag-1	69
3.5 - Analyse de l'expression du gène pro-apoptotique bak	74
4 - Transfert des lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L dans le système anti-CD27	76



<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION</b>	<b>81</b>
1- Les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L prolifèrent pendant plusieurs semaines	<b>81</b>
2- Les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L peuvent se différencier en plasmocytes	<b>82</b>
3- Les lymphocytes B différenciés en plasmocytes meurent par apoptose suite à un traitement à la cycloheximide	<b>84</b>
4- Certains membres de la famille Bcl-2 ne peuvent être associés aux variations du comportement des lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L	<b>85</b>
4.1- A1	<b>85</b>
4.2- Bcl-2	<b>86</b>
4.3- Bak	<b>86</b>
4.4- Bad	<b>87</b>
5- Les variations du taux de synthèse de la protéine Bcl-X <sub>L</sub> chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L sont associées aux variations du comportement cellulaire	<b>88</b>
6- L'expression du gène bag-1 pourrait être associée à l'enclenchement du processus du différenciation	<b>89</b>
7- Le système de culture anti-CD27 permet d'améliorer la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B	<b>91</b>
8- Les anticorps produits par les lymphocytes B dans les système de culture CD40L et anti-CD27 sont polyclonaux	<b>92</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>93</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>95</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>97</b>

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>ADN</b>	<b>Acide désoxyribonucléique</b>
<b>ADNc</b>	<b>ADN complémentaire</b>
<b>ARN</b>	<b>Acide ribonucléique</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of differentiation</b>
<b>CDF</b>	<b>Cellules dendritique folliculaire</b>
<b>CMH</b>	<b>Complexe majeur d'histocompatibilité</b>
<b>GC</b>	<b>Germinal center (Ex. : cellules GC i.e. cellules des centres germinatifs)</b>
<b>ICAMs</b>	<b>Molécules d'adhésion intercellulaire</b>
<b>Ig A, D, E, G, M</b>	<b>Immunoglobulines de classe A, D, E, G ou M</b>
<b>IgIV</b>	<b>Immunoglobulines intraveineuses</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukines</b>
<b>LFA-1, LFA-3</b>	<b>Antigène associé à la fonction lymphocytaire</b>
<b>NGF</b>	<b>Nerve growth factor</b>
<b>PBL</b>	<b>Lymphocytes du sang périphérique</b>
<b>TCR</b>	<b>Récepteur des cellules T</b>
<b>TNF</b>	<b>Tumor necrosis factor</b>
<b>TNFr</b>	<b>Récepteur du TNF</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

**TABLEAU 3.1- Évaluation de l'induction de l'apoptose chez les plasmocytes  
retrouvés dans le système de culture CD40L**

**66**

## **LISTE DES FIGURES**

<b>FIGURE 1.1- Résumé du développement des lymphocytes B chez l'Homme</b>	<b>16</b>
<b>FIGURE 1.2- Stimulation de la prolifération et induction de la différenciation des lymphocytes B par les cellules T auxiliaires</b>	<b>18</b>
<b>FIGURE 1.3- Schéma du système de culture CD40L et de la commutation de classe dans ce système</b>	<b>21</b>
<b>FIGURE 1.4- Membres de la famille Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques</b>	<b>32</b>
<b>FIGURE 3.1- Prolifération des lymphocytes B dans le système de culture CD40L</b>	<b>54</b>
<b>FIGURE 3.2- Dosage des immunoglobulines totales sécrétées par les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>58</b>
<b>FIGURE 3.3- Analyse de la polyclonalité des anticorps produits par les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L</b>	<b>59</b>

<b>FIGURE 3.4- Analyse de l'expression des marqueurs de surface CD20, CD38 et CD40 chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>61</b>
<b>FIGURE 3.5- Analyse de la sensibilité à la mort induite par la CHX chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>63</b>
<b>FIGURE 3.6- Analyse de la synthèse de la protéine A1 chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>67</b>
<b>FIGURE 3.7- Analyse de la synthèse de la protéine Bcl-2 chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>68</b>
<b>FIGURE 3.8- Analyse de la synthèse de la protéine Bcl-X<sub>L</sub> chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>70</b>
<b>FIGURE 3.9- Analyse de l'expression du gène <i>bag-1</i> chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>72</b>
<b>FIGURE 3.10- Analyse de la synthèse de la protéine Bag-1 chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>73</b>
<b>FIGURE 3.11- Analyse de l'expression du gène <i>bak</i> chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L</b>	<b>75</b>
<b>FIGURE 3.12- Dosage des immunoglobulines totales sécrétées par les lymphocytes B cultivés dans le système de culture anti-CD27</b>	<b>78</b>
<b>FIGURE 3.13- Analyse de la polyclonalité des anticorps produits dans le système de culture anti-CD27</b>	<b>80</b>

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

Depuis l'arrivée de la technologie des anticorps monoclonaux, l'utilisation des anticorps à des fins scientifiques et cliniques a connu un essor considérable. Cependant, pour plusieurs applications, il est encore nécessaire de faire appel à des préparations polyclonales d'anticorps ; par exemple, de très grandes quantités d'IgIV (Immunoglobulines (polyclonale) Intraveineuses) sont requises pour soulager les gens atteints de certaines maladies auto-immunes. Des immunoglobulines polyclonales spécifiques sont aussi utilisées contre certaines infections (ex. : CMV) ou pour la prévention de la maladie hémolytique du nouveau-né. La quantité d'immunoglobulines nécessaire à ces fins est importante et requiert le fractionnement de centaines de litres de sang humain.

Au début des années 1990, un système de culture de lymphocytes B *in vitro* a été mis au point par l'équipe de Jacques Banchereau (Banchereau, 1991a et 1991b). Puisque les lymphocytes B sont responsables de la génération des anticorps *in vivo*, il est donc possible d'envisager la production d'immunoglobulines humaines par le biais de cultures *in vitro*. Les principes régissant le développement de ces cellules sont décrits dans les sections qui suivent.

## **1- GÉNÉRATION DES LYMPHOCYTES B *IN VIVO***

L'humain génère des lymphocytes tout au cours de sa vie bien que la quantité produite diminue avec l'âge. Cela permet le renouvellement constant des lymphocytes B ainsi que la production d'anticorps contre une grande variété de pathogènes (Tsubata, 1991). Chez les mammifères, ces cellules sont issues de la moelle osseuse qui offre un microenvironnement essentiel à leur développement (Kincade, 1993). Le processus de génération des lymphocytes B est complexe. Les paragraphes suivants le résumant brièvement afin de connaître la provenance des cellules à l'étude dans ce projet (Janeway, 1996).

À partir d'une cellule souche (Figure 1.1), il y a formation d'une cellule pro-B précoce dont les gènes d'immunoglobulines ne sont pas réarrangés. Les cellules pro-B se différencient en pré-B tardives et pré-B caractérisées respectivement par les réarrangements incomplets et complets des gènes codant pour les chaînes lourdes  $\mu$  des immunoglobulines (Hardy, 1991). Les cellules B immatures sont ensuite générées lorsque les gènes codant pour la chaîne légère sont réarrangés et qu'il y a expression d'un IgM à la surface. Cela constitue la première phase du développement.

Les cellules B immatures sont rapidement sélectionnées dans la moelle osseuse. Si elles sont autoréactives, i.e lorsqu'elles sont activées par reconnaissance d'un antigène du soi, ces cellules sont éliminées probablement par apoptose. Ce phénomène s'appelle délétion clonale (Kincade, 1993). Les cellules qui subsistent à cette sélection pourront exprimer l'IgD de surface et migrer en périphérie ; ce sont les cellules B matures.

Les cellules matures vont donc quitter la moelle osseuse pour se diriger dans les ganglions lymphatiques, la rate et les autres tissus lymphoïdes. Les cellules B matures font

partie des lymphocytes recirculants i.e. ils passent du sang aux follicules lymphoïdes primaires pour retourner dans le sang périphérique.

Si, lors de son entrée dans un tissu lymphoïde, un lymphocyte B rencontre un antigène présenté par un lymphocyte T, il devient activé et prolifère. Certaines cellules B vont quitter la région riche en lymphocytes T pour former des centres germinaux. Les centres germinaux sont des sites d'intense prolifération pour les lymphocytes B ; il se produit chez ces cellules des mutations somatiques dans les gènes des régions variables des immunoglobulines bien que ceux-ci soient déjà réarrangés (MacLennan, 1992). Les cellules en prolifération vont éventuellement se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes) qui se retrouvent majoritairement dans les ganglions lymphatiques, la pulpe rouge de la rate et dans la moelle osseuse. Les cellules en prolifération peuvent aussi se différencier en lymphocytes B à mémoire ; ces cellules sont au repos et seront réactivées lors d'une seconde rencontre avec l'antigène. Les lymphocytes B à mémoire sont entre autres responsables de la mémoire du système immunitaire. Les cascades d'événements qui mènent à la formation de plasmocytes et/ou de cellules B à mémoire ne sont pas totalement éclaircies. Il est connu que les isotypes d'anticorps qui dominent le début des réponses secondaires et suivantes, sont d'ordinaire des IgG avec un peu d'IgA et d'IgE. Ces anticorps sont produits par des cellules B à mémoire qui ont déjà réalisé la commutation de l'IgM vers ces isotypes plus matures et qui expriment en surface des IgG, des IgA ou des IgE, de même que des molécules du CMH de classe II à un niveau quelque peu plus élevé que celui des cellules B naïves. Tous ces changements facilitent la capture et la présentation de l'antigène par les cellules B à mémoire et leur permettent de mettre en œuvre des interactions avec des cellules T auxiliaires armées à des doses d'antigène plus faibles (Janeway, 1996).

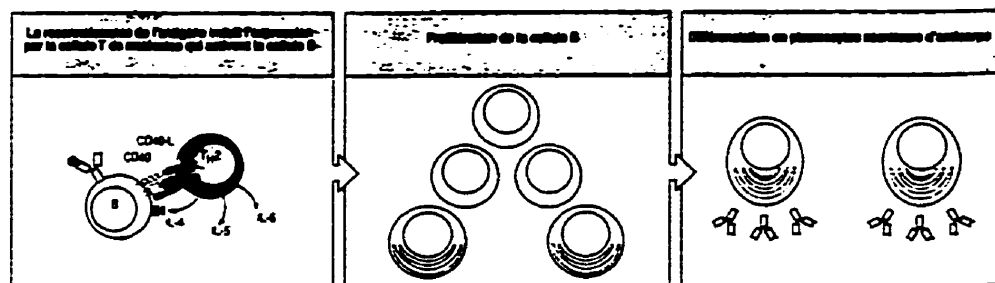


Cellules B		Classe de anticorps produits	Classe de anticorps sériques	Présence de chaînes muqueuses	Présence de chaînes J
Cellule B naïve		Complément synthétisé	Complément synthétisé	+	+
Cellule B naïve activée		Complément synthétisé	Complément synthétisé	+	+
Cellule B naïve activée		DJ	Complément synthétisé	+	+
Cellule B naïve		VHJ	Complément synthétisé	+	+
Cellule B naïve		VHJ synthétisé Chaine muqueuse synthétisée Chaine J synthétisée	Complément synthétisé	+	+
Cellule B naïve		VHJ synthétisé Chaine muqueuse synthétisée Chaine J synthétisée Chaine alpha synthétisée Chaine beta synthétisée Chaine gamma synthétisée Chaine delta synthétisée	VJ synthétisé	+	+
Cellule B naïve		VHJ synthétisé Chaine muqueuse synthétisée Chaine J synthétisée Chaine alpha synthétisée Chaine beta synthétisée Chaine gamma synthétisée Chaine delta synthétisée	VJ synthétisé	+	+
Cellule B naïve		Switch génétique Chaine muqueuse synthétisée Chaine J synthétisée	VJ synthétisé	+	+
Cellule B naïve		Switch génétique Chaine muqueuse synthétisée Chaine J synthétisée Chaine alpha synthétisée Chaine beta synthétisée Chaine gamma synthétisée Chaine delta synthétisée	VJ synthétisé	+	+

**FIGURE 1.1** Résumé du développement des lymphocytes B chez l'Homme  
(tiré de Janeway, 1996)

De façon générale, la sécrétion d'anticorps est initiée lorsqu'un lymphocyte B lie un antigène et qu'il y a signalement par un lymphocyte T (Figure 1.2). Un antigène peut se lier à l'immunoglobuline de surface du lymphocyte B et y être internalisé pour ensuite être présenté dans le contexte du CMH II. Le T auxiliaire (ou helper) reconnaît l'association peptide - CMH II et transmet un signal d'activation au lymphocyte B via les cytokines et via des associations ligand-récepteur. Ce type d'activation est désigné T-dépendante. Il est possible d'activer les lymphocytes B de façon T-indépendante ; les polysaccharides bactériens peuvent induire la sécrétion d'anticorps par cette voie. Cependant, lorsqu'il y a activation de façon T indépendante, certains signaux sont absents (notamment celui du CD40) et la commutation de classe n'a généralement pas lieu ; il y a alors production exclusive d'IgM (Pecanha, 1991).

Voilà donc un portrait très général de la génération des lymphocytes B. Les prochains paragraphes font état de façon plus explicite des processus d'activation, de prolifération et de différenciation de ces cellules.



**FIGURE 1.2 Stimulation de la prolifération et induction de la différenciation des lymphocytes B par les cellules T auxiliaires (Janeway, 1996)**

## **2 -ACTIVATION, PROLIFÉRATION ET DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES B**

### **2.1 - Activation**

#### **2.1.1 - *In vivo***

Au cours d'une réaction immunitaire *in vivo*, des lymphocytes T spécifiques s'apparient avec des cellules B. Les interactions qui surviennent amènent un échange intense d'informations qui mèneront à deux événements importants dans le cycle vital des lymphocytes B : l'induction de la prolifération et la différenciation en cellule productrice d'anticorps, le tout prenant place à l'intérieur d'un centre germinale créé suite à cette interaction (Deslauriers, 1996). Cette activation est due entre autres à une interaction entre le complexe antigénique MHC de classe II et le TCR ; le signal est augmenté par des interactions entre le LFA-3 et le CD2 ainsi que des interactions entre la molécule ICAM-I et LFA-I (Deslauriers, 1996). Plusieurs autres molécules de surface sont aussi impliquées dans l'activation des lymphocytes B et des lymphocytes T et ce, afin de solidifier l'interaction T-B et favoriser un contact prolongé, comme par exemple CD28 et CTLA4/B7 (Deslauriers, 1996). Cela permet la sécrétion directionnelle de cytokines (Deslauriers, 1996). Plusieurs molécules de surface sont impliquées dans la transmission de signal d'activation (ex. : CD22, CD40, CD21, CD19) (Deslauriers, 1996). Il est maintenant bien connu que le CD40 délivre le signal le plus important pour l'activation des lymphocytes B, plus important encore que les signaux transmis via la liaison de l'immunoglobuline de surface avec un antigène (Noelle, 1992). Au cours de l'interaction T-B, les lymphocytes sécrètent un certain nombre de cytokines qui ont un effet bénéfique sur les lymphocytes B. Cela comprend l'IL-2 qui induit la prolifération chez les cellules B et les cellules T, l'IL-4 qui agit tôt dans l'activation des lymphocytes B et l'IL-6 qui donne un fort signal de différenciation (Banchereau, 1994). Notons également que les cellules produisent

aussi le TNF $\alpha$  qui semble jouer un rôle important dans la croissance des lymphocytes B (Roitt, 1996).

### **2.1.2 - *In vitro***

#### **2.1.2.1 - Principes du système de culture CD40L**

La culture des lymphocytes B demandent une constante stimulation. Le premier système mettant à profit cette caractéristique a été élaboré par Banchereau (Banchereau, 1991a) et a enfin permis la survie à long terme *in vitro* de lymphocytes B purifiés via la liaison du CD40. L'antigène CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de 45-50 kilodalton qui fait partie d'une famille regroupant les récepteurs TNF, les récepteurs NGF et d'autres antigènes de surface dont le CD27 et Fas (Lane, 1992). L'antigène CD40 est exprimé par les cellules exprimant le CMH de classe II dont les cellules épithéliales, les cellules de Langherans et par certaines lignées de carcinomes (Banchereau, 1991b). Chez les lymphocytes B, le CD40 est présent à partir du stade « pré-B ». Lorsqu'il y a différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, le CD40 est toujours exprimé mais ne joue aucun rôle dans la survie cellulaire (Kooten, 1996). Dans le système de culture original, la stimulation des lymphocytes était assurée par un anticorps monoclonal spécifique au CD40 ; cet anticorps était présenté à l'antigène CD40 grâce au récepteur Fc $\gamma$ RII/CDw32 (Fc spécifique) exprimé par une cellule de fibroblaste murin irradiée (Banchereau, 1991b).

Le système de culture a grandement été amélioré par l'identification du ligand naturel du CD40, la gp39 (ou CD40L ou CD154). Il s'agit d'une glycoprotéine type II appartenant à la famille des récepteurs TNF (Hollenbaugh, 1992). L'isolement et la caractérisation de l'ADNc codant pour la protéine membranaire gp39 retrouvée sur les lymphocytes T activés

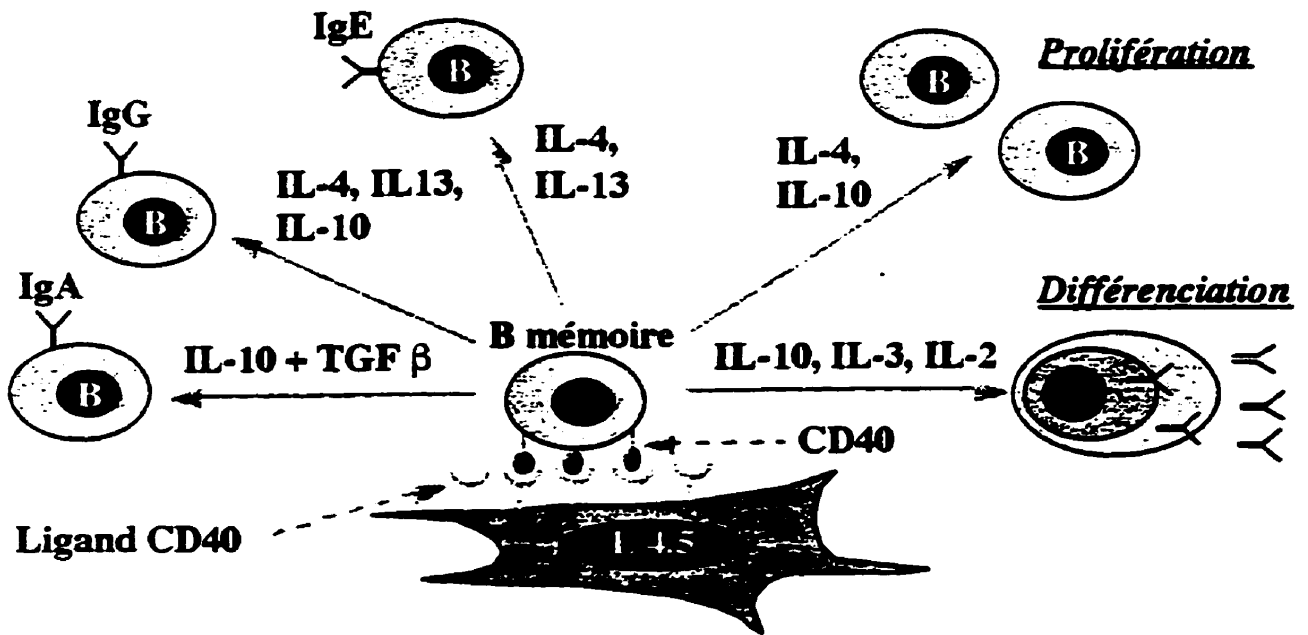


Figure 1.3 Schéma du système de culture CD40L et de la commutation de classe dans ce système (Aubin, 1996)

CD4<sup>+</sup> (Armitage, 1992) ont permis de transfecter des cellules facilement cultivables (cellules de type fibroblaste) ce qui vient par conséquent faciliter la culture de lymphocytes B. La liaison entre le CD40 et son ligand naturel présenté par les cellules de la lignée L4.5 permet au lymphocyte de sortir de son état de latence (G<sub>0</sub>) pour entrer éventuellement en phase de synthèse d'ADN (Figure 1.3 ). L'interleukine-4 (IL-4) utilisée dans le système semble être la cytokine de choix pour appuyer l'induction d'une forte prolifération des lymphocytes B stimulés permettant ainsi une croissance à long terme (Defrance, 1987). Bien sûr, d'autres molécules d'adhésion entrent en jeu lors d'une véritable collaboration T-B ; la liaison CD40-CD40L semble cependant être la plus importante. Ces autres molécules d'adhésion ne sont pas exprimées par les fibroblastes. En plus de favoriser la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, la liaison du CD40 protège les cellules de l'apoptose induite *in vitro* par la liaison du CD95 (Fas) ou de l'IgM de surface. Cela favorise également l'augmentation de l'expression de B7 (CD80), Fas, ICAM-1, CD23, de la lymphotoxin- $\alpha$  et de l'agrégation homotypique via LFA-1. Plus important encore, la liaison du CD40 favorise la commutation de classe des immunoglobulines. (Hanissian, 1997 ; Hollenbaugh, 1992)

Le signalement via le CD40 mène à la phosphorylation et/ou à la déphosphorylation d'un grand nombre de protéines incluant les tyrosines-kinases Lyn, Fyn et Syk. Des résultats obtenus à l'aide d'analyses réalisées sur des lymphocytes B isolés des PBL, démontrent que la liaison du récepteur de l'IL-4 mène à l'activation de facteurs de transcription STAT6. Par contre, la liaison du CD40 active la voie de signalement des kinases c-Jun. Le point de convergence entre ces deux voies semble être l'inactivation de I $\kappa$ B, l'inhibiteur naturel de NF- $\kappa$ B. Donc l'activation des lymphocytes B via le CD40 et l'IL-4 vise l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Jeppson, 1998). Ce facteur est impliqué dans la transcription du gène codant pour l'IL-6, elle-même impliquée dans la régulation autocrine de la différenciation des lymphocytes B.

### 2.1.2.2 - Applications du système de culture CD40L

Lorsque des lymphocytes B purifiés du sang périphérique sont mis en culture *in vitro*, l'activation de ces cellules se fait principalement par le biais du CD40 lorsqu'il se lie au CD40L ; cela donne le signal d'entrée en prolifération. Certaines cytokines peuvent être libérées par les lymphocytes B à ce moment ; la caractérisation de ces cytokines dans le système comprenant des cellules irradiées exprimant le gp39 et des lymphocytes B issus des PBL est présentement en cours dans notre laboratoire. Les cytokines TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-5, IL-6 et IL-8 sont produites par les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L. L'IL-6 semble être la seule cytokine dont l'expression est modulée. Il y a également production de  $\beta$ -actine (Sonia Néron, communication personnelle). L'ajout d'IL-4 exogène est cependant requis et semble être la cytokine la plus appropriée pour appuyer et renforcer le signal d'activation.

L'étude des centres germinaux menée par l'équipe de Banchereau, peut donner un indice sur ce qui se passe dans le système de culture. Une publication récente explique comment des lymphocytes B à mémoire et des plasmocytes ont été générés *in vitro* à partir de cellules de centres germinaux isolés à partir d'amygdales (Arpin, 1995). En suivant l'expression de certains marqueurs de surface, il a été possible de déterminer certaines phases dans la culture de lymphocytes B dans le système CD40L. Notons d'abord que les cellules B des centres germinaux (cellules B-CG) sont de phénotype CD38<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>. Une culture primaire a été élaborée pour remplacer l'étape à laquelle une cellule B-CG prend un antigène d'une cellule dendritique folliculaire (CDF) et le présente à un lymphocyte T exprimant le CD40L. Après trois jours de culture en conditions optimales, les cellules B-CG étaient en phase exponentielle de croissance et produisaient des Ig ainsi qu'une faible quantité de CD38 et de CD20. Fait à remarquer : les cellules GC ont été sauvées de l'apoptose et ont entrepris la prolifération suite à cette liaison CD40-CD40L ; elles ne se sont pas encore différenciées en plasmocytes ou en cellules B à mémoire (Arpin, 1995). Il a également été démontré que la liaison du CD40 (situé sur les lymphocytes B murins purifiés à partir des amygdales) au CD40L



induit la sécrétion des IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ainsi que le TNF- $\alpha$ , le LT- $\alpha$  et le GM-CSF (Burdin, 1995).

## **2.2 - Prolifération**

### **2.2.1 - *In vivo***

La prolifération et la différenciation sont deux événements exclusifs contrôlés par un équilibre entre des signaux cellulaires opposés. En plus d'augmenter le nombre de lymphocytes B, il se produit, lors de la prolifération, des événements caractéristiques de la réponse immunitaire comme par exemple la majorité des commutations d'isotypes. Cependant, la commutation peut aussi survenir avant la rencontre avec l'antigène i.e. tôt durant l'expansion clonale et la maturation des lymphocytes B. La régulation d'isotype est aussi contrôlée par les cytokines émises par les cellules T ; chez l'homme, l'IL-4 produite par les cellules T semble être impliquée dans la production massive d'IgE chez les individus souffrant d'atopie (manifestation clinique des réactions d'hypersensibilité de type I) (Roitt, 1996).

### **2.2.2 - *In vitro***

Il a été démontré dans notre laboratoire qu'il est possible d'augmenter le nombre de lymphocytes B d'environ 700 fois en 17 jours par le biais du système de culture CD40L (Aubin, 1996). Ces résultats suggèrent que la majorité des lymphocytes B dans ces cultures soient des lymphocytes B proliférants, du moins dans les premiers jours de culture, et que l'activation des lymphocytes B par le ligand du CD40 transfecté et exprimé par des cellules de fibroblaste est très efficace (Aubin, 1996).

Récemment, il a été démontré qu'une prolifération maximale des lymphocytes B provenant de centres germinaux est observée lorsqu'ils sont cultivés en présence de cellules dendritiques folliculaires, d'anticorps monoclonal dirigé contre le CD40 et d'une combinaison d'IL-4 et d'IL10 (Grouard, 1995). Ces résultats démontrent que les CDF induisent une prolifération à court terme des lymphocytes B. De plus, certains facteurs externes entrent en jeu au cours de la prolifération. La prolifération induite par le CD40L est accrue d'une façon significative en présence d'IL2, d'IL4 ou d'IL10 et fortement réprimée par le TGF- $\beta$  (Armitage, 1993).

## **2.3 - Différenciation**

### **2.3.1 - *In vivo***

Lorsque les lymphocytes B sont activés par un antigène, ils peuvent se différencier en cellules productrices d'anticorps et ainsi parvenir au stade final de différenciation ou devenir des cellules B à mémoire. Il semble évident que les centres germinaux des différents tissus lymphoïdes sont des sites importants pour le développement des lymphocytes B à mémoire. À ces endroits les cellules B entreprennent une mutation des gènes codant pour les régions variables de leur anticorps. Ce procédé peut résulter en la mort par apoptose de certaines cellules B qui auraient fait un mauvais réarrangement (Roitt, 1996). Notons cependant l'importance de l'interaction CD40-CD40L ; une gp39 mutée incapable de se lier au CD40 est retrouvée chez les patients souffrant du syndrome « X-linked hyper-IgM » (Arrufo, 1993). Les individus atteints possèdent des lymphocytes B incapables de faire la commutation de classe de l'IgM à l'IgG, à l'IgA et à l'IgE tel que prévu au cours de la maturation des lymphocytes B (Roitt, 1996). Encore une fois, l'interaction CD40-CD40L est importante mais demande l'assistance d'autres molécules de costimulation, notamment le CD27, pour mener à bien le processus de différenciation (Agematsu, 1998).

### 2.3.2 - *In vitro*

Un phénomène de différenciation des lymphocytes B a également été observé dans le système de culture CD40L (Aubin, 1996). À divers moments dans la culture des lymphocytes B, la proportion de plasmocytes a été évaluée en mesurant la quantité de cellules sécrétrices d'anticorps. Il semble qu'au jour 8 d'une culture typique, la population est majoritairement composée de cellules en prolifération puisque la sécrétion d'anticorps est faiblement détectée. Au 15<sup>ème</sup> jour de culture, la différenciation des lymphocytes semble très importante puisqu'une proportion élevée de plasmocytes y est détectée (environ 30%) ; le nombre de plasmocytes a été évalué indépendamment de l'isotype sécrété (Aubin, 1996). Les résultats obtenus démontrent que la différenciation se fait de façon graduelle à partir du jour 10 et ce jusqu'au jour 18 pour obtenir un maximum de 37,8% de plasmocytes. Cette différenciation semblait augmentée lorsqu'une fraction de l'ancien milieu de culture était mélangée avec le milieu frais. Il a été noté par l'auteur de la parution (Aubin, 1996) que la conservation d'une partie du milieu de culture à chaque transfert résultait en une meilleure différenciation des lymphocytes B ; cela serait dû à l'accumulation de certains facteurs endogènes (ex. cytokines sécrétées par les lymphocytes B proliférants).

Les études sur les centres germinaux dans le système de culture CD40L ont permis de confirmer la nécessité du CD40L pour la différenciation des cellules GC ( $CD38^- CD20^+$ ) en cellules B à mémoire ( $CD38^- CD20^+$ ) et en plasmocytes ( $CD38^+ CD20^-$ ) (Arpin, 1995). Le moyen de prouver cette hypothèse fût d'enlever le signal CD40L des cultures (en utilisant des cellules non transfectées). Le pourcentage de cellules ayant le phénotype  $CD38^+ CD20^-$  s'est accru avec l'enlèvement progressif du CD40L alors que le pourcentage de cellules ayant le phénotype  $CD38^- CD20^+$  a diminué. Les résultats obtenus démontrent que l'interruption du signal CD40L après trois jours de culture résulte en une différenciation terminale des lymphocytes B proliférants. La modulation de l'expression du CD40L sur les lymphocytes T qui interagissent avec les lymphocytes B *in vivo* pourrait donc être responsable (du moins en

partie) soit de la génération de cellules B à mémoire, soit de la génération de cellules sécrétrices d'anticorps (Arpin, 1995). La densité du ligand sur la cellule T serait aussi importante que le stade de différenciation des cellules B en ce qui a trait à la production d'anticorps. Cela suggère donc une régulation bidirectionnelle de la réponse des lymphocytes B aux interactions CD40-CD40L (Miyashita, 1997). Les plasmocytes obtenus dans le système de culture *in vitro* suite à une transmission de signal par le CD40L ont une morphologie correspondant à celle de cellules différenciées. Ils sont ovales et ont un noyau excentrique dense. Ces cellules ont perdu toute capacité proliférative i.e. elles sont incapables de se remettre à proliférer même lorsqu'elles se retrouvent en présence de cellules de fibroblaste transfectées avec le CD40L (Arpin, 1995). Par contre les cellules B à mémoire entrent en forte prolifération lorsque remises en présence de cellules de fibroblaste transfectées et font une synthèse modérée d'ADN en présence d'un anticorps dirigé contre les immunoglobulines de surface (Arpin, 1995).

Des études ont démontré que les plasmocytes précoces (situées entre le lymphoblaste et le plasmocyte sur la figure 1.1) constituent seulement 0,1% des PBL et que la présence de cellules stromales de la moelle osseuse est nécessaire pour éviter l'apoptose qui a lieu dans les trois jours suivant la mise en culture (Kawano, 1995). Le système de culture CD40L ne permet pas la survie de ces cellules (Kawano, 1995).

Un bon nombre d'études sont aujourd'hui menées sur la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. La découverte du CD27 et de son ligand, le CD70, a permis l'éclaircissement du processus. Le CD27 est une glycoprotéine transmembranaire de type I d'environ 120 kDa appartenant à la famille des récepteurs TNF (Tesselaar, 1997). Ce marqueur de surface est exprimé par les lymphocytes B et T non activés ; il s'agit en effet d'un marqueur des lymphocytes B à mémoire. Le ligand naturel du CD27, le CD70, est exprimé par les lymphocytes B et T activés (Tesselaar, 1997). Le CD70 est une protéine transmembranaire de type II présentant également des homologies avec les récepteur du TNF (Agematsu, 1997).

Des études réalisées à l'aide de lymphocytes B isolés du sang périphérique ont permis de cerner d'abord deux sous-populations : les cellules IgD<sup>+</sup> ou cellules B primaires et les cellules IgD<sup>-</sup> qui sont des B à mémoire qui ont subi la permutation de classe (switch). Une subdivision plus fine peut être faite sur la base de l'expression du CD27. Il est ensuite possible de distinguer 3 sous-classes : IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> (65.4% ± 6.4% des lymphocytes B du sang périphérique) qui sont en fait des B naïfs qui ne produisent pas d'anticorps, les cellules IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> (12.3% ± 2.0% des lymphocytes B du sang périphérique) qui produisent majoritairement des IgM et qui sont en transition pour l'expression du phénotype IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. Les cellules possédant ce dernier phénotype (19.4% ± 3.2% des lymphocytes B du sang périphérique) sont des B à mémoire qui produisent des IgA, des IgG et des IgM (Agematsu, 1997 ; Agematsu, 1995). Il semble que le système de culture CD40L favorise la prolifération des B à mémoire (Arpin, 1995) et que seules ces cellules peuvent sécréter des anticorps dans ces conditions (Kindler, 1997). De plus, l'addition de cytokines sécrétées par les Th<sub>2</sub> (notamment l'IL4) dans le système de culture CD40L pourrait favoriser l'expression du CD27 comme c'est le cas pour les lymphocytes B de patients atteints de leucémie (Ranheim, 1995). On rapporte d'ailleurs que la façon d'augmenter l'expression du CD27 chez les lymphocytes B est de les mettre en présence de SAC et d'IL-2 ou encore en présence du CD40L, d'IL2 et d'IL10 (Kobota, 1995). Or, la production d'immunoglobulines par ces cellules mémoires peut être fortement augmentée par la liaison de leur CD27 (Kobota, 1995). La liaison du CD27 par le CD70 induit l'expression du CD38 ce qui signifie que les cellules se sont différenciées en plasmocytes (Agematsu, 1998). Ces études suggèrent que le signalement par le CD40 agirait sur la phase précoce de l'activation tandis que la stimulation via le CD27 serait impliquée dans l'induction de la différenciation causant ainsi la sécrétion d'immunoglobulines (Agematsu, 1998). La présence des interleukines 2 et 10 lors d'interactions CD27 - CD70 améliore la sécrétion d'anticorps (Agematsu, 1998). Il est connu que l'IL-10 induit les lymphocytes B humains préalablement activés via le CD40 à sécréter de grandes quantités d'IgG, d'IgA et d'IgM (Defrance, 1992). De plus, l'IL-2 et l'IL-10 entrent en synergie afin d'induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes B normaux et leucémiques activés par un anticorps anti-CD40 (Fluckiger, 1993).

### **3 - LA MORT CELLULAIRE**

Les recherches menées jusqu'à présent ont bien démontré qu'il existe deux types majeurs de mort cellulaire : la nécrose qui est associée à des altérations cytoplasmiques et l'apoptose reliée à l'altération de l'ADN dans le noyau (Uchiyama, 1995). L'apoptose est un phénomène omniprésent dans la formation des lymphocytes B. En effet, c'est par le biais de l'apoptose que sont éliminées les cellules B autoréactives ou qui n'ont pas réarrangé correctement leurs gènes codant pour les immunoglobulines.

#### **3.1 - La nécrose**

La nécrose survient exclusivement lors d'un changement brutal des conditions environnantes les rendant ainsi trop différentes des conditions physiologiques. Certaines altérations morphologiques sont spécifiques à la nécrose : il y a par exemple perte de la perméabilité sélective des membranes cellulaires, perturbations de la membrane plasmique induisant des dommages aux membranes des organelles du cytoplasme (spécialement les mitochondries), dilatation du reticulum endoplasmique et désagrégation des polysomes. Le processus peut affecter plusieurs cellules à la fois (Cory, 1995).

#### **3.2 - L'apoptose**

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire contrôlée génétiquement qui survient généralement pour maintenir un nombre adéquat de cellules dans différents tissus lors de l'embryogénèse et dans l'optimisation des fonctions des systèmes immunitaires et nerveux (Cory, 1995). L'apoptose est caractérisée par la condensation du noyau, par la dégradation de

l'ADN en fragments de 180-200 paires de bases, par l'éclatement de la cellule en de nombreuses vésicules (corps apoptotiques) et cela en maintenant l'intégrité de la membrane plasmatique. Contrairement à la nécrose, l'apoptose peut affecter seulement une cellule (Cory, 1995).

Nos connaissances sur l'apoptose proviennent du modèle *Caenorhabditis elegans*. L'étude du nématode nous a renseigné sur la cascade intracellulaire programmée conduisant à la mort. Trois protéines de *C. elegans* sont essentielles au processus de l'apoptose : CED-3 et CED-4 qui favorisent l'apoptose et CED-9 qui l'inhibe (CED pour Cell Death) (Hengartner, 1994). CED-3 est une caspase (protéase à cystéine) qui coupe certaines protéines après des résidus spécifiques d'acide aspartique. CED-3 s'autoactive par sa propre coupure (Thornberry, 1998). CED-4 se lie à CED-3 et active cette dernière tandis que CED-9 lie CED-4 l'empêchant ainsi d'activer CED-3 (Chinnaiyan, 1997). Normalement, CED-9 forme un complexe avec CED-4 et CED-3 pour garder CED-3 inactive. Un stimulus apoptotique cause la dissociation de CED-9 permettant ainsi l'activation de CED-3 donc, l'enclenchement du processus menant à l'apoptose.

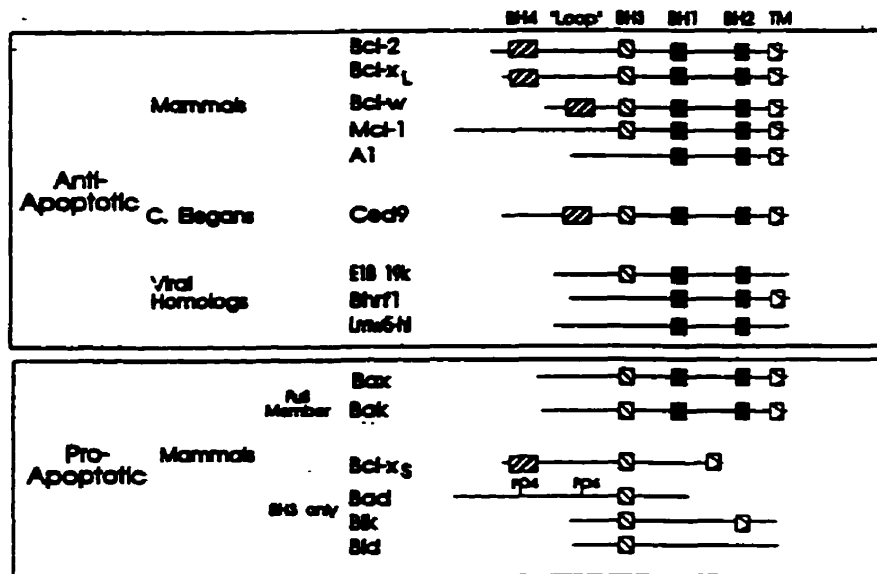
Le sentier apoptotique décelé chez *Caenorhabditis elegans* est, en plusieurs points, similaire au sentier apoptotique retrouvé chez certaines cellules de mammifères ayant reçu un stimulus apoptotique particulier. En effet, l'homologie entre Apaf-1 et CED-4 a été démontrée (Zou, 1997). Tout comme CED-4, Apaf-1 favorise l'activation des caspases et interagit avec Bcl-X<sub>L</sub> et la caspase 9 qui sont respectivement des homologues de CED-9 et CED-3 (Chinnaiyan, 1997 ; Spector, 1997).

### **3.3 - Gènes reliés à l'apoptose**

« Une cellule est destinée à mourir jusqu'à ce qu'elle reçoive le signal contraire de la part d'autres cellules. » (Cory, 1995) Cette hypothèse a longtemps soulevé la controverse jusqu'à ce que certains comportements cellulaires viennent l'appuyer. Le fait de porter un programme intrinsèque de mort cellulaire est un danger en soi ; l'évolution d'un système complexe de contrôle était de mise afin que la survie soit aussi une possibilité. Le gène *bcl-2* et d'autres gènes homologues sont les éléments clé de ce réseau de régulation (Cory, 1995).

Au moins 11 membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés dans les cellules de mammifères et certains autres sont d'origine virale (Chao, 1998 ; Yang, 1996) (Figure 1.4). Tous les membres possèdent au moins un des quatre domaines conservés désignés BH1 à BH4 (Bcl-2 Homology domains). La plupart des membres anti-apoptotiques qui sont efficaces contre une vaste gamme de stimuli apoptotiques (ou cytotoxiques) sont au moins constitués des domaines BH1 et BH2. Les membres qui possèdent les quatre domaines « BH » sont les plus structurellement semblables à Bcl-2. Les membres pro-apoptotiques sont subdivisés en deux sous-classes selon leur homologie à Bcl-2. Il y a d'abord la sous-classe des protéines de type Bax qui comprend Bak, Bax et Bik. Ces protéines sont constituées des domaines BH1, BH2 et BH3 et ressemblent étroitement à Bcl-2. Il y a ensuite la sous-classe de protéines à BH3 dont les membres ne possèdent que la courte partie centrale du domaine BH3. C'est le cas entre autres de la protéine Bad (Chittenden, 1995). Les membres de la famille Bcl-2, anti- et pro-apoptotiques, peuvent hétérodimériser via leur domaine BH. De récentes observations suggèrent que l'hétérodimérisation n'est pas nécessaire dans un contexte anti-apoptotique (Cheng, 1996). Par contre, elle est essentielle pour l'accomplissement de la fonction pro-apoptotique des protéines à BH3 (Chittenden, 1995). Cependant, les protéines de type Bax ne requièrent pas nécessairement d'hétérodimérisation.





**Figure 1.4 Membres de la famille Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques.**

(tiré de Chao, 1998)

L'expression des membres de la famille Bcl-2 dépend des conditions cellulaires environnantes. Par exemple, la transcription de plusieurs gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques est induite par la présence de certaines cytokines (Kozopas, 1993). Aussi, dans certaines cellules, l'expression de Bax est induite par des dommages qui nécessitent une réponse impliquant p53 (Miyashita, 1995). Les membres de la famille Bcl-2, anti- et pro-apoptotiques agissent en tant que contrôleurs ; c'est un déséquilibre entre les deux groupes d'antagonistes qui provoque l'activation des caspases et le dysfonctionnement des mitochondries (Chao, 1998). Les membres de la famille Bcl-2 peuvent également moduler la progression du cycle cellulaire (Linette, 1996). Par exemple, dans des conditions de cultures non-optimales, Bcl-2 favorise l'entrée en latence ( $G_0$ ) et retarde la rentrée dans le cycle. Cette fonction est complètement indépendante des fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 (Uhlmann, 1996).

Au cours de ce projet, l'expression des protéines reliées à l'apoptose a été étudiée chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L. Une revue des principaux membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 et A1) et pro-apoptotiques (Bad, Bak et Bax) fait l'objet des prochains paragraphes. La protéine anti-apoptotique Bag-1, qui ne fait pas partie de la famille Bcl-2, sera tout de même le sujet de quelques lignes.

### 3.3.1 - *Bcl-2*

Bcl-2 est reconnu pour inhiber l'apoptose induite par une grande variété d'agents. Par exemple, plusieurs lignées cellulaires (lymphoïde, myéloïde, neuronale) survivent lors d'une carence en cytokines (IL-3, IL-2, IL-7) ; cette survie est associée à la présence de Bcl-2. Le transcrit prédominant code pour un polypeptide de 239 acides aminés (Cory, 1995). La protéine Bcl-2 est ancrée du côté cytoplasmique des membranes mitochondriales, nucléaires et du reticulum endoplasmique. Bien que le domaine C-terminal soit important pour l'ancrage

aux membranes, il n'est pas essentiel à la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 (Nguyen, 1994). Cette protéine joue le rôle d'un canal sélectif en laissant circuler de petites molécules et certaines protéines (Green, 1998) ; Bcl-2 est donc responsable de l'intégrité des organelles. Elle prévient (directement ou non) le relâchement du cytochrome c des mitochondries ; cette libération du cytochrome c induit, avec l'aide de l'ATP, un changement structural chez la protéine Apaf-1. La restructuration d'Apaf-1 permet le recrutement et le « processing » de la procaspase 9. Le processus d'apoptose est alors irréversiblement enclenché (Zou, 1997). Cependant, Bcl-2 ne semble pas protéger uniquement en empêchant la libération du cytochrome c car dans certains cas, elle intervient alors que le cytochrome c est déjà relâché (Green, 1998). Comme c'est le cas pour certains autres membres anti-apoptotiques, l'activité de Bcl-2 peut être augmentée ou supprimée par phosphorylation notamment par les kinases JUN (Haldar, 1997 ; Ito, 1997). L'activation a lieu lorsque le résidu sérine en position 70 est phosphorylé ; il y a inactivation (ou, à tout le moins, altération) lorsque différents sites en forme de boucles sont phosphorylés (Haldar, 1997).

Bcl-2 donne le signal de survie lors de la sélection positive des lymphocytes B dans les centres germinaux (Liu, 1989) et lors du recrutement de cellules B à mémoire de forte affinité (Nunez, 1991). Il semble que parmi tous les membres de la famille, *bcl-2* soit le gène impliqué dans la survie des lymphocytes B naïfs et B à mémoire en périphérie (Ohta, 1995).

### 3.3.2 - *Bcl-X<sub>L</sub>*

Le transcrit de Bcl-X peut être épissé différemment et produire ainsi deux protéines (Bcl-X<sub>S</sub> et Bcl-X<sub>L</sub>) ayant des activités contraires (Cory, 1995). Bcl-X<sub>L</sub> possède 63 acides aminés de plus que Bcl-X<sub>S</sub> ; cette délétion survient dans une région très conservée et commune aux membres de la famille Bcl-2 (Tuscano, 1996). Bcl-X<sub>S</sub> favorise la mort cellulaire par inhibition de Bcl-2. Bcl-X<sub>L</sub> peut s'associer à Bax pour inhiber le processus de mort cellulaire ;

il semble également possible qu'il puisse agir seul dans le même but (Tuscano, 1996). Dans d'autres circonstances, la fonction protectrice de Bcl-X<sub>L</sub> peut être inhibée par association avec la protéine Bad (Tuscano, 1996). La détermination de la conformation tridimensionnelle de Bcl-X<sub>L</sub> a permis d'élucider le mystère des associations entre les membres de la famille Bcl-2 (Chittenden, 1995). La coalescence des hélices  $\alpha$  des régions BH1, BH2 et BH3 forme un creux dans lequel l'hélice  $\alpha$  d'un domaine BH3 peut se loger avec une affinité comparable à celle d'un récepteur et de son ligand (Sattler, 1997). La région BH4 de Bcl-X<sub>L</sub> est essentielle à l'accomplissement de son rôle anti-apoptotique et donc à la liaison à la protéine Apaf-1 (notons qu'une fraction du Bcl-X<sub>L</sub> cellulaire est associée aux membranes alors qu'une autre fraction est libre dans le cytosol). De cette façon, Bcl-X<sub>L</sub> empêche l'association d'Apaf-1 avec la procaspase-9 prévenant ainsi l'activation de la caspase 9. C'est à ce stade que certains membres pro-apoptotiques peuvent intervenir (notamment Bad et Bax) en liant Bcl-X<sub>L</sub> ce qui libère Apaf-1. Bcl-X<sub>L</sub> protège les cellules animales contre divers stimuli apoptotiques. Il semble que l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> soit essentiellement limitée aux pré-B, un stade de différenciation caractérisé par une sélection clonale rigoureuse et chez les cellules B matures suite à une activation (Grillot, 1996). Des résultats obtenus dans nos laboratoires établissent un lien entre la résistance à l'apoptose en présence de cycloheximide (CHX) et le niveau d'expression de Bcl-X<sub>L</sub> dans des cellules de myélome et des hybridomes dérivés de lymphocytes B (Gauthier, 1996). La CHX inhibe la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 80S du ribosome, ce qui empêche la liaison de la guanosine triphosphate (GTP) sur le ribosome. La GTP est nécessaire au ribosome afin qu'il puisse migrer sur l'ARN messager (Todorov, 1990). Normalement, l'arrêt de la traduction est un processus réversible. Cependant, dans certaines lignées (myélomes, hybridomes) il a été montré qu'un traitement à la CHX induit le processus de mort par apoptose, ce qui suggère que le processus de mort cellulaire est déjà enclenché mais réprimé par des protéines (possiblement de courte demi-vie).

Récemment, des résultats préliminaires obtenus dans nos laboratoires (Aubin, 1996) suggèrent que Bcl-X<sub>L</sub> est exprimé dans les lymphocytes B humains du sang périphérique cultivés *in vitro* dans le système de culture CD40L puisque les cellules B en prolifération dans

le système CD40L sont résistantes à l'apoptose induite par un traitement à la cycloheximide (Aubin, 1996). Ces résultats sont en accord avec les analyses récentes effectuées sur des lymphocytes B humains du sang périphérique cultivés dans le système CD40L et qui ont démontré que la liaison du CD40 par son ligand fait augmenter le niveau d'expression de Bcl-X<sub>L</sub> (Lomo, 1997). Cela assure la protection des lymphocytes B contre l'apoptose. L'IL4 favorise également l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> bien que le signal donné par le CD40 soit plus fort (Lomo, 1997). Les résultats préliminaires également obtenus démontraient une progression vers un stade de différenciation plus poussé (i.e. plasmocytes) chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L. C'est à partir de ces observations que l'analyse de l'expression de ce gène protecteur de l'apoptose à différents stades de la culture dans le système CD40L a été envisagée (Aubin, 1996).

### 3.3.3 - *Mcl-1*

Mcl-1 a été découvert en criblant des banques des cellules cancéreuses humaines (leucémie). Les banques ont été créées à différentes étapes de culture en présence d'esters de phorbol ce qui provoque la différenciation de ces cellules (Kozopas, 1996). La surexpression de *mcl-1* dans les cellules ovariennes de hamster inhibe l'apoptose induite par une surexpression de *c-myc* (Reynolds, 1994), ce qui suggérait que le produit du gène *mcl-1* soit un inhibiteur de la mort cellulaire. De façon similaire aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, la protéine Mcl-1 s'associe à Bax. Cependant, Mcl-1 semble être moins efficace que Bcl-2 pour retarder la mort cellulaire lorsque surexprimée dans des lignées de cellules humaines (Reynolds, 1994). Des analyses de type Western blot démontrent que Mcl-1, protéine d'environ 40 KDa, est exprimée par les lymphocytes B du sang périphérique (Ohta, 1995). Il semble que la réception d'un signal de survie par ces lymphocytes (ex. : IL-4 + anticorps anti-IgM) empêche la diminution de l'expression de Mcl-1. On croit que Mcl-1 pourrait réguler l'apoptose à la place de Bcl-2 qui lui ne subit aucune variation dans son expression dans ces conditions (Lomo, 1996). Les études de Lomo *et al.* (Lomo, 1997) tentent d'associer une augmentation de

l'expression de Mcl-1 chez les lymphocytes B du sang périphérique suite à une interaction CD40-CD40L en présence d'IL-4 ou d'IL-13 ; cependant, les effets observés sont plutôt limités.

### **3.3.4 - A1**

A1 favorise la survie cellulaire (Lin, 1993) en s'associant à Bax qui devient inapte à accomplir sa fonction pro-apoptotique (Seldak, 1995). La protéine A1 (19 KDa) partage des homologies de structure avec les autres membres de la famille Bcl-2 ; elle est constituée des domaines BH1 et BH2 mais n'a pas de région N-terminale riche en résidus chargés commune à la plupart des autres membres de la famille. L'induction de A1 n'est pas bloquée par la présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique ; la cycloheximide peut en quelque sorte induire l'expression de ce gène (Lin, 1993). Il a également été prouvé que A1 est exprimé dans le thymus et dans la rate mais non dans une variété de tissus non-hématopoïétiques chez la souris (Lin, 1993). L'expression de A1 chez les cellules B est faible à toutes les étapes précédant la maturation finale en périphérie (ex. : aux stades pro- et pré-B) (Tomayko, 1998). Contrairement aux autres membres de la famille à l'étude (Bcl-2 et Bax), l'expression de A1 est augmentée de 10 fois lorsque les cellules B immatures retrouvées en périphérie sont recrutées dans la rate pour devenir matures. Les auteurs proposent l'examen de la variation de l'expression de A1 comme marqueur de différenciation des lymphocytes B normaux (Tomayko, 1998).

### **3.3.5 - Bad**

La protéine *Bad* est essentiellement impliquée en faveur de la mort par apoptose. *Bad* fait également partie de la famille *bcl-2* dans la sous-classe des protéines à BH3. *Bad* dimérise

avec Bcl-X<sub>L</sub> et Bcl-2 mais non avec Bax, Bcl-X<sub>S</sub>, Mcl-1, A1 ou lui même. Bad se lie plus fortement à Bcl-X<sub>L</sub> qu'à Bcl-2 dans les cellules des mammifères ; cela a pour effet d'annuler l'activité de Bcl-X<sub>L</sub> (répresseur de la mort cellulaire) mais non celle de Bcl-2. Au départ, on croyait que l'association de Bad avec Bcl-X<sub>L</sub> libérait Bax favorisant l'apoptose (Yang, 1995). Beaucoup d'études ont été réalisées sur Bad pour découvrir que son activité pro-apoptotique dépend de son état de phosphorylation. Dans des cellules hématopoïétiques stimulées à l'IL-3, Bad est phosphorylée et donc séquestrée au cytosol par les protéines 14-3-3. C'est seulement lorsque Bad n'est pas phosphorylée qu'elle peut se lier à Bcl-X<sub>L</sub> ; dans cette situation, Bcl-X<sub>L</sub> est incapable de lier Apaf-1 et l'activation des caspases a lieu conduisant la cellule vers la mort (Francke, 1997). Dans ce cas-ci, le signal émis à partir du récepteur d'IL-3 semble être transmis via la protéine kinase Akt. La phosphorylation a lieu sur deux résidus sérine (positions 112 et 136) situées dans le site de liaison aux protéines 14-3-3 (Datta, 1997). Bad a été détectée dans plusieurs tissus normaux dont la rate ; le fait que Bad soit exprimé spécifiquement dans les lymphocytes B ne semble établi. Dans les cellules normales, le fait que Bad soit associée aux organelles vient du fait qu'elle se lie aux autres membres de la famille Bcl-2, eux-mêmes associés aux organelles *in vivo* (analyses d'immunohistochimie) (Kitada, 1998).

### 3.3.6 - *Bak*

Bak est une protéine de 211 acides aminés (23,4 kDa) à effet pro-apoptotique identifiée dans des lignées de cellules B transformées par le virus Epstein-Barr (Kiefer, 1995). Bak (Bcl-2-homologous antagonist/Killer) démontre des similarités structurales à Bcl-2 et aux autres membres de la famille particulièrement dans les domaines BH1 et BH2. Bak contient un domaine hydrophobique à son extrémité carboxy-terminale. Il s'agirait donc d'une protéine transmembranaire. Des analyses de l'ARN (Northern) ont montré que *bak* est détecté dans une grande variété de cellules sous la forme d'un transcrit de ≈2,4 Kb. Bien que le taux de détection le plus élevé se retrouve dans le cœur et les muscles squelettiques, *bak* est également détecté dans la rate, le thymus et les PBL prélevés de fœtus humains (Kiefer, 1995). En

revanche, d'autres études ont démontré que Bak était présent dans les lymphocytes de la rate et des ganglions mais non dans les lymphocytes du sang périphérique (Krajewski, 1996). La protéine Bak est la plupart du temps impliquée en faveur de la mort cellulaire. Bak est exprimé dans la plupart des tissus ; pour contrer l'effet néfaste de Bak, les cellules ont besoin d'un inhibiteur de l'apoptose et il semble que Bcl-X<sub>L</sub> soit le mieux placé pour remplir cette fonction étant donné qu'il est exprimé dans une grande variété de cellules (Kiefer, 1995).

### 3.3.7 - Bax

Tout comme Bcl-X<sub>L</sub> et Bcl-2, Bax a la capacité de former des canaux dans des membranes artificielles (*in vitro*). Les pores formés par Bcl-2 ont la particularité d'être sélectifs à certains ions (Green, 1998). Or, Bax est une protéine pro-apoptotique et il a été démontré que Bax peut contrer l'effet protecteur de Bcl-2 (Cory, 1995). Bax agit indépendamment des caspases. Donc, même en présence d'inhibiteurs de caspases, la surexpression de Bax (ou de protéines « Bax-like ») a pour effet de tuer les cellules de mammifères. Cela provoque la condensation de l'ADN, l'altération des membranes sans activer les caspases. La mort par apoptose reliée à la présence de Bax est due à sa capacité de former des pores provoquant la perméabilité des mitochondries (Green, 1998). Certains membres de la famille Bcl-2 ont la capacité de former des dimères avec Bax ; les protéines Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 et A1 sont des partenaires d'association. Les résultats obtenus suggèrent que la susceptibilité à l'apoptose est déterminée par de multiples associations compétitives dans lesquelles Bax semble être un partenaire commun (Sedlak, 1995). Lorsqu'il y a association de Bcl-2 et de Bax, cela prévient la mort cellulaire par apoptose. Par contre, lorsqu'il y a homodimérisation de Bax, cela accélère le processus de mort et inhibe aussi la protection fournie par l'hétérodimère Bcl-2/Bax (Tuscano, 1996). Lors de leur isolement du sang périphérique, les lymphocytes B expriment une protéine de 21 kDa qui est en fait la protéine Bax (Ohta, 1995).



### 3.3.8 - *Bag-1*

C'est en voulant comprendre la fonction cellulaire de Bcl-2 que la protéine Bag-1 a été découverte (Wang, 1996). Il a été démontré que Bag-1 interagit physiquement avec Bcl-2 *in vitro*. De plus, en présence de Bag-1 et de Bcl-2 dans une même cellule, on assiste à une synergie des fonctions anti-apoptotiques tel que démontré par des expériences de cotransfection (Wang, 1996). Bien que Bag-1 soit quasi ubiquiste, sa surexpression peut prolonger la survie cellulaire de concert avec Bcl-2 (Takayama, 1995). La protéine ne partage pas d'homologie avec quoi que ce soit de connu si ce n'est une courte région (37 à 73 aa) qui montre 50% d'homologie avec plusieurs protéines de type ubiquitine. Il s'agit d'une protéine acide (pI 4,81) qui ne contient pas de domaine transmembranaire (Takayama, 1995); le poids moléculaire attendu de Bag-1 humain est de 36 KDa (Packham, 1997). Il est maintenant connu que, tout comme Bcl-2, Bag-1 interagit avec la kinase à sérine/thréonine Raf-1, bien qu'elle ne soit pas phosphorylée par celle-ci (Wang, 1996). Il semble également que les cellules de mammifères expriment deux isoformes de la protéine Bag-1 qui sont générées par des initiations alternatives de la traduction (Packham, 1997); il est donc possible de retrouver, en plus de la forme à 32-36 KDa, une forme de plus haut poids moléculaire (~ 50 KDa) (Packham, 1997) désignée Bag-1L. Après analyses, il a été démontré que Bag-1L réside au noyau alors que Bag-1 est associé aux organelles (Takayama, 1997). Étrangement, Bag-1 n'est pas exprimé dans les lymphocytes du sang périphérique au repos (sans distinction entre cellules B ou T) ni dans les plasmocytes de la moelle osseuse (analyses d'immunohistochimie) (Takayama, 1997). L'augmentation de l'expression de Bag-1 est souvent associée à la présence de cytokines. Par exemple, chez les lymphocytes T, la liaison de l'IL-2 à son récepteur induit l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bag-1 (Adachi, 1998).

#### **4 - OBJECTIFS DU PROJET**

Des études récemment réalisées dans nos laboratoire démontrent que les lymphocytes B humains normaux cultivés *in vitro* dans le système de culture CD40L sont capables de se différencier (Aubin, 1996) ce qui confirme les précédentes études sur le sujet (Arpin, 1995). Cette différenciation est détectable par une augmentation du nombre de cellules sécrétrices d'anticorps. De plus, ces études suggéraient que les lymphocytes B différenciés étaient plus sensibles à l'apoptose que les lymphocytes B proliférant lorsqu'ils sont incubés en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique (CHX). L'hypothèse émise alors suggère que la résistance à l'apoptose observée chez les lymphocytes B en prolifération est due à l'expression d'un gène inhibiteur de l'apoptose tel que Bcl-X<sub>L</sub>. Cependant, aucune évidence expérimentale ne permettait alors d'appuyer cette hypothèse.

À la lumière de ces observations, le présent projet vise principalement la compréhension des limites du système de culture CD40L et ce, afin d'évaluer la possibilité d'utiliser un système de culture *in vitro* pour 1) permettre l'expansion massive des lymphocytes B isolés du sang périphérique et 2) permettre la différenciation contrôlée en vue de produire de grande quantité d'anticorps polyclonaux humains. D'un point de vue cellulaire, le comportement des lymphocytes B normaux sera évalué par l'élaboration de courbes de croissance, par des analyses de sécrétion d'anticorps, d'expression des marqueurs cellulaires de surface et de sensibilité à l'apoptose. Nous nous proposons de déterminer le moment où la différenciation s'installe dans le système et l'importance de cette différenciation par rapport à la prolifération. Nous voulons également démontrer que la baisse de viabilité précédemment observée (Aubin, 1996) au cours de la culture est due à la mort préférentielle des plasmocytes et que cette mort est réellement une mort apoptotique. D'un point de vue moléculaire, nous allons étudier l'expression des membres de la famille Bcl-2 qui semblent être impliqués dans le processus de mort cellulaire programmée dans le but d'associer l'expression d'un (ou plusieurs) gène(s) à certains comportements cellulaires. L'identification de tels gènes pourrait permettre

**d'augmenter la survie des cellules en culture *in vitro* par transfection, ce qui pourrait permettre d'accroître l'expansion maximale des cellules avant la différenciation. De plus, dans le cas où le système CD40L ne permettrait pas une différenciation massive des lymphocytes B ayant proliféré, l'utilisation de signaux secondaires favorisant la différenciation des lymphocytes B sera aussi évaluée.**

## **CHAPITRE II**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **1 - ASPECTS CELLULAIRES**

##### **1.1 - Lignées cellulaires**

Les cellules du fibroblaste de souris L929 (ATCC, Rockville, MD, USA) exprimant de façon stable le ligand de CD40 (CD154) à leur surface (Néron, 1996) sont désignées L4.5. Les cellules du fibroblaste de souris (L929) exprimant de façon stable le récepteur FcγRII/CDw32 sont désignées 16.2CG7 (Peltz, 1988). Les lignées cellulaires L929, L4.5, et 16.2CG7 étaient disponibles dans nos laboratoires au début de ce projet.

Les cellules L4.5, L929 et 16.2CG7 sont cultivées en milieu Iscove (Iscove's modified Dulbecco's medium ; Gibco/BRL, Burlington, ONT.) additionné de 5% de sérum bovin (Fetalclone I ; Hyclone Laboratories Inc, Logan, Utah) et des antibiotiques (pénicilline (50 U/ml), streptomycine (50 µg/ml) (Sigma, St-Louis, MO, USA)). Les cellules sont incubées à

37°C dans un incubateur à atmosphère humide (Forma Scientific, Marietta, OH, USA) contenant 10% de CO<sub>2</sub>. Lors des passages, les cellules sont lavées une fois au PBS (PO<sub>4</sub>, 10mM, pH 7,4, NaCl 150 mM,) suppléé avec 2 mg/ml de glucose (PBS-glucose). Les cellules sont ensuite décollées du flacon suite à une incubation (1 minute, 37°C) en présence de trypsine-EDTA (0,5 mg/ml trypsine, 0,2 mg/ml Na<sub>4</sub>-EDTA) (Gibco/BRL). L'action de la trypsine est inhibée par l'ajout du milieu de culture contenant le sérum.

## **1.2 - Lymphocytes B**

### **1.2.1 - Isolement des lymphocytes B**

Les lymphocytes (PBL) de donneurs volontaires en santé ont été isolés du sang périphérique par centrifugation sur gradient de Ficoll-Paque (Pharmacia biotech, Uppsala, Sweden). Les lymphocytes T ont été enlevés des PBL suite à trois adsorptions successives sur des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps monoclonal dirigé contre le CD2 selon les recommandations du fabricant (DynaL, New-York NY, USA). Suite à cela, les cellules adhérentes sont éliminées (adhérence de 4 heures dans une plaque à 96 puits (Falcon ; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA)). La pureté des lymphocytes B est évaluée par cytométrie à flux sur la base de l'expression du CD40.

### **1.2.2 - Système de culture CD40L**

Les lymphocytes B sont cultivés tel que précédemment décrit (Néron, 1996) en plaque (96 puits) à une concentration de  $2,5 \times 10^4$  cellules par puits (100 µl/puits) en présence de  $1 \times 10^4$  cellules (100 µl/puits) L4,5 irradiées au césium 137 (7500 rad) (Gammacell 1000 ELITE ;

Nordion International, Kanata, ONT.). Le milieu utilisé est composé d'Iscove additionné de 10% de FBS (Characterized serum ; Hyclone Laboratories) décomplémenté (inactivé 30 minutes à 56°C), de la transferrine humaine (5 µg/ml, (Sigma)), de l'insuline bovine (5 µg/ml, (Sigma)), de l'IL-4 recombinant humain (100 U/ml, (Genzyme, Cambridge, MA, USA ou R&D Systems, Minneapolis, MN, USA )) et des antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml), Streptomycine (50 mg/ml)). Les cultures sont gardées à 37°C dans un incubateur à atmosphère humide contenant 10% de CO<sub>2</sub>. Le renouvellement du milieu est fait tous les trois jours par remplacement de 100 µl de milieu usé par du milieu frais contenant les mêmes additifs. Tous les six jours, les lymphocytes B doivent être transférés sur des cellules L4.5 fraîchement irradiées. Lors des renouvellements de milieu, la concentration des cellules B est réajustée à  $2,5 \times 10^4$  cellules par puits si la densité cellulaire est trop élevée.

### **1.2.3 - Système de culture anti-CD27**

Les lymphocytes B sont retirés du système de culture CD40L et dénombrés. La concentration cellulaire est réajustée pour avoir  $2,5 \times 10^4$  cellules par puits. Les cellules 16.2CG7 fraîchement irradiées (7500 rad) sont également ajoutées à raison de  $1 \times 10^4$  cellules par puits. Le milieu utilisé est composé d'Iscove suppléé avec 10% de FBS décomplémenté (inactivé à la chaleur), de la transferrine humaine (5 µg/ml), de l'insuline bovine (5 µg/ml), des antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml), Streptomycine (50 mg/ml)), de l'IL-2 humaine recombinante (50 U/ml) (R&D systems), de l'IL-10 humaine recombinante (50 ng/ml) (R&D systems) et l'anticorps monoclonal dirigé contre le CD27 humain (Ansell Corporation, Bayport, MN) à raison de 1µg/ml. Les cultures sont gardées à 37°C dans un incubateur à atmosphère humide contenant 10% de CO<sub>2</sub>.

### **1.3 - Viabilité**

#### **1.3.1 - Évaluation de la viabilité**

L'évaluation de la concentration des cellules viables est faite selon le principe d'exclusion du bleu de trypan. Une solution de bleu de trypan 0,4% (préparé dans du NaCl 150 mM) (Gibco/BRL) est mélangée à la suspension cellulaire (1 : 1). Le comptage est réalisé à l'aide d'un hémacytomètre (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA).

#### **1.3.2 - Induction de l'apoptose : traitement à la cycloheximide**

La cycloheximide (CHX) (Sigma) est ajoutée aux cellules à une concentration finale de 25 µg/ml. Les cellules sont incubées pendant trois heures à 37°C dans un incubateur à atmosphère humide contenant 10% de CO<sub>2</sub> (si détection de l'apoptose par cytométrie à flux) ou pendant six heures à 37°C avec agitation continue (si détection de l'apoptose à l'aide du bleu de trypan). Les conditions d'incubation varient en fonction du test de détection de l'apoptose qui suivra l'induction à la CHX.

#### **1.3.3 - Détection de l'apoptose**

L'évaluation de l'apoptose est faite à l'aide du test à l'annexin V couplée à un agent fluorescent, soit le PE (Pharmingen, Mississauga, ONT.) soit le FITC (gracieuseté du Dr E. Pryzdial, CBS, Ottawa, ONT). Des colorants fluorescents sont également utilisés afin d'évaluer la viabilité cellulaire ; le 7-amino-actinomycine (7-AAD) (Pharmingen) ou l'iodure de

propidium (gracieuseté du Dr E. Pryzdial). Après un traitement de trois heures en présence de CHX, les cellules sont lavées au PBS-glucose. Les marquages à l'annexin V : PE et au 7-AAD sont réalisés de la façon suggérée par le commerçant. Les marquages à l'annexin V : FITC et à l'iodure de propidium sont réalisés de façon similaire. Pour les contrôles positifs de marquage à l'annexin V, les cellules sont perméabilisées à l'aide d'un tampon HBS/Ca<sup>2+</sup> contenant de la saponine à 0,3% ; elles sont ensuite marquées selon la procédure habituelle. Pour les contrôles négatifs de marquage à l'annexin V, les cellules sont reprises, après le lavage, dans un tampon HBS/EDTA (5mM) et marquées selon la procédure habituelle. Les cellules sont analysées au laboratoire de cytométrie à flux (cytofluoromètre Coulter Epics, Laboratoire de recherche du CHUQ, Pavillon CHUL, QC).

#### **1.4 - Analyse de l'expression des marqueurs de surface**

À différents moments au cours de la culture, les lymphocytes B sont prélevés ( $2,5 \times 10^5$  cellules) et analysés en fonction de l'expression des marqueurs de surface. Les cellules sont d'abord lavées dans le PBS-glucose froid. Pendant ce temps, les dilutions d'anticorps recommandées par le fournisseur (anti-human CD20 : FITC (Ansell Corporation), anti-CD38 : FITC (Serotec, Hornby, ONT.), anti-CD40 : FITC (Serotec) et les contrôles de spécificité d'isotype (Serotec et Ansell Corporation) sont préparées dans l'Iscove froid contenant 1% de sérum bovin décomplémenté. Après le lavage, les cellules sont reprises dans les solution d'anticorps (100µl) et incubées sur la glace pendant 30 minutes. Les anticorps non liés sont éliminés par un lavage au PBS-glucose froid. Les cellules sont reprises dans le PBS et analysées immédiatement ou fixées à la PBS-paraformaldéhyde 4% (incubation de 30 minutes à la température de la pièce), conservées à 4°C et analysées au cours de la semaine au laboratoire de cytométrie à flux. Pour analyser l'expression du marqueur CD27, il faut d'abord incubé en



présence d'un anti- CD27 humain(Ancell Corporation) produit chez la souris de la façon décrite ci-haut. Les cellules sont lavées et incubées en présence d'un anticorps anti-IgG murin couplé au FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Après un dernier lavage, les cellules sont analysées ou fixées.

## **1.5 - Production d'anticorps**

### **1.5.1 - Évaluation de la sécrétion d'anticorps**

La technique utilisée est celle de l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) couramment utilisée. Brièvement, la surface des puits est recouverte avec un anti-Ig humain de chèvre (anti-IgG (H+L)) (Jackson Immuno Research Laboratories) 10 µg/ml dans un tampon carbonate 100 mM, pH 9,7. Après une nuit d'incubation à 4°C (ou 30 minutes à 37°C), la plaque est lavée avec un solution saline (150 mM NaCl) puis réincubée (30 minutes, 37°C) après y avoir déposé une solution de PBS-caséine (0,25% caséine dans du PBS) dans le but de bloquer les sites de fixation résiduels. Pendant ce temps, les dilutions des surnageants de culture de lymphocytes B sont préparées dans du PBS-caséine. Les dilutions d'une solution calibrée d'immunoglobulines humaines (Sigma) sont également préparées. La plaque est lavée de nouveau ; les différentes dilutions sont déposées dans les puits et le tout est incubé pendant 30 minutes à 37°C. La plaque est lavée de nouveau. L'anticorps de révélation est alors ajouté (anti IgG (H+L) humain de chèvre couplé à la peroxydase (Jackson Immuno Research Laboratories)) à la dilution recommandée. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, la plaque est lavée une dernière fois puis la solution substrat est ajoutée (O-phényldiamine 1mg/ml dans un tampon citrate 0,1 M, pH 4.5 et du peroxyde d'hydrogène à 0,012%). Les lectures de densités optiques sont lues à l'aide d'un lecteur de microplaque (MR 5000, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) à la longueur d'ondes de 490 nm.

### 1.5.2- Étude de la polyclonalité des anticorps

L'étude de la polyclonalité des anticorps produits par les lymphocytes B dans les systèmes de culture est réalisée par électrophorèse de zone (Coligan, 1994) tel que décrit par Bazin et al (Bazin, 1996). Les population d'anticorps sont séparées par une électrophorèse sur un gel d'agarose 1% dans un tampon barbital 60 mM pH 8.6 (Sigma). Auparavant, les échantillons de surnageants de culture de lymphocytes B sont concentrés par centrifugation dans un centricon-30 (Amicon, Beverly, MA, USA). Le sérum humain, servant de contrôle positif, est dilué à 1 mg d'Ig /ml dans le tampon barbital. Un volume de 2 µl d'échantillon est déposé sur le gel de 0,4mm d'épaisseur préparé à l'aide d'un appareil mini-IEF (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ONT.). L'électrophorèse a lieu dans une chambre d'électrophorèse standard (Bio-Rad Laboratories) pendant une heure à 100V. Pour analyser la population d'anticorps, les protéines sont transférées passivement sur une membrane de PVDF (Millipore, Mississauga, ONT.) pendant 15 minutes. La membrane est incubée pendant 30 minutes dans un tampon de blocage (TBS (NaCl 150 mM, Tris (pH 7,6) 20 mM) comprenant 0,05% Tween et 1% BSA fraction V). Un anticorps anti-Ig humaines polyvalent de chèvre couplé à la phosphatase alcaline dilué dans le tampon de blocage est ensuite ajouté à la membrane ; la réaction dure une heure. Après des lavages au TBS, la révélation est faite par l'ajout du substrat pour la phosphatase alcaline (NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Tris 100mM pH9,5, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-p toluidine salt (BCIP) 165µg/ml et Nitroblue tetrazolium chloride (NBT) 330µg/ml).

## **2 - ASPECTS MOLÉCULAIRES : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES RELIÉS À L'APOPTOSE**

### **2.1 - Extraction des ARN**

Pour l'extraction de l'ARN, la méthode du TRIzol (Gibco/BRL) telle que décrite par le fournisseur est utilisée. Brièvement, des culots de  $1-5 \times 10^6$  cellules sont congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Lors de l'extraction, les culots sont décongelés et sont défaits à l'aide du solution de TRIzol (Gibco/BRL) (1 ml) ; il y a alors une incubation de 5 minutes à la température de la pièce. Suite à cela, il y a ajout de chloroforme (0,2 ml) après une brève incubation de 3 minutes à la température de la pièce, il y a centrifugation de 15 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse est transférée avant d'y ajouter de l'isopropanol (0,5 ml). Suivent une incubation de 10 minutes à la température de la pièce ainsi qu'une centrifugation de 10 minutes à 16 000 g. Le culot est ensuite lavé à l'éthanol 70% (1 ml) par centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes. Le culot est finalement resuspendu dans de l'eau stérile (50  $\mu\text{l}$ ). La quantité d'ARN extraite est évaluée par spectrophotométrie ( $A_{260\text{nm}}$ ). La qualité des ARN est évaluée par une électrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une visualisation aux U.V.

### **2.2 - Analyses de type Northern blot**

L'analyse de l'ARN est réalisée par la méthode de Northern blot fréquemment utilisée. Brièvement, l'ARN (5-10  $\mu\text{g}$ ) est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (1 % d'agarose, 2,2% formaldéhyde, 40mM MOPS pH7, 10mM acétate de sodium, 1mM EDTA) pendant deux heures à 60 Volts et est transféré sur une membrane de nylon (Boehringer Mannheim, Laval, QC). Le transfert se fait par succion à l'aide de l'appareil de transfert

Vacugene XL (Pharmacia Biotech). La qualité du transfert est évaluée par coloration au bleu de méthylène. La préhybridation se fait par incubation d'une heure à la même température que celle choisie pour l'hybridation selon le degré d'homologie entre la sonde et le gène à détecter (ici, 65°C). Le tampon de Church (Church,1984) sert pour l'hybridation et pour la préhybridation. Les sondes d'ADN correspondant aux ARN à l'analyse sont marquées à la digoxygénine (Boehringer Mannheim) selon la méthode d'initiation aléatoire à l'aide de la trousse Dig-High Prime (Boehringer Mannheim). Avant d'hybrider toute la nuit à la température appropriée, la sonde est dénaturée 10 minutes à 100°C et filtrée sur une membrane de cellulose 0,45µm. Suite à l'hybridation et après lavages, la détection est réalisée selon les indications du fabricant i.e en incubant en présence de fragment Fab anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim) et en révélant à l'aide du substrat chimioluminescent CDP-Star™ (Boehringer Mannheim).

### **2.3 - Préparation des extraits protéiques**

Les culots cellulaires fraîchement décongelés ( $1-5 \times 10^6$  cellules) sont resuspendus dans le tampon de lyse PLC (Giordano, 1997) et incubés pendant 30 minutes sur la glace. Les cellules ainsi lysées sont centrifugées 5 minutes à 16000 g à 4°C. La quantité de protéines contenue dans le surnageant est évaluée par un dosage selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant un échantillon calibré d'albumine sérique du bœuf (BioRad protein assay standard II BSA ; BioRad) comme référence.

### **2.4 - Analyses de type western blot**

Les analyses de protéines sont réalisées par la méthode de Western blot. Brièvement, les protéines (5-10 µg) sont transférées sur une membrane de PVDF (Millipore) après une

électrophorèse classique en SDS-page (Laemmli, 1970). Les protéines sont transférées (1 heure, 100 V, 4°C) à l'aide d'un appareil à transfert électrophorétique (Bio-Rad Laboratories) dans un tampon constitué de Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,01% et méthanol 20%. Les sites libres sur la membrane sont bloqués par incubation d'une heure à la température de la pièce ou toute une nuit à 4°C dans un tampon de blocage TBS-Tween (NaCl 150 mM, Tris (pH 7,6) 20 mM, 0,1% Tween) contenant du lait écrémé en poudre 5% et du polyvinyle pyrrolidone 1%. La réaction de reconnaissance peut ensuite avoir lieu à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt. Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-A1 (C-19), anti-Bag-1 (C-16), anti-Bax (B-9), anti-Bcl-2 ( $\Delta$ C-21) anti-Mcl-1, anti-Bak (G-23), (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Bcl-X<sub>L</sub>, anti-Bad, anti-Mcl-1 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), anti-phospho-Bad (ser112, ser136) (New England Biolabs, Mississauga, ONT.). Pour vérifier l'efficacité du transfert et pour comparer la quantité de protéines de chaque échantillon, on utilise l'anti-actine (I-19) (Santa Cruz biotechnology). Ces anticorps sont utilisés selon les recommandations du fabricant. L'incubation d'une heure en présence du second anticorps approprié couplé à la peroxydase est réalisée après trois lavages. Finalement, les protéines sont visualisées à l'aide du substrat ECL (Amersham, Oakville, ONT.).

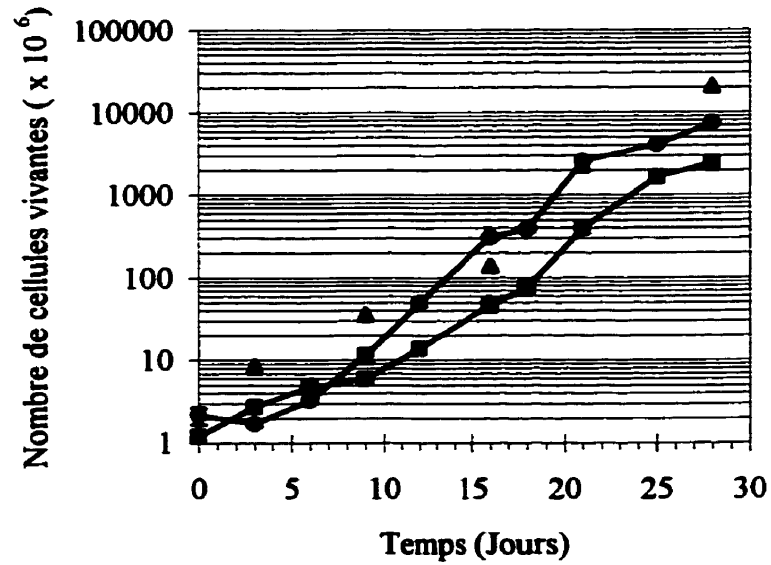
## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS**

#### **1- ÉVALUATION DE LA PROLIFÉRATION DES LYMPHOCYTES B DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L**

Pour évaluer la prolifération des lymphocytes B dans le système de culture CD40L, un compte cellulaire a été effectué à tous les trois jours soit lors du renouvellement du milieu. Lors du compte, seules les cellules vivantes sont dénombrées. L'utilisation du bleu de trypan facilite l'exercice ; les cellules mortes vont incorporer le colorant contrairement aux cellules vivantes. Ces observations permettent la mesure de l'expansion ainsi que l'extrapolation du temps de génération des lymphocytes B dans le système de culture.

La figure 3.1 présente la prolifération des lymphocytes B dans le système de culture. Il s'agit d'une courbe qui représente l'expansion maximale des lymphocytes B dans le système CD40L (Calculs en annexe).



**FIGURE 3.1 - Prolifération des lymphocytes B dans le système de culture CD40L**

Chaque courbe représente le profil d'une culture et chaque culture provient de donneurs différents. Représentation du nombre cumulé de cellules aux différents temps de culture. (Cercle : donneur CR, carré : donneur RB et triangle : donneur AB).

Ces résultats permettent le calcul de l'expansion maximale d'une population de lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L. L'expansion maximale est évaluée entre 2 et  $3,4 \times 10^3$  fois et correspond à la quantité optimale de cellules générées au cours de la culture. Au jour zéro, la population fraîchement purifiée est majoritairement constituée de lymphocytes B ; il subsiste une faible proportion de cellules adhérentes qui sont perdues dans les premiers heures de culture dans le système CD40L. Après 4 heures passées en plaque à 96 puits, la population de cellules non adhérentes est constituée à 99.7% de lymphocytes B tel qu'évalué par cytométrie à flux sur la base de l'expression du CD40.

La culture des lymphocytes B peut facilement être divisée en deux phases distinctes par leur temps de génération, soit le temps requis pour doubler une population cellulaire (figure 3.1). Pour des cellules fraîchement isolées du sang, la mise en culture constitue un changement considérable des conditions environnantes. L'adaptation à ces nouvelles conditions peut s'échelonner sur une période relativement longue. La première phase de la culture correspond donc à une phase d'adaptation ayant un temps de génération d'environ 4,5 jours et qui s'échelonne sur une période d'environ 9 jours. La deuxième phase, ou phase de prolifération, est caractérisée par un temps de génération plus court qui est évalué ici à 1,5 jours ; cette phase commence au jour 9 et n'est pas terminée lors de l'arrêt de la culture. Les fréquents renouvellements de milieu ne permettent pas d'atteindre la phase stationnaire. Une question reste en suspend : Y a-t-il différenciation des lymphocytes B dans le système de culture CD40L et si oui, à quel moment se déroule ce processus ?



## **2 - ANALYSE DE LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES B DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L**

### **2.1 - Analyse de la sécrétion d'anticorps**

Lors d'études précédemment réalisées dans nos laboratoires, un accroissement du nombre de cellules sécrétrices d'anticorps avait été observé chez les lymphocytes B maintenus dans le système de culture CD40L pendant une période d'au moins 14 jours (Aubin, 1996). Afin de confirmer ces observations, des analyses de type ELISA ont été réalisées. Il s'agissait donc de mesurer la quantité d'immunoglobulines présentes dans le surnageant de cultures de lymphocytes B aux différents jours suivant la mise en culture. La figure 3.2 résume l'évaluation de la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L. Il s'agit d'un dosage des immunoglobulines totales. On constate que la sécrétion d'anticorps n'est pas constante au cours de la culture. En effet, on remarque une augmentation de la sécrétion au 16<sup>ième</sup> jour suivant la mise en culture alors que la prolifération est bien enclenchée (revoir figure 3.1). Notons que les anticorps produits sont principalement des IgA, des IgM et des IgG (S. Néron, communication personnelle). La quantité d'IgE produits dans le système de culture a été évaluée puisque l'on sait que l'IL-4 favorise la formation de cet isotype. Par un dosage ELISA spécifique aux IgE, nous avons démontré que la quantité d'IgE produits est inférieure à 25 ng/ml peu importe le nombre de jours passés dans le système de culture CD40L (dosage réalisé sur le surnageant de 2 cultures différentes provenant de 2 donneurs différents).

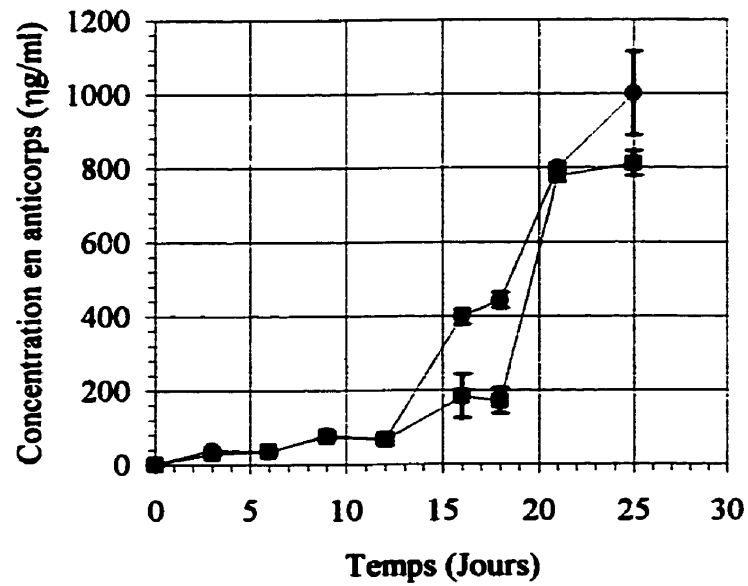
La présence de différents isotypes d'anticorps ne nous donne cependant pas vraiment d'indication sur la diversité de la population de cellules B (et par conséquent de la population d'anticorps) capables de produire des immunoglobulines dans le système CD40L. Cet aspect a été évalué par électrophorèse de zone. Les résultats obtenus (figure 3.3) montrent que les anticorps produits sont polyclonaux. En électrophorèse de zone, les anticorps monoclonaux

migrent pour ne former qu'une seule bande puisqu'ils sont constitués d'un seul isotype (figure 3.3, couloirs #1 et #2). On remarque que les deux échantillons d'anticorps monoclonaux migrent différemment puisque leur charge est différente. L'échantillon de sérum humain qui comporte différents isotypes est bien entendu polyclonal. On constate que la population d'anticorps contenue dans les surnageants de culture migrent de la même façon que le sérum humain ce qui démontre que les anticorps produits par les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L sont polyclonaux. Des expériences en IEF réalisées dans nos laboratoires confirment ces résultats (Sonia Néron, communication personnelle).

## **2.2 - Analyse de l'expression des marqueurs de surface**

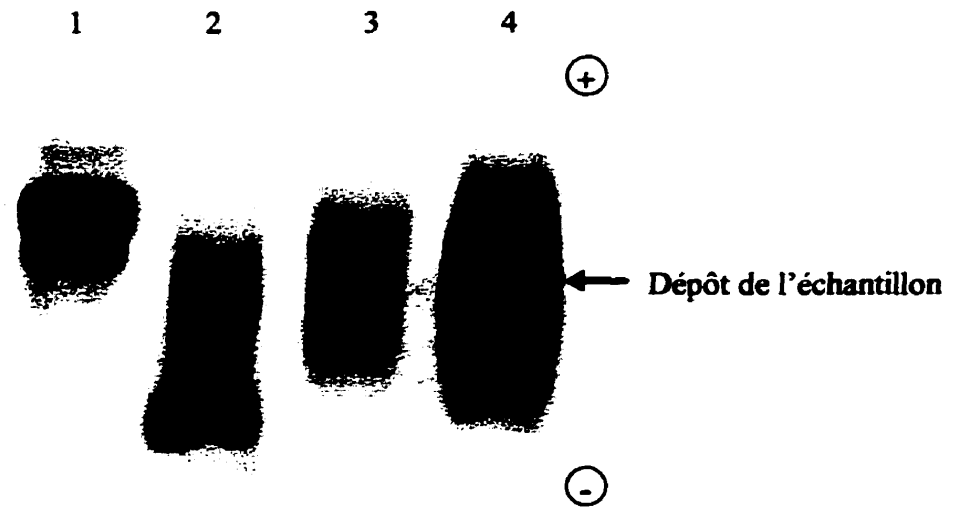
Le fait d'observer une sécrétion d'anticorps doit correspondre à un état de différenciation particulier de la population ou du moins d'une sous-population de lymphocytes B cultivés dans le système CD40L. L'analyse de l'expression de certains marqueurs de surface s'impose afin de confirmer cette hypothèse. La figure 3.4 présente les résultats obtenus lors de l'analyse de l'expression des marqueurs CD20, CD38 et CD40 chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L.

Ces analyses suggèrent qu'il y a bel et bien enclenchement du processus de différenciation au 16<sup>ième</sup> jour suivant la mise en culture. En effet, l'expression du CD20 est maximale jusqu'au jour 16 où il y a diminution de 20% ; la perte de l'expression du CD20 a lieu au cours du processus normal de différenciation des lymphocytes B (Harada, 1996 ; Arpin, 1995). De la même façon, l'expression du CD38 est faible jusqu'au 16<sup>ième</sup> jour suivant la mise



**FIGURE 3.2 - Dosage des immunoglobulines totales sécrétées par les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L**

Les surnageants de culture sont prélevés à différents temps et les immunoglobulines qu'ils contiennent sont dosées par ELISA. Chaque courbe représente une culture provenant de donneurs différents. (Cercle : donneur CR et carré : donneur RB)



**FIGURE 3.3 - Analyse de la polyclonalité des anticorps produits par les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L**

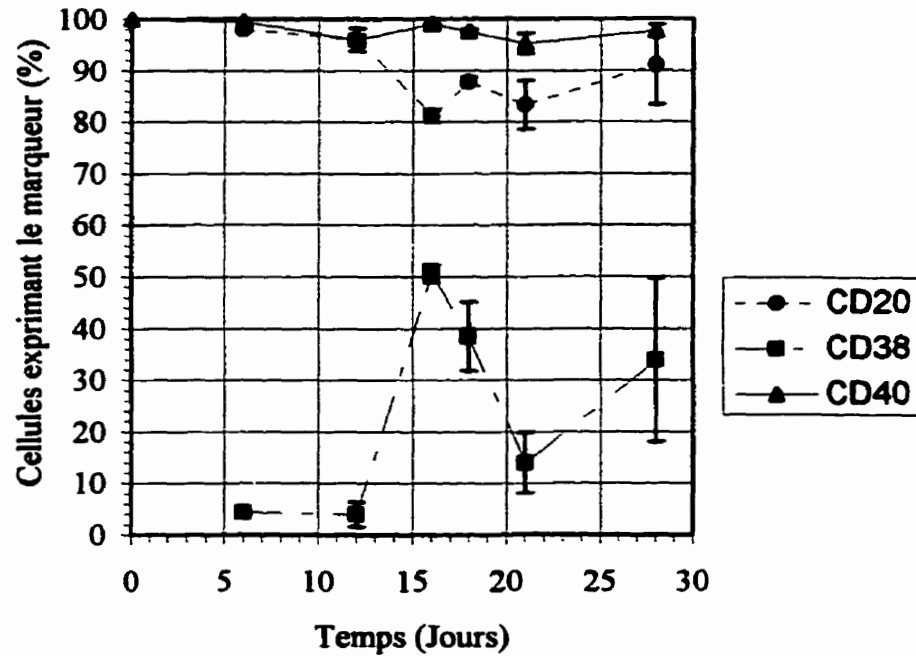
Analyse de la population d'anticorps contenue dans les surnageants de culture par électrophorèse de zone. Le couloir #1 contient un échantillon d'anticorps monoclonal (Sigma), le couloir #2 contient un échantillon d'anticorps monoclonal humain (notre laboratoire), le couloir #3 contient un échantillon de surnageant de culture de lymphocytes B (jour 25) et le couloir #4 contient un échantillon de sérum humain. Chaque couloir contient  $2\mu\text{g}$  d'immunoglobulines. Le couloir #3 est représentatif de deux cultures différentes provenant de deux donneurs différents.

en culture ce qui suggère que les cellules sont peu différenciées. Toutefois, il y a une induction de l'expression du marqueur de surface CD38 (jusqu'à 50% d'augmentation du nombre de cellules qui expriment le marqueur) qui est clairement visible au jour 16 et suivants. On remarque également une fluctuation dans l'expression de ces deux marqueurs de surface dans les jours qui suivent le jour 16. Notons que l'expression du marqueur CD40 est constante quel que soit le nombre de jours passés dans le système de culture. Retenons que la modification de l'expression du CD20 et du CD38 (modification qui correspond à un phénotype de cellules différenciées) survient au 16<sup>ième</sup> jour suivant la mise en culture, ce même jour où l'augmentation de la sécrétion d'anticorps est observée (revoir la figure 3.2).

### **2.3 - Analyse de la susceptibilité à l'apoptose**

#### **2.3.1 - Étude de la viabilité cellulaire**

Puisque les plasmocytes sont normalement destinés à l'apoptose et que les résultats présentés précédemment suggèrent la présence de plasmocytes dans les cultures, il est intéressant d'étudier la viabilité de cellules B en cours de culture. La différenciation des cellules B est un phénomène qui va mener éventuellement à l'apoptose. Ce phénomène peut être accéléré dans certains cas par un traitement à la CHX. Les lymphocytes B ont donc été testés pour leur sensibilité à la CHX aux différents jours suivant la mise en culture. La viabilité est par la suite évaluée par exclusion du bleu de trypan immédiatement après le traitement à la CHX. La figure 3.5 présente les résultats des études de sensibilité à la CHX en relation avec le nombre de jours passés dans le système de culture.



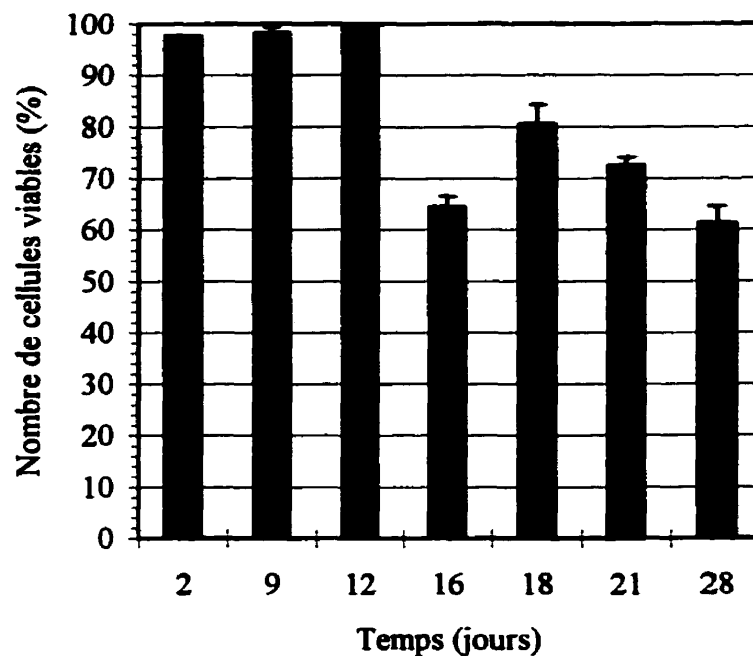
**FIGURE 3.4 - Analyse de l'expression des marqueurs de surface CD20, CD38 et CD40 chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L**

Les cellules sont prélevées à différents jours suivant la mise en culture, marquées avec un anticorps monoclonal couplé au FITC et analysées par cytométrie à flux. Chaque courbe représente la moyenne de l'expression d'un des marqueurs chez des cellules B provenant de deux cultures différentes. Chaque culture provient de donneurs différents.

Remarquons que dans les premiers jours suivant la mise en culture, les cellules sont résistantes à un traitement à la CHX ; la viabilité varie entre 97 et 100%. C'est donc au 16<sup>ième</sup> jour que la viabilité diminue de 35% par un traitement à la CHX. Par la suite, la viabilité varie mais ne sera jamais équivalente à ce qui est observé en début de culture. Par la suite des tests à l'annexin V : FITC et à l'iodure de propidium ont été réalisés afin de déterminer si les baisses de viabilité sont dues à la mort par apoptose. Les résultats obtenus (non montrés) démontrent que la baisse de viabilité est associée à une mort par apoptose induite par la CHX. Il semble donc avoir une sous-population de cellules (environ 35% au jour 16) qui entre plus facilement en apoptose. Les résultats présentés jusqu'à présent suggèrent fortement que cette sous-population sensible est constituée de plasmocytes ; l'analyse de la mort préférentielle des plasmocytes pourrait confirmer cette hypothèse.

### **2.3.2 - Analyse de la mortalité préférentielle des plasmocytes**

Afin de démontrer de façon plus directe que les plasmocytes dans le système de culture CD40L sont ces cellules qui sont sensibles à l'apoptose, l'expérience suivante a été entreprise. Les cellules ont été traitées à la CHX puis marquées à l'annexin V : PE, au 7-AAD afin de détecter le niveau d'apoptose. Les cellules sont également marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 (anti-CD20 :FITC) ou contre le CD38 (anti-CD38 :FITC). De cette façon, il est possible de déterminer si les cellules positives pour le marquage à l'annexin V (donc en phase précoce d'apoptose) sont aussi les cellules différenciées (i.e. n'expriment plus le CD20 et/ou expriment le CD38). Le tableau 3.1 présente les résultats obtenus pour ce genre d'analyses. On remarque que les cellules CD20- (donc les cellules qui ont entrepris le processus de différenciation) sont plus susceptibles à l'apoptose que les cellules CD20+. Cette différence (en moyenne ~30%) entre les deux sous-populations montre que les cellules différenciées (CD20-) sont plus sensibles à la CHX que les cellules en prolifération (CD20+). Si on analyse le taux d'entrée en



**FIGURE 3.5 - Analyse de la sensibilité à la mort induite par la CHX chez les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L**

Les cellules sont prélevées à différents jours suivant la mise en culture et placées en présence de CHX pendant 6 heures. La viabilité est analysée par dénombrement des cellules viables et mortes (exclusion du bleu de trypan). Chaque bande représente la moyenne de l'analyse de la viabilité chez des cellules B provenant de trois cultures différentes. Chaque culture provient de donneurs différents.



apoptose chez les cellules par rapport à l'expression du CD38, le résultat est comparable. Les cellules CD38<sup>-</sup> sont plus résistantes que les cellules CD38<sup>+</sup>. Dans ce cas, le niveau d'entrée en apoptose varie fortement entre les deux sous-population, soit 29.4% (en moyenne). Des problèmes sont survenus lors des analyses de la susceptibilité à l'apoptose en fonction de l'expression du CD38 ; c'est pour cette raison qu'un seul résultat est disponible. Retenons cependant que les mêmes analyses en fonction de l'expression du CD20 suggèrent que les cellules différenciées sont plus sensibles à l'apoptose induite par la CHX que les cellules peu différenciées.

### **3 - ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES DE LA FAMILLE BCL-2 CHEZ LES LYMPHOCYTES B CULTIVÉS DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L**

Les résultats présentés jusqu'ici suggèrent le système CD40L permet l'enclenchement du processus de différenciation du moins chez une sous-population de cellules. Le 16<sup>ième</sup> jour de culture semble être un point critique puisque c'est à ce jour que la sécrétion d'anticorps augmente, que la viabilité cellulaire diminue et que l'expression des marqueurs de surface varie. Lors de l'évaluation de la mortalité préférentielle des plasmocytes qui a été réalisée au jour 16, on remarque que les cellules différenciées (CD20<sup>-</sup>) sont plus sensibles à l'induction de l'apoptose par la CHX. À l'aide des expériences entreprises par la suite, nous voulions associer l'expression (ou l'absence d'expression) d'un ou plusieurs gène de la famille Bcl-2 à ces modifications de comportements. Les membres de la famille Bcl-2 comportent un intérêt certain puisqu'il est connu que Bcl-X<sub>L</sub> est impliqué dans l'inhibition de l'apoptose induite par la CHX dans certaines lignées cellulaires (Gauthier, 1996). Les lymphocytes B ont été cultivés sur une période de 28 jours ; des prélèvements ont été faits à différents jours suivant la mise en culture en vue d'analyser les cellules en Western blot et en Northern blot.

La synthèse des protéines A1, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Bag-1 par les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L a été analysée par Western blot sur des extraits cellulaires de lymphocytes B cultivés pendant différentes périodes de temps. L'expression du gène bag-1 a aussi été analysé en Northern blot tout comme l'expression du gène pro-apoptotique bak.

### **3.1 - Analyse de la synthèse de la protéine anti-apoptotique A1**

Les résultats obtenus et présentés à la figure 3.6 démontrent que la protéine A1 n'est pas exprimée chez les lymphocytes B en culture et ce peu importe le nombre de jours passés dans le système CD40L (figure 3.6, couloirs #2 à 7). Le contrôle positif utilisé ici est une lignée résultant de la transfection de cellules d'hybridome D5 avec un plasmide d'expression eucaryotique comportant le cDNA codant pour la protéine A1(figure 3.6, couloir #1). Le contrôle d'actine réalisé sur la même membrane déshybridée montre qu'il s'agit bien d'une absence de synthèse de la protéine A1.

### **3.2 - Analyse de la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-2**

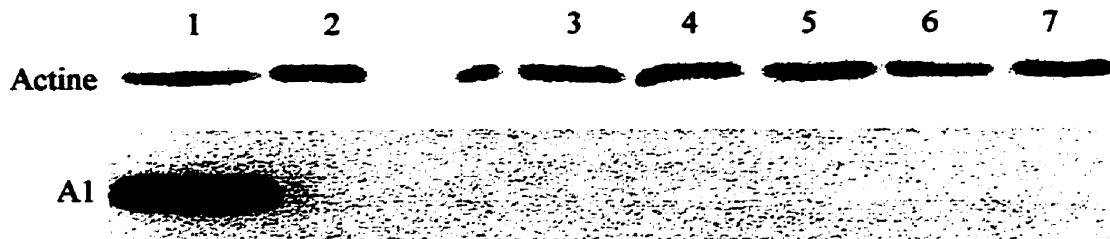
Les résultats obtenus et présentés à la figure 3.7 démontrent que la protéine Bcl-2 est exprimée de façon constante chez les lymphocytes B en culture, lors de l'isolement (jour 0) (figure 3.7, couloir #1) et lors de la culture et ce, peu importe le nombre de jours passés dans le système CD40L (figure 3.7, couloirs #2, 3 et 4). La protéine est exprimée à un niveau constant au cours de la culture et cela est clairement visible à l'aide du contrôle d'actine fait simultanément sur la même membrane. Le contrôle positif utilisé ici est une lignée cellulaire (11A3) reconnue pour exprimer la protéine Bcl-2.

**TABLEAU 3.1 - Évaluation de l'induction de l'apoptose chez les plasmocytes retrouvés dans le système de culture CD40L.**

		CD20 +	CD20 -	CD38 -	CD38 +
%	Expérience A	40,3	65,0	43,6	84,3
de cellules en					
apoptose	Expérience B	41,0	74,2	51,8	N.D.

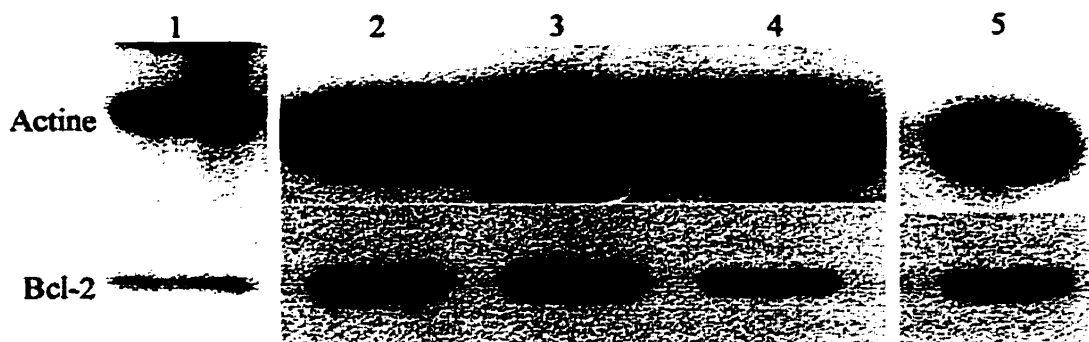
N.D. : Non disponible

Les cellules sont prélevées au 16<sup>ème</sup> jour suivant la mise en culture et placées en présence de CHX pendant 3 heures. L'apoptose est détectée par cytométrie à flux (cellules positives pour le marquage à l'annexin V et négatives pour la coloration au 7-AAD). Les résultats représentent deux cultures différentes provenant de donneurs différents (A : donneur RB et B : donneur DJ).



**FIGURE 3.6 - Analyse de la synthèse de la protéine A1 chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L**

Le couloir #1 contient 5  $\mu$ g d'extrait protéique de cellules D5 exprimant de façon stable le gène A1 (cellules 5D9). Les couloirs #2 à 7 contiennent 5  $\mu$ g d'un extrait protéique de lymphocytes B cultivés pendant 2 (#2), 9 (#3) et 12 (#4), 16 (#5), 18 (#6) et 21 (#7) jours. Ces résultats sont représentatifs de deux cultures différentes provenant de deux donneurs différents.



**FIGURE 3.7 - Analyse de la synthèse de la protéine Bcl-2 chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L**

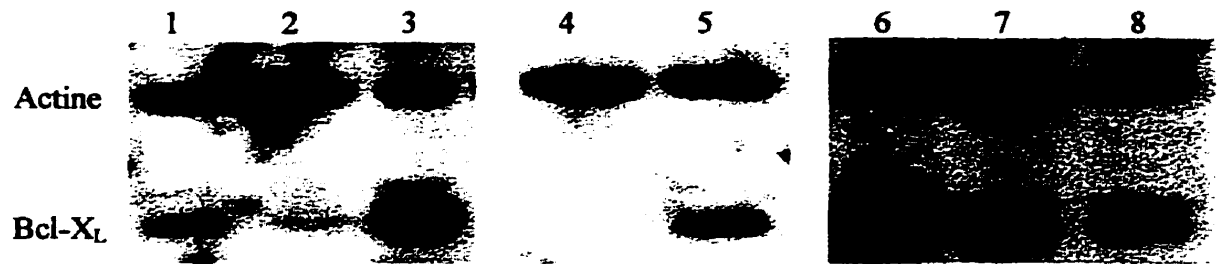
Les couloirs 1 à 4 contiennent 5  $\mu$ g d'extrait protéique de lymphocytes B cultivés pendant 0 (#1), 9 (#2), 15 (#3) et 21 (#4) jours. Le couloir 5 contient 5  $\mu$ g d'un extrait protéique de cellules 11A3, contrôle positif pour la production de Bcl-2. Ces résultats sont représentatifs de deux cultures différentes provenant de deux donneurs différents.

### **3.3 - Analyse de la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub>**

La figure 3.8 présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L. Il est clair que Bcl-X<sub>L</sub> est très faiblement synthétisé au jour 0 (figure 3.8, couloir #4) et que l'expression est à son maximum au jour 9 (figure 3.8, couloir #6). Dans les jours qui suivent, soit aux jours 15 (figure 3.8, couloir #7) et 21 (figure 3.8, couloir #8), l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> a considérablement diminué. On peut donc associer la baisse de synthèse de Bcl-X<sub>L</sub> à la baisse de viabilité observée au même moment (figure 3.5). De plus, si on compare le niveau de production de la protéine lors de l'isolement (figure 3.8, couloir #4) et après 48h (figure 3.8, couloirs #1, 2 et 5) en culture on constate qu'il augmente. Or l'augmentation n'est pas la même selon les conditions de culture. Lorsque les cellules sont en présence du CD40L (sans IL-4) (figure 3.8, couloir #1), le niveau de production de Bcl-X<sub>L</sub> est plus élevé que dans le cas où les cellules sont en présence d'IL-4 seulement (figure 3.8, couloir #2). Il semble donc que la synthèse de Bcl-X<sub>L</sub> est reliée en majeure partie à la liaison du CD40 avec son ligand et que la présence d'IL-4 vient simplement appuyer ce phénomène. À la lumière de ces informations, il est étonnant de constater que l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> diminue précisément à partir du 15<sup>ème</sup> jour suivant la mise en culture puisque la présence du CD40L est constamment renouvelée au cours de la culture.

### **3.4 - Analyse de l'expression de bag-1**

Les résultats obtenus et présentés à la figure 3.9 démontrent que le gène bag-1 est exprimé chez les lymphocytes B en culture (figure 3.9, couloirs #1 à 6). Remarquons que l'expression de bag-1 est à son plus fort au 6<sup>ème</sup> jour (figure 3.9, couloir #1) de culture et décroît au jour 9 (figure 3.9, couloir #2) pour être nulle au jour 16 (figure 3.9, couloir #3). Au jour 18 (figure 3.9, couloir #4), l'expression est forte puis rediminue dans les derniers jours de culture (figure 3.9, couloirs #5 et 6). Par la suite, ayant obtenu un anticorps monoclonal, des

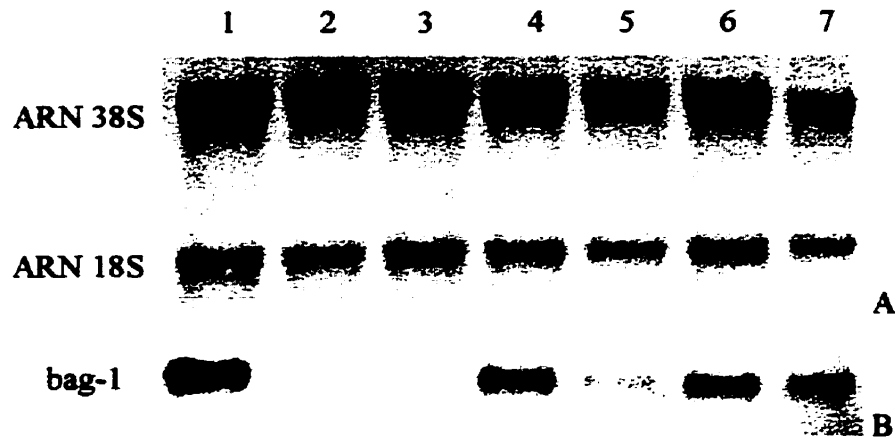


**FIGURE 3.8 - Analyse de la synthèse de la protéine Bcl-X<sub>L</sub> chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L**

Chaque couloir contient 5 µg d'extraits protéiques. Le couloir #1 contient un échantillon protéique de lymphocytes B cultivés pendant 48 h en présence du CD40L uniquement. Le couloir #2 contient un échantillon protéique de lymphocytes B cultivés pendant 48 h en présence d'IL-4 uniquement. Le couloir #3 contient un extrait protéique de cellules RSV-3T3, contrôle positif pour la présence de Bcl-X<sub>L</sub>. Les couloirs 4 à 8 contiennent des extraits protéiques de lymphocytes B cultivés pendant 0 (#4), 2 (#5), 9 (#6), 15 (#7) et 21 (#8) jours. Ces résultats sont représentatifs de trois cultures différentes provenant de trois donneurs différents.

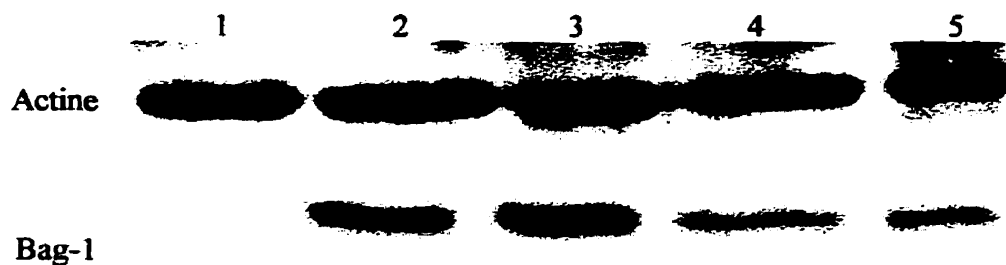
analyses de type Western blot ont été réalisées. Les résultats obtenus et présentés à la figure 3.10 démontrent que la protéine anti-apoptotique est synthétisée chez les lymphocytes B en culture (figure 3.10, couloir #2) mais absente lors de l'isolement (figure 3.10, couloir #1). On remarque également que la synthèse de la protéine soit majoritairement reliée à la liaison du CD40 avec son ligand (figure 3.10, couloir #3) puisque le niveau détecté est plus élevé que dans le cas où les cellules sont en présence d'IL-4 seulement (figure 3.10, couloir #4). Donc, la synthèse de cette protéine serait donc modulée par la mise en culture des cellules B. Cela est clairement visible à l'aide d'une hybridation contrôle contre l'actine. Le contrôle positif utilisé ici est une lignée cellulaire (11A3) reconnue pour synthétiser la protéine Bag-1 (figure 3.10, couloir #5).





**FIGURE 3.9 - Analyse de l'expression du gène *bag-1* chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L**

La partie A représente une coloration au bleu de méthylène des ARN présents sur la membrane et la partie B correspond à l'hybridation de type Northern blot de la sonde *bag-1*. Chaque couloir contient 5  $\mu$ g d'ARN total. Les couloirs #1 à 6 contiennent un échantillon d'ARN de lymphocytes B cultivés pendant 6, 9, 16, 18, 21 et 25 jours respectivement. Le couloir #7 contient un échantillon d'ARN de cellules 11A3 qui sert de contrôle positif.



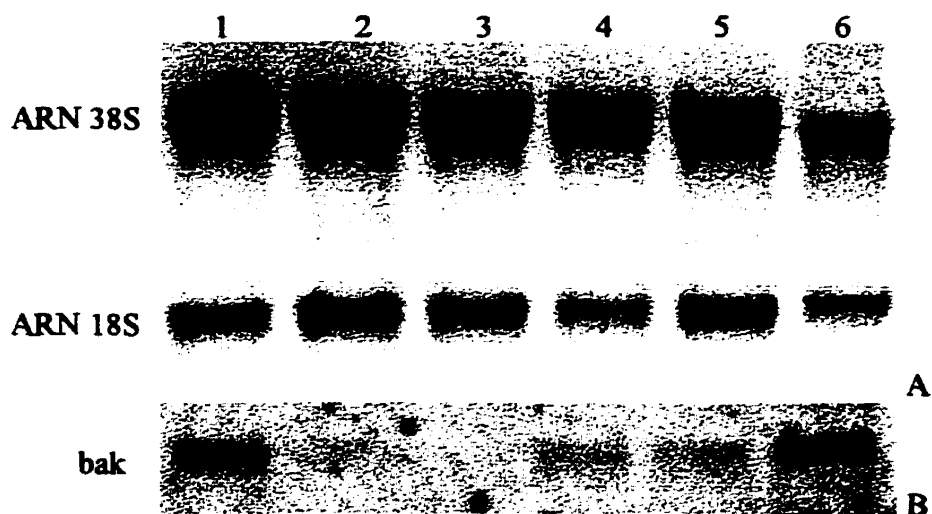
**FIGURE 3.10 - Analyse de la synthèse de la protéine Bag-1 chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L.**

Chaque couloir contient 5  $\mu$ g d'extraits protéiques. Le couloir #1 contient un échantillon protéique de lymphocytes B purifiés. Le couloir #2 contient un échantillon protéique de lymphocytes B cultivés pendant 48 h dans le système CD40L. Le couloir #3 contient un échantillon protéique de lymphocytes B cultivés pendant 48 h en présence du CD40L mais en absence d'IL-4. Le couloir #4 contient échantillon protéique de lymphocytes B cultivés pendant 48 h en présence d'IL-4 uniquement. Le couloir #5 contient un extrait protéique de cellules 11A3, contrôle positif pour l'expression de Bag-1. Ces résultats sont représentatifs de deux cultures différentes provenant de deux donneurs différents.

### **3.5 - Analyse de l'expression du gène pro-apoptotique bak**

Jusqu'à ce jour, il n'a pas été démontré que bak était exprimé chez les lymphocytes B du sang périphérique cultivés dans le système CD40L. La figure 3.10 présente des résultats de l'analyse des ARN messagers spécifiques au gène pro-apoptotique bak.

Par comparaison avec la coloration au bleu de méthylène (figure 3.10-A), il est clairement visible que le niveau d'ARNm spécifique à bak varie en cours de culture. Par exemple, on remarque que le niveau détecté au jour 6 (figure 3.10-B, couloir #1) est beaucoup plus élevé qu'aux autres jours de culture (figure 3.10-B, couloirs #2 à 5). Il est étonnant de constater que le niveau de bak est à son plus faible au 16<sup>ième</sup> jour de la culture (figure 3.10-B, couloir #2) puisque c'est à ce jour que le taux de viabilité est le plus faible (figure 3.5). Il est cependant impossible, par ces analyses, de déterminer si bak est présent lors de l'isolement, i.e au jour 0. En fait, la faible quantité de cellules disponibles lors de l'isolement ne permet pas de préparer des extraits d'ARN tout en gardant des cellules pour la culture. Il est également impossible d'affirmer que la variation des ARNm provoque des changements au niveau du comportement cellulaire parce que ces analyses ne nous renseignent évidemment pas sur l'action de la protéine.



**FIGURE 3.11 - Analyse de l'expression du gène bak chez les lymphocytes B normaux cultivés dans le système CD40L**

Chaque couloir contient 5 µg d'ARN total. La partie A représente une coloration au bleu de méthylène des ARN présents sur la membrane et la partie B correspond à l'hybridation de type Northern blot de la sonde bak. Les couloirs #1 à 5 contiennent un échantillon d'ARN de lymphocytes B cultivés pendant 6, 9, 16, 21 et 25 jours respectivement. Le couloir #6 contient un échantillon d'ARN de cellules 11A3 qui sert de contrôle positif. Ces résultats sont représentatifs de deux cultures différentes provenant de deux donneurs différents.

Suite à ces diverses analyses, on constate que les lymphocytes expriment la plupart des membres de la famille Bcl-2 étudiés. Or, certains de ces membres suscitent un intérêt particulier en ce sens qu'ils peuvent contribuer à la survie des cellules ; c'est le cas de Bcl-X<sub>L</sub> et de Bag-1. L'utilisation du système de culture CD40L pour augmenter le nombre de lymphocytes B est efficace mais non sans faille. En effet, on détecte des comportements caractéristiques de la différenciation notamment la baisse de viabilité des cellules. Pour éviter la modulation de la survie cellulaire, on peut envisager la transfection d'un de ces deux gènes.

Le système CD40L permet une induction partielle de la différenciation ; seulement 29,4% des cellules B vont devenir des plasmocytes (selon les études de mortalité préférentielle des plasmocytes, section 2.3.2). Le système CD40L tel qu'utilisé ici ne semble pas le plus adéquat pour la différenciation massive des lymphocytes B. Idéalement, il faudrait favoriser la différenciation lorsque l'expansion est suffisante et cela pourrait être possible par la culture en deux phases.

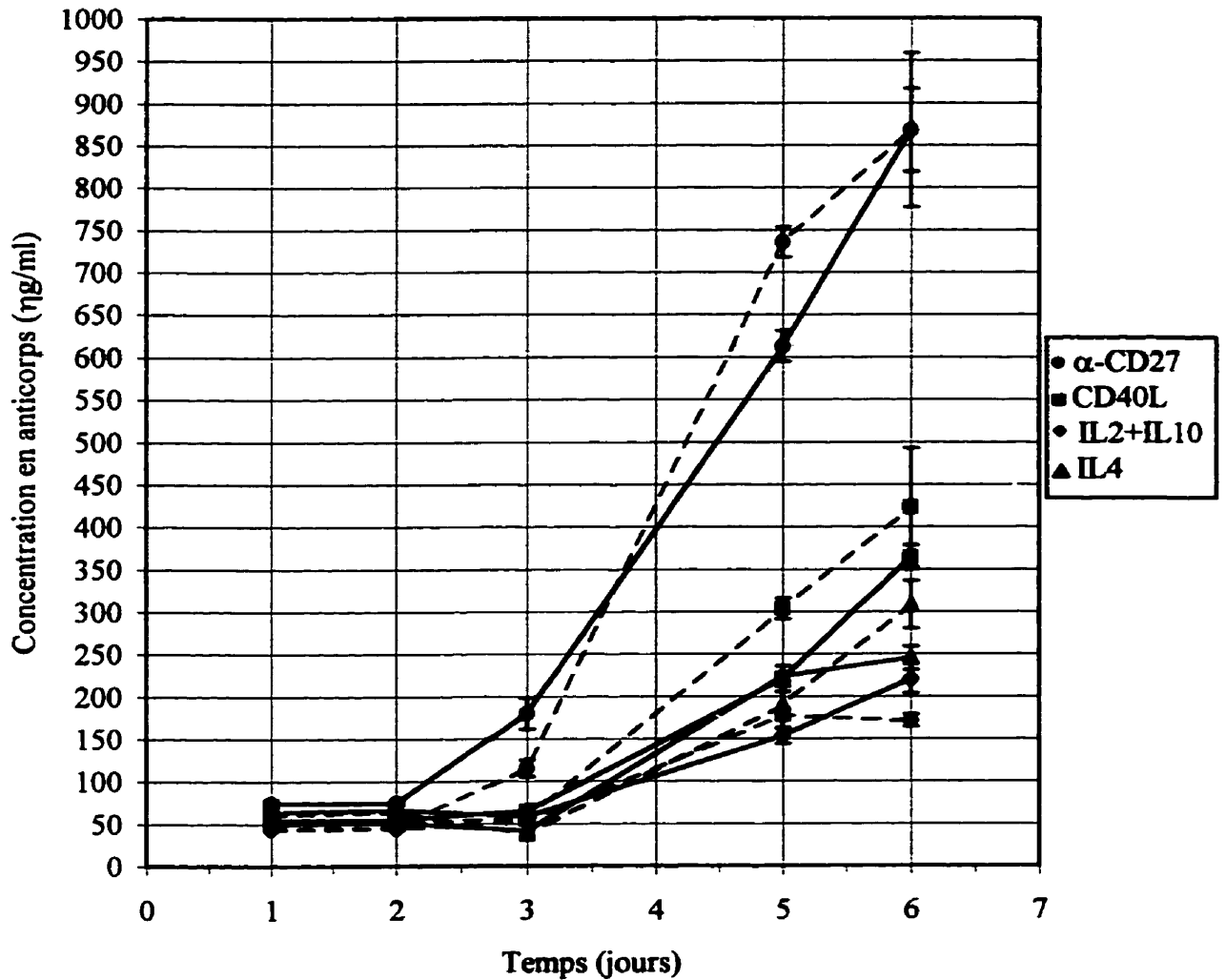
#### **4 - TRANSFERT DES LYMPHOCYTES B CULTIVÉS DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L DANS LE SYSTÈME ANTI-CD27**

Comme les processus de prolifération et de différenciation sont bien distincts, il fallait mettre au point un second système de culture qui favoriserait la formation de plasmocytes et, par conséquent, la sécrétion d'anticorps. Ce second système de culture fait appel à la signalisation via l'antigène de surface CD27 présent chez les lymphocytes B (Chapitre I, section 2.3.2). Les lymphocytes B cultivés dans le système de culture CD40L sont transférés sur des fibroblastes exprimant le récepteur FcγRII/CDw32 (16.2CG7) auxquelles un anticorps monoclonal dirigé contre le CD27, de l'IL2 et de l'IL10 ont été ajoutés ; ce système de culture est désigné système anti-CD27. En parallèle, des lymphocytes B demeurent dans le système

CD40L alors que d'autres sont transférés sur des cellules de fibroblaste en présence d'IL-4 ou d'IL-2 et d'IL-10.

Suite au transfert des lymphocytes B dans le système anti-CD27, la viabilité cellulaire a été analysée par exclusion du bleu de trypan. Les lymphocytes B en présence du CD40L et d'IL-4 continuent de proliférer. C'est d'ailleurs la seule condition qui permet la survie de cellules sur une période de 6 jours. Dans les autres conditions, les cellules meurent très rapidement. En effet après 3 jours, 39,8% des cellules B en présence d'IL-4 sont mortes, 77,6% des cellules B dans le système anti-CD27 sont mortes et 62,4% des cellules B en présence des IL-2 et IL-10 sont mortes. Après 6 jours, il ne reste aucune cellule viable dans ces conditions. La sécrétion d'anticorps a été analysée par dosage des surnageants en ELISA à différents jours suivant le transfert. Par la suite, les immunoglobulines totales contenues dans les surnageants de culture sont dosées par ELISA ; la figure 4.1 présente les résultats obtenus.

On remarque que la sécrétion d'anticorps commence à augmenter au 3<sup>ème</sup> jour après le transfert. Il faut noter que les cellules ont été lavées avant le transfert donc la quantité d'immunoglobulines initiale est quasi nulle (non représentée sur le graphique). Après le 6<sup>ème</sup> jour de transfert, la quantité d'immunoglobulines sécrétées n'augmente plus. À la fin du transfert, on remarque que la sécrétion d'anticorps est deux fois plus élevée dans le système anti-CD27. On remarque également que le fait de lier le CD27 à l'aide d'un anticorps monoclonal favorise la sécrétion puisque la condition contrôle (cellules de fibroblaste + IL-2 + IL-10) présente la plus faible capacité de sécrétion.



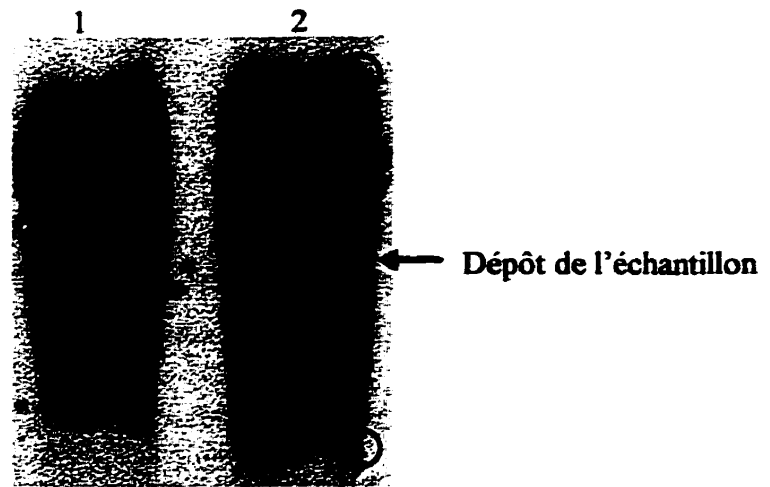
**FIGURE 3.12 - Dosage des immunoglobulines totales sécrétées par les lymphocytes B cultivés dans le système de culture anti-CD27**

Les surnageants de culture sont prélevés à différents temps et les immunoglobulines qu'ils contiennent sont dos es par ELISA. Chaque courbe représente une culture provenant de donneurs différents. (Donneurs : ..... : CR et — : DJ)

**Il fallait s'assurer que les anticorps produits par les lymphocytes B dans le système de culture anti-CD27 étaient polyclonaux comme cela a été fait pour les anticorps produits dans le système CD40L (figure 3.3). Des analyses par électrophorèse de zone ont été réalisées telles que décrites à la section 2.1 et les résultats sont présentés à la figure 4.2.**

**Le sérum humain présente un patron de migration représentatif d'une population d'anticorps polyclonaux (figure 4.2, couloir #1). Les échantillons provenant des surnageants de culture de lymphocytes B dans le système anti-CD27 (figure 4.2, couloir #2) présentent le même patron de migration que les immunoglobulines contenues dans le sérum humain.**





**FIGURE 3.13 - Analyse de la polyclonalité des anticorps produits dans le système de culture anti-CD27**

Analyse par électrophorèse de zone des surnageants de culture recueillis après 8 jours dans le système anti-CD27. Le couloir #1 contient un échantillon de sérum humain et le couloir #2 contient un échantillon de surnageant de culture de lymphocytes B. Chaque couloir contient 2 $\mu$ g d'immunoglobulines. Le couloir #2 est représentatif de deux cultures différentes provenant de deux donneurs différents.

## **CHAPITRE IV**

### **DISCUSSION**

#### **1 - LES LYMPHOCYTES B CULTIVÉS DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L PROLIÈRENT PENDANT PLUSIEURS SEMAINES**

Dans un premier temps, les études portaient sur la compréhension du comportement des cellules dans le système de culture CD40L. Tel qu'expliqué en introduction, la rencontre du CD40 présent chez les lymphocytes B avec le CD40L en présence d'IL-4 induit l'entrée en prolifération des cellules afin de permettre une culture prolongée. Les résultats obtenus ici démontrent qu'il est possible d'accroître une population de lymphocytes B d'un facteur variant entre 2 et  $3,4 \times 10^3$  fois sur une période de 28 jours. Par exemple, il est envisageable de générer au minimum  $9 \times 10^{10}$  lymphocytes B à partir d'un don de sang d'environ 450ml. L'élaboration des courbes de croissance a également permis de bien caractériser le comportement cellulaire pour ainsi comparer les lymphocytes B isolés de différents donneurs et voir s'ils ont sensiblement les mêmes réactions face à la mise en culture et aux conditions de culture. La période d'adaptation observée dans les premiers jours suivant la mise en culture vient sans doute du fait que les cellules subissent un changement important de l'environnement

qui les entoure. La mise en culture comme telle peut agir à titre de sélection dans la population ; tous les lymphocytes B du sang périphérique ne survivent pas au choc et certains autres sont probablement incapables d'entrer en prolifération dans ce système de culture.

## **2- LES LYMPHOCYTES B CULTIVÉS DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L PEUVENT SE DIFFÉRENCIER EN PLASMOCYTES**

À l'origine, le système de culture CD40L a été conçu pour permettre la prolifération de lymphocytes B normaux et ne devrait donc pas permettre la différenciation de ces cellules (Banchereau, 1991a). Suite à l'élaboration de ce système de culture, il a été possible de générer, à partir de lymphocytes B isolés de centres germinaux, des cellules ayant le phénotype de cellules B à mémoire (Arpin, 1995). Les observations recueillies et présentées au chapitre précédent suggèrent qu'il est possible de générer des cellules différenciées avec des lymphocytes B isolés du sang périphérique cultivés sur une longue période de temps. Il est clairement visible, à l'analyse de la figure 3.2 que la sécrétion d'anticorps effectue une remontée aux alentours du jour 16 suivant la mise en culture. Cela est donc un signe relativement évident que certaines cellules ont enclenché le processus de différenciation. De plus, les études de viabilité réalisées au cours de la culture viennent appuyer cette hypothèse. Il est connu que les plasmocytes ont une durée de vie relativement courte et sont destinés à mourir probablement par apoptose. Il s'agirait donc d'une population sensible à l'apoptose. Nous avons placé les cellules dans une condition qui favorise l'apoptose i.e. en présence d'un inhibiteur de la traduction. L'analyse de la viabilité permettait de spéculer sur la présence de plasmocytes. C'est donc par ce genre d'études que nous avons observé une baisse de viabilité après le 16<sup>ième</sup> jour suivant la mise en culture. Ce jour semble être un point tournant dans le processus de différenciation. Ces observations sont en accord avec celles recueillies dans nos laboratoires et disponibles au début de ce projet (Aubin, 1996). Après le 16<sup>ième</sup> jour de culture, on remarque que la viabilité augmente et rediminue cycliquement. L'analyse de l'expression des marqueurs de surface vient une fois de plus appuyer ces observations. Dans les premiers jour de culture,

les cellules ont le phénotype de cellules peu différenciées puisqu'elles expriment le CD20 mais non le CD38. À partir du 16<sup>ième</sup> jour suivant la mise en culture, on assiste à une baisse de l'expression du CD20 et à une augmentation significative de l'expression du CD38, phénotype correspondant à celui des plasmocytes. Après le 16<sup>ième</sup> jour de culture, on remarque une fluctuation de l'expression des marqueurs de surface qui correspond aux fluctuations de la viabilité cellulaire. Remarquons également que les pourcentages d'expression des deux marqueurs ne se complètent pas et cela est sûrement explicable par le fait que l'expression des deux marqueurs se chevauchent ; l'expression du CD20 n'exclut pas l'expression simultanée du CD38. Le pourcentage de cellules positives pour le CD38 au jour 16 par exemple indique que 50,6% des cellules expriment faiblement le marqueur (CD38<sup>low</sup>). En aucun cas nous ne sommes en présence d'une proportion de cellules fortement différenciées (CD38<sup>high</sup>) ; il semble donc qu'il soit très difficile de séparer physiquement les cellules différenciées des cellules non différenciées. Au cours de ces différentes analyses, nous remarquons que le jour 16 est un point tournant pour l'enclenchement du processus de différenciation. Aux alentours du 16<sup>ième</sup> jour de culture, la prolifération est fortement enclenchée et le nombre de cellules augmente rapidement. Les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L ont probablement la capacité de sécréter des cytokines. Certaines de ces cytokines ont un effet autocrine sur les cellules en ce sens qu'elles provoquent leur différenciation comme c'est le cas de l'IL-6. À certains moments de la culture (notamment ceux qui précèdent le renouvellement du milieu de culture), la concentration en cytokines endogènes devient sans doute plus élevée ce qui doit favoriser la différenciation. De plus une autre cytokine sécrétée par les cellules B en culture affecte les fibroblastes (Sonia Néron, manuscrit en préparation). On peut croire que les fibroblastes vont être éliminés petit à petit et que la présence du CD40L va diminuer. Il est connu qu'un arrêt du signalement via le CD40 permet la différenciation des lymphocytes B (Randall, 1998). Donc au 16<sup>ième</sup> jour suivant la mise en culture, la quantité de cytokines sécrétée doit être relativement forte. Alors, la différenciation peut avoir lieu suite à une perte de disponibilité du CD40L et/ou à la présence suffisante de cytokines régulant la différenciation de façon autocrine. Le renouvellement du milieu rétablit le niveau de cytokines présentes et le remplacement des cellules L4.5 redonne le signal CD40L perdu. D'ailleurs dans les jours suivant ces renouvellements, le taux de viabilité est plus élevé, le pourcentage de cellules différenciées est

moins élevé tel qu'évalué par des analyses par cytométrie à flux (50,6% CD38+ au jour 16 vs 38,4% CD38+ au jour 18). Cela pourrait expliquer donc les fluctuations observées dans les études de viabilité et dans les analyses d'expression des marqueurs de surface. Suite aux renouvellements, les plasmocytes sont probablement morts et la prolifération est fortement reprise.

### **3- LES LYMPHOCYTES B DIFFÉRENCIÉS EN PLASMOCYTES MEURENT PAR APOPTOSE SUITE À UN TRAITEMENT À LA CYCLOHEXIMIDE**

Au 16<sup>ième</sup> jour de culture, nous sommes donc en présence de cellules sécrétrices d'anticorps qui ont donc atteint un certain état de différenciation. Il restait à savoir si ces cellules différenciées sont aussi les mêmes qui sont affectées par un traitement à la CHX. La détection de l'apoptose se fait à l'aide de l'annexinV. D'abord, on confirme que le traitement à la CHX induit bien une mortalité par apoptose. Nous avons donc déterminé le niveau d'apoptose dans les sous-populations différenciées et non différenciées. Le niveau d'apoptose est évalué par rapport à chaque marqueur séparément (puisque l'expression d'un marqueur n'exclut pas l'expression de l'autre). Pour la réalisation de ces analyses, les cellules ont été cultivées pendant 16 jours dans le système CD40L puisqu'à ce jour, les analyses de viabilité marquent une diminution. Pour ce genre d'analyses, les cellules sont traitées trois heures en présence de l'inhibiteur de synthèse protéique. Les traitements à la CHX n'ont pas tous la même durée selon le mode de détection de l'apoptose. Il faut se rappeler que l'annexinV se colle aux cellules qui sont en phase précoce d'apoptose parce que ces cellules externalisent les phosphatidylsérines. Lors des études de viabilité évaluées par exclusion du bleu de trypan, on fait appel à une propriété de l'apoptose qui se manifeste tardivement (la perméabilité des membranes). Pour déterminer la durée des traitements, les cellules (prélevées à différents jours suivant la mise en culture) ont été placées en présence de CHX pour des incubations de durées différentes. Les temps d'incubation retenus sont ceux qui faisaient varier la viabilité aux jours tardifs de la culture mais non dans les premiers jours de culture. On observe que le

pourcentage de cellules en apoptose est plus élevé chez les cellules différenciées (CD20-) que chez les cellules non différenciées (CD20+). Il y a également plus de mortalité chez les cellules CD38+ que chez les cellules CD38-. Cependant, des problèmes techniques ont empêché la reproduction de ce dernier résultat. On peut retenir que les traitements à la CHX vont affecter préférentiellement les plasmocytes en se rapportant aux analyses réalisées sur la base de l'expression du CD20. Finalement, on remarque que le pourcentage d'entrée en apoptose varie de 29,4% (CD20+ vs CD20-) ce qui est comparable à la perte de viabilité observée au jour 16 par des analyses faisant appel au bleu de trypan (perte de viabilité de 34,5%). On remarque que les cellules CD20+ sont elles aussi sensibles à la CHX puisque 40,6% des cellules entrent en apoptose suite à un traitement. Cela pourrait être expliqué par le fait que les cellules peuvent avoir enclenché le processus de différenciation sans avoir complètement perdu l'expression du CD20. Le suivi de l'expression de marqueurs de différenciation intermédiaires aurait pu permettre une subdivision plus fine des cellules qui sont en phase précoce de différenciation des cellules qui sont en prolifération.

#### **4 - CERTAINS MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 NE PEUVENT ÊTRE ASSOCIÉS AUX VARIATIONS DU COMPORTEMENT DES LYMPHOCYTES B CULTIVÉS DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L**

##### **4.1 - A1**

L'intérêt d'étudier l'expression de cette protéine réside dans le fait que l'expression de A1 est augmentée chez les lymphocytes B qui sont retrouvés dans la rate (Tomayko, 1998) et que le système CD40L reproduit une des interactions prédominantes des centres germinaux. D'abord, il y eut l'étude des membres anti-apoptotiques appartenant à la famille Bcl-2. Nous avons montré que la protéine anti-apoptotique A1 n'est pas exprimée chez les lymphocytes B isolés du sang périphérique et que les conditions de culture du système CD40L ne permettent

pas l'induction de son expression. La protéine A1 n'est donc pas impliquée dans la baisse de viabilité et par conséquent ne peut supporter la survie des plasmocytes lors de la différenciation. Or, il n'est pas possible d'associer l'expression de A1 avec une interaction CD40-CD40L.

#### **4.2 - Bcl-2**

Un second membre de la famille Bcl-2 qui comporte un intérêt certain est Bcl-2 lui-même puisqu'il est bien connu que les lymphocytes B isolés du sang périphérique expriment cette protéine ; nos résultats confirment ce fait. Les conditions de culture du système CD40L ne semblent pas modifier, à la hausse ou à la baisse, le niveau d'expression de cette protéine et ce, en dépit du nombre de jours passés en culture. Bcl-2 n'est donc pas responsable des modifications de comportement observés au cours de la culture.

#### **4.3 - Bak**

Les résultats obtenus quant à la présence d'ARNm spécifique à Bak ne permettent pas de confirmer que Bak est absent des lymphocytes B isolés du sang périphérique (Krajewski, 1996) puisque la quantité de cellules fraîchement isolées n'était pas suffisante. Cependant, on remarque que le messager de Bak est présent à partir du 6<sup>ième</sup> jour suivant la mise en culture et est modulé à la baisse par la suite. Or, Bak est un membre de la famille Bcl-2 qui est pro-apoptotique. Ces résultats peuvent donc sembler contradictoires avec les résultats présentés précédemment. En effet, la viabilité qui est élevée en début de culture (jour 6) correspond au niveau d'ARN messager à son plus fort. C'est au jour 16 que le niveau de messager est le plus bas alors que la mortalité cellulaire est à son maximum. Cependant, ces résultats ne nous renseignent pas sur le niveau protéique de Bak ni sur l'activité de cette dernière. Peut-être que les messagers ne sont pas traduits compte tenu des conditions de culture. Des analyses de

types Western blot nous auraient renseigné sur le niveau protéique de Bak dans les lymphocytes B au cours de la culture dans le système CD40L. Les anticorps disponibles pour la détection de cette protéine n'étaient pas spécifiques puisque qu'ils reconnaissaient fortement une protéine d'environ 38 KDa alors que Bak a un poids moléculaire de 23 KDa (résultats non montrés). Le point à retenir de ce genre d'analyse est que le système CD40L permet l'induction de la transcription de Bak alors que les résultats de Krajewski et al. démontrent que Bak est absent des lymphocytes B isolés du sang périphérique (Krajewski, 1996).

#### **4.4 - Bad**

Des résultats (non montrés) concernant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bad ont été obtenus et pourraient comporter un certain intérêt. Par Western blot, il est possible de voir qu'il y a expression de Bad au jour 0 c'est à dire lors de l'isolement des lymphocytes B. L'expression de Bad est toujours aussi forte au jour 9 mais diminue considérablement aux jours 15 et 21. Bad est capable de s'associer à Bcl-X<sub>L</sub> afin d'inhiber sa fonction anti-apoptotique (Yang, 1995). Cependant, pour s'associer à Bcl-X<sub>L</sub>, la protéine Bad ne doit pas être phosphorylée (Zha, 1996). Deux sites de phosphorylation jouent un rôle important dans la liaison possible avec Bcl-X<sub>L</sub> ; il s'agit de la sérine en position 112 et de la sérine en position 136 (Zha, 1996). Toujours par Western blot, il est possible de déterminer à quels moments la phosphorylation est présente au cours de la culture. La protéine Bad ne semble pas phosphorylée au jour 0 ce qui signifie qu'elle est apte à accomplir son rôle pro-apoptotique. Par contre, au jour 9 elle semble fortement phosphorylée donc inapte à lier Bcl-X<sub>L</sub> ; les conditions sont donc totalement défavorables à l'apoptose. Au 15<sup>ème</sup> jour, la phosphorylation est moindre qu'au jour 9 mais toujours présente. Finalement, au jour 21, la phosphorylation est à son minimum. Cependant, ces résultats se sont révélés difficilement reproductibles et bien que plusieurs expériences aient été faites pour tenter de comprendre ce problème, nous n'avons pu établir hors de tout doute un lien entre la phosphorylation de Bad et la différenciation



observée chez les lymphocytes B cultivés dans le système CD40L. Il reste que le phénomène est intéressant et mérite d'être étudié plus à fond.

L'analyse de l'expression de Bax et de Mcl-1 n'a pas été possible. Les anticorps monoclonaux disponibles n'étaient pas spécifiques à une seule protéine ce qui faisait que plusieurs bandes étaient visibles.

#### **5 - LES VARIATIONS DU TAUX DE SYNTHÈSE DE LA PROTÉINE BCL-X<sub>L</sub> CHEZ LES LYMPHOCYTES B CULTIVÉS DANS LE SYSTÈME DE CULTURE CD40L SONT ASSOCIÉES AUX VARIATIONS DU COMPORTEMENT CELLULAIRE**

Des études effectuées dans nos laboratoires démontrent que certaines lignées cellulaires dérivées de lymphocytes B sont soit sensibles, soit résistantes à l'apoptose induite par la présence de CHX, tel qu'expliqué en introduction. Il avait alors été démontré que les lignées cellulaires résistantes à l'apoptose induite par la CHX exprimaient davantage de Bcl-X<sub>L</sub> que les lignées sensibles (Gauthier, 1996). Nous avons donc voulu vérifier si ce gène inhibiteur d'apoptose est exprimé dans les lymphocytes B en culture dans le système CD40L. Il est connu que la liaison du CD40 avec son ligand provoque une augmentation de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> et c'est bel bien ce qui se produit dans le système CD40L. Il est clairement visible que Bcl-X<sub>L</sub> n'est pas détecté lors de l'isolement des lymphocytes B du sang périphérique. Après seulement 2 jours passés dans ces conditions de culture, on remarque que l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> est augmentée considérablement. De plus, on conçoit que cette augmentation est due majoritairement à la liaison du CD40 avec son ligand puisque lorsque les cellules sont en présence seulement d'IL-4, l'augmentation de Bcl-X<sub>L</sub> est beaucoup moins forte. L'expression est à son maximum au 9<sup>ème</sup> jour suivant la mise en culture, jour auquel la viabilité est bonne (98,2%). On remarque que, par la suite, l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> subit des fluctuations. Cela correspond aux variations observées lors des analyses de viabilité et d'expression des

marqueurs de surface. Donc, on peut associer une diminution de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> à la hausse de la sensibilité à la CHX. Les fluctuations de l'expression concordent avec les fluctuations de comportement cellulaire qui ont été expliquées dans les paragraphes précédents. L'activation des lymphocytes B via le CD40 favorise l'expression de Bcl-X<sub>L</sub>. Chez les lymphocytes B en prolifération, c'est l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> qui serait responsable de la résistance à la CHX tel que précédemment démontré chez les myélomes (Gauthier, 1996). La transfection de bcl-X<sub>L</sub> dans les lymphocytes B cultivés sur un courte période de temps dans le système CD40L (9 jours et moins) pourrait permettre la survie des cellules et favoriser la prolifération à long terme. Puisque nous voulons produire des anticorps, il faut que la différenciation ait lieu. Selon les résultats obtenus, la différenciation survient au même moment où la synthèse de Bcl-X<sub>L</sub> diminue. L'expression de bcl-X<sub>L</sub> dans les lymphocytes B devrait donc être contrôlée ; il y aurait expression du gène au cours de la prolifération et arrêt de l'expression lors de la différenciation.

#### **6 - L'EXPRESSION DU GÈNE BAG-1 POURRAIT ÊTRE ASSOCIÉE À L'ENCLÈCHEMENT DU PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION**

Nous avons par la suite étudié l'expression de Bag-1. Takayama et al (Takayama, 1997) avaient montré, par des analyses d'immunohistochimie, que la protéine Bag-1 est absente des lymphocytes du sang périphérique indépendamment qu'il s'agisse de lymphocytes B ou T. Nos résultats sont en accord pour ce qui est des cellules fraîchement isolées. Cependant, la mise en culture dans le système CD40L permet l'augmentation de la synthèse de Bag-1. L'isoforme retrouvé est celui de 32-36 KDa, isoforme qui est associé aux organelles. Cette activation n'a jamais encore été rapportée dans la littérature et pourrait être due à la présence de certaines interleukines. Des résultats obtenus dans nos laboratoires concernant la sécrétion de cytokines par les lymphocytes B dans le système CD40L peuvent aider à expliquer ce phénomène (Sonia Néron, communication personnelle). Il semble que le système de culture permette la sécrétion d'IL-6 par les lymphocytes B. L'IL-6 est connu pour induire la

différenciation des lymphocytes B. Chez la lignée 11A3 (hybridome myélome-lymphocyte B murin) dépendante de l'IL-6, le retrait de cette cytokine fait diminuer le niveau d'expression de Bag-1 (Serge Côté, communication personnelle). De façon hypothétique, on peut croire que l'IL-6 induirait l'expression de Bag-1 et que Bag-1 pourrait supporter la survie cellulaire au cours de la différenciation. Bag-1 est constitué d'un domaine homologue à l'ubiquitine qui participe théoriquement à la liaison de Bag-1 à Bcl-2 ou à d'autres protéines (Toniolo, 1988). À l'aide de ce domaine, il semble que Bag-1 peut chaperonner d'autres des protéines telles que Bcl-2 (ou d'autres protéines de la famille Bcl-2 dont Bcl-X<sub>L</sub>) au protéasome (Takayama, 1995). Il est maintenant bien connu que, dans certaines circonstances physiologiques, l'apoptose est induite par l'activation de protéases (Yuan, 1993). De façon hypothétique, on pourrait croire que Bag-1 amène Bcl-X<sub>L</sub> aux protéases en empêchant l'enclenchement de l'apoptose. Puisqu'on remarque une augmentation simultanée de la synthèse de Bag-1 et de Bcl-X<sub>L</sub>, on peut croire que ces deux protéines vont interagir ensemble pour inhiber l'apoptose chez les lymphocytes B en prolifération dans le système de culture CD40L.

Suite à ces analyses, deux membres anti-apoptotiques retiennent notre attention. De fait, Bcl-X<sub>L</sub> et Bag-1 pourraient éventuellement être transfectés chez des lymphocytes B de façon à améliorer la prolifération et éviter l'apoptose détectée au 16<sup>ième</sup> jour et aux jours suivants. Les transfections devraient donc être réalisées avant le 16<sup>ième</sup> jour de culture de façon à ce que la différenciation ne soit pas encore enclenchée. De façon à clarifier l'importance de l'interaction entre Bag-1 et Bcl-X<sub>L</sub>, les gènes pourraient être transfectés séparément et co-transfectés. Tel que mentionné précédemment, l'expression de ces gènes devrait être contrôlée de façon à ce que leur présence n'empêche pas l'enclenchement du processus de différenciation lorsque le moment est venu de produire massivement des anticorps polyclonaux.

## **7- LE SYSTÈME DE CULTURE ANTI-CD27 PERMET D'AMÉLIORER LA SÉCRÉTION D'ANTICORPS PAR LES LYMPHOCYTES B**

Lors des analyses réalisées au cours de ce projet, les lymphocytes B ont été cultivés dans le système de culture CD40L et transférés dans le système anti-CD27. Ce système est constitué de cellules de fibroblaste murin exprimant le récepteur FcγRII/CDw32 (cellules 16.2CG7) auxquelles de l'IL2, de l'IL10 et un anticorps monoclonal dirigé contre le CD27, ont été ajoutés. Ce système a été élaboré en tenant compte de la première version du système CD40L. C'est parce que le CD70, tout comme le CD40L, est retrouvé sous forme de trimère (Tesselaar, 1997) que ce système a été utilisé. On tente de recréer l'effet trimérique. On remarque donc que la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B est augmentée d'un facteur d'au moins 2 dans le système anti-CD27. Nous suggérons l'utilisation d'un système de culture en deux phases. Une phase de prolifération pendant laquelle on s'attend à multiplier le nombre de cellules par un facteur variant entre 2 et  $3,4 \times 10^3$ . Donc, à partir d'un don de sang de 450 ml qui peut générer au minimum  $9 \times 10^{10}$  cellules B, on peut escompter produire au minimum 625 mg d'anticorps (calculs en annexe). On accorde une attention particulière au fait que la liaison du CD27 par un anticorps monoclonal favorise la sécrétion d'anticorps. Les conditions similaires (sans liaison du CD27 mais présence d'IL-2 et d'IL-10) ne favorise qu'une faible sécrétion d'anticorps. La liaison du CD27 par un anticorps monoclonal ne semble pas améliorer la survie des cellules en différenciation. Le clonage du ligand naturel du CD27, le CD70, pourrait améliorer la formation de plasmocytes et par conséquent la sécrétion d'anticorps.

## **8 - LES ANTICORPS PRODUITS DANS LES SYSTÈMES DE CULTURE CD40L ET ANTI-CD27 SONT POLYCLONAUX**

Les analyses par électrophorèse de zone démontrent clairement que les anticorps produits dans les systèmes de culture CD40L et anti-CD27 sont polyclonaux. Les conditions de culture ne semblent pas biaiser pas la production d'anticorps vers un isotype particulier. Il est impossible par ces analyses de déterminer quels isotypes sont produits. Remarquons que ces résultats nous renseignent sur le fait qu'il ne s'agit donc pas de l'expansion extraordinaire d'une seule ou de quelques cellules B. D'ailleurs le fait que les anticorps produits au cours de la culture soit polyclonaux et non mono- ou oligoclonaux. appuie cette hypothèse.

## **CONCLUSION**

Les études réalisées au cours de ce projet ont permis la caractérisation du système de culture CD40L. On retient que le système de culture permet d'accroître considérablement une population de lymphocytes B isolés du sang de donneurs sains. Des analyses nous ont permis de confirmer qu'une proportion de lymphocytes B entrent en différenciation bien que le système de culture ne soit théoriquement pas conçu pour favoriser l'enclenchement de ce processus. En effet, on remarque que les cellules sécrètent des anticorps polyclonaux. Le comportement de ces cellules sécrétrices d'anticorps a été analysé par des études d'expression des marqueurs cellulaires de surface et de sensibilité à l'apoptose particulièrement au niveau de l'expression des gènes qui contrôlent cette mort cellulaire programmée. Les observations recueillies révèlent que la sensibilité à l'apoptose augmente en cours de culture en concordance avec la diminution de l'expression des gènes *bcl-X<sub>L</sub>* et *bag-1*. De la même façon, les analyses d'expression des marqueurs de surface laissent entrevoir une modification du phénotype des lymphocytes B vers une forme différenciée (CD20-, CD38+); cela pourrait aussi expliquer l'augmentation de la sécrétion d'anticorps qui reste toutefois très limitée dans le système CD40L. Tous ces phénomènes surviennent aux environs du 16<sup>ième</sup> jour de culture. Pour contrer la perte des cellules qui se différencient et qui vont rapidement mourir par apoptose, il serait envisageable de transférer ces gènes chez les lymphocytes B. Nous avons également montré qu'il est possible d'augmenter la sécrétion d'anticorps polyclonaux par la liaison du marqueur CD27 présent sur les lymphocytes B. La liaison du CD27 était assurée par un anticorps monoclonal; on peut escompter améliorer la différenciation en mettant les lymphocytes B en présence du ligand naturel du CD27 qui pourrait être exprimé par des cellules de fibroblastes. Ainsi, puisque le but ultime de ce projet est d'optimiser l'expansion des lymphocytes B pour ensuite maximiser la sécrétion d'anticorps, nous proposons l'utilisation

**d'une culture en deux phases. La première phase consiste en la prolifération massive des lymphocytes B par le biais du système de culture CD40L ; la seconde phase qui vise la sécrétion de grandes quantités d'anticorps, fait appel à un second système de culture qui favorise la différenciation des lymphocytes B.**

## **ANNEXES**

- **EXEMPLE DE CALCUL DE L'EXPANSION MAXIMALE DES LYMPHOCYTES B DANS LE SYSTÈME CD40L :**

Nombre initial de cellules :  $1,2 \times 10^6$  cellules

Nombre final de cellules :  $2403,5 \times 10^6$  cellules

(Volume initial de culture (réel) : 4,8 ml vs volume final de culture (extrapolé) :  $36 \times 10^4$  ml)

Calcul de l'expansion maximale : Nombre final de cellules  $\div$  Nombre initial de cellules

$$2403,5 \times 10^6 \text{ cellules} \div 1,2 \times 10^6 \text{ cellules}$$

$$\text{Expansion maximale} = 2003 \text{ fois} \rightarrow 2 \times 10^3 \text{ fois}$$

### **Extrapolation :**

Une prise de sang de 10 ml contient  $\sim 1 \times 10^6$  cellules B. Un don de sang normal a un volume de 450 ml soit  $45 \times 10^6$  cellules B.

Compte tenu du facteur d'expansion maximale, on peut compter générer :

$$45 \times 10^6 \text{ cellules B} \times 2 \times 10^3 \text{ fois} = 90 \times 10^9 \text{ cellules B}$$



• **EXEMPLE DE CALCUL DE LA SÉCRÉTION MAXIMALE D'ANTICORPS PAR LES LYMPHOCYTES B DANS LE SYSTÈME ANTI-CD27 :**

Après 6 jours dans le système anti-CD27, les lymphocytes B ont sécrété 868 ng d'anticorps/ml de surnageant. Donc :

$$868 \text{ ng d'anticorps/ml de surnageant} = x \text{ ng d'anticorps/puits de } 200 \mu\text{l de surnageant}$$

$$x = 174 \text{ ng d'anticorps /puits}$$

Chaque puits contient 25 000 cellules B. Donc chaque cellule produit :

$$174 \text{ ng d'anticorps /puits} = 174 \text{ ng d'anticorps /} 25\,000 \text{ cellules} = 6,94 \text{ pg d'anticorps /cellule}$$

Si on compte générer  $90 \times 10^6$  cellules B à partir d'un don de sang de 450 ml, on peut compter produire :

$$6,94 \text{ pg d'anticorps /cellule} = x \text{ pg d'anticorps /} 90 \times 10^9 \text{ cellules B}$$

$$x = 626,4 \text{ mg} \rightarrow \sim 625 \text{ mg}$$

## **RÉFÉRENCES**

- **ADACHI, M., SEKIYA, M., TORIGOE, T., TAKAYAMA, S., REED, J.C., MIYAZAKI, T., MINAMI, Y., AND IMAI, K. 1996. Interleukin-2 (IL-2) upregulates BAG-1 gene expression through-serine rich region within IL-2 receptor  $\beta$ c chain. *Blood*. 88 : 4118.**
- **ADACHI, M., TORIGOE, T., TAKAYAMA, S. AND IMAI, K. 1998. BAG-1 and Bcl-2 in IL-2 signaling. *Leukemia and lymphoma*. 30 :483.**
- **AGEMATSU, K., KOBATA, T., YANG, F.-C., NAKAZAWA, T., FUKUSHIMA, K., KITAHARA, M., MORI, T., SUJITA, K., MORIMOTO, C., KOMIYAMA, A. 1995. CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur. J.Immunol*. 25 : 2825**
- **AGEMATSU, K., NAGUMO, H., OGUCHI, Y., NAKAZAWA, T., FUKUSHIMA, K., YASUI, K., ITO, S., KOBATA, T., MORIMOTO, C., KOMIYAMA, A. 1998. Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells : synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood*. 91(1) : 173.**

- **AGEMATSU, K.**, NAGUMO, H., YANG, F.-C., NAKAZAWA, T., FUKUSHIMA, K., ITO, S., SUJITA, K., MORI, T., KOBATA, T., MORIMOTO, C., KOMIYAMA, A. 1997. **B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production.** *Eur. J.Immunol.* 27 : 2073-2079
  
- **ARMITAGE, R.J.**, FANSLow, W.C.O., STROCKBINE, L., SATO, T.A., CLIFFORD, K.N., MACDUFF, B.M., ANDERSON, D.M., GIMPEL, S. D., DAVIS-SMITH, T., MALISZEWSKI, C.R., CLARK, E.A., SMITH, C.A., GRABSTEIN, K.H., COSMAN, D. AND SPRIGGS, M.K. 1992. **Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40.** *Nature.* 357 :80.
  
- **ARMITAGE, R.J.**, MACDUFF, B.M., SPRIGGS, M.K., AND FANSLow, W.C. 1993. **Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines.** *J. Immunol.* 150 : 3671.
  
- **ARPIN, C.**, DÉCHANET, J., VAN KOOTEN, C., MERVILLE, P., GROUARD, G., BRIÈRE, F., BANCHEREAU, J., AND LIU, Y.-J. 1995. **Generation of memory B cells and plasma cells *in vitro*.** *Science.* 268 : 72.
  
- **ARRUFO, A.**, FARRINGTON, M., HOLLENBAUGH, D., LI, X., MILATOVICH, A., NONYAMA, S., BAJORATH, J., GROSMARE, L.S., STENKAMP, R., NEUBAUER, M., ROBERTS, R.L., NOELLE, R.J., LEDBETTER, J.A., FRANCKE, U., AND OCHS H.D. 1993. **The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome.** *Cell.* 72 : 291.
  
- **AUBIN, S.** 1996. **Contrôle de l'apoptose dans les lymphocytes B humains cultivés *in vitro*.** Mémoire de maîtrise, Université Laval, Ste-Foy, Québec.
  
- **BANCHEREAU, J.**, AND ROUSSET, F. 1991b. **Growing human B lymphocytes in the CD40 system.** *Nature.* 353 : 678.

- **BANCHEREAU, J., BAZAN, F., BLANCHARD, D., BRIÈRE, F., GALIZZI, J.P., VANKOOTEN, C., LIU, Y.J., ROUSSET, F AND SAELAND, S. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Ann. Rev. Immunol.* 12 :881.**
- **BANCHEREAU, J., DE PAOLI, P., VALLÉ, A., GARCIA, É., ROUSSET, F. 1991a. Long-term human B cell lines dependant on interleukin-4 antibody to CD40. *Science.* 251 : 70.**
- **BAZIN, R., CHEVRIER, M.C., DELAGE, R. AND LEMIEUX, R. 1996. Evidence for restricted diversity of antigen-specific human antibodies in immunized hu-PBL-SCID mice. *Hum. Antibod. Hybridomas.* 7 :129.**
- **BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248.**
- **BURDIN, N., VAN KOOTEN, C., GALIBERT, L., ABRAHAMS, J.S., WIJDENES, J., BANCHEREAU, J., AND ROUSSET, F. 1995. Endogenous Il-6 and Il-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Immunol.* 154 : 2533.**
- **CHAO, T. AND KORSMEYER, S.J. 1998. Bcl-2 Family : Regulators of cell death. *Ann. Rev. Immunol.* 16 : 395.**
- **CHENG, Y., LEVINE, B., BOISE, L.H., THOMPSON, C.B. AND HAARDWICK, J.M. 1996. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-X<sub>L</sub>. *Nature.* 379 : 554.**

- **CHINNAIYAN, A.M., O'ROURKE, K., LANE, B.R. AND DIXIT, V.M. 1997. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9 : a molecular framework for cell death. *Science*. 275 : 1122.**
- **CHITTENDEN, T., FLEMINGTON, C., HOUGHTON, A.B., EBB, R.G., GALLO, G.J., ELANGOVAN, B., CHINNADURAL, G. AND LUTZ, R.J. 1995. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* (14) : 5589.**
- **CHURCH, G.M. AND GILBERT, W. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 81 :1991.**
- **COLIGAN, J.E., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M. AND STROBER, W. 1994. in : *Current Protocols Immunology*, New York : John Wiley**
- **CORY, S. 1995. Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. *Annu. Rev. Immunol.* 13 : 513.**
- **DATTA, R.S., DUDECK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. AND GREENBERG, M.E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91 : 231.**
- **DEFRANCE, T., VANBERVLIET, B., AUBRY, J.-P., TAKEBE, Y., ARAI, N., MIYAJIMA, A., YOKOTA, T., ARAI, K.-I., DE VRIES, J.E., AND BANCHEREAU, J. 1987. B cell growth-promoting activity of recombinant human interleukin 4. *J. Immunol.* 139 : 1135.**

- **DEFRANCE, T., VANBERVLIET, B., BRIÈRE, F., DURANT, I., ROUSSET, F. AND BANCHEREAU, J.** 1992. **Interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$  cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A.** *J. Exp. Med.* 175 :671.
- **DESLAURIERS, N.** 1996. **MCB-17425 Molécules et cellules de l'immunité.** Notes de cours, Université Laval, Ste-Foy, Québec.
- **FLUCKIGER, A.-C., GARRONE, P., DURAND, I., GALIZZI, J.-P. AND BANCHEREAU, J.** 1993. **Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocyte.** *J. Exp. Med.* 178 : 1473.
- **FRANCKE, T.F. AND CANTLEY, L.C.** 1997. **A bad kinase makes good.** *Nature.* 390 : 116.
- **GAUTHIER, É., PICHÉ, L., LEMIEUX, G. AND LEMIEUX, R.** 1996. **Rôle of bcl-X<sub>L</sub> in the control of apoptosis in murine myeloma cells.** *Cancer Res.* 56, 1451.
- **GIORDANO, V., DE FALCO, G., CHIARI, R., QUINTO, I., PELICCI, P.G., BARTHOLOMEW, L., DELMASTRO, P., GADINA, M. AND SCALA, G.** 1997. **Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase.** *J.Immunol.* 158 : 4097.
- **GREEN, D.R. AND REED, J.C.** 1998. **Mitochondria and apoptosis.** *Science.* 281 : 1309.
- **GRILLOT, D.A.M., MERINO, R., PENA, J.C., FANSLAW, W.C., FINKELMAN, F.D., THOMPSON, C.B., AND NUNEZ, G.** 1996. **bcl-x exhibits regulated expression during B cell**

development and activation and modulates lymphocyte survival in transgenic mice. *Jour. Exp. Med.*, 183 : 381.

- **GROUARD, G., DE BOUTELLER, O., BANCHEREAU, J., AND LIU, Y.-J.** 1995. **Human follicular dendritic cells enhance cytokine-dependent growth and differentiation of CD40-activated B cells.** *J. Immunol.* 155 : 3345.
- **HALDAR, S., BASU, A. AND CROCE, C.M.** 1997. **Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity.** *Cancer Res.* 57 : 229.
- **HANISSIAN S.H. AND GEHA, R.S.** 1997. **Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells.** *Immunity.* 6(4) :379.
- **HARADA, Y., KAWANO, M.M., HUANG, N., MAHMOUD, M.S., LISUKOV, I.A., MIHARA, K., TSUJIMOTO, T. AND KURAMOTO, A.** 1996. **Identification of early cells peripheral blood and their clinical significance.** *Br. J. Haematol.* 92(1) : 184.
- **HARDY, R.R., CARMACK, C.E., SHINTON, S.A., KEMP, J.D. AND HAYAKAWA, K.** 1991. **Resolution and characterization of pre-pro-B stages in normal mouse bone marrow.** *J. Exp. Med.* 173 : 1213.
- **HENGARTNER, M.O. AND HORVITZ, H.R.** 1994. ***C.elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homologue of the mammalian proto-oncogene bcl-2.** *Cell.* 76(4) : 665.
- **HOLLENBAUGH, D., GROSMARE, L.S., KULLAS, C.D., CHALUPNY, N.J., BRAESCH-ANDERSEN, S., NOELLE, R.J., STAMENKOVIC, I., LEDBETTER, J.A., AND ARRUFFO, A.** 1992. **The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the**

**CD40 receptor : expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity.**  
*EMBO Jour.* 11 : 4313.

- **ITO, T., DENG, X., CARR, B. AND MAY, W.S.** 1997. **Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function.** *J. Biol. Chem.* 272 : 11671.
- **JANEWAY, C.A. AND TRAVERS, P.** 1997. **Immunobiologie.** Traduction de la 2<sup>ème</sup> édition, De Boeck University, Paris, 582p.
- **JEPPSON, J.D., PATEL, H.R., SAKATA, N., DOMENICO, J., TERADA, N. AND GELFAND, E.W.,** 1998. **Requirement for dual signals by anti-CD40 and IL-4 for the induction of nuclear factor  $\kappa$ B, IL-6 and IgE in human B lymphocytes.** *J.Immunol.* 161 :1738.
- **KAWANO, M.M., MIHARA, K., HUANG, N., TSUJIMOTO, T., AND KURAMOTO, A.** 1995. **Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis.** *Blood.* 85 : 487.
- **KIEFER, M.C., BRAUER, M.J., POWERS, V.C., WU, J.J., URMANSKY, S.R., TOMEL, L.D., AND BARR, P.J.** 1995. **Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak.** *Nature (Lond.)* 374 : 736.
- **KINCADE, P.W., LEE, G., PIETRANGELI, C.E., HAYASHI, S.I AND GIMBLE, J.M.** 1993. **Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow.** *Ann. Rev. Immunol.* 7 : 111.
- **KINDLER, V. AND ZUBLER, R.H.** 1997. **Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3.** *J. Immunol.* 159 : 2085.



- **KITADA, S., KRAJEWSKA, M., ZHANG, X., SCUDIERO, D., ZAPATA, J.M., WANG, H.G., SHABAIK, A., TUDOR, G., KRAJEWSKI, S., MYERS, T.G., JONHSON, G.S., SAUSVILLE, E.A. AND REED, J.C. 1998. Expression and localisation of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *Am. J. Pathol.* 152 : 51.**
  
- **KOBOTA, T., JACQUOT, S., KOZLOWSKI, S., AGEMATSU, K., SCHLOSSMAN, S.F., 1995. CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 11249.**
  
- **KOOTEN, C.V. AND BANCHEREAU, J. 1996. CD40-CD40 ligand : a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv. Immunol.* 61 : 1.**
  
- **KOZOPAS, K.M., YANG, T., BUCHAN, H.L., ZHOU, P. AND CRAIG R.W. 1993. Mcl-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 3516.**
  
- **KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., REED, J.C. 1996. Immunohistochemical analysis of *in vitro* patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res.* 56(12) : 2849.**
  
- **LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680.**
  
- **LANE, P., TRAUNECKER, A., HUBELE, S., INUI, S., LANZAVECCHIA, A., AND GRAY, D. 1992. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 wich participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 22 : 2573.**

- REED, J.C. 1998. **Expression and localisation of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines.** *Am. J. Pathol.* 152 : 51.
- **KOBOTA, T., JACQUOT, S., KOZLOWSKI, S., AGEMATSU, K., SCHLOSSMAN, S.F., 1995. CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 11249.
  - **KOOTEN, C.V. AND BANCHEREAU, J. 1996. CD40-CD40 ligand : a multifunctional receptor-ligand pair.** *Adv. Immunol.* 61 : 1.
  - **KOZOPAS, K.M., YANG, T., BUCHAN, H.L., ZHOU, P. AND CRAIG R.W. 1993. Mcl-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 3516.
  - **KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., REED, J.C. 1996. Immunohistochemical analysis of *in vitro* patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family.** *Cancer Res.* 56(12) : 2849.
  - **LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 227 : 680.
  - **LANE, P., TRAUNECKER, A., HUBELE, S., INUI, S., LANZAVECCHIA, A., AND GRAY, D. 1992. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes.** *Eur. J. Immunol.* 22 : 2573.

- **MACLENNAN, I.C., LIU, Y.J. AND JOHNSON, G.D. 1992. Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol. Rev.* 126 : 143.**
- **MIYASHITA, T. AND REED, J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80 : 293.**
- **MIYASHITA, T., MCLLRAITH, M.J., GRAMMER, A.C., MIURA, Y., ATTREP, J.F., SHIMAOKA, Y., AND LIPSKY, P.E. 1997. Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J. Immunol.* 158 : 4620.**
- **NÉRON, S., PELLETIER, A., CHEVRIER, M.-C., MONIER, G., LEMIEUX, R., AND DARVEAU, A. 1996. Induction of LFA-1 independent human B cell proliferation and differentiation by binding of CD40 with its ligand. *Immunol. Invest.* 25 (1&2) : 79.**
- **NGUYEN, M., BRANTON, P.E., WALTON, P.A., OLTVAL, Z.N., KORSMEYER, S.J. AND SHORE, G.C. 1994. Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J. Biol. Chem.* 269 : 16521.**
- **NOELLE, R.J., ROY, M., SHEPHERD, D.M., STAMEKOVIC, I., LEDBETTER, J.A. AND ARRUFÒ, A. 1992. A 39-kDa protein in activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 6550.**
- **NUNEZ, G., D.HOCKENBERY, T.J. MCDONNELL, C.M. SORENSEN, AND S.J. KORSMEYER. 1991. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature (Lond.)*. 353 : 71..**
- **OHTA, K., IWAI, K., KASAHARA, Y., TANIGUCHI, N., KRAJEWSKI, S., REED, J.C., AND MIYAWAKI, T. 1995. Immunoblot analysis of cellular expression of Bcl-2 family proteins,**

**Bcl-2, Bax, Bcl-X and Mcl-1, in human peripheral blood and lymphoid tissues. *Int. Immunol.* 7 : 1817.**

- **OLTVAI, Z.N., MILLIAM, C.L. AND KORSMEYER, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* (74) : 609.**
- **PACKHAM, G., BRIMMELL, M. AND CLEVELAND, J.L. 1997. Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *Biochem. J.* 328 : 807.**
- **PECANHA, L., SNAPPER, C., FINKELMAN, F. AND MONOD, J. 1991. Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T-cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion *in vitro*. I. Lymphokine dependence. *J. Immunol.* 146 : 833.**
- **PELTZ, G.A., TROUNSTINE, M.L. AND MOORE, K.W. 1988. Cloned and expressed human Fc receptor for IgG mediates anti-CD3-dependent lymphoproliferation. *J. Immunol.* 141 : 1891.**
- **RANDALL, T.D., HEATH, A.W., SANTOS-ARUMEDO, L., HOWARD, M.C., WEISSMAN, I.L. AND LUND, F.E. 1998. Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling : mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity*, 8 : 733.**
- **RANHEIM, E. A., CANTWELL, M.J., KIPPS, T.J. 1995. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 85(12) : 3556.**
- **REYNOLDS, J.E., YANG, T., QIAN, L., JENKINSON, J.D., ZHOU, P., EASTMAN, A. AND CRAIG, R.W. 1994. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 54 : 6348.**

- **ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D.** 1996. **Immunology.** Fourth edition, Mosby.
- **SAKAI, I., KRAFT, A.S.** 1997. **The kinase domain of Jak2 mediates induction of bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells.** *J.Biol.Chem.* 272(19) :12350.
- **SATTLER, M., LIANG, H., NETTESHEIM, D., MEADOWS, R.P., HARLAN, J.E., EBERSTADT, M., YOON, H.S., SHUKER, S.B., CHANG, B.S., MINN, A.J., THOMPSON, C.B. AND FESIK, S.W.** 1997. **Structure of Bcl-X<sub>L</sub>-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis.** *Science*, 275 : 983.
- **SELDAK, T.W., OLTVAI, Z.N., YANG, E., WANG, K., BOISE, L.H., THOMPSON, C.B., AND KORSMEYER, S.J.** 1995. **Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 7834.
- **SPECTOR, M.S., DESNOYERS, S., HOEPPNER, D.J., HENGARTNER, M.O.,** 1997. **Interaction between the C. elegans cell-death regulators CED-9 and CED-4.** *Nature* 385 : 653.
- **TAKAYAMA, S., SATO, T., KRAJEWSKI, S., KOHEL, K., IRIE, S., MILLAN, J.A., AND REED, J.C.** 1995. **Cloning and functional analysis of Bag-1 : A novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity.** *Cell.* 80 : 279.
- **TAKYAMA, S., KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., KITADA, S., ZAPATA, J.M., KOHEL, K., KNEE, D., SCUDIERO, D., TUDOR, G., MILLER, G.J., MIYASHITA, T., YAMADA, M. AND REED, J.C.** 1998. **Expression and localisation of Hsp/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and cell lines.** *Cancer Res.* 58 :3116.

- **TESSELAAR, K., GRAVESTAIN, L.A., VAN SCHIJNDEL, M.W., BORST, J. AND VAN LIER, R.A.W.** 1997. **Characterization of murine CD70, the ligand of the TNF receptor family member CD27.** *J. Immunol.* 159 :4959.
- **THORBERRY, N.A. AND LAZEBNICK, Y.,** 1998. **Caspases : ennemies within.** *Science.* 281 : 1312.
- **TODOROV, I.N.** 1990. **How cells maintain stability.** *Scientific American,* December : 66.
- **TOMAYKO, M.M. AND CANCRO, M.P.** 1998. **Long-lived B cells are distinguished by elevated expression of A1.** *J. Immunol.,* 160 : 107.
- **TONIOLO, D., PERISCO, M. AND ALCALAY, M.** 1988. **A « housekeeping » gene on the X chromosome encodes a protein similar to ubiquitin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 851.
- **TSUBATA, T. AND NISHIKAWA, S.I.** 1991. **Molecular and cellular aspects of early B-cell development.** *Curr. Opin. Immunol.* 3 : 186.
- **TUSCANO, J.M., DRUEY, K.M., RIVA, A., PENA, J., THOMPSON, C.B., AND KEHRL, J.H.** 1996. **Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center.** *Blood.* 88 : 1359.
- **UCHIYAMA, Y.** 1995. **Apoptosis : The history and trends of its studies.** *Arch. Histol. Cytol.* 58 : 1359.
- **UHLMANN, E.J., D'SA-EIPPER, C., SUBRAMANIAN, T., WAGNER, A.J., HAY, N. AND CHINNADURAI, G.** 1996. **Deletion of a nonconserved region of Bcl-2 confers a novel gain**

of function : suppression of apoptosis with concomitant cell proliferation. *Cancer Res.* 56 : 2506.

- **WANG, H.-G., TAKAYAMA, S., RAPP, U.R. AND REED, J.C.** 1996. **Bcl-2 interacting protein, Bag-1 binds to and activates the kinase Raf-1.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 7063.
- **YANG, E. AND KORSMEYER, S.J.** 1996. **Molecular thanatopsis : a discourse on the Bcl-2 family and cell death.** *Blood.* 88 : 386.
- **YANG, E., ZHA, J., JOCKEL, J., BOISE, L.H., THOMPSON, C.B., AND KORSMEYER, S.J.** 1995. **BAD, a heterodimeric partner for Bcl-X<sub>L</sub> and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death.** *Cell,* 80 : 285.
- **YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H.M. AND HORVITZ, H.R.** 1993. **The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme.** *Cell.* 75 : 641.
- **ZHA, J., HARADA, H., YANG, E., JOCKEL, J., KORSMEYERS, S.J.** 1996. **Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X.** *Cell.* 87 : 619.
- **ZOU, H., HENZEL, W.J., LIU, X., LUTSCHG, A. AND WANG, X.** 1997. **Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.** *Cell* 90 : 405.