

# techniques de cytogénétique animale



P. Popescu,  
H. Hayes,  
B. Dutrillaux,  
coord.

TECHNIQUES ET PRATIQUES

 **INRA**  
EDITIONS



**techniques  
de  
cytogénétique  
animale**



# techniques de cytogénétique animale

P. Popescu,  
H. Hayes,  
B. Dutrillaux,  
coord.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

147, rue de l'Université, 75338 Paris Cedex 07

## TECHNIQUES ET PRATIQUES

*Ouvrages parus dans la même collection*

### **Maladies de la tomate**

**Observer, identifier, lutter**

D. BLANCARD, 1988, 232 p.

### **Espèces exotiques utilisables pour la reconstitution du couvert végétal en région méditerranéenne**

Bilan des arboretums forestiers  
d'élimination

P. ALLEMAND, 1989, 150 p.

### **Le cerf et son élevage**

**Alimentation, techniques et pathologie**

A. BRELURUT, A. PINGUARD

et M. THERIEZ, 1990, 144 p.

### **L'alimentation des chevaux**

W. MARTIN-ROSSET

1990, 232 p.

### **Maladies des Cucurbitacées**

**Observer, identifier, lutter**

D. BLANCARD, H. LECOQ

et M. PITRAT, 1991, 320 p.

### **Weeds of the Lesser Antilles**

**Mauvaises Herbes des Petites Antilles**

J. FOURNET et J. L. HAMMERTON

1991, 214 p.

### **Maladies de conservation des fruits**

**à pépins : pommes et poires**

P. BONDOUX, 1992, 228 p.

### **Techniques de cytogénétique végétale**

J. JAHIER, 1992, 196 p.

### **Pratique des statistiques**

**non paramétriques**

P. SPRENT

Trad. fr. : J.-P. LEY, 1992, 302 p.

### **Immuno-analyses**

**pour l'agriculture et l'alimentation**

A. PARAF, G. PELTRE

Trad. française : E. RERAT

et A. BOUROCHE, 1992, 356 p.

### **Graines des feuillus forestiers**

**De la récolte au semis**

B. SUSZKA, C. MULLER

et M. BONNET-MASIMBERT

1994, 318 p.

### **Guide pour la description des sols**

D. BAIZE et B. JABIOL, 1995, 388 p.

### **Flore des champs cultivés**

P. JAUZEIN, 1995, 898 p.

### **Référentiel Pédologique 1995**

1995, 332 p.

### **Seeds of Forest Broadleaves from Harvest to Sowing**

B. SUSZKA, C. MULLER

et M. BONNET-MASIMBERT

1996, 336 p.

### **Catalogue des Aphididae du monde (Homoptera Aphidoidea)**

G. REMAUDIÈRE et M. REMAUDIÈRE

1997, 478 p.

### **Identifier les champignons transmis par les semences**

R. CHAMPION, 1997, 400 p.

### **Détection et isolement des champignons du sol**

P. DAVET et F. ROUXEL, 1997, 208 p.

### **De la canne au rhum**

L. FAHRASMANE et B. GANOU-PARFAIT

1997, 112 p.

### **Maladies du tabac**

**Observer, identifier, lutter**

D. BLANCARD, 1998, 376 p.

### **Le caviar**

**De la pêche au grain**

V. STERNIN, I. DORÉ

Trad. fr. : T. BONHOMME

1998, 216 p.

© INRA, Paris 1998      ISBN : 2-7380-0819-4      ISSN : 1150-3912

Le code de la propriété intellectuelle du 1<sup>er</sup> juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Le non respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique. Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC), 20 rue des Grands-Augustins, 75006 Paris.

# Préface

On ne pouvait concevoir meilleur « casting ». Les auteurs de cet ouvrage sont orfèvres en sa matière. J'ai suivi leurs travaux depuis le début de leur « entrée » en cytogénétique et je leur voue une grande estime. C'est un honneur pour moi d'avoir été choisi pour préfacer leur opus.

Paul Popescu, Directeur de recherche à l'INRA, a joué un rôle prépondérant dans le développement de la cytogénétique animale, tout particulièrement des animaux d'élevage. Il peut vous dire « combien ça coûte » une translocation dans un élevage de porcs ou une population bovine : une fortune ! P. Popescu a contribué largement à l'établissement de la carte génique chez ces espèces grâce aux techniques d'hybridation *in situ* d'ADN. Ses travaux sont universellement reconnus. Son laboratoire accueille chaque année de nombreux visiteurs et sert de référence pour la cytogénétique des animaux d'élevage.

Hélène Hayes, chargé de recherche à l'INRA, a collaboré avec lui à l'élaboration des techniques mises en œuvre et à bien d'autres découvertes qui transparaissent dans sa bibliographie. Elle pourrait nous raconter la fascinante homologie des chromosomes bovins avec les chromosomes humains et la cartographie génique comparée des bovidés domestiques.

Bernard Dutrillaux, directeur de recherche au CNRS, a fait ses premières armes dans le laboratoire du Professeur Jérôme Lejeune auprès duquel il a contribué de manière décisive au développement de la cytogénétique humaine. Il a essaimé ensuite pour créer son propre laboratoire à l'Institut Curie. Son œuvre est universellement reconnue : la mise au point de nombreuses techniques de marquage chromosomique, l'étude des chromosomes méiotiques, la reconstitution de la phylogénie chromosomique des primates et de nombreux autres phylums (canidés, pinnipèdes, rongeurs, etc.)... une œuvre considérable, une contribution majeure à la connaissance du rôle des remaniements chromosomiques à l'origine et au cours de l'évolution des tumeurs malignes, le développement de la notion d'oncogène et d'antioncogène. L'œuvre de B. Dutrillaux et de ses collaborateurs constitue un bastion incontournable de la cytogénétique humaine et animale.

Après les premiers travaux sur la drosophile et la souris, la cytogénétique a pris son essor avec Tjio et Levan (1954) qui ont montré que le nombre chromosomique de l'homme est 46 et non 48, ainsi qu'on l'enseignait. Puis, ce fut la découverte de la trisomie 21 par J. Lejeune. S'ensuivit une véritable explosion de découvertes en pathologie humaine congénitale et en cancérologie. Mais, ce fut aussi bien autre chose. La cytogénétique a permis :

- d'élaborer la carte génique de l'homme (*Human Gene Mapping*) et de maintes espèces animales,

- de reconstituer la phylogénie des primates et de nombreuses espèces (ce qui fut des généticiens « humains » et non des anthropologues),
- de connaître le fonctionnement du génome,
- de décrypter le rôle des chromosomes en écouvillon,
- de localiser les contrôles du développement embryonnaire dans le monde animal,
- la fécondation *in vitro*,
- le diagnostic *in utero*,
- les techniques transgéniques,
- la thérapie génique.

Cette formidable explosion de la génétique n'a été rendue possible que grâce à la mise au point d'une volée de techniques spécifiques très « pointues ». Elles sont l'objet de cet ouvrage. Il est, bien sûr, un livre de recettes, mais constitue aussi autant de fenêtres ouvertes sur les acquisitions obtenues grâce à elles :

- l'obtention des étalements chromosomiques, coloration et marquage permettant, entre autres, les différentes techniques de haute résolution ;
- les techniques d'hybridation *in situ* en vue de localisations géniques,
- les études germinales et la fécondation *in vitro* interspécifique en vue d'évaluer la fréquence des aneuploïdies des spermatozoïdes,
- la cartographie des chromosomes en écouvillon chez les pleurodèles, entre autres ;
- les chromosomes de la drosophile, polytènes en particulier, permettant les localisations géniques ;
- la coloration de la chromatine sexuelle,
- la cytométrie de flux et le tri des chromosomes.

L'ensemble de ces techniques adaptées au monde animal trouve du reste son reflet dans les techniques de cytogénétique végétale (cf. *Techniques de cytogénétique végétale*, J. Jahier, 1992).

Il est évident que le « Popescu, Hayes, Dutrillaux » aura une carrière longue et brillante au même titre que le toujours actuel « Ali-Bab » en cuisine (première édition, 1928). L'ouvrage n'attend plus que sa traduction dans les principales langues du monde scientifique. Il est un « *must* » pour la paillasse et la bibliothèque des biologistes « de tout poil » pour lesquels la cytogénétique est un allié indispensable : les généticiens, les zoologistes, les cartographes des gènes, les cancérologues, les embryologistes et la liste est loin d'être close. Il sera un magnifique cadeau de thèse pour ceux qui entreprennent de percer les secrets de la vie ; il y en a encore beaucoup.

**Dr. Jean de GROUCHY**  
Directeur de Recherche honoraire au CNRS

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	11
<b>Abréviations</b> .....	12
<b>I. OBTENTION DES ÉTALEMENTS CHROMOSOMIQUES</b>	
<b>Techniques de culture cellulaire</b> .....	15
Culture de lymphocytes .....	15
Culture de fibroblastes .....	17
<i>Etablissement de cultures à partir de fragments de tissus</i> .....	17
<i>Etablissement de cultures à partir d'un embryon d'oiseau</i> .....	19
<i>Comptage des cellules</i> .....	20
<i>Stockage des cellules</i> .....	21
<b>Obtention de cellules en prophase ou en prométaphase</b> .....	21
Synchronisation simple ou double par la thymidine .....	22
Synchronisation par l'améthoptérine .....	25
Synchronisation par la 5-fluorodéoxyuridine .....	26
Synchronisation par la 5-bromodéoxyuridine ou BrdU .....	26
<b>Techniques directes et cultures de très courte durée</b> .....	26
Etude de la moelle .....	27
Etude des chromosomes d'oiseaux à partir d'une plume .....	27
Etude des chromosomes de poisson .....	29
Etude des chromosomes d'insectes .....	30
<i>Obtention d'étalements métaphasiques à partir de cellules embryonnaires</i> .....	31
<i>Obtention d'étalements métaphasiques à partir de gonades</i> .....	31
<i>Analyse des chromosomes d'autres tissus</i> .....	32
<i>Remarques générales</i> .....	32
<b>Préparation des étalements chromosomiques</b> .....	33
<b>Techniques de coloration des étalements chromosomiques</b> .....	35
Coloration classique au Giemsa .....	35
Coloration à l'orcéine .....	36

Coloration par l'acridine orange .....	37
Coloration par l'iodure de propidium ou par le DAPI .....	39

## II. TECHNIQUES DE MARQUAGE CHROMOSOMIQUE

<b>Introduction</b> .....	41
Organisation du chromosome .....	41
L'euchromatine .....	43
<i>Les bandes « structurales »</i> .....	45
<i>Les bandes « dynamiques »</i> .....	47
Code des techniques de marquage chromosomique .....	49
<b>Techniques basées sur la structure de l'ADN</b> .....	49
Bandes QFQ par la moutarde de quinacrine .....	49
Bandes GTG par la trypsine .....	51
Bandes GAG par la « dénaturation » .....	52
Bandes RHG par la dénaturation thermique .....	53
Bandes T (terminales) .....	56
Bandes riches en 5-méthylcytosine .....	58
<i>Introduction</i> .....	58
<i>Révélation des bandes riches en 5-mC par immunofluorescence</i> .....	59
<b>Techniques basées sur la réplication de l'ADN</b> .....	62
Bandes R ou G par incorporation de BrdU .....	62
<i>Détection de l'incorporation de BrdU dans les chromosomes par immunofluorescence</i> .....	63
<i>Technique FPG (fluorochrome-photolyse-Giemsa)</i> .....	65
<i>Technique de coloration par l'iodure de propidium</i> .....	67
<i>Technique de coloration par le DAPI</i> .....	69
<i>Préparation de chromosomes marqués par le BrdU durant la deuxième moitié de la phase S pour induire les bandes R</i> .....	69
<i>Préparation de chromosomes marqués par le BrdU durant la première moitié de la phase S pour induire les bandes G</i> .....	70
Mise en évidence des échanges entre chromatides sœurs (SCE) .....	71
Asymétrie de l'incorporation du BrdU .....	72
<b>Techniques de différenciation chromosomique en fonction de la composition en bases de l'ADN</b> .....	73
Traitement par la 5-azacytidine ou la 5-désoxyazacytidine .....	73
<b>Coloration de l'hétérochromatine</b> .....	74
Bandes CBG .....	74
Bandes CT .....	77
Bandes G11 .....	77
Coloration au DA-DAPI .....	78
<b>Coloration des régions organisatrices nucléolaires (NOR)</b> .....	81
<b>Techniques de marquages chromosomiques séquentiels</b> .....	82

### III. TECHNIQUES D'HYBRIDATION *IN SITU*

<b>Introduction</b> .....	85
L'hybridation <i>in situ</i> de sondes radioactives .....	85
L'hybridation <i>in situ</i> de sondes non radioactives .....	86
L'identification des chromosomes hybridés .....	87
<b>Méthodes</b> .....	88
Préparation des étalements chromosomiques .....	88
Marquage des sondes d'ADN .....	88
<i>Marquage non radioactif pour les sondes d'ADN</i> <i>de taille supérieure à 1 kb</i> .....	88
<i>Marquage non radioactif pour les sondes d'ADN de taille</i> <i>comprise entre 0,25 et 1,5 kb</i> .....	89
<i>Marquage radioactif</i> .....	90
Prétraitement des préparations chromosomiques à la ribonucléase A .....	91
Dénaturation de l'ADN chromosomique .....	91
Préparation, marquage et dénaturation des sondes .....	91
Hybridation <i>in situ</i> .....	92
Lavages des préparations après hybridation .....	92
<i>Cas des sondes radioactives</i> .....	92
<i>Cas des sondes non radioactives</i> .....	92
Détection des signaux d'hybridation et révélation des bandes .....	93
<i>Cas des sondes radioactives : détection par autoradiographie</i> .....	93
<i>Cas des sondes non radioactives : détection par immunoréaction</i> .....	94
Observation et photographie des résultats .....	95
<i>Cas des sondes radioactives</i> .....	95
<i>Cas des sondes non radioactives</i> .....	95
<b>Remarques sur d'autres applications de l'hybridation <i>in situ</i></b> .....	95

### IV. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES CELLULES GERMINALES

<b>La méiose chez le mâle</b> .....	99
Technique classique .....	100
Technique des complexes synaptonématiques .....	104
<b>La méiose chez la femelle de mammifère</b> .....	109
<b>Étude des chromosomes du spermatozoïde</b> <b>par la fécondation <i>in vitro</i> interspécifique</b> .....	114

### V. LES CHROMOSOMES EN ÉCOUVILLON D'AMPHIBIENS

<b>Bases de la cartographie des chromosomes en écouvillon</b> .....	119
L'organisation des chromosomes en écouvillon .....	119
Topographie morphologique des chromosomes en écouvillon .....	122
<i>Variations morphologiques d'origine génétique</i> .....	122
<i>Variations morphologiques d'origine physiologique</i> .....	124

Topographie immunomorphologique .....	124
Les cartes de chromosomes en écouvillon dans le genre <i>Pleurodeles</i> .....	125
<i>Les conditions d'établissement des cartes</i> .....	125
<i>Les cartes intraspécifiques</i> .....	126
<b>Techniques de préparation des chromosomes en écouvillon pour la microscopie optique</b> .....	126
Préparation des ovocytes .....	126
Préparation des chromosomes pour les analyses morphologiques .....	129
Immunomarquages des chromosomes .....	133
<b>Techniques de préparation des chromosomes en écouvillon pour la microscopie électronique</b> .....	135
Analyse ultrastructurale .....	135
Immunomarquage haute résolution .....	139
<i>Immunomarquage en pré-inclusion</i> .....	139
<i>Immunomarquage en post-inclusion</i> .....	141
<b>Techniques de préparation des chromosomes mitotiques</b> .....	142
<b>Analyse des chromosomes en écouvillon</b> .....	144
Les marqueurs morphologiques .....	144
<i>Structures axiales</i> .....	144
<i>Boucles</i> .....	148
Les marquages immunologiques .....	149
Les paramètres cartographiques .....	149
<i>Classement des chromosomes</i> .....	149
<i>Orientation des chromosomes</i> .....	150
<i>Localisation des marqueurs</i> .....	150
<i>Correspondances entre cartes de chromosomes en écouvillon</i> .....	150
<b>Intérêt des chromosomes en écouvillon</b> .....	150
Détection et analyse de mutations .....	150
Etude de populations et évolution des chromosomes .....	151
Etude de la physiologie transcriptionnelle <i>in situ</i> .....	151

## VI. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES CHROMOSOMES DE DROSOPHILE

<b>Chromosomes mitotiques</b> .....	153
Description .....	153
Préparation des étalements chromosomiques .....	154
Coloration et marquage des chromosomes mitotiques .....	156
Hybridation <i>in situ</i> .....	156
<b>Chromosomes polytènes</b> .....	157
Description .....	157
Structure .....	157
Cartes de référence .....	160

Préparation des chromosomes : techniques de cytogénétique classique et moléculaire .....	160
<i>Condition d'élevage des larves</i> .....	160
<i>Préparation des chromosomes polytènes pour des analyses cytogénétiques classiques</i> .....	161
<i>Préparation des chromosomes pour l'hybridation in situ</i> .....	162
Hybridation <i>in situ</i> .....	163
Observation des chromosomes .....	165

## VII. TECHNIQUES D'ÉTUDE DU NOYAU INTERPHASIQUE

<b>Examen de la chromatine sexuelle</b> .....	167
<b>La chromatine en halo</b> .....	168
<b>Hybridation <i>in situ</i> sur noyaux interphasiques</b> .....	169

## VIII. APPLICATION DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX ET DE TYPE « SLIT-SCAN » À L'ANALYSE ET AU TRI DES CHROMOSOMES DE MAMMIFÈRES

<b>Présentation</b> .....	173
<b>Principes de la cytométrie en flux</b> .....	174
Cytométrie en flux standard .....	174
Fluorométrie de type « slit-scan » .....	176
Tri en flux .....	176
Calcul .....	177
<b>Préparation et coloration des chromosomes</b> .....	178
Méthode à l'hexanediol modifiée .....	179
Méthode au TAcCaM .....	179
Méthode au méthanol-acide acétique .....	180
Méthode au Tris/MgCl <sub>2</sub> /Triton X100 .....	180
Méthode à la polyamine .....	181
Méthode à la polyamine modifiée .....	181
Méthode à l'HEPES/MgSO <sub>4</sub> .....	182
Méthode à l'HEPES modifiée .....	182
Marquage à la fluorescéine pour l'hybridation <i>in situ</i> .....	182
Colorants et lasers .....	183
<b>Mesures et évaluation en cytométrie en flux</b> .....	185
Caryotypes en flux .....	185
Évaluation des données de caryotypes en flux .....	185
Mesures obtenues par la cytométrie de type « slit-scan » .....	189
Perspectives .....	193
Identification des chromosomes triés par la technique des bandes GTG .....	193
<b>Hybridation <i>in situ</i> sur chromosomes en suspension</b> .....	196
<b>Nomenclature</b> .....	205

<b>Glossaire</b> .....	207
<b>Annexes</b> .....	211
C Solutions pour coloration ou marquage chromosomique .....	211
D Divers .....	213
E Solutions pour chromosomes en écouvillon .....	216
F Solutions pour la cytométrie en flux et de type « slit-scan » .....	217
H Solutions pour l'hybridation <i>in situ</i> .....	219
M Milieux de culture .....	221
S Solutions de stockage .....	223
T Solutions tampon .....	224
V Solutions pour traitements <i>in vivo</i> .....	226
<b>Références bibliographiques</b> .....	229
<b>Index</b> .....	251
<b>Liste des auteurs</b> .....	259

# Remerciements

Nous tenons à remercier Messieurs Jean de Grouchy, Jean Générmont et Joseph Jahier pour leurs conseils et critiques.

Nous remercions aussi Mme Jeannine Hommel, Directeur du Service des Editions de l'INRA, pour son aide morale et financière dans la réalisation de ce livre.

# Abréviations

A	adénine
AT	paire de bases adénine-thymine
5-ACR	5-azacytidine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNase	acide désoxyribonucléase
ARN	acide ribonucléique
BET	bromure d'éthidium
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BSS	<i>balanced salt solution</i>
C	cytosine
CCD	<i>cooled camera device</i>
CI	indice centromérique
COC	complexe ovocyte-cumulus
ConA	concanavaline A
cpm	coup par minute
DA	distamycine A
DAB	3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride
5-dACR	5-désoxyazacytidine
DAPI	4'-6-diamino-2-phénylindole
dATP	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
DTT	dithiothreitol
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	2'-désoxynucléotide 5'-triphosphate
dTTP	2'-désoxythymidine 5'-triphosphate
dUDP	désoxyuridine triphosphate
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
FdU	5-fluoro-2'-déoxyuridine
FITC	fluorescéine isothiocyanate
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
FPG	fluorochrome-photolyse-Giemsa
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i>

G	guanine
GC	paire de bases guanine-cytosine
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
ISCN	<i>International System for human Cytogenetics Nomenclature</i>
ISCNDA	<i>International System of Cytogenetics Nomenclature for Domestic Animals</i>
kb	kilobase
LH	<i>luteinizing hormone</i>
LINES	<i>long interspersed repeated sequences</i>
LPS	lipopolysaccharide
5-mC	5-méthylcytosine
MTX	méthotrexate
NOR	régions organisatrices nucléolaires
pb	paire de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PHA	phytohémagglutinine
PI	iodure de propidium
PMT	photomultiplicateur
PPD	p-phénylènediamine
PVP	polyvinylpyrrolidone
PWM	pokeweed mitogène
qsp	quantité suffisante pour
Rnase	ribonucléase
SAR	<i>scaffold associated regions</i>
SCE	<i>sister chromatid exchange</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SINEs	<i>short interspersed repeated sequences</i>
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
SVF	sérum de veau fœtal
T	thymine
UI	unités internationales
UV	lumière ultraviolette
vol.	volume
vs	<i>versus</i>
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>

NB. Le chapitre « Annexes » regroupe les protocoles pour la préparation de diverses solutions et il est organisé en 9 sous-chapitres selon le type de solution :

- C Solutions pour coloration ou marquage chromosomique
- D Divers
- E Solutions pour chromosomes en écouvillon
- F Solutions pour la cytométrie en flux et de type « slit-scan »
- H Solutions pour l'hybridation *in situ*
- M Milieux de culture
- S Solutions de stockage
- T Solutions tampon
- V Solutions pour traitements *in vivo*

Dans le texte, « annexe suivie d'une lettre majuscule et d'un numéro, par exemple annexe C1 », renvoie au sous-chapitre correspondant du chapitre « Annexes ».

## CHAPITRE I

# Obtention des étalements chromosomiques

## Techniques de culture cellulaire

H. Hayes et B. Dutrillaux

L'analyse chromosomique nécessite la préparation de lames riches en étalements chromosomiques analysables, ce qui est réalisé en trois étapes :

- mise en culture de lymphocytes stimulés par un agent mitogène ou culture primaire de fibroblastes ;
- accumulation de cellules en métaphase ou en prométaphase, stades du cycle cellulaire auxquels les chromosomes sont les mieux individualisés ;
- récolte des cellules et préparation des étalements chromosomiques.

## Culture de lymphocytes

### Principe

Le sang, facile à prélever, est la source de cellules la plus utilisée en cytogénétique humaine. Chez les mammifères, les lymphocytes B et T sont les seules cellules du sang susceptibles d'être transformées en cellules actives et proliférantes. Cette transformation lymphoblastique induite *in vivo* par les antigènes peut être stimulée *in vitro* par des composés tels que les lectines. Il existe plusieurs types de lectines (Sharon et Lis, 1989), dont les plus couramment employées pour la transformation lymphoblastique sont la phytohémagglutinine (PHA), la concanavaleine A (Con A) et le pokeweed mitogène (PWM). Leurs effets mitogènes diffèrent : ainsi la PHA et la Con A activent de préférence les lymphocytes T alors que le PWM active les lymphocytes T et surtout B. De plus, ces trois lectines ne stimulent pas les mêmes sous-populations de lymphocytes T. Les lymphocytes peuvent être mis en culture soit à partir de sang total (Moorhead *et al.*, 1960), soit après séparation par sédimentation ou par centrifugation en gradient de densité (Boyum, 1968).

### **Protocole à partir de sang total**

Le sang est prélevé à une veine facilement accessible (jugulaire chez les bovins) dans un tube stérile (type vacutainer) contenant de l'héparine de sodium. Pour chaque échantillon de sang, différents milieux nutritifs sont utilisés pour augmenter la probabilité d'obtenir des lames de bonne qualité. Le sang prélevé (0,5 ml) est ensemencé dans un volume final de 8,5 ml d'un mélange composé d'un milieu de base Ham F12, TC199 ou RPMI1640 (annexe M1) auquel sont ajoutés 10 à 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) et un mitogène ConA (Serva) ou PWM (IBF) à la concentration finale de 10 µg/ml.

Les cultures sont incubées dans des tubes fermés à 37 °C pendant 3 jours en présence de Con A et 4 ou 5 jours en présence de PWM.

### **Protocole à partir de lymphocytes séparés par sédimentation**

Le sang est prélevé de la même manière que précédemment. Les tubes de sang sont laissés à température ambiante pendant 30 à 80 mn. Les globules rouges plus denses que les lymphocytes sédimentent dans la moitié inférieure du tube laissant au-dessus, une couche plasmatique enrichie en lymphocytes qui est recueillie et utilisée pour les mises en culture. Cette suspension cellulaire (0,5 ml) est ensemencée dans 8 ml de milieu de culture, dans les mêmes conditions que pour le sang total. Les cellules nucléées peuvent être comptées après coloration au bleu trypan (annexe D3) pour avoir une densité finale d'environ 0,5 à 1.10<sup>6</sup> cellules/ml.

### **Protocole à partir de lymphocytes séparés par centrifugation en gradient de densité**

La séparation des lymphocytes peut être également réalisée par centrifugation du sang sur un mélange de Ficoll (agent qui agglutine les globules rouges) et de métrizoate de sodium ou de diatrizoate de sodium (agents de densité élevée) dont les propriétés particulières de densité et de pression osmotique permettent un meilleur rendement (Boyum, 1968). De tels mélanges sont commercialisés par Pharmacia Chemicals (Ficoll-Paque) et par Nycomed (Lymphoprep).

Le sang est prélevé sur héparine de sodium (concentration finale de 5 à 10 UI/ml), puis dilué au tiers avec une solution stérile PBS<sup>-</sup> (annexe T1). Le sang dilué (15 ml à 20 ml) est déposé délicatement à la surface de 7,5 ml du mélange de séparation (Ficoll-Paque ou Lymphoprep) contenus dans un tube de centrifugation stérile. Après centrifugation à 1 500 g pendant 15 mn à 20 °C, les globules rouges sont agglutinés par le Ficoll et sédimentent au fond du tube tandis que les lymphocytes se trouvent à l'interface de la couche plasmatique et du mélange de séparation. Le surnageant est retiré pour éliminer au maximum le plasma et les plaquettes, puis les lymphocytes sont prélevés en évitant d'entraîner des globules rouges. Les lymphocytes sont lavés trois fois avec du milieu sans sérum (3 vol.) et centrifugés à 400 g pendant 5 mn. Les lymphocytes sont comptés après coloration au bleu trypan (annexe D3), puis remis en suspension dans du milieu avec sérum et inoculés à raison de 0,5 à 1.10<sup>5</sup> cellules/ml dans les mêmes conditions que pour le sang total.