

Activité chimiotactique de lait d'artiodactyle sur les lymphocytes porcins

D. FRONTEAU (1), Gwenola TANNEAU (1), Gwenaëlle HENRY (2), Claire CHEVALEYRE (1),
Joëlle LÉONIL (2), H. SALMON (1)

Institut National de la Recherche Agronomique

(1) Laboratoire de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie - 37380 Nouzilly

(2) Laboratoire de Recherches de Technologie Laitière - 65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

Activité chimiotactique de lait d'artiodactyle sur les lymphocytes porcins

Dans l'hypothèse où le lait sécrété dans la mamelle exerce une activité chimiotactique permettant le recrutement local de plasmocytes, source d'immunoglobulines dans le lait, nous avons développé un test de chimiotactisme utilisant des lymphocytes B de la lignée L14.

Nous avons déterminé les paramètres optimaux de migration face au chimioattractant bactérien le fMLP puis nous avons procédé à l'étude comparative d'un peptide dérivé de la caséine β bovine et de lactosérum provenant de lait de truie.

Les résultats montrent que les cellules L14 permettent de révéler l'activité chimiotactique du fMLP, du peptide bovin et du lactosérum porcine. De plus nous avons montré par utilisation d'un titrage en échiquier que le lactosérum était doué de chimiocinèse en plus de son activité chimiotactique. Le lactosérum porcine ainsi que le peptide bovin induisent la migration de deux fois plus de cellules que le fMLP.

Ces résultats confortent l'hypothèse de substances dans le lait responsables de la localisation des plasmocytes muqueux.

Chemotactic activity of bovine and porcine milk onto swine lymphocytes

We developed a chemotactic assay using L14 line B lymphocytes to test the theory that milk, secreted in the mammary gland, exerts chemotactic activity allowing the local recruitment of plasmocytes, which are a source of milk immunoglobulins. We determined the optimal parameters of migration towards the bacterial chemoattractant, fMLP.

We then performed a comparative study using a peptide derived from bovine β -casein and porcine lactoserum.

The results show that the L14 cells allow the chemotactic activity of fMLP, the bovine peptide and the porcine lactoserum to be observed. In addition, by using a checkerboard titration assay, we showed that lactoserum possessed chemokinetic as well as chemotactic activity. The bovine peptide and the porcine lactoserum induced the migration of twice as many cells as the fMLP.

These results support the hypothesis that milk substances are responsible for the localisation of mucosal plasmocytes.

INTRODUCTION

La protection du jeune à la mamelle est conférée par le lait maternel pour autant que la mère ait été au contact de l'agent infectieux. Cette immunité passive, lactogène (SALMON, 1995) est constituée chez les monogastriques par les IgA (75 %) alors que les polygastriques présentent en majorité des IgG1. Il a clairement été établi que ces IgA étaient le produit de l'activité de plasmocytes localisés dans la mamelle (BERTHON et SALMON, 1993). Or ces plasmocytes dérivent de lymphoblastes qui ont pour origine des lymphocytes localisés dans le tube digestif. C'est à la suite du contact avec l'antigène dans l'intestin que le lymphocyte se transforme en lymphoblaste et entreprend son périple jusqu'à la mamelle (SALMON, 1987, 1989, 1996). A l'heure actuelle, rien n'explique le mécanisme de migration transendothéliale du sang dans le parenchyme mammaire. L'hypothèse retenue est l'attraction de ces lymphoblastes par un facteur chimiotactique spécifique qui serait excrété par les cellules de l'épithélium sécréteur. Ainsi chez la souris, CZINN et LAMM en 1986, ont mis en évidence l'activité chimiotactique du lait de souris pour les lymphocytes d'origine méésentérique.

Il a été prouvé à de nombreuses reprises, que le fMLP peptidique bactérien, présentait la propriété d'attirer les monocytes (EL NAGGAR et al, 1981), les neutrophiles (BIGNOLD et al, 1990) et plus récemment les cellules de la lignée lymphoblastoïde L14 (LYSCIA, 1991). Ces cellules sont des lymphocytes B dont 50% expriment des immunoglobulines membranaires IgM ; elles ont été immortalisées et clonées à partir d'un porc miniature de la lignée histocompatible d'haplotype MHC d/d (KAEFFER et al, 1990 ; WOJCIK et al, 1993).

Dans cette communication, nous rapportons les résultats de test chimiotactique en utilisant les chambres de migration Neuroprobe et les cellules L14 comme cellules cibles vis à vis de substances dérivées de lait d'artiodactyle : il s'agit d'un peptide dérivé de la β -caséine bovine (COSTE et al, 1992) et de lactosérum d'une truie au 3ème jour de lactation.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Réactifs

1.1.1. fMLP

Le fMLP (fMét-Leu-Phe, (Sigma (F-3506, lot 48F5805)) est conservé à -20°C à la concentration de 10^{-3} M dans du Me_2SO . Il est utilisé comme témoin positif de migration ; les dilutions sont faites dans du RPMI 1640 sans sérum de veau foetal (SVF).

1.1.2. Peptide bovin

Le peptide bovin, β -CN (193-209) est un dérivé de la caséine β . Il a été purifié (BOUHALLAB et al., 1993) au Laboratoire de Recherche de Technologie Laitière de Rennes. Sa séquence en acides aminés est la suivante : Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val.

1.1.3. Lactosérum porcin

Le lactosérum provient d'un lait de truie au 3ème jour après la mise bas dont on a retiré les lipides et les caséines par centrifugation. (ABDA et SALMON, article en préparation)

1.2. Lymphocytes et lymphoblastes de lignée L14

Les cellules de la lignée L14 (KAEFFER et al., 1990) (ECACC n°91012317) sont conservées dans l'azote liquide. Après décongélation rapide, les cellules sont lavées puis ajustées à 10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine, 1 mM de pyruvate, 2 mM de glutamine et $5 \cdot 10^{-5}$ mM de β -mercaptoéthanol. Les cellules sont cultivées dans une étuve à 5% CO_2 , à 37°C pendant 24 h pour obtenir les cellules en division (en phase de croissance exponentielle) ou 72 h pour les obtenir en phase de croissance stationnaire. La viabilité jugée par le test d'exclusion au Bleu Trypan est supérieure à $97\% \pm 1$.

1.3. Évaluation de la migration

La migration des cellules L14 a été éprouvée en utilisant la chambre de migration Neuroprobe (Cabin John, MD, USA) constituée de deux plaques de 48 micropuits ; dans chaque puit inférieur, il est déposé 28 μl de la solution à tester (fMLP, peptide bovin ou lactosérum de truie) en triple exemplaires. Dans les puits supérieurs, on dépose 48 μl de suspension cellulaire. Les deux puits sont séparés par un filtre poreux de polycarbonate (dépourvu de polyvinyl-pyrrolidone) dont le diamètre des pores est de 12 μm .

La chambre est placée pendant une heure dans une étuve à 37°C , en atmosphère humide et en présence de 5 % de CO_2 . À la fin de la période d'incubation, le filtre est retiré puis débarassé des cellules de la face supérieure, fixé 1 minute dans du méthanol pur et coloré 4 minutes à l'hématoxyline.

Les cellules qui ont traversé les pores du filtre et qui sont retrouvées adhérentes à la face inférieure du filtre, sont numérotées au microscope en utilisant un objectif à huile de x40 et un oculaire de x10. Le nombre de cellules contenues dans 16 champs microscopiques par puits est compté. Les résultats sont exprimés en moyenne de 3 puits.

1.4. Le titrage en échiquier pour distinguer le chimiotactisme de la chimiocinèse

La chimiocinèse provoque chez la cellule des modifications métaboliques qui favorisent son déplacement. Le chimiotactisme implique une locomotion dirigée vers une substance chimique dans le sens d'un gradient de concentration. Pour déterminer si la substance est chimiocinétique ou chimiotactique, nous avons utilisé le titrage en échiquier (ZIGMOND et LAUFFENBURGER, 1986) où les cellules sont reprises dans différentes concentrations de l'agent supposé chimiotactique et migrent face à différentes concentrations du même agent placé seul sous le filtre. Ainsi, il est possible de créer des gradients positif, négatif, ou bien nul, simplement en jouant sur les concentrations du facteur.

Dans cet essai, la concentration de cellules L14 dans les puits supérieurs est de $4 \cdot 10^6$ cellules/ml.

2. ANALYSE STATISTIQUE

Pour chacune des concentrations cellulaires, on ajuste la courbe effet-dose à une droite de régression dont la pente est comparée à celle des autres droites de régression par un test F.

Les moyennes du nombre de cellules ayant migrées face aux différentes substances sont comparées par une analyse de variance dont la significativité est donnée par un test t.

Les graphiques et analyses statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. RÉSULTATS

3.1. Paramètres optimaux de la migration des cellules L14

3.1.1. Effet de la concentration cellulaire et du fMLP

En absence de fMLP, la migration spontanée (MS) est dépendante de la concentration cellulaire initiale. (figures 1A et B) En présence de fMLP, le nombre de lymphocytes qui migrent (Migration Induite, MI) augmente proportionnellement au logarithme de la concentration de fMLP quelques soient les trois concentrations cellulaires étudiées.

Figure 1 - Influence de la concentration cellulaire et de la concentration en fMLP sur la migration des cellules L14.

Figure 1A - Phase de croissance exponentielle

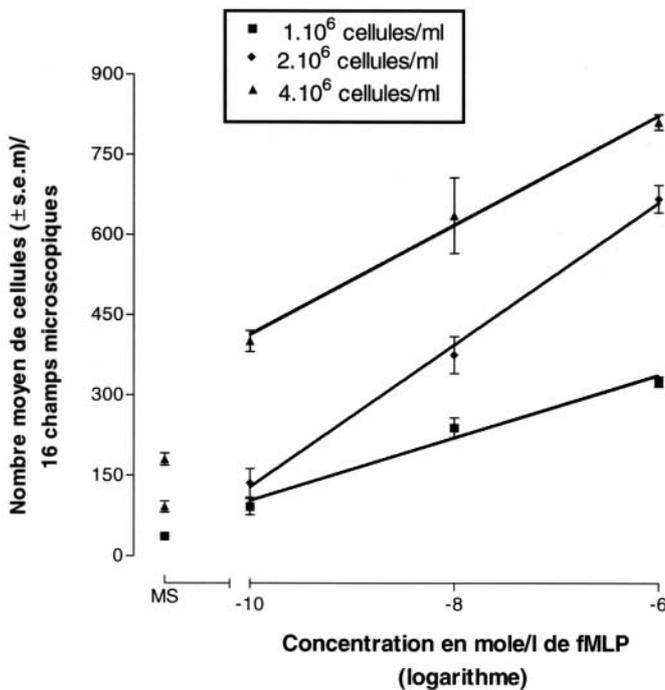
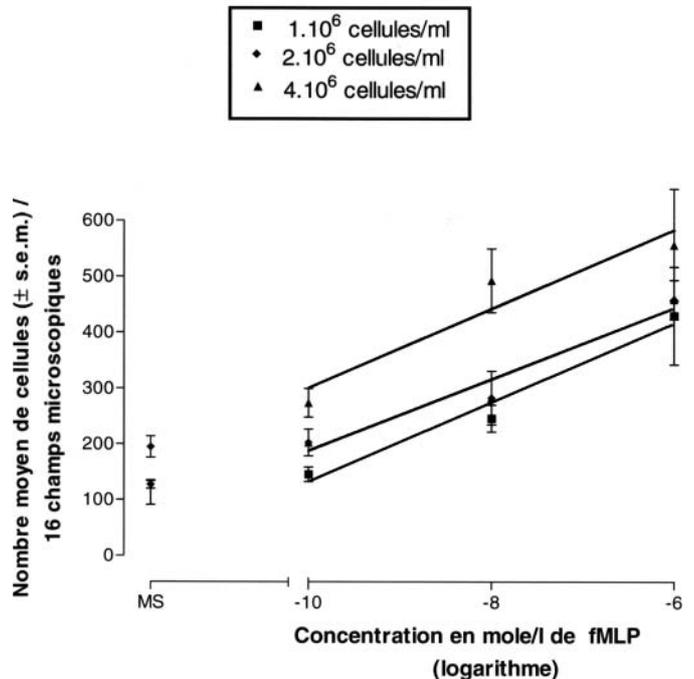


Figure 1B - Phase de croissance stationnaire



3.1.2 Influence du stade de croissance cellulaire

Il y a plus de cellules migrant spontanément parmi les L14 prélevées en phase stationnaire (figure 1B, MS) qu'en phase de croissance exponentielle (figure 1A, MS) et il en va de même pour la migration induite par le fMLP. Aucune différence significative n'est mise en évidence après comparaison des pentes de régression des deux phases de croissance cellulaire aux concentrations de 1 et $4 \cdot 10^6$ cellules/ml. Par conséquent, les deux phases sont autant sensibles à la variation de concentration en fMLP ; cependant on note une migration spécifique plus forte pour les cellules en phase de croissance exponentielle pour une même concentration (tableau 1).

En conclusion, pour obtenir une induction maximale de la migration par le fMLP, les cellules L14 doivent être utilisées en phase de croissance exponentielle à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules/ml et 10^{-6} M de fMLP, conditions qui seront utilisées par la suite.

Tableau 1 - Estimation de la migration spécifique des L14 au cours de leurs phases de croissance stationnaire ou exponentielle.

Phase de croissance cellulaire	Migration spécifique aux concentrations cellulaires par ml		
	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶
Stationnaire	317	331	362
Exponentielle	289	575	631

Les chiffres représentent la différence du nombre de cellules ayant migré en présence et en absence de fMLP à différentes concentrations cellulaires.

3.2. Activité chimiotactique du peptide bovin et du lactosérum porcin

3.2.1 Mise en évidence des activités chimiotactiques et chimiocinétiques

En présence du peptide β (193-209) bovin (tableau 2A), les cellules L14, dans un gradient positif, sont induites à migrer (548 et 219 cellules aux concentrations 10^{-4} M et 10^{-6} M de peptide bovin) comparativement à la migration spontanée du contrôle (132 cellules migrant spontanément). Malgré la présence de facteur chimioattractant, quand il n'y a pas de gradient de concentration, les cellules L14 ne migrent pas plus que le contrôle (107 et 133 comparé à 132). Dans le cas d'établissement d'un gradient de concentration négatif, la migration est inhibée par rapport au contrôle (57 comparée à 132).

En conclusion, le peptide bovin présente une activité chimiotactique sans activité chimiocinétique.

Tableau 2 - Mise en évidence des activités chimiotactiques et chimiocinétiques du peptide bovin et du lactosérum porcin sur les cellules L14.

Tableau 2A - Titrage en échiquier pour mettre en évidence les activités chimiotactiques ou chimiocinétiques du peptide bovin β (193-209).

Concentration de peptide bovin dans les puits inférieurs (mol/L)	Concentration de peptide bovin dans les puits supérieurs (mol/l)		
	0	10^{-4}	10^{-6}
0	132±33,5	*54±7,8	57±9,1
10^{-4}	*548±28,2	107±12,2	*287±22,5
10^{-6}	219±12,6	95±11,1	133±26,5

Tableau 2B - Titrage en échiquier pour mettre en évidence les activités chimiotactiques ou chimiocinétiques du lactosérum porcin

Dilution du lactosérum porcin dans les puits inférieurs	Dilutions du lactosérum porcin dans les puits supérieurs		
	0 (1)	1/10	1/100
0 (1)	122±10,7	168±45,8	*184±22,1
1/10	*319±13,6	97±6,4	76±11,1
1/100	*443±27,7	*280±38,0	75±9,1

(1) : absence de lactosérum.

Pour chaque colonne, la zone en grisé représente la migration en l'absence de gradient, avec une même concentration du facteur dans les puits supérieurs et inférieurs. Les valeurs en italique représentent celles obtenues avec un gradient de concentration négatif.

Les valeurs sont les moyennes \pm s.e.m. de 3 mesures du nombre de lymphocytes ayant migré; les moyennes sont comparées à celles obtenues en l'absence de gradient (zone en grisé) par un test t (* : $p < 0.05$).

En présence de lactosérum porcin (tableau 2B), dans un gradient positif, les cellules L14 sont induites à migrer et la dilution au 1/100 est plus chimioattractante qu'au 1/10 (443 et 319 respectivement). À la différence du peptide bovin, l'absence de gradient provoque une inhibition de la migration spontanée d'autant plus que le lactosérum est plus dilué : ainsi de 122 cellules ayant migrées spontanément, on n'en retrouve que 97 et 75 aux dilutions de 1/10 et 1/100 de lactosérum de part et d'autre du filtre. L'effet chimiocinétique est particulièrement net en présence d'un gradient de concentration négative aux dilutions de 1/10 ou 1/100 de lactosérum. Lorsque les cellules L14 sont incubées dans ce lactosérum, on constate une augmentation de migration par rapport au contrôle (168 et 184 vis à vis de 97 et 75).

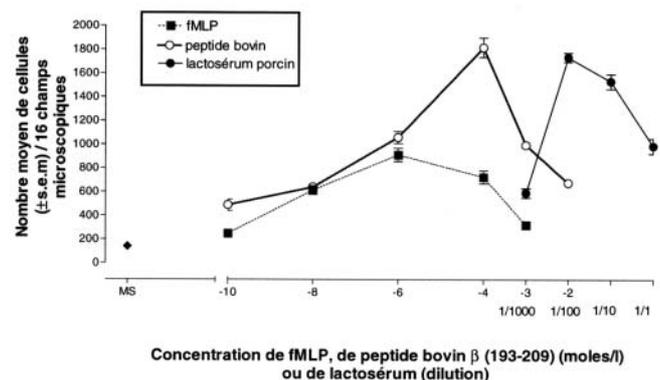
En conclusion, le lactosérum porcin présente une double activité chimiotactique et chimiocinétique pour les cellules L14.

3.2.2. Chimioattraction comparée des deux facteurs issus du lait

Le nombre de cellules L14 migrantes suit une courbe en cloche avec une concentration optimale différente pour chaque facteur étudié (figure 2).

La courbe d'activité du peptide bovin recouvre celle du peptide bactérien ; si bien qu'à la concentration de 10^{-6} M, les deux peptides exercent la même activité chimioattractante ; cependant pour le peptide bovin l'optimum est à 10^{-4} M induisant la migration de deux fois plus de cellules comparé au fMLP à 10^{-6} M. Cette même migration maximale est observée par le lactosérum porcin à la dilution 1/100.

Figure 2 - Effet comparé du fMLP, du peptide bovin β (193-209) et du lactosérum porcin sur la migration des cellules L14



En conclusion, le peptide bovin et le lactosérum porcin induisent un recrutement deux fois plus important de cellules L14 que le fMLP bactérien.

DISCUSSION

Les résultats de cette étude confirment l'intérêt des cellules de la lignée L14 pour les études de facteur chimioattractant. L'observation d'une migration plus importante, lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle, concorde avec l'idée que les cellules activées sont plus à même de migrer dans un gradient de substance chimiotactique. C'est

ainsi que EL NAGGAR et al (1980) pratiquent les tests de migration après une mise en culture des cellules pendant 24 h. Des progrès restent à accomplir pour faciliter la lecture et pouvoir l'automatiser.

Quelque soit le chimioattractant, nous observons une inhibition en excès de réactifs ; cette diminution a été déjà observée et expliquée pour le fMLP par une diminution du nombre de récepteurs suite à l'internalisation de ceux saturés par le facteur.

Récemment WONG et al (1996) ont montré qu'un peptide dérivé de la β caséine bovine (Pro-Gly-Ile-Pro-Asn) de la région 60-70, exerce entre autres activités immunologiques, une activité inhibitrice de la migration des polynucléaires ovins. Il est possible que la caséine réputée chimioattractante ne le soit que dans les espèces hétérologues.

En conclusion le peptide bovin apparaît donc, comme chimioattractant pour les cellules L14 avec un optimum correspondant à la concentration de 10^{-4} M vraisemblablement du à un récepteur différent du fMLP. L'activité à la fois chimiotactique et chimiocinétique exercée par le lactosérum porcin peut être attribuée à un mélange de substances. Des expé-

riences sont en cours pour les purifier et les résultats montrent qu'on peut filtrer le lactosérum sur des membranes de 10 kDa sans perte d'activité (ABDA et SALMON, article en préparation). Il reste néanmoins que ces cellules L14 sont des cellules B dont l'isotype prédominant est constitué par les IgM et donc elles ne peuvent répondre à la question d'une migration préférentielle des préplasmocytes à IgA par rapport à ceux à IgG ou IgM.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Hormis sa fonction alimentaire et immunitaire passive, le lait par ses propriétés chimiotactiques attribuables à des peptides pouvant ainsi traverser les épithéliums de la mamelle pour attirer les cellules immunitaires, pourrait être à même d'exercer la même fonction soit dans la muqueuse digestive du nouveau-né soit encore dans celle d'individus recevant régulièrement ces peptides par voie orale. De surcroît, certains de ces peptides sont également doués d'activités immuno-modulatrices (KAYSER et MEISEL, 1996) et la possibilité de les obtenir en quantité commerciale permet d'ores et déjà d'envisager des applications biomédicales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIGNOLD L.P., FERRANTE A., HAYNES D.R., 1990. *Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol.*, 91, 1-7.
- BERTHON P., SALMON H., 1993. In : « Biologie de la lactation » 389-414 Ed. INSERM/INRA
- BOUHALLAB S., MOLLE D., LEONIL J., 1993. *Biotechnol.Lett.*, 15, 697-702.
- COSTE M., ROCHET V., LEONIL J., MOLLE D., BOUHALLAB S., TOME D., 1992. *Immunol. Letters.*, 33, 41-46.
- CZINN S.J., LAMM M.E., 1986. *J. Immunol.*, 136, 3607-3611.
- EL NAGGAR A., VAN EPPS D.E., WILLIAMS R.C.JR., 1981. *Cell Immunol.*, 60, 43-49.
- KAEFFER B., BOTTREAU E., PHAN THANH L., OLIVIER M., SALMON H., 1990. *Int. J. Cancer.*, 46, 481-488.
- KAYSER H., MEISEL H., 1996. *Febs letters.*, 383, 18-20.
- LYSCIA E., 1991. Mise en évidence du chimiotactisme des lymphocytes. DEA.Université de Tours.
- SALMON H., 1987. *Vet. Immun. Immunopath.*, 17, 367-388.
- SALMON H., 1989. *Pig News Inf.*, 10, 151-157
- SALMON H., 1995. *Vet. Res.*, 26, 232-237.
- SALMON H., 1996. Régulation de synthèse et fonction des IgAs. Atelier de formation INSERM 85
- WOJCIK J., BRITTON P., POCOOCK D., KAEFFER B., SALMON H., 1993 *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, 38, 49-58.
- WONG C.W., SEOW H. F., LIU A.H., HUSBAND A. J., SMITHERS G.W., WATSON D.L., 1996. *Immunol. Cell biology.*, 74, 323-329.
- ZIGMOND S.H., LAUFFENBURGER D.A., 1986. *Annu. Rev. Med.*, 37, 149-155.