



HAL
open science

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-immunoglobulines humaines

Christine Weil-Miko

► **To cite this version:**

Christine Weil-Miko. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-immunoglobulines humaines. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1991. Français. NNT : 1991NAN10446 . tel-01747163

HAL Id: tel-01747163

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747163>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE NANCY I

FACULTE DE MEDECINE



THESE PREPAREE A L'INSERM UNITE 284
POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
EN GENIE BIOLOGIQUE

PAR
CHRISTINE WEIL-MIKO

PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS
MONOCLONAUX ANTI-IMMUNOGLOBULINES
HUMAINES

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 19 DECEMBRE 1991
DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

| | |
|-------------|----------------------------------|
| Président | J.F. STOLTZ |
| Rapporteurs | G. POTRON F. BELLEVILLE-NABET |
| Examineurs | C. RIVAT V. REGNAULT |

A Monsieur le Professeur J.F. STOLTZ,

Directeur de l'Unité INSERM U 284, Instrumentation avancée et réactifs

qui m'a accueillie dans cette unité et qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Qu'il soit assuré de mon respect et de ma gratitude.

A Monsieur le Docteur C. RIVAT,

qui a dirigé ce travail et a toujours su me conseiller judicieusement durant ces années de recherche et de rédaction.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur F. BELLEVILLE-NABET

qui m'a reçue si longuement et a eu la bienveillance de lire et corriger cette thèse avec minutie.

Qu'elle soit convaincue de ma sincère reconnaissance pour ses conseils précieux.

A Monsieur le Professeur G. POTRON,

qui m'a si aimablement conseillée, et dont les remarques m'ont permis d'améliorer le contenu de cette thèse.

Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude.

A Madame le Docteur V. REGNAULT,

qui a toujours su m'aider par sa rigueur scientifique et ses conseils encourageants.

Qu'elle soit profondément remerciée d'avoir accepté de participer à ce jury.

A Monsieur le Docteur B. GUERIN

qui a bien voulu m'accueillir en stage aux Laboratoires des Staller-gènes et qui a permis l'obtention d'un soutien financier pour ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mes sentiments respectueux.

A Madame M. PFISTER,

qui m'a formée et éclairée tout au long de ce travail.

Qu'elle soit remerciée sincèrement.

A Madame A. MORIOT,

Un grand merci pour sa sympathie et son aide dans les moments difficiles.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes de l'Unité pour leur gentillesse et leurs encouragements.

Merci, enfin à F. DE PAOLA, collègue durant ces quatre années, pour son association à ce travail.

Elle restera toujours présente dans notre cœur.

A ma mère,

A mon oncle

qui m'ont aidée tout au long de mes études.

Qu'ils trouvent ici la récompense de leur soutien.

A mon mari,

qui m'a encouragée par son amour et sa confiance.

A Natacha et Chloé

A mes amis



SOMMAIRE

| | <u>PAGES</u> |
|--|--------------|
| <i>INTRODUCTION</i> | 1 |
| <i>1. HYBRIDOMES ET ANTICORPS MONOCLONAUX</i> | 1 |
| 1.1. <i>Definition et historique</i> | 1 |
| 1.2. <i>Interêt et utilisation</i> | 2 |
| 1.3. <i>Anticorps monoclonaux anti-classes d'IgG</i> | 8 |
| 1.3.1. <i>- Immaturité du système immunitaire</i> | 9 |
| 1.3.2. <i>- Immunodeficiences</i> | 9 |
| 1.3.3. <i>- Variation du taux d'IgG4</i> | 10 |
| 1.3.4. <i>- Variation du taux d'IgA</i> | 11 |
| 1.3.5. <i>- Réponses biologiques face aux polyoses</i> | 11 |
| 1.3.6. <i>- Auto-anticorps</i> | 12 |
| 1.3.7. <i>- Suivi thérapeutique</i> | 13 |
| | - |
| <i>2. IMMUNOGLOBULINES HUMAINES</i> | 14 |
| 2.1. <i>Modèle structural des immunoglobulines</i> | 14 |
| 2.2. <i>Structure des IgG</i> | 22 |
| 2.3. <i>Structure des IgM</i> | 27 |
| 2.4. <i>Structure des IgA</i> | 27 |
| 2.5. <i>Structure des IgD</i> | 29 |
| 2.6. <i>Structure des IgE</i> | 30 |
| 2.7. <i>Synthèse, production et diversité des immunoglobulines</i> | 30 |
| 2.7.1. <i>- Synthèse</i> | 30 |
| 2.7.2. <i>- Diversité</i> | 31 |
| 2.7.3. <i>- Production</i> | 32 |

| | <u>PAGES</u> | |
|------|--|----|
| 4.2. | <i>Dot immunoblot</i> | 56 |
| | 4.2.1. - <i>Réactifs</i> | 56 |
| | 4.2.2. - <i>Protocole du test</i> | 56 |
| | 4.2.2.1. - <i>Revêtement du support</i> | 56 |
| | 4.2.2.2. - <i>Saturation des sites aspecifics</i> | 58 |
| | 4.2.2.3. - <i>Incubation de la solution d'anticorps</i> | 58 |
| | 4.2.2.4. - <i>Dépôt de l'anticorps conjugué à l'enzyme</i> | 58 |
| | 4.2.2.5. - <i>Reaction enzymatique</i> | 58 |
| | 4.2.3. - <i>Mise au point du test</i> | 58 |
| 5. | <i>SELECTION DES CLONES DESIRES</i> | 59 |
| 6. | <i>CULTURE - EXTENSION - CONSERVATION</i> | 61 |
| | 6.1. <i>Methode in vitro</i> | 61 |
| | 6.2. <i>Méthode in vivo</i> | 61 |
| | 6.3. <i>Conservation des clones</i> | 62 |
| 7. | <i>CARACTERISATION DES HYBRIDOMES APRES CLONAGE</i> | 63 |
| | 7.1. <i>Principe</i> | 63 |
| | 7.2. <i>Protocole</i> | 64 |
| | 7.2.1. - <i>Réactifs</i> | 64 |
| | 7.2.2. - <i>Déroulement de la manipulation</i> | 64 |
| 8. | <i>PURIFICATION DES ANTICORPS</i> | 65 |
| | 8.1. <i>Purification des IgG sur protéine A-Sepharose 4B</i> | 65 |
| | 8.1.1. - <i>Principe</i> | 65 |
| | 8.1.2. - <i>Methode</i> | 65 |
| | 8.1.2.1. - <i>Protéine A-Sepharose 4B</i> | 65 |
| | 8.1.2.2. - <i>Tampons utilisés</i> | 66 |
| | 8.1.2.3. - <i>Protocole</i> | 66 |

| | | |
|------|---|----|
| 8.2. | <i>Purification des IgM sur Concanavalline A-Ultragei</i> | 67 |
| | 8.2.1. - <i>Principe</i> | 67 |
| | 8.2.2. - <i>Methode</i> | 68 |
| | 8.2.2.1. - <i>Concanavalline A-Ultragei</i> | 68 |
| | 8.2.2.2. - <i>Tampons utilises</i> | 68 |
| | 8.2.2.3. - <i>Protocole</i> | 69 |
| 8.3. | <i>Contrôle de la purification</i> | 70 |
| | 8.3.1. - <i>Electrophorèse</i> | 70 |
| | 8.3.2. - <i>Protocole</i> | 70 |
| | 8.3.2.1. - <i>Reactifs</i> | 70 |
| | 8.3.2.2. - <i>Solutions de developpement et de coloration</i> | 70 |
| | 8.3.2.3. - <i>Methode</i> | 71 |
| 9. | <i>VERIFICATION DE LA PURETE DES PROTEINES DE LA "PROTEINOTHEQUE"</i> | 72 |
| 9.1. | <i>Principe</i> | 72 |
| 9.2. | <i>Reactifs</i> | 72 |
| 9.3. | <i>Protocole</i> | 73 |

| | <u>PAGES</u> |
|--|--------------|
| <i>RESULTATS</i> | 74 |
| 1. <i>MISE AU POINT DU TEST ELISA</i> | 74 |
| 1.1. <i>Determination de la quantite de revêtement necessaire</i> | 74 |
| 1.2. <i>Contrôle de la specificité du test</i> | 74 |
| 1.3. <i>Contrôle de la sensibilité du test</i> | 76 |
| 2. <i>MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DES "DOT BINDING IMMUNO-ASSAYS"</i> | 77 |
| 2.1. <i>Optimisation</i> | 77 |
| 2.2. <i>Contrôle de la specificité du test</i> | 78 |
| 3. <i>CONTROLE DU TITRE EN ANTICORPS DES SOURIS IMMUNISEES</i> | 79 |
| 4. <i>RECAPITULATIF DES DIFFERENTES FUSIONS ET DENOMINATION DES CLONES OBIENUS</i> | 83 |
| 5. <i>CARACTERISTIQUES DES CLONES ANTI-IgG</i> | 86 |
| 6. <i>CARACTERISTIQUES DU CLONE 8 G1 G5A 1H3, DENOMME A10</i> | 94 |
| 7. <i>CARACTERISTIQUES DU CLONE 3D7 E9 H7 B4, DENOMME M8</i> | 94 |
| 8. <i>CARACTERISTIQUES DES CLONES ANTI-IgG4 : G4 III et G.IX</i> | 97 |
| 9. <i>CARACTERISTIQUES DES CLONES ANTI-IgD</i> | 100 |
| 10. <i>CONTROLE DE LA STABILITE DES CLONES</i> | 103 |
| 11. <i>PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES DE SOURIS OBTENUES</i> | 105 |
| <i>DISCUSSION</i> | 111 |
| <i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> | 136 |

F I G U R E S

PAGES

FIGURE 1

Anticorps anti-idiotype

6

FIGURE 2

Modele de la molecule d'immunoglobuline

15

FIGURE 3

Variabilite des amino-acides des domaines variables des chaines
lourdes et legeres des immunoglobulines humaines

17

FIGURE 4

Organisation en domaines de chaines d'immunoglobulines

18

FIGURE 5

Allotypes des immunoglobulines humaines d'après MALE D. et al. (1988)

23

FIGURE 6

Localisation probable de quelques allotypes et allo-isotypes humaines
d'après WILLIAMSON A.R. et al. (1987)

24

FIGURE 7

Modeles proposes pour les conformations en solution des sous-classes
d'IgG par GREGORY L. et al. (1986)

26

FIGURE 8

Structure des IgA

28

FIGURE 9

Developpement de la réponse anticorps d'après MALE M. et al. (1988)

32

| | <u>PAGES</u> |
|--|--------------|
| <i>FIGURE 10</i> <i>Voies metaboliques intervenant dans la synthese des acides nucleiques</i> | 41 |
| <i>FIGURE 11</i> <i>Schematisation de la technique ELISA</i> | 49 |
| <i>FIGURE 12</i> <i>Schema chronologique du clonage</i> | 60 |
| <i>FIGURE 13</i> <i>Contrôle de la specificite du test ELISA</i> | 75 |
| <i>FIGURE 14</i> <i>Contrôle de la sensibilite du test ELISA grace à l'anti-IgG3 27A</i> | 76 |
| <i>FIGURE 15</i> <i>Reponse immune d'une souris prise au hasard dans un lot Balb/C</i> | 80 |
| <i>FIGURE 16</i> <i>Reponse immune de 3 souris d'un lot Bioczi</i> | 81 |
| <i>FIGURE 17</i> <i>Comparaison de la reponse immune interspecificque</i> | 82 |
| <i>FIGURE 18</i> <i>Dilution du surnageant de culture du clone G 125</i> | 93 |
| <i>FIGURE 19</i> <i>Courbe de dilution du clone Dc15</i> | 102 |
| <i>FIGURE 20</i> <i>Stabilite au cours du temps : exemple du clone Dc15</i> | 104 |
| <i>FIGURE 21</i> <i>Froil d'elution de l'anticorps murin A10 d'isotype IgG1 par chromatographie d'affinite sur proteine A-Sepharose</i> | 107 |

PAGES*FIGURE 22*

Profil d'elution de l'anticorps murin DC13 d'isotype IgM par chromatographie d'affinite sur Concanavaine A Ultrogel

108

FIGURE 23

Mecanismes de la commutation de classe

114

T A B L E A U X

PAGES

| | |
|---|----------|
| <i>TABLEAU I</i> | |
| <i>Comparaison de la sequence d'acides amines de la region charniere et des domaines constants des IgG humaines, d'apres BURTON D.R. et al. (1986).</i> | 19-20-21 |
| <i>TABLEAU II</i> | |
| <i>Caracteristiques des IgG humaines</i> | 34 |
| <i>TABLEAU III</i> | |
| <i>Proprietes biologiques des IgG, derivant des recepteurs de Fc existant a la surface de differents types cellulaires</i> | 35 |
| <i>TABLEAU IV</i> | |
| <i>Recapitulation des immunisations effectuees</i> | 37 |
| <i>TABLEAU V</i> | |
| <i>Protocoles d'immunisation</i> | 38 |
| <i>TABLEAU VI</i> | |
| <i>KPMI 1640 - Composition du milieu de base</i> | 44 |
| <i>TABLEAU VII</i> | |
| <i>Preparation du milieu de culture et des milieux de selection</i> | 45 |
| <i>TABLEAU VIII</i> | |
| <i>Caracteristiques des immunoglobulines employees</i> | 51-52 |
| <i>TABLEAU IX</i> | |
| <i>Solutions utilisees pour la mise en oeuvre du test ELISA</i> | 53 |
| <i>TABLEAU X</i> | |
| <i>Reactifs utilisees pour la mise en oeuvre du Dot-Immunoblot</i> | 57 |

| | |
|--|----|
| <i>TABLEAU XI</i> | |
| <i>Elution séquentielle par paliers de pII utilisée pour la séparation des IgG de souris sur colonne de protéine A</i> | 67 |
| <i>TABLEAU XII</i> | |
| <i>Optimisation des conditions de mise en oeuvre de la technique des "Dot Binding Immuno-Assays"</i> | 77 |
| <i>TABLEAU XIII</i> | |
| <i>Contrôle de la spécificité du test des "Dot Binding Immuno-Assay"</i> | 78 |
| <i>TABLEAU XIV</i> | |
| <i>Recapitulatif des fusions effectuées avec les différents rendements obtenus à chaque étape</i> | 85 |
| <i>TABLEAU XV</i> | |
| <i>Caractéristiques du surnageant des clones G 7.1, G 7.2 et G 4.10</i> | 87 |
| <i>TABLEAU XVI</i> | |
| <i>Détermination du titre en anticorps des surnageants de culture des fusions G et G bis vis à vis des immunoglobulines non fragmentées</i> | 89 |
| <i>TABLEAU XVII</i> | |
| <i>Caractérisation du titre en anticorps des surnageants des clones des fusions G et G bis vis à vis de fragments d'immunoglobulines et de chaînes légères</i> | 90 |
| <i>TABLEAU XVIII</i> | |
| <i>Caractéristiques des clones des fusions G et G bis</i> | 92 |
| <i>TABLEAU XIX</i> | |
| <i>Caractéristiques des réponses obtenues avec les surnageants de culture des clones de la fusion A1, et particulièrement avec le clone A10</i> | 95 |

TABLEAU XX

Caracteristiques des reponses obtenues avec les surnageants de culture des clones de la fusion M1, et particulièrement avec le clone M8

96

TABLEAU XXI

Amelioration du titre en anticorps du surnageant de culture du clone M8 au cours des clonages successifs

97

TABLEAU XXII

Réactivite du clone G4 III

98

TABLEAU XXIII

Caracteristiques des reponses obtenues avec le clone anti-IgG4

99

TABLEAU XXIV

Determination du titre en anticorps des surnageants de culture des clones issus de la fusion D

101

TABLEAU XXV

Methode de purification retenue apres determination de l'isotype de l'anticorps murin par la technique d'Ouchterlony

106

TABLEAU XXVI

Quantites d'anticorps obtenus par purification par chromatographie

109

TABLEAU XXVII

Concentration sérique d'IgG de souris âgées de 12 semaines (d'apres BOS A.N. et al., (1989))

115

TABLEAU XXVIII

Optimisation proposée de la methode de travail

135



ABREVIATIONS

| | |
|---------------|---|
| AC | Anticorps |
| ACM | Anticorps Monoclonal |
| AG | Antigène |
| AMP,ADP,ATP | Adénosine 5' - mono-, di-, et tri-phosphate |
| BJK | Bence Jone Kapa |
| BSA | Albumine Sérique bovine |
| CMP, CDP,CTP | Cytidine 5' - mono-, di-, et tri-phosphate |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxyde |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay |
| GMP, GDP, GTP | Guanosine 5' - mono-, di-, et tri-phosphate |
| H | Chaîne lourde des immunoglobulines |
| HAT | Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine |
| HT | Hypoxanthine, Thimidine |
| Ig | Immunoglobuline |
| IMP, IDP, ITP | Inosine 5' - mono-, di-, et tri-phosphate |
| L | Chaîne légère lambda (λ) ou Kappa (κ) des immunoglobulines |
| OPD | Ortho Phénylène Diamine |
| FBS | Phosphate Buffered Saline |
| PEG | Poly Ethylène Glycol |
| Poly G | Anticorps de spécificité anti-immunoglobulines G |
| Poly G + A | Anticorps de spécificité anti-immunoglobulines G et A |
| RAST | Radio-Allergo Sorbent Test |
| SDS PAGE | Electrophorèse en gel de poly Acrylamide sodium Dodécylsulfate |
| SVF | Serum de veau foetal |
| TBS | Tris buffered saline |
| T.M.B. | 3, 3', 5, 5', Tétraméthyl Benzidine |
| IRIS | 2-Amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol |
| UMP, UDP, UTP | Uridine 5' - mono-, di- et tri-phosphate |



INTRODUCTION

1. - HYBRIDOMES ET ANTICORPS MONOCLONAUX

1.1. - Définition et historique

Fabriqués il y a une quinzaine d'années par KOHLER et MILSTEIN (1975), les anticorps monoclonaux et la technique de leur production ont valu à leurs auteurs le prix Nobel en 1984.

Injectée dans l'organisme, une substance étrangère, l'antigène, va stimuler la cytodifférenciation et la multiplication cellulaire de cellules spécialisées de l'organisme, les lymphocytes B. Chaque site de reconnaissance de l'antigène, appelé épitope, va stimuler un lymphocyte B qui donnera naissance à une colonie (clone) de cellules filles, toutes identiques et produisant des anticorps dirigés contre cet épitope. L'antigène étant porteur de multiples épitopes, la réponse de l'organisme à cette intrusion sera polyclonale, des milliers de lymphocytes B ayant été produits.

L'astuce de KOHLER et MILSTEIN a été d'immortaliser les cellules sécrétrices afin de pouvoir plus aisément détecter et isoler un clone cellulaire correspondant spécifiquement à un épitope.

La fusion cellulaire entre un lymphocyte B de myelome possédant la capacité de se reproduire indéfiniment, et un lymphocyte B spécifique d'un antigène, produit une cellule hybride, l'hybridome, sécrétant un type unique d'anticorps, l'anticorps monoclonal. A cause de la diversité des lymphocytes B produits par la rate de l'animal immunisé, on se trouve devant une population d'hybridomes sécrétant chacun un anticorps particulier, mais donnant globalement une réponse polyclonale.

Toutes les lignées cellulaires, réparties dans les puits de culture, sont alors testées afin de ne retenir que celles secretant l'anticorps recherché. Celles-ci vont pouvoir être produites indéfiniment.

1.2. - Intérêt et utilisation

La méthode de préparation des anticorps monoclonaux est aujourd'hui appliquée pour la production d'immunoreactifs tant à l'échelle du laboratoire de recherche fondamentale qu'à celle de l'industrie. Le champ d'application des anticorps monoclonaux ne cesse de s'agrandir. Leur qualité primordiale est leur spécificité jamais égalee par les reactifs classiques ni par les anticorps polyclonaux. Spécifiques, ils sont également de qualité constante, reproductibles indéfiniment et permettant donc une standardisation des résultats. Leurs performances sont puissantes. Leur spécificité extrême permet la purification de nombreuses molécules puisqu'il existe une relation étroite entre l'épitope contre lequel est dirigé l'ACM et l'ACM.

Le site de liaison spécifique d'un anticorps est estimé à 3 amino-acides, ce qui correspond au niveau du gène, à 9 nucléotides. Un anticorps monoclonal peut repérer la variation d'un amino-acide au niveau d'une protéine ce qui lui confère également une supériorité sur les sondes à ADN, qui, elles, ont une longueur variant de 10 à 500 nucléotides (Shoemaker H. et al., 1985). Néanmoins, les anticorps monoclonaux reconnaissant des structures secondaires et tertiaires, peuvent perdre leur capacité à se lier par un changement même minime dans ces structures. Les sondes à ADN reconnaissent une structure linéaire qui peut correspondre alors à diverses structures dans la protéine codée.

De véritables banques de données regroupent les informations sur les anticorps monoclonaux actuellement produits. Utilisés pour le diagnostic et le cytodagnostic, la thérapie de certains cancers, l'imagerie nucléaire, la recherche fondamentale, les anticorps monoclonaux sont des outils de choix. Les paragraphes suivants tendront à dresser une liste non exhaustive de leurs utilisations possibles.

Les tests de diagnostic se développent tant en médecine humaine que vétérinaire. Dans le secteur agro-alimentaire, des études sont en cours pour le contrôle de la qualité des chaînes de production par des biocapteurs. Ceux-ci sont constitués d'électrodes couplées à des anticorps monoclonaux, qui, dès leur liaison avec un antigène spécifique de germes, déclenchent un signal électrique.

L'immunofluorescence directe permet de distinguer les auto-anticorps dirigés contre l'épiderme ou la membrane basale (pemphigus et pemphigoïde bulleuse), les dépôts d'IgA dans les papilles dermiques (dermatite herpétiforme) et les dépôts granuleux d'IgG et de complément dans le lupus érythémateux disséminé ou cutané (CHAPÉL H. et al., 1985).

JIN-GHEE TEH et son équipe (1988) ont produit des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de carcinome colorectal, à partir de l'immunisation de souris avec du sérum de malades. Des examens de biopsies de peau, à l'aide d'anticorps monoclonaux, peuvent permettre de caractériser des maladies de l'épiderme et du derme.

Les antigènes spécifiques de tumeur circulant dans le sérum peuvent être détectés, tels que, par exemple, le Lewis^x sialosyle (FUJIWARA K. et al., 1988) par un ACM d'isotype IgM marqué à la β -galactosidase.

L'existence de ces antigènes associés aux tumeurs permet le développement de méthodes histochimiques permettant le diagnostic de tumeur. Les immuno-dosages utilisant les anticorps monoclonaux aident au diagnostic du cancer. Ils sont également utiles dans le suivi thérapeutique de la maladie et de ses rechutes éventuelles.

L'identification de désordres prolifératifs tels que la macroglobulinémie de Waldenström et les lymphomes a été faite par tests ELISA.

Les anticorps monoclonaux ont ouvert la voie à de nouveaux moyens thérapeutiques.

L'utilisation d'anticorps murins pose néanmoins un problème par leur immunogénicité et leur demi-vie brève chez l'homme. Elle est donc réduite à deux ou trois injections seulement (OSTBERG L., 1987). Une alternative passerait par la production d'hybrides homme-(souris-homme).

Des rejets de greffe dus à l'activation du système immunitaire qui rejette le non-soi, en l'occurrence l'organe transplanté, peuvent être prévenus par l'élimination ou la réduction de cellules T immuno-compétentes à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8, et une immuno-suppression par de la cyclosporine A avec ou sans méthotrexate peut contribuer à la réussite de la greffe.

Les anticorps monoclonaux peuvent également servir à débarrasser la moelle osseuse des cellules malignes, grâce aux antigènes spécifiques de surface, dans le cas de transplantations autologues. L'immunologie des tumeurs a ouvert de nouveaux axes de recherche en immunothérapie.

La cytotoxicité à médiation cellulaire, dépendant de la fixation sur l'anticorps des cellules tumorales d'une part, et de cellules effectrices d'autre part, permet d'espérer des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes associés à des tumeurs, une alternative à la chimiothérapie traditionnelle.

L'objectif de traitement des tumeurs par cette nouvelle voie ne peut être atteint avec un seul anticorps monoclonal. L'hétérogénéité de composition des tumeurs et l'existence de variétés de tumeurs, imposent de disposer d'un panel d'anticorps reconnaissant des épitopes différents. Anticorps à but diagnostique ou à but thérapeutique s'interpénètrent donc (WALKER L.C. et al., 1987). Une technique élégante permettant de fabriquer des sortes d'armes ciblées à visée thérapeutique voit le jour.

Les anticorps monoclonaux, spécifiques d'antigènes tumoraux, sont couplés à une toxine, telle l' α -amanitine ou la ricine et détruisent spécifiquement les cellules cibles. Malheureusement, des problèmes existent encore, ces composés étant souvent instables, ou produisant des réactions croisées, en particulier avec des cellules hématopoïétiques.

Une seconde approche, est l'administration d'anticorps anti-idiotypes, qui permettrait une participation active du système immunitaire du patient à la destruction des métastases et des tissus tumoraux.

Des anticorps préparés contre des antigènes spécifiques de tumeurs auront un site antigénique, l'idiotype, complémentaire à l'antigène qui a stimulé leur fabrication. Injectés à leur tour à un animal en présence d'adjuvant immunitaire, ils induisent la fabrication d'anticorps anti-idiotypes (voir fig. n° 1). Ceux-ci sont une sorte d'image de l'antigène de départ, ils se lient aux cellules tumorales et stimulent *in vivo* la production d'anticorps dirigés contre la tumeur (COURTENAY-LUCK N.S. et al., 1988). Pour éviter les réactions croisées dues à des antigènes étrangers, la production peut se faire par immortalisation par le virus d'Epstein Barr, de lymphocytes B de malades présentant déjà une réponse anti-idiotype.

Ce type de vaccination anti-idiotype peut également s'appliquer à des antigènes viraux (hépatite B, polyovirus) parasitaires (trypanosomiase africaine) (DODET B., 1984). Il peut également servir de thérapeutique locale contre le virus HIV-1. Celui-ci s'adsorbe spécifiquement sur l'antigène CD4 des cellules T, et les infecte alors. Des anticorps anti-idiotypes préparés contre des anticorps anti-CD4 se sont montrés capables de neutraliser le virus *in vitro* (MASUHOY., 1988).

Par leur spécificité très fine, les anticorps monoclonaux sont un outil de choix dans la recherche fondamentale et appliquée. Ils permettent en effet d'identifier des variants antigéniques de molécules, de détecter des marqueurs cellulaires, avec les implications possibles dans le typage des tumeurs, d'étudier des récepteurs protéiques. L'identification de marqueurs phénotypiques, particuliers à certaines cellules, permet la classification des lymphocytes et des phagocytes.

Ils sont également performants pour l'immunopurification de molécules diverses. En bloquant des récepteurs cellulaires, ils permettent d'étudier des mécanismes biologiques variés. L'étude des constantes d'affinité permettrait une évaluation de la relation structure-affinité et des modifications conformationnelles qu'implique une fixation de l'antigène sur l'anticorps (SCHOTS A. et al., 1988).

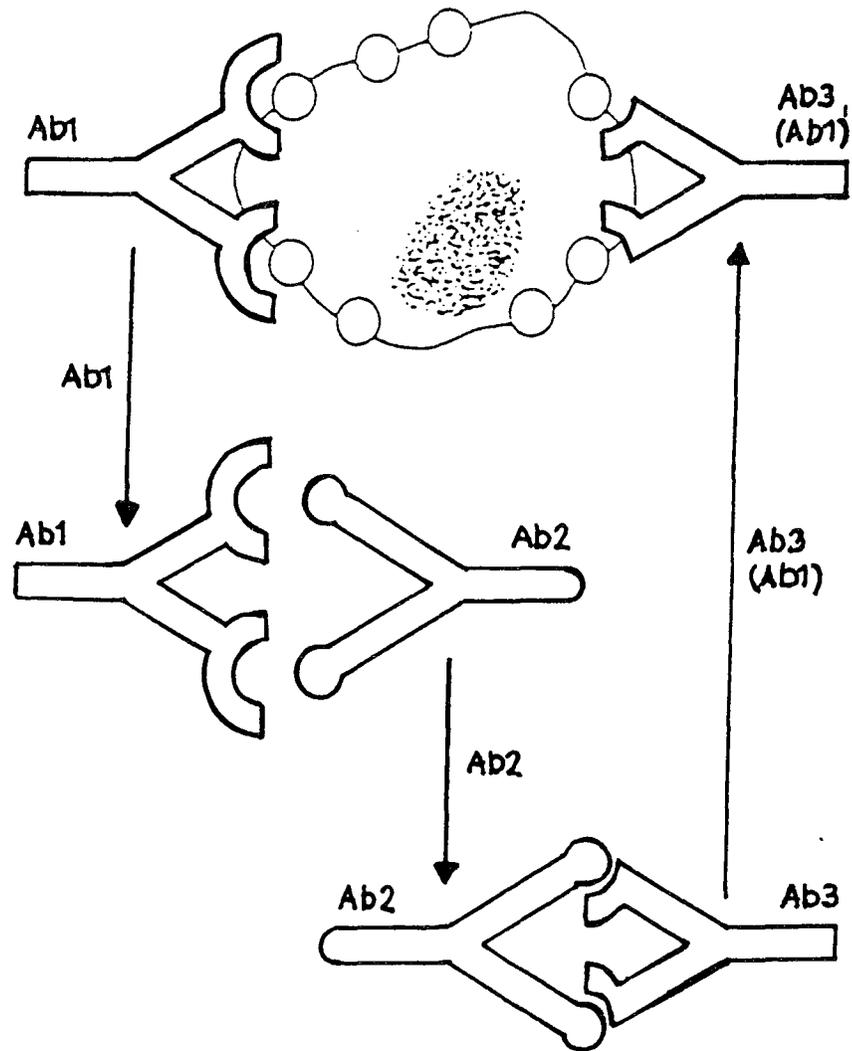


FIG. 1 Anticorps anti-idiotypique

L'immunisation contre un anticorps antitumoral (Ab1) entraîne la formation d'anticorps dont certains (Ab2) reconnaissent l'idiotypie de l'Ab1. Une partie de ces anticorps anti-idiotypique - sorte d'image interne - entraîne la production, chez un second animal, d'anticorps (Ab3) qui ont la même spécificité que l'Ab1 (Ab1').

La sensibilité des réactions antigène-anticorps est telle qu'elle permet une application dans les immuno-dosages de laboratoire. Néanmoins, les ACM ont des limites imposées par des problèmes de spécificité dus à l'épitope reconnu : les épitopes existent sous trois formes, linéaire, conformationnelle ou cryptique (determinant neoantigenique). Ce dernier type d'épitope cache ne présente qu'un moindre intérêt, puisque l'ACM ne pourra l'atteindre.

1.3. - Anticorps monoclonaux anti-classes d'Ig. But du travail

Compte tenu de l'utilisation potentielle des anticorps anti-immunoglobulines humaines, on nous a chargé d'obtenir, par la technique de fusion cellulaire, ces réactifs spécifiques et de qualité constante. La demande est, à notre connaissance, très importante. Des anticorps monoclonaux murins anti-isotype d'immunoglobulines humaines sont donc produits et purifiés au cours de ce travail. Ils pourront être fournis à des laboratoires de recherche ou d'analyses, et utilisés par des techniques immuno-enzymatiques (ELISA ou blotting) afin de permettre, par exemple, l'exploration du système immunitaire de l'individu sain ou malade.

Allergologues, bactériologistes, virologistes sont intéressés par l'analyse des sous-classes. Celles-ci possédant également des propriétés biologiques différentes, leur analyse qualitative et quantitative se révèle importante. Divers exemples de ces utilisations potentielles sont décrits dans les paragraphes suivants.

Les immunodosages appliqués au diagnostic sérologique sont actuellement en majeure partie basés sur les anticorps monoclonaux. Les diagnostics de laboratoire emploient largement les troussees commerciales comprenant ces réactifs hautement spécifiques et permettant surtout une standardisation des résultats.

Parmi les différents serodiagnostic, la quantification des quatre sous-classes d'IgG apporte beaucoup de renseignements. En effet, ayant des propriétés biologiques différentes, leur taux peut moduler la réponse immunitaire de l'organisme (Persson M.A.A. et al., 1987).

Les IgG1 et IgG3 par exemple, activent le complément de manière plus efficace que les IgG2, tandis que les IgG4 ne l'activent pas du tout et peuvent même avoir une fonction d'anticorps bloquant ainsi que nous le verrons plus loin.

1.3.1. - Immaturité du système immunitaire

Les mécanismes de défense de l'enfant ne sont pas entièrement développés à la naissance. Les IgA et les IgM n'apparaissent que progressivement dans la salive, les anticorps capables de neutraliser des attaques virales sont les IgG, en particulier les IgG1 héritées, de la mère. Le dosage des isotypes des anticorps de bébé peut se faire par ELISA et permet l'analyse de l'efficacité d'une vaccination précoce (WATT P.J. et al., 1986 - SMITH D.J. et al., 1988).

1.3.2. - Immunodéficiences

Certaines infections virales peuvent dérégler la réponse immune en la supprimant ou en infectant les cellules du système immunitaire. C'est le cas notamment d'une infection primaire par le cytomegalo virus ou par le rétrovirus HIV-1 causant le S.I.D.A. (syndrome immunodéficience acquise). La détection sérologique du S.I.D.A. passe par la mise en évidence d'anticorps spécifiques au virus (seropositivité). Chez certains individus, de longues périodes asymptomatiques existent, pendant lesquelles l'étude des isotypes des IgG spécifiques du virus peut s'avérer utile pour comprendre les mécanismes de cytotoxicité cellulaire. Une augmentation du titre en IgG1 et IgG3, accompagnée d'une baisse du titre en IgG2 et IgG4 a été décrite (LJUNGGREN K. et al., 1988).

La détection d'immunodéficiences peut également être utile afin d'identifier et de traiter les patients à risques (HANSON L.A. et al., 1986).

En effet, la cause d'infections récurrentes est souvent une déficience en sous-classes IgG et la détermination de sous-classes d'IgG peut amener des renseignements sur la cause des infections. Celles-ci sont rarement limitées à une seule sous-classe. Sur la base d'études statistiques, on peut dire qu'une déficience en IgG1 reflète une baisse du taux global d'IgG.

Il existe des agammaglobulinémies et des hypoglobulinémies héréditaires liées à une mutation sur le chromosome X, ce qui conduit à une cytodifférenciation anormale des lymphocytes. Des affections pulmonaires sont courantes chez ces sujets malgré les traitements substitutifs d'immunoglobulines (THORSTEINSSON L. et al., 1990)

1.3.3. - Variation du taux d'IgG4

Les déficiences isolées en IgG4 sont certainement les plus courantes et s'observent chez des patients atteints d'infections respiratoires. Lorsque celles-ci sont récurrentes, un taux d'IgG4 inférieur à 0,3 g/l, peut traduire une déficience sévère (HEINER D.C., 1986).

Les déficiences en IgG4 peuvent être familiales, elles se transmettent de manière récessive et autosomique, ou résulter d'un défaut de régulation ou simplement d'une infection passagère. La détection est donc importante, elle utilise naturellement les anticorps monoclonaux.

Outre les déficiences en IgG4, on peut observer des valeurs supérieures à la normale par des tests ELISA simples ou sandwich, des radio-immuno-dosages. Ces anticorps étant présents en quantité très faible dans le sérum normal, ils ne peuvent être détectés par des tests mesurant la quantité totale en IgG et nécessitent des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de sous-classes. Cette faible réponse peut être corrélée à la position du gène Cx4, située le plus en 3' par rapport aux gènes des autres sous-classes gamma, et suivi seulement des gènes Cc et Cx2 (OGAWA T. et al., 1988). La sous-classe des anticorps dirigés contre les facteurs de coagulation (notamment le facteur VIII), trouvés chez les hémophiles est prépondérément celle des IgG4. Ils sont souvent impliqués dans les phénomènes allergiques en réponse au venin d'abeille (URBANEK R., 1988), au pollen, à la poussière de maison (MERRETT J., 1984), aux parasites tels ceux provoquant la filariose (MAGNUSSON C.G.M. et al., 1986). Ils ont été suspectés dans la pathogénèse de la maladie des éleveurs de pigeons (SEE KITT et al., 1986). POULSEN L.K. (1988) et son équipe ont néanmoins démontré qu'ils ne jouaient pas un rôle dans la libération de l'histamine par les basophiles, qui serait, elle, largement dirigée par les IgE.

En effet, une augmentation du taux des IgG4 est souvent liée à une augmentation du taux d'IgE (OGAWA T. et al., 1988). Du fait de leur incapacité à fixer le complément, une variation du taux d'IgG en faveur des IgG4, modifie les réponses biologiques de l'organisme. Les IgG4 ont souvent été décrits comme des "anticorps bloquants" susceptibles d'entrer en compétition avec les IgE dans les réactions anaphylactiques (JARING S. et al., 1986).

Cet aspect sera évoqué dans le paragraphe traitant du suivi thérapeutique. En tout état de cause, un taux élevé en IgG4 est observé après des expositions répétées à un allergène.

Le dosage des IgG4 est utile pour le suivi des allergènes alimentaires, l'intolérance au lait par exemple, et de leurs manifestations cutanées telles que les eczémas atopiques (SHAKIB F. et al., 1986).

1.3.4. - Variation du taux d'IgA

La déficience en IgA est la plus commune des immunodéficiences primaires (CHAPEL H., KATKA K., 1988).

Elle peut exister à tous les âges et s'associe à des infections récurrentes, des allergies et des maladies auto-immunes. Son diagnostic peut être utile, par exemple pour éliminer les risques éventuels dus à une vaccination orale par le poliovirus. SAVILAHTI E.(1988) et son équipe ont utilisé le test ELISA, pour montrer que cette déficience s'accompagnait d'une excrétion du virus beaucoup plus tardive, ce qui accroissait les risques potentiels de la vaccination.

1.3.5. - Réponses biologiques face aux polyoses

Les polyoses sont un constituant important des parois bactériennes (Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenza). Ils sont également présents à la surface de Schistosoma mansoni. Des études épidémiologiques utilisant des tests ELISA et l'immunofluorescence sont utiles afin de détecter la distribution en sous-classe de la réponse immunitaire et examiner l'efficacité de vaccination. Les réponses sont essentiellement des IgG1, IgG2, IgA1 et IgA2 (CRYZ S.J. et al., (1988) - FRAISSE P. et al., (1988) - HEILMANN C. et al., (1988) - KIENLE E. et al., (1989) - LUE C. et al., (1988) - SHACKELFORD P.G. et al., (1987) - WAGNER D.K. et al. (1987) - WINDEBANK K.F. et al. (1987)).

Les IgG2 et les IgM ont été décrits comme protecteurs en cas de réinfection après traitement (BUTTERWORTH A. et al., 1988).

1.3.6. - Auto-anticorps

La caractérisation des isotypes des auto-anticorps peut mener à la distinction entre auto-anticorps protecteurs naturels et auto-anticorps pathogéniques acquis, notamment dans le lupus érythémateux systémique (SUENAGA R. et al., 1988). La variation isotypique des anticorps anti-toxine tétanique traduit la maturation immunitaire. Une commutation de classe en faveur des IgG4 peut même être observée en cas de stimulation antigénique chronique (RUBIN R.L. et al., 1986).

Les auto-anticorps humains sont en général de classe IgM contrairement à ceux de l'espèce murine de classe IgG (SANZ I. et al., 1988). Ces anticorps, dans le cas des facteurs rhumatoïdes sont dirigés contre les portions Fc des IgG, et leur affinité a pu être démontrée (MERLINI G. et al., 1986). Dans le cas d'arthrite rhumatoïde, des tests ELISA ont détecté la présence de facteurs rhumatoïdes de sous-classe IgG4, ce qui peut avoir des implications dans les mécanismes de pathogénicité (COHEN P.L. et al., 1987). La détermination du type de classe IgM ou IgG par tests ELISA notamment, peut être utile à la compréhension du mécanisme conduisant à la production de l'une ou l'autre immunoglobuline (LEVINSON A.I. et al., 1988). L'importance pathologique de la classe des auto-anticorps, IgA ou IgG dans la maladie de Grave, ou la thyroïdite de Hashimoto est également étudiée à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces isotypes (VEETWAN A.P. et al., 1987). Les phénomènes auto-immuns associés à la malaria chez l'homme sont étudiés de la même manière (ZOUALI M. et al., 1986).

1.3.7. - Suivi thérapeutique

Puisque les manifestations pathologiques de maladies diverses se traduisent par des variations du taux d'immunoglobulines, celui-ci peut également devenir le témoin d'un retour à la normale ou de la persistance d'un état pathologique. Le suivi thérapeutique en est ainsi facilité.

Les candidoses orales sont des dermatoses très fréquentes. L'analyse des sous-classes d'IgA présentes dans la salive indique une prédominance d'IgA1 spécifiques à *Candida albicans*. Après une thérapie antifongique, le taux d'IgA2 reste inchangé mais devient prépondérant grâce à une baisse des IgA1.

Les résultats obtenus par ELISA témoignent du succès de la thérapie (JEGANATHAM S. et al.).

L'inflammation paradontale se traduit également par une élévation du taux d'anticorps due à une stimulation bactérienne (THOMAS J.P., 1981). L'effet d'un traitement (immunothérapie, polissage, détartrage), peut être suivi grâce à l'évolution des IgG, A et M, par un ELISA qui permet d'établir la physiopathologie de la maladie et de comprendre ses mécanismes immunitaires.

La détection des IgM dirigés contre *Treponema pallidum* est d'un intérêt diagnostique considérable. La persistance de ces anticorps indique la présence d'antigènes de treponème et nécessite la poursuite du traitement. Les valeurs sont établies par un ELISA modifié, après immunoprécipitation des IgG (MULLER F. et al., 1987).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux murins anti-sous-classes d'IgG permet de suivre l'évolution de la syphilis à travers ses trois stades et de suivre l'éventuelle apparition d'auto-anticorps (BAUGHN R.E. et al., 1988).

Certaines vaccinations pouvant présenter des risques éventuels, un serodiagnostic permet d'établir l'état immunitaire de l'individu. La mesure du taux en IgM et en sous-classes d'IgG est très sensible et spécifique grâce aux anticorps monoclonaux (LINDE G.A. et al., 1987).

L'allergie, qui est une manifestation pathologique de la réponse immune, se traduit sérologiquement par une augmentation d'anticorps spécifiques, aisément dosés par ELISA. Les IgE spécifiques sont habituellement dosés par radio-immuno-essais.

La capacité d'anticorps bloquants d'inhiber la réaction allergique est attribuée aux IgG4 et quelquefois aux IgA (MERMAN H., 1985). Leur rôle pourrait être de créer une compétition entre IgE et IgG pour l'allergène, tant au niveau sérique, sécrétoire et cellulaire, et de diminuer ainsi la réaction anaphylactique. La mesure de cette activité bloquante a été faite par ELISA avec un anticorps monoclonal (HA BAIK LEE et al., 1988). L'efficacité d'une immunothérapie peut s'évaluer par l'apparition de ces IgG4.

Une technique ELISA inversée de type sandwich a été décrite (MIYAZAWA H. et al., 1988). Elle possède l'avantage d'être moins coûteuse que le R.A.S.T. (Radio-Allergo-Sorbent-Test) proposé par BOUSQUET J. et al., (1988). Le suivi d'une désensibilisation par un allergène montre une augmentation du taux d'IgG4 spécifiques (HAMILTON R.G., 1988), ceci étant en accord avec les hypothèses postulant une augmentation de cette sous-classe lors des expositions prolongées à un allergène et des infections récurrentes.

2 - IMMUNOGLOBULINES HUMAINES

Le système immunitaire spécifique constitue une barrière de défense contre les agressions par des germes pathogènes, après une reconnaissance spécifique de l'antigène. Celle-ci s'effectue par l'intermédiaire de 3 groupes de molécules, les récepteurs d'antigènes des cellules T et des cellules B, et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

Les anticorps existent sous forme fixée à la membrane cellulaire et sous forme circulante, ce qui a permis de les purifier et de déterminer leur structure par analyse biochimique et cristallographique.

Les anticorps ou immunoglobulines, sont des glycoprotéines synthétisées par les lymphocytes B et leur descendance plasmocytaire. Si ces molécules ont des caractéristiques communes qui permettent de les individualiser, elles présentent, par contre, une variabilité remarquable qui les distingue des autres protéines plasmatiques.

2.1. - MODELE STRUCTURAL DES IMMUNOGLOBULINES

On distingue cinq classes d'immunoglobulines (Ig) : les IgG, IgM, IgA, IgD et IgE, dont la structure de base est identique (fig. 2).

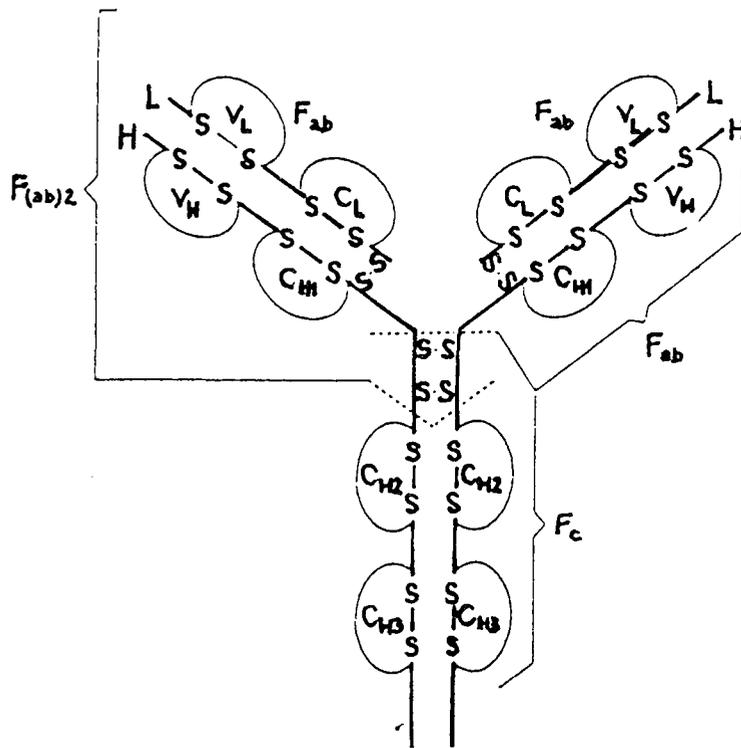


FIG 2 **Modèle de la molécule d'immunoglobuline**

F_{ab} = fragment liant l'antigène; tous les acides aminés des régions variables ne sont pas impliqués dans la liaison de l'antigène, mais seulement ceux appartenant aux régions "hypervariables"

$F_{(ab)c}$ = produit de clivage comprenant les deux fragments F_{ab}

F_c = fragment cristallisable; il est formé par les domaines constants des chaînes lourdes autres que CH_1 . Cette région comprend les sites de fixation pour les récepteurs F_c de plusieurs types de cellules (macrophages, leucocytes polymorphonucléaires, basophiles)

H = chaîne lourde

L = chaîne légère

C = région constante

V = région variable

(d'après LUCKENBACH G.A., 1987)

A cette structure, peuvent s'ajouter diverses modifications (associations de plusieurs monomères de base, de chaînes glycosidiques, de ponts disulfure), caractéristiques des différentes sous-classes ou isotypes. On distingue 4 sous-classes d'IgG : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 et 2 sous-classes d'IgA : IgA1 et IgA2. L'anticorps est formé par l'association de deux chaînes lourdes (H), de masse moléculaire avoisinant les 50 000 daltons sauf pour les IgM et IgE où elle est proche de 70 000 daltons, et de deux chaînes légères (L), de 25 000 daltons environ. Elles sont reliées entre elles par des ponts disulfure.

La chaîne L existe sous deux types Kappa (K) et lambda (λ), ne coexistant pas simultanément sur un même anticorps, à cause d'un système génétique d'exclusion allélique. Dans l'espèce humaine, on trouve 60% des Ig avec des chaînes K. La chaîne H existe sous neuf formes différentes : γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , α 1, α 2, δ et ϵ , déterminant l'isotype de l'anticorps ainsi que de nombreuses fonctions biologiques. A ces chaînes H, sont branchées de 2 à 14% de résidus glycosidiques.

Les structures secondaires et tertiaires sontournées par le repliement des chaînes polypeptidiques et leur organisation en domaines de 110 amino-acides comportant beaucoup d'homologies de séquences. Les chaînes L ont une partie C terminale constante (CL), la structure variable (VL) est différente d'une chaîne à l'autre.

A l'intérieur des domaines variables VL et VH, il existe trois segments hypervariables appelés CDR1, CDR2, CDR3, déterminant la complémentarité à l'antigène. Par analyse de diffraction RX, on a pu déterminer que ces trois CDR étaient exposés à la surface de la molécule. Ces régions montrent évidemment une très grande variabilité entre Ig (fig. 3)

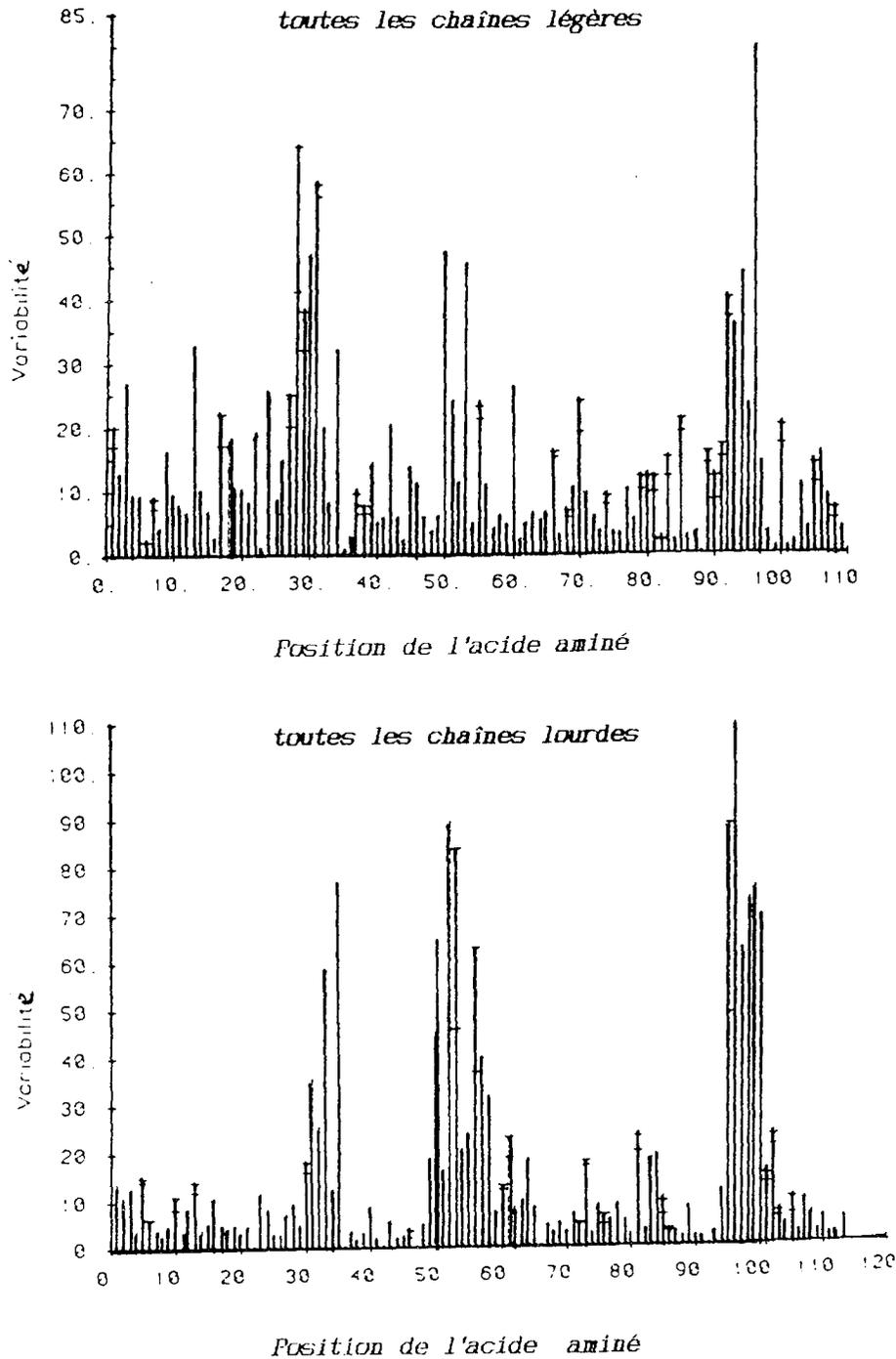


FIG. 3 Variabilité des amino-acides des domaines variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines humaines

Pour une position donnée, on définit par variabilité, le rapport du nombre d'acides aminés différents trouvés à cette position par la fréquence de l'acide aminé le plus commun. Les acides aminés sont étudiés par marquage d'affinité. Au dessus d'un certain bruit de fond de variabilité qui existe tout au long des chaînes, trois pics se distinguent nettement, séparés par quatre régions de faible variabilité : ce sont les trois CDR (d'après KABAT E.A., 1971)

Les chaînes H sont constituées de 4 à 5 domaines, un domaine variable (VH) à la partie N terminale, et 3 à 4 domaines constants (fig. 4)

Chaîne légère L

λ ou κ

$L = V_L + \text{domaine } C_L$

Chaîne lourde H

$\gamma = V_H + C_H1 + \text{charnière} + C_H2 + C_H3$ (IgG)

$\mu = V_H + C_H1 + \text{charnière} + C_H2 + C_H3 + C_H4 + \text{polypeptide terminal}$ (IgM)

$\alpha = V_H + C_H1 + \text{charnière} + C_H2 + C_H3 + \text{polypeptide terminal}$ (IgA)

$\delta = V_H + C_H1 + \text{charnière} + C_H2 + C_H3 + \text{polypeptide terminal}$ (IgD)

$\epsilon = V_H + C_H1 + \text{charnière} + C_H2 + C_H3 + C_H4$ (IgE)

FIG. 4 Organisation en domaines des chaînes d'immunoglobulines.

Les Ig membranaires ont des séquences C terminales hydrophobes permettant l'ancrage à la membrane plasmique (d'après BURTON D.R., 1986).

La région charnière représente une zone de flexibilité entre les domaines C_H1 et C_H2 , où les chaînes H sont reliées par au moins deux points disulfure. Cette région est celle qui présente le plus de différences entre IgG différentes (Tab. 1)

Les Ig présentent une grande diversité qui est due à trois types de variabilité, isotypique, allotypique et idiotypique.

TABLEAU I

COMPARAISON DE LA SEQUENCE D'ACIDES AMINES DE LA REGION CHARNIERE ET DES DOMAINES CONSTANTS DES IgG HUMAINES.

La séquence du domaine CY1 des chaînes lourdes des IgG3 n'a pas été déterminée. d'après BURTON D.R. et al. (1986)

| Domaine CY1 | | | | Charnière | | | | Domaine CY2 | | | | Domaine CY3 | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|---|
| Y1 | Y2 | Y4 | | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | |
| 118 | Ala | : | : | 216 | Glu | Glu | Glu | Glu | 231 | Ala | : | : | 341 | Gly | : | : |
| 119 | Ser | : | : | 217 | Pro | Arg | Leu | Ser | 231 | Pro | : | : | 342 | Gln | : | : |
| 120 | Thr | : | : | 218 | Lys | Lys | Lys | Lys | 233 | Glu | Pro | : | 343 | Pro | : | : |
| 121 | Lys | : | : | 219 | Ser | - | Thr | Tyr | 234 | Leu | Val | : | Phe | 344 | Arg | : |
| 122 | Gly | : | : | 220 | Cys | - | Pro | Gly | 235 | Leu | Ala | : | : | 345 | Glu | : |
| 123 | Pro | : | : | 221 | Asp | Cys | Leu | - | 236 | Gly | - | : | : | 346 | Pro | : |
| 124 | Ser | : | : | | - | Cys | Gly | - | 237 | Gly | : | : | : | 347 | Gln | : |
| 125 | Val | : | : | | - | - | Asp | - | 238 | Pro | : | : | : | 348 | Val | : |
| 126 | Phe | : | : | 222 | Lys | Val | Thr | - | 239 | Ser | : | : | : | 349 | Tyr | : |
| 127 | Pro | : | : | 223 | Thr | - | Thr | - | 240 | Val | : | : | : | 350 | Thr | : |
| 128 | Leu | : | : | 224 | His | Glu | His | Pro | 241 | Phe | : | : | : | 351 | Leu | : |
| 129 | Ala | : | : | 225 | Thr | - | Thr | Pro | 242 | Leu | : | : | : | 352 | Pro | : |
| 130 | Pro | : | : | 226 | Cys | Cys | Cys | Cys | 243 | Phe | : | : | : | 353 | Pro | : |
| 131 | Ser | Cys | Cys | 227 | Pro | Pro | Pro | Pro | 244 | Pro | : | : | : | 354 | Ser | : |
| 132 | Ser | : | : | 228 | Pro | Pro | Arg | Ser | 245 | Pro | : | : | : | 355 | Arg | : |
| 133 | Lys | Arg | Arg | 229 | Cys | Cys | Cys | Cys | 246 | Lys | : | : | : | 356 | Glu | : |
| 134 | Ser | : | : | 230 | Pro | Pro | Pro | Pro | 247 | Pro | : | : | : | 357 | Glu | : |
| 135 | Thr | : | : | | | | Glu | | 248 | Lys | : | : | : | 358 | Met | : |
| 136 | Ser | : | : | | | | Pro | | 249 | Asp | : | : | : | 359 | Thr | : |
| 137 | Gly | Glu | Glu | | | | Lys | | 250 | Thr | : | : | : | 360 | Lys | : |
| 138 | Gly | Ser | Ser | | | | Ser | | 251 | Leu | : | : | : | 361 | Asn | : |
| 139 | Thr | : | : | | | | Cys | | 252 | Met | : | : | : | 362 | Gln | : |
| 140 | Ala | : | : | | | | Asp | | 253 | Ile | : | : | : | 363 | Val | : |
| 141 | Ala | : | : | | | | Thr | | 254 | Ser | : | : | : | 364 | Ser | : |
| 143 | Leu | : | : | | | | Pro | | 255 | Arg | : | : | : | 365 | Leu | : |
| 143 | Gly | : | : | | | | Pro | | 256 | Thr | : | : | : | 366 | Thr | : |
| 144 | Cys | : | : | | | | Pro | | 257 | Pro | : | : | : | 367 | Cys | : |
| 145 | Leu | : | : | | | | Cys | | 258 | Glu | : | : | : | 368 | Leu | : |
| 146 | Val | : | : | | | | Pro | | 259 | Val | : | : | : | 369 | Val | : |

Suite Tableau 1

| Domaine CX1 | | | | Charnière | | | | Domaine CX2 | | | | Domaine CX3 | | | |
|-------------|-----|----|----|-----------|----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|
| X1 | X2 | X3 | X4 | X1 | X2 | X3 | X4 | X1 | X2 | X3 | X4 | X1 | X2 | X3 | X4 |
| 147 | Lys | : | : | | | Arg | 260 | Thr | : | : | : | 370 | Lys | : | : |
| 148 | Asp | : | : | | | Cys | 261 | Cys | : | : | : | 371 | Gly | : | : |
| 149 | Tyr | : | : | | | Pro | 262 | Val | : | : | : | 372 | Phe | : | : |
| 150 | Phe | : | : | | | Glu | 263 | Val | : | : | : | 373 | Tyr | : | : |
| 151 | Pro | : | : | | | Pro | 264 | Val | : | : | : | 374 | Pro | : | : |
| 152 | Glu | : | : | | | Lys | 265 | Asp | : | : | : | 375 | Ser | : | : |
| 153 | Pro | : | : | | | Ser | 266 | Val | : | : | : | 376 | Asp | : | : |
| 154 | Val | : | : | | | Cys | 267 | Ser | : | : | : | 377 | Ile | : | : |
| 155 | Thr | : | : | | | Asp | 268 | His | : | : | Gln | 378 | Ala | : | : |
| 156 | Val | : | : | | | Thr | 269 | Glu | : | : | : | 379 | Val | : | : |
| 157 | Ser | : | : | | | Pro | 270 | Asp | : | : | : | 380 | Glu | : | : |
| 158 | Trp | : | : | | | Pro | 271 | Pro | : | : | : | 381 | Trp | : | : |
| 159 | Asn | : | : | | | Pro | 272 | Gln | Glu | Glx | Glu | 382 | Glu | : | : |
| 160 | Ser | : | : | | | Cys | 273 | Val | : | : | : | 383 | Ser | : | : |
| 161 | Gly | : | : | | | Pro | 274 | Lys | Gln | Gln | Gln | 384 | Asn | : | : |
| 162 | Ala | : | : | | | Arg | 275 | Phe | : | : | : | 385 | Asp | Gly | Gly |
| 163 | Leu | : | : | | | Cys | 276 | Asn | : | Lys | : | 386 | Gly | Gln | Gln |
| 164 | Thr | : | : | | | Pro | 277 | Trp | : | : | : | 387 | Glu | Pro | Pro |
| 165 | Ser | : | : | | | Glu | 278 | Tyr | : | : | : | 388 | Pro | Glu | Glu |
| 166 | Gly | : | : | | | Pro | 279 | Val | : | : | : | 389 | Glu | Asn | Asn |
| 167 | Val | : | : | | | Lys | 280 | Asp | : | : | : | 390 | Asn | : | : |
| 168 | His | : | : | | | Ser | 281 | Gly | : | : | : | 391 | Tyr | : | : |
| 169 | Thr | : | : | | | Cys | 282 | Val | : | : | : | 392 | Lys | : | Asn |
| 170 | Phe | : | : | | | Asp | 283 | Gln | Glu | Glu | Glu | 393 | Thr | : | : |
| 171 | Pro | : | : | | | Thr | 284 | Val | : | : | : | 394 | Thr | : | : |
| 172 | Ala | : | : | | | Pro | 285 | His | : | : | : | 395 | Pro | : | : |
| 173 | Val | : | : | | | Pro | 286 | Asn | : | : | : | 396 | Pro | : | : |
| 174 | Leu | : | : | | | Pro | 287 | Ala | : | : | : | 397 | Val | Met | Met |
| 175 | Gln | : | : | | | Cys | 288 | Lys | : | : | : | 398 | Leu | : | : |
| 176 | Ser | : | : | | | Pro | 289 | Thr | : | : | : | 399 | Asp | : | : |
| 177 | Ser | : | : | | | Arg | 290 | Lys | : | : | : | 400 | Ser | : | : |
| 178 | Gly | : | : | | | Cys | 291 | Pro | : | : | : | 401 | Asp | : | : |
| 179 | Leu | : | : | | | Pro | 292 | Arg | : | : | : | 402 | Gly | : | : |
| 180 | Tyr | : | : | | | | 293 | Glu | : | : | : | 403 | Ser | : | : |

Suite Tableau 1

| Domaine C11 | | | | Charnière | | | | Domaine C12 | | | | Domaine C13 | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----------|----|----|----|-------------|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|
| X1 | X2 | X4 | | X1 | X2 | X3 | X4 | X1 | X2 | X3 | X4 | X1 | X2 | X3 | X4 |
| 182 | Leu | : | : | | | | | 296 | Gln | : | : | 405 | Phe | : | : |
| 183 | Ser | : | : | | | | | 296 | Tyr | Phe | : | 406 | Leu | : | : |
| 184 | Ser | : | : | | | | | 297 | Asn | : | : | 407 | Tyr | : | : |
| 185 | Val | : | : | | | | | 298 | Ser | : | : | 408 | Ser | : | : |
| 186 | Val | : | : | | | | | 299 | Thr | : | : | 409 | Lys | : | Arg |
| 187 | Thr | : | : | | | | | 300 | Tyr | Phe | Phe | 410 | Leu | : | : |
| 188 | Val | : | : | | | | | 301 | Arg | : | : | 411 | Ihr | : | : |
| 189 | Pro | : | : | | | | | 302 | Val | : | : | 412 | Val | : | : |
| 190 | Ser | : | : | | | | | 303 | Val | : | : | 413 | Asp | : | : |
| 191 | Ser | : | : | | | | | 304 | Ser | : | : | 414 | Lys | : | : |
| 192 | Ser | Asn | : | | | | | 305 | Val | : | : | 415 | Ser | : | : |
| 193 | Leu | Phe | : | | | | | 306 | Leu | : | : | 416 | Arg | : | : |
| 194 | Gly | : | : | | | | | 307 | Thr | : | : | 417 | Trp | : | : |
| 195 | Thr | : | : | | | | | 308 | Val | : | : | 418 | Gln | : | : |
| 196 | Gln | : | Lys | | | | | 309 | Leu | Val | : | 419 | Gln | : | Glu |
| 197 | Thr | : | : | | | | | 310 | His | : | : | 420 | Gly | : | : |
| 198 | Tyr | : | : | | | | | 311 | Gln | : | : | 421 | Asn | : | : |
| 199 | Ile | Thr | Thr | | | | | 312 | Asn | Asp | Asp | 422 | Val | Ile | : |
| 200 | Cys | : | : | | | | | 313 | Trp | : | : | 423 | Phe | : | : |
| 201 | Asn | : | : | | | | | 314 | Leu | : | : | 424 | Ser | : | : |
| 202 | Val | : | : | | | | | 315 | Asp | Asn | Asn | 425 | Cys | : | : |
| 203 | Asn | Asp | Asp | | | | | 316 | Gly | : | : | 426 | Ser | : | : |
| 204 | His | : | : | | | | | 317 | Lys | : | : | 427 | Val | : | : |
| 205 | Lys | : | : | | | | | 318 | Glu | : | : | 428 | Met | : | : |
| 206 | Pro | : | : | | | | | 319 | Tyr | : | : | 429 | His | : | : |
| 207 | Ser | : | : | | | | | 320 | Lys | : | : | 430 | Glu | : | : |
| 208 | Asn | : | : | | | | | 321 | Cys | : | : | 431 | Ala | : | : |
| 209 | Thr | : | : | | | | | 322 | Lys | : | : | 432 | Leu | : | : |
| 210 | Lys | : | : | | | | | 323 | Val | : | : | 433 | His | : | : |
| 211 | Val | : | : | | | | | 324 | Ser | : | : | 434 | Asn | : | : |
| 212 | Asp | : | : | | | | | 325 | Asn | : | : | 435 | His | Arg | : |
| 213 | Lys | : | : | | | | | 326 | Lys | : | : | 436 | Tyr | : | : |
| 214 | Arg | Thr | : | | | | | 327 | Ala | Gly | Gly | 437 | Thr | : | : |
| 215 | Val | : | : | | | | | 328 | Leu | : | : | 438 | Gln | : | : |
| | | | | | | | | 329 | Pro | : | : | 439 | Lys | : | : |
| | | | | | | | | 330 | Ala | : | Ser | 440 | Ser | : | : |
| | | | | | | | | 331 | Pro | : | Ser | 441 | Leu | : | : |
| | | | | | | | | 332 | Ile | : | : | 442 | Ser | : | : |
| | | | | | | | | 333 | Glu | : | : | 443 | Leu | : | : |
| | | | | | | | | 334 | Lys | : | : | 444 | Ser | : | : |
| | | | | | | | | 335 | Thr | : | : | 445 | Pro | : | Leu |
| | | | | | | | | 336 | Ile | : | : | 446 | Gly | : | : |
| | | | | | | | | 337 | Ser | : | : | 447 | - | Lys | Lys |
| | | | | | | | | 338 | Lys | : | : | | | | |
| | | | | | | | | 339 | Ala | Thr | : | | | | |
| | | | | | | | | 340 | Lys | : | : | | | | |

→ **La variabilité isotypique**, portée par la chaîne H, définit 5 classes et 6 sous-classes d'Ig, retrouvées chez tous les individus. Elle se situe sur les domaines constants (variantes isotypiques des régions C) et variables (sous groupes de variabilité). Chaque individu d'une même espèce possède les gènes nécessaires à l'expression de chaque variant isotypique (LEDER J., 1983).

Pour ce qui est des chaînes légères L, un seul variant isotypique est connu pour la chaîne kappa, mais il existe plusieurs marqueurs antigéniques pour la chaîne lambda, dont le facteur Kern en position 154 (permutation glycine-sérine).

→ **La variabilité allotypique**, portée par certains individus seulement, d'une même espèce. Les allotypes sont des polymorphismes génétiques suivant un déterminisme mendélien et sont détectables sérologiquement. Quatre systèmes allotypiques sont connus dans l'espèce humaine : Gm, Km, Am et HV.

Les spécificités Gm sont portées par les régions constantes des chaînes lourdes gamma. Les spécificités Km existent sous trois formes alléliques, Km^{1,2}, Km¹ et Km², associées aux chaînes kappa (fig. 5 et fig. 6).

→ **La variabilité idiotypique** caractérise un anticorps issu d'un clone spécifique d'un antigène. Les idiotypes sont portés par les régions hypervariables des chaînes H et L. Les exons codant pour les domaines V des chaînes lourdes sont produits par recombinaison de segments de gènes V, D et J. Le grand nombre de combinaisons pouvant se produire au cours de cette association explique la variabilité idiotypique et les capacités de reconnaissance d'antigènes très variable. La variabilité idiotypique est donc spécifique de chaque anticorps et peut induire la production d'anticorps anti-idiotype.

2.2. - STRUCTURE DES IgG

Les IgG humaines sont constituées d'un ensemble de molécules de type H₂ L₂, les chaînes L sont reliées aux chaînes H par des ponts disulfure situés entre C₁ et C₁-1.

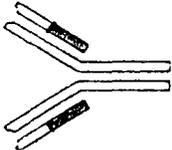
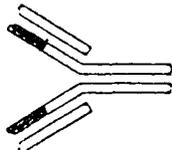
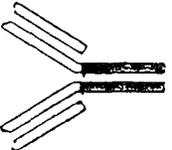
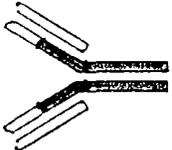
| Systeme allotypique | Situation | Commentaires |
|---------------------|---|--|
| Km (= Inv) |  <p>Chaines K</p> | <p>Exprimés sur les IgG1 et les IgG3; comprend 3 variantes. Nécessite l'intégrité de la structure quaternaire de l'IgG</p> |
| Hv |  <p>Domaines V des chaînes lourdes</p> | <p>Deux variants</p> |
| Am |  <p>Portion Fcα</p> | <p>Deux variants des IgA2</p> |
| Gm |  <p>Portion Fc et domaine CH₁</p> | <p>Au moins 24 variantes 4 pour les IgG1 1 pour les IgG2 13 pour les IgG3 7 non rattachés à une classe</p> |

FIG. 5 Allotypes des immunoglobulines humaines
Liste des systèmes principaux d'allotypes des immunoglobulines
humaines et leur localisation génétique.

D'après MALE O, et al, (1988)

| Allotype ou iso-allotype | Chaîne | Domaine | Séquence | Amino-acide |
|-----------------------------|------------|---------|-----------|-----------------|
| G1m(1) ou G1m(a) | x1 | Cx3 | 355-358 | Arg-Asp-Glu-Leu |
| nG1m(1) ou nG1m(a) | x1, x2, x3 | Cx3 | 355-358 | Arg-Glu-Glu-Met |
| G1m(2) ou G1m(x) | x1 | Cx3 | 431 | Gly |
| G1m(3) ou G1m(t) | x1 | Cx1 | 214 | Arg |
| G1m(17) ou G1m(z) | x1 | Cx1 | 214 | Lys |
| G3m(21) ou G3m(g) | x3 | Cx2 | 296 | Tyr |
| nG3m(21) ou nG3m(g) | x2, x3 | Cx2 | 296 | Phe |
| G3m(11) ou G3m(b'') | x3 | Cx3 | 436 | Phe |
| nG3m(11) ou nG3m(b'') | x1, x2, x3 | Cx3 | 436 | Tyr |
| n64m(a) | x1, x2, x3 | Cx2 | 309 | Val-Leu-His |
| n64m(b) | x2, x4 | Cx2 | 309 | Val-His |
| A2m(1) | x2 | Cx1 | 212...221 | Pro...Pro |
| A2m(2) | x2 | Cx1 | 212...221 | Ser...Arg |
| Km1 | K | Cx | 153...191 | Val...Leu |
| Km1,2 | K | Cx | 153...191 | Ala...Leu |
| Km3 | K | Cx | 153...191 | Ala...Val |

FIG. 6 Localisation probable de quelques allotypes et allo-isotypes humains
D'après WILLIAMSON A.R. et al. (1987)

Entre les deux chaînes H, il y a deux ponts disulfure (IgG1 et IgG4, quatre IgG2 ou quinze IgG3). La distinction entre sous-classes d'IgG est due à la séquence des acides aminés des domaines constants des chaînes lourdes. Malgré tout, elles présentent 90 à 95% d'homologie structurale. La principale différence existant entre sous-classes est liée à la composition de la région charnière. Cette dernière, riche en proline et cystéine, détermine la flexibilité de la molécule et sa susceptibilité à la protéolyse. La flexibilité est importante, en ce qu'elle permet une reconnaissance divalente de déterminants antigéniques par le positionnement des bras Fab relativement au fragment Fc. La flexibilité des IgG est directement liée à la longueur de cette région charnière. Par exemple, la molécule d'IgG3, la plus susceptible aux digestions par la papaine et la pepsine, possède une région charnière de 47 acides aminés de plus que la molécule d'IgG1. Ces séquences, comprenant plusieurs résidus cystéine, expliquent certainement son poids moléculaire légèrement plus élevé (165 000), sa structure plus rigide et son catabolisme plus rapide. Ces propriétés sont ensuite décroissantes pour la molécule d'IgG1, puis d'IgG2 et d'IgG4.

L'équipe de GREGORY L. a proposé, en 1986, un modèle structural d'IgG en solution, fondé sur ces considérations (Fig. 7). Ces modèles, élaborés à l'aide de la diffraction RX corroborent le fait que la longueur de cette région charnière, ainsi que la flexibilité qu'elle établit, permettent une activation du complément plus efficace pour les IgG3 et IgG1 que pour les IgG2 ou IgG4.

Une autre différence structurale entre sous-classes d'IgG est le point d'attachement de la chaîne légère à la chaîne lourde. L'attachement, qui se fait par une liaison disulfure inter-chaîne, s'effectue en milieu de la chaîne lourde des IgG1, alors qu'il se trouve environ au quart de la distance de l'extrémité N terminale des chaînes lourdes des autres sous-classes (Hamilton R.G., 1987).

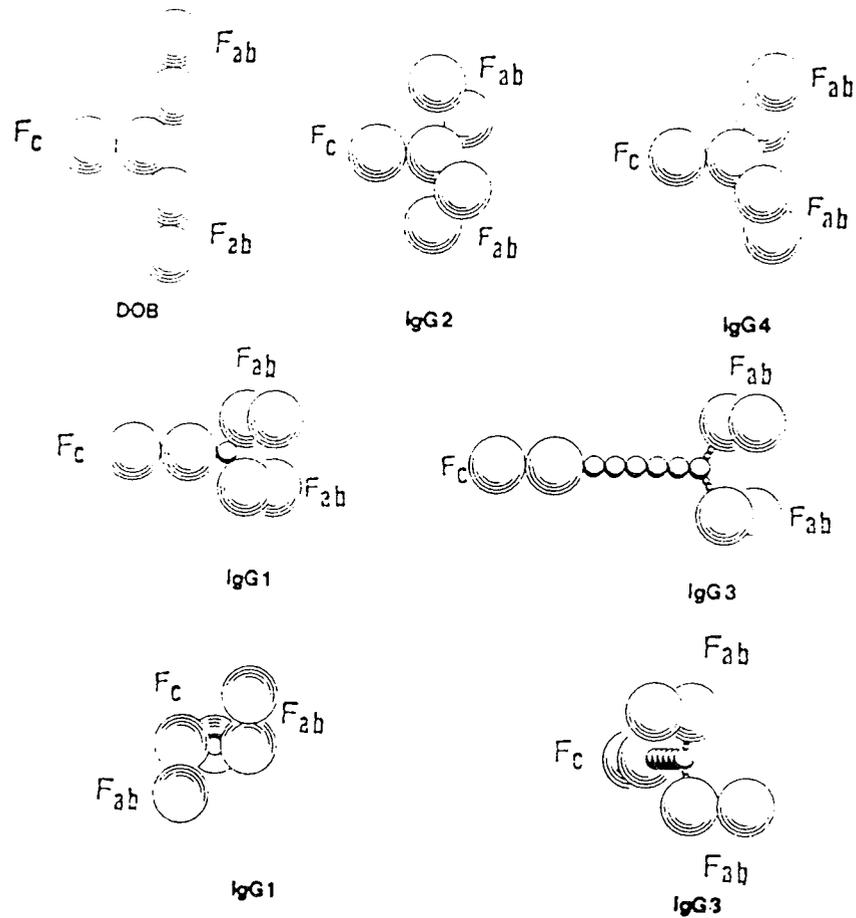


Fig. 7 Modèles proposés pour les conformations en solution des sous-classes d'IgG par GREGORY L. et al. (1986)

DOB : IgG1 particulière ne possédant pas de région charnière utilisée comme référence.

IgG2 et IgG4 ressemblent à la protéine DOB.

Dans les IgG3, la région charnière est la plus longue.

2.3. STRUCTURE DES IgM

Les IgM sont constituées par un assemblage de cinq monomères de base. Leurs chaînes H (μ) comportent quatre domaines CH. Chaque monomère est relié par des ponts disulfure au niveau des domaines CH₁ et CH₄. L'état de glycosylation des chaînes H (μ) a un rôle sur la polymérisation de la molécule (Davis A.C. et al., 1989).

Chaque pentamère contient une chaîne de jonction J, d'environ 20 000 daltons, insérée de façon covalente entre deux régions Fc adjacentes, et qui est supposée initier le processus de polymérisation. Le pentamère possède donc dix sites de fixation de l'antigène. Cette multivalence en augmente l'avidité et l'efficacité à activer le système du complément.

2.4. STRUCTURE DES IgA

Elles sont caractérisées par une grande hétérogénéité de leurs formes moléculaires qui présentent des distributions tissulaires caractéristiques.

La chaîne H (α) présente des homologies avec la chaîne H (μ), mais comporte 18 amino-acides de plus. Cette séquence supplémentaire serait impliquée dans la polymérisation, notamment par l'accrochement d'une chaîne de jonction J sur un résidu cystéine en avant dernière position (Chevailler A. et al., 1989).

Il existe deux isotypes d'IgA, IgA₁ et IgA₂ qui ne diffèrent que par 22 amino-acides sur 365. Deux allotypes sont décrits A 2 m(1) et A 2 m(2) qui portent sur les amino-acides 212 à 221 (fig. 5 et 6).

Les IgA existent sous plusieurs formes monomériques et polymériques ($(\alpha 2 L 2) n$).

Dans les sécrétions de l'organisme (salive, larmes, liquide intestinal, trachéo-bronchial, génito-urinaire, lait, colostrum) existent des IgA sécrétoires, formées d'un dimère d'IgA reliées par les chaînes J et une pièce sécrétoire associée au moment de l'exocytose. Cette dernière favorise le transport des IgA à travers la muqueuse et les protège de la protéolyse (fig. 8).

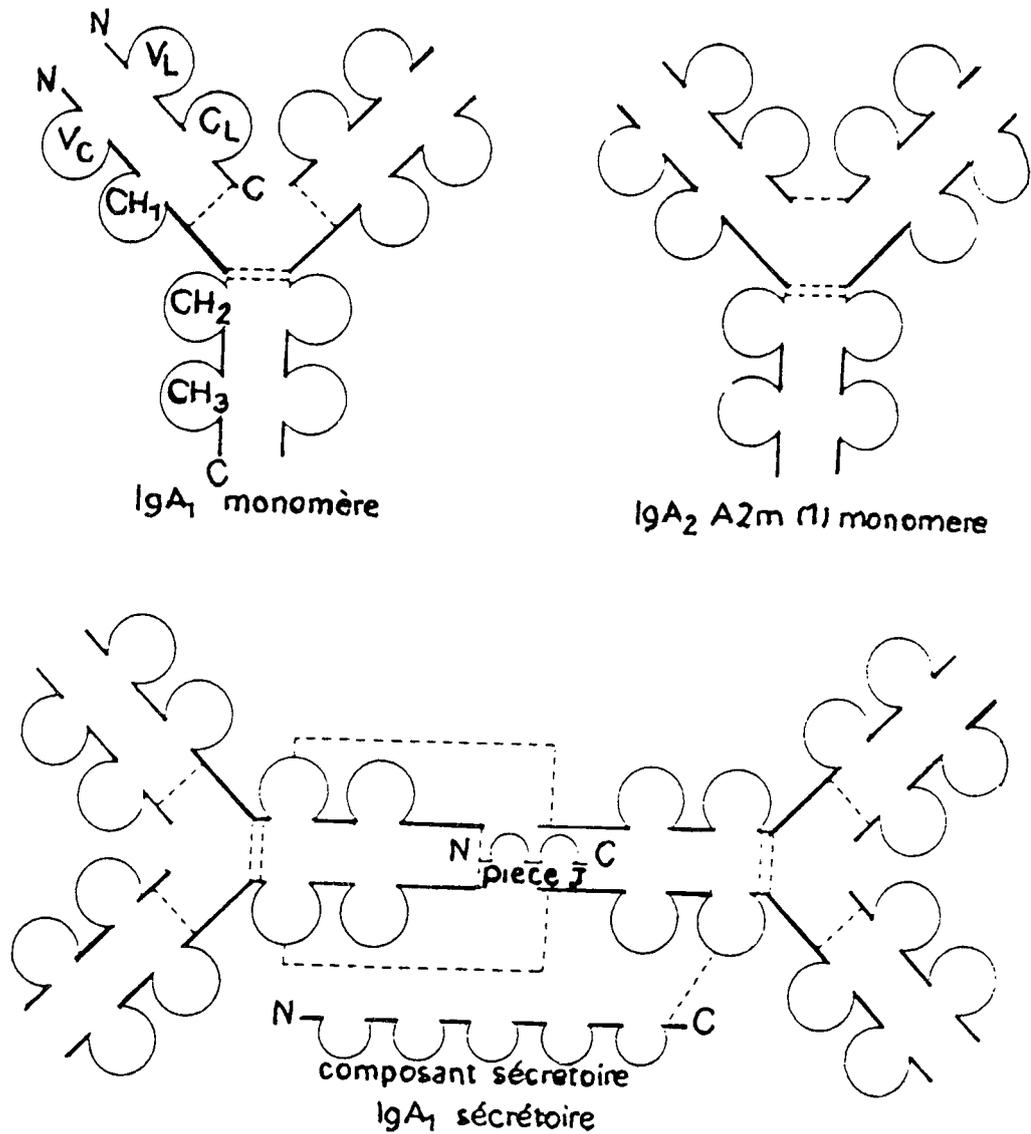


Fig 8

Structure des IgA

La structure schématique avec la formation des domaines (Q) est représentée pour chacune des chaînes polypeptidiques qui entre dans la composition des IgA monomères et sécrétoires : chaîne α , chaîne légère chaîne J et composant sécrétoire. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées (N et C), les ponts disulfures intra- et extra-caténares sont figurés par des pointilles (d'après Chevailler A. et al., 1989)

Pour les IgA seriques, on trouve 80 à 90% d'IgA₁, alors que les IgA₂ sont majoritaires à 70% pour les IgA secretoires.

2.5. - STRUCTURE DES IgD

Ce sont des glycoproteines contenant trois domaines CH relies par un seul pont disulfure. Elles sont riches en N acetylgalactosamine.

La difference la plus remarquable est une tres longue region charniere d'environ 70 amino-acides, comparable a celle de l'IgG3, mais situee plus en amont . Elle permet certainement une grande flexibilite dans la position relative des deux bras Fab de la molecule. La sequence carboxy-terminale de la region charniere est extremement riche en residus charges

(3 Arg, 6 Lys, 10 Glu). Elle est susceptible aux proteolyses et rend la molecule instable, ce qui induit des problemes pour l'isoler.

Les IgD sont la principale classe d'immunoglobulines trouvées avec les IgM à la surface des lymphocytes B. Les données sur leur fonction sont minimes. Elles pourraient jouer un rôle dans la tolérance à des antigènes particuliers.

2.6. - STRUCTURE DES IgE

Les IgE comportent quatre domaines CH et deux ponts disulfure entre les chaînes lourdes H (ϵ). Leur structure est similaire à celle du monomère d'IgM. Leur fragment Fc est probablement semblable à celui des IgG.

La région située entre CH₂ et CH₃ est présumée contenir les récepteurs spécifiques permettant la liaison à la surface des mastocytes ou des basophiles, ce qui se traduit par le relargage de médiateurs chimiques impliqués dans les phénomènes d'inflammation.

2.7. - SYNTHÈSE, PRODUCTION ET DIVERSITÉ DES IMMUNOGLOBULINES

2.7.1. - Synthèse

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines synthétisées par les lymphocytes B et leur descendance plasmocytaire. Leur production est sous la dépendance de plusieurs gènes répartis sur trois chromosomes :

Le chromosome 2 porte les gènes VL (20 à 50 gènes), JL (pour la chaîne de jonction J), CL de la chaîne légère K.

Le chromosome 22 porte les gènes VL (90 à 300 gènes), JL et CL de la chaîne légère λ .

Le chromosome 14 porte les gènes VH (300 gènes), D (D pour diversité), JH et CH de la chaîne lourde. Les gènes CH sont dans l'ordre :

5' C μ -C δ -C γ 3-C γ 1-C γ 2-C α 1-C γ 2-C γ 4-C ϵ -C α 2 3'.

Les anticorps sont produits par 3 segments génétiques codant pour les chaînes légères k et λ , et pour les chaînes lourdes H . Des gènes particuliers codent pour les régions variables des chaînes H et L , et peuvent être associés par recombinaison site-spécifique pendant la différenciation des lymphocytes B. Pour la chaîne L , il existe des gènes pour les domaines constants C et plusieurs segments de gènes pour les régions variables et la chaîne de jonction.

Pour la chaîne H , il existe des gènes pour les régions constantes C , les régions variables V , des segments génétiques D pour diversité, et des segments génétiques J . Pour obtenir une molécule d'anticorps, un segment génétique V est recombinaison avec un segment génétique J pour donner un gène V de la chaîne légère, et un segment de gène V_H est recombinaison avec un segment D_H et un segment J_H pour donner un gène V pour chaque chaîne lourde.

Chacun de ces segments génétiques est alors transcrit en association avec une séquence de la région C .

2.7.2. - Diversité

Cinq mécanismes génèrent la diversité des immunoglobulines :

- 1 - Famille multigénique de gènes V
- 2 - Recombinaisons VJ et VDJ
- 3 - Recombinaisons au niveau des jonctions VJ et DJ
- 4 - Mutation somatique ponctuelle dans les régions d'hypervariabilité
- 5 - Association des chaînes lourdes et légères

Ces réarrangements de l'ADN des cellules souches peut donner naissance à des millions de combinaisons différentes.

2.7.3. - Production et propriétés

La production des anticorps est provoquée par la stimulation par un antigène, molécule étrangère à l'organisme, comportant des épitopes différents de ceux de l'hôte. La réponse immunitaire primaire est constituée par des IgM à affinité assez basse. L'affinité de la réponse va augmenter par l'apparition au cours du temps, d'IgG qui constituent la réponse secondaire (fig. 9)

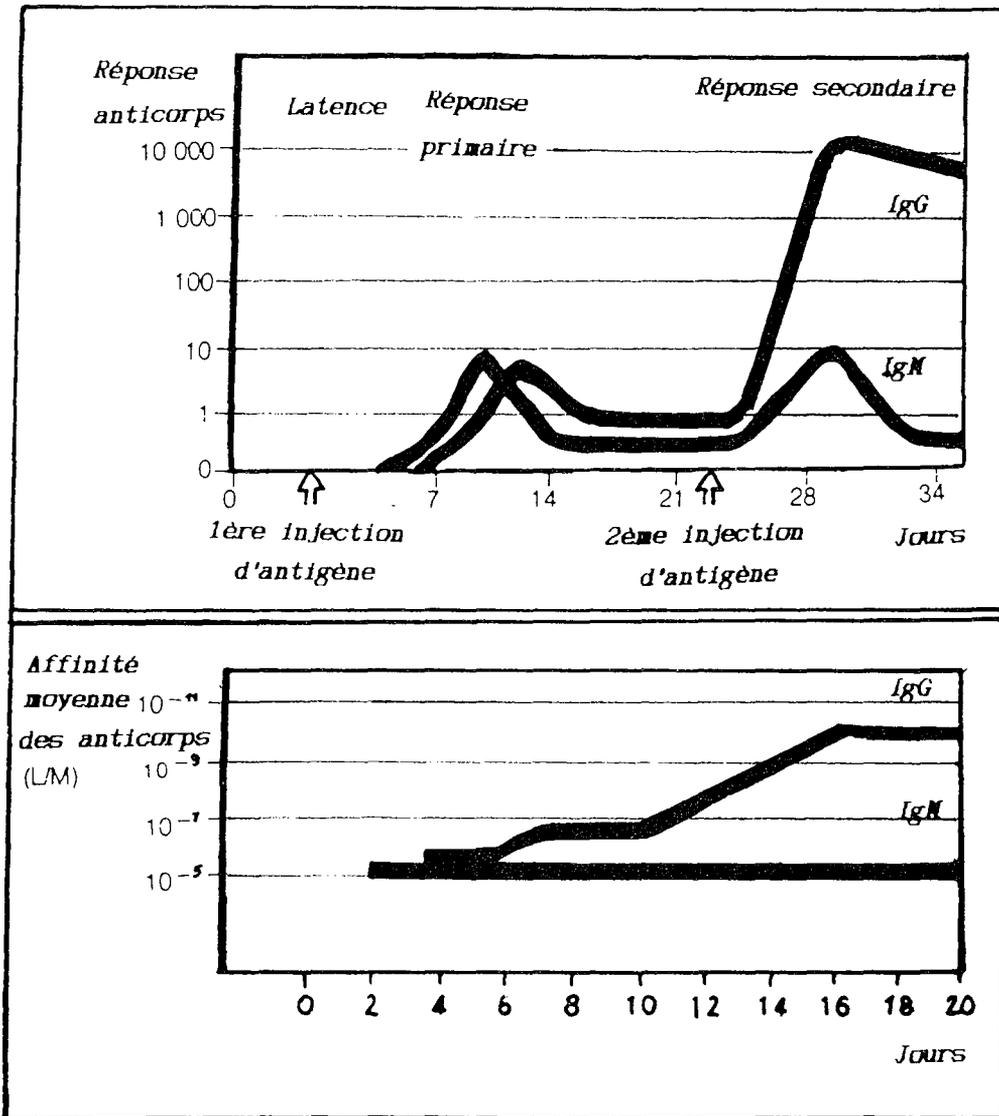


FIG. 9 Développement de la réponse anticorps

D'après MALE M. et al. (1988)

Outre les propriétés de fixation de l'antigène, liées aux sites Fab, les fonctions biologiques des IgG sont liées au fragment Fc, dans les domaines CH2 et CH3.

L'activation du système du complément par la voie classique est due à la fixation d'un antigène aux fragments Fc, suivie de la fixation du composant C1q de ce système au récepteur du domaine CH2, avec une affinité mesurable. L'ordre des constantes d'affinités est $IgG3 > IgG1 > IgG2$.

Les IgG4 fixent le complément, sans toutefois l'activer. Malgré leur faible proportion par rapport aux IgG totales, les IgG4 jouent un rôle particulier dans certaines réponses immunes impliquées dans les allergies.

Dans les traitements d'hyposensibilisation, l'IgG4 produite, spécifique de l'allergène, est non anaphylactique. Elle a une activité bloquante, agissant par compétition avec l'IgE anaphylactique.

Dans les cas normaux, la cascade du complément est impliquée dans le processus de l'inflammation. En cas d'infections ou de maladies auto-immunes, les effets inflammatoires et lytiques du complément peuvent contribuer à la pathologie de la maladie.

Les récepteurs de la région Fc interagissent avec de nombreux types cellulaires et sont associés à la phagocytose (monocytes, macrophages, neutrophiles), à la cytotoxicité à médiation cellulaire (monocytes, macrophages, lymphocytes), au transfert de la mère vers le fœtus à travers la barrière hémoplacentaire du trophoblaste, à l'immuno-modulation (lymphocytes).

En dehors de leur fonction commune de reconnaître l'antigène spécifique qui a stimulé leur formation, les différentes caractéristiques et propriétés des immunoglobulines sont résumées par les tableaux II et III.

TABLEAU II - CARACTERISTIQUES DES IgG HUMAINES

| Sous-classe IgG | A | B | C | D | E | F | G |
|-----------------|---------|----|----|----|-----|---|---|
| IgG1 | 146 000 | 15 | 70 | 25 | ++ | 0 | + |
| IgG2 | 146 000 | 12 | 20 | 23 | (+) | 0 | + |
| IgG3 | 165 000 | 62 | 6 | 9 | ++ | 0 | - |
| IgG4 | 146 000 | 12 | 4 | 25 | - | + | + |

A : Poids moléculaire (daltons)

B : Amino-acide région charnière (nombre)

C : #total IgG

D : Demi-vie (jours)

E : Fixation complément

F : Activité bloquante (allergie)

G : Fixation Staphylococcus

d'après HAMILTON R.G. (1987), OCHS H.D. et al. (1987)

TABLEAU III

PROPRIETES BIOLOGIQUES DES IgG, LIBES AUX RECEPTEURS DE Fc EXISTANT A LA SURFACE DE DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES

| Espèce et type cellulaire | Récepteur | Constante d'association M^{-1} | Spécificité isotypique | Fonctions possibles |
|--------------------------------|--------------|--|---|--|
| Monocyte humain | RFc γ | 5×10^6 | IgG3, IgG1 > IgG4 >> IgG2 | Adhérence de particules opsonisées |
| Polynucléaire humain | RFc γ | 10^6 | IgG3, IgG1 > IgG4 >> IgG2 | Adhérence de particules opsonisées |
| Cellule T humaine | RFc γ | 10^{10} , 10^{12} * | IgG1, IgG3 > IgG4 > IgG2* IgG2, IgG3 > IgG1 > IgG4 | Immuno- régulation |
| Plaquette humaine | RFc γ | 2×10^7 | IgG3, IgG1 > IgG2 > IgG4 | Réaction inflammatoire |
| Syncytiotrophoblaste humain | RFc γ | $1,4 \times 10^7$ | IgG1, IgG3 > IgG4 > IgG2 | Passage trans- placentaire |
| Cellule T humaine | RFc μ | $2,5 \times 10^6$ | - | Immuno- régulation |
| Cellule T humaine | RFc α | - | IgA2 > IgA1 | Immuno- régulation |

Δ Pour les anticorps sous forme monomérique, et de l'isotype pour lequel le récepteur a l'affinité la plus élevée

* Variable selon les expérimentateurs

Fc = Fragment peptidique cristallisable

R = Récepteur

α = Chaîne peptidique lourde des IgA

γ = Chaîne peptidique lourde des IgG

μ = Chaîne peptidique lourde des IgM

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. - IMMUNISATIONS

1.1. Animaux

Des souris Balb/C, élevées au laboratoire, des 2 sexes et âgées de 7 à 12 semaines sont utilisées pour l'immunisation et la production d'anticorps monoclonaux en ascite.

Les immunisations ont aussi été effectuées sur des souris BIOZZI, sélectionnées pour leur bonne réponse immunitaire.

1.2. - Antigènes : Immunoglobulines humaines

Les immunisations sont faites avec des immunoglobulines humaines, purifiées à partir de serum de patients atteints de myelomes et provenant de la collection de proteines du laboratoire. Nous avons choisi d'immuniser différents lots de souris, chaque lot avec une seule immunoglobuline d'isotype particulier selon les données du tableau IV. Ces immunoglobulines ont été séparées dans l'équipe de Monsieur RIVAL, par électrophorèse de zone préparative sur PEVIKON. Leur sous-classe et leur pureté ont été déterminées par recherche semi-quantitative des allotypes des immunoglobulines humaines et par immunoelectrophorèse.

TABLEAU IV
RECAPITULATION DES IMMUNISATIONS EFFECTUEES

| Souris immunisées | | Immunsation | Fusions effectu es |
|-------------------|---------|--------------|--------------------------------|
| Nombre | Espèces | | |
| 7 | Balb/C | IgG4 HRV (K) | G015 64,1, 64,2, 64,3, 64,4 |
| 5 | Balb/C | IgG4 POI (K) | 64,5, 64,6, 64,7, 64,8 |
| 5 | Biozzi | IgG4 POI (K) | 64,9, 64,10 |
| 5 | Balb/C | IgG3 BRI (L) | 6 63,1 |
| 3 | Balb/C | IgM LAT (K) | M1 |
| 3 | Balb/C | IgG4 LEM (K) | A1 |
| 3 | Biozzi | IgD SAL (L) | O1 |

Les immunoglobulines sont dilu es dans du PBS sans azothydrate de sodium, et st rilis es par filtration sur un filtre 0,22 μ m MILEX (Sartorius).

1.3. - Mode d'immunsation

Le protocole d'immunsation choisi est classiquement utilisé *in vivo* (Bazin R. et al., 1988).

L'un des paramètres essentiels à la reussite d'une fusion est la dernière injection d'antigènes. Nous avons cependant expérimenté diverses modalités dont les caractéristiques sont r sum es dans le tableau V, en sachant que la dernière injection d'AG est un paramètre essentiel à la reussite d'une fusion.

TABLEAU V Protocoles d'immunisation

| Chronologie n° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|-----------------|--------|--------|
| Fusions | G | G3a | G4.1 | G4.2 | G4.3 | M1 | G4.4 | G4.5 | G4.6 | G4.7 | A1 | G3.1 | G4.8 | G4.9 | G4.10 | D1 |
| Antigène | Ø3 BRI | Ø4 HRU | Ø4 HRU | Ø4 HRU | Ø4 HRU | M LAT | Ø4 HRU | Ø4 POI | Ø4 POI | Ø4 POI | A LEM | Ø3 BRI | Ø4 POI | Ø4 POI | Ø4 POI | D SAL |
| Souris | BALB C | BALB C | BALB C | BALB C | BALB C | BALB C | BALB C | BALB C | BALB C | BIOZZI | BIOZZI | BIOZZI |
| Cellules nourricières | 10 ^h | 0 | 0 | 10 ^h | 0 | 10 ^h | 0 | 0 |
| Distribution nbre puits | 240 | 240 | 19200 | 9600 | 9600 | 9600 | 9600 | 9600 | 9600 | 9600 | 9600 | 9600 | 9600 | 10560 | 21120 | 19200 |
| Rapport Sp ² O/lymphocyte | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/1000 | 1/9 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/15 | 1/10 |
| 1ère injection | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Quantité | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 45 | 25 | 25 | 75 | 75 | 75 |
| Mode | SC | SC | SC | SC | SC | SC | SC | SC | SC | SC | IP | SC | SC | IP | IP | IP |
| Adjuvant | AFC | AFC | AFC | AFC | AFC | AFC | AFC | AFC | AFC | AFC | - | - | - | - | - | - |
| 2ème injection : IP | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Quantité | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 45 | 25 | 25 | 75 | 75 | 75 |
| Adjuvant | AFI | AFI | AFI | AFI | AFI | AFI | AFI | AFI | AFI | AFI | - | - | - | - | - | - |
| 3ème injection : IP | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Quantité | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 70 | 25 | 25 | 75 | 75 | 75 |
| 4ème injection : IP | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Quantité | | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | | 25 | 25 | 75 | 75 | |
| 5ème injection : IP | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Quantité | | | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | | | 25 | 90 | | | |
| 6ème injection : IP | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Quantité | | | | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | | | | | | | |
| 7ème injection : IP | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Quantité | | | | | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | | | | | | | |
| Injections avant fusion | | | | | | | | | | | | | | | | |
| J-7 IP | | | | | | 25 | | | | | | | | 150 | | |
| J-4 IP | | | | | | 25 | | | | | | 200 | 90 | 150 | | |
| J-3 IP | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 43 | 86 | 90 | 200 | - | - | 150 | |
| J-2 IP | | | | | | 25 | | | | | 90 | 200 | 90 | 150 | 150 | 150 |
| J-1 IP | | | | | | 25 | | | | | 90 | 200 | 90 | 150 | 150 | 150 |

SC : sous cutané IP : intra peritonéal AFC : adjuvant Freund complet AFI : adjuvant Freund incomplet

J-jour de la fusion

Les quantités d'antigène injectées sont données en microgrammes

Les cellules nourricières sont constituées par des macrophages péritoneaux.

1.4. Détermination du titre en anticorps après immunisation

Le titre en anticorps du serum preleve par voie intra-veineuse des souris immunisees a ete determine par immuno-dosage ELISA, test communement employe pour cette determination (LANE R.D. et al., 1986).

Le titre en anticorps est l'inverse de la dernière dilution du serum donnant une réponse positive. Les immunisations sont répétées jusqu'à obtenir un titre approximatif de 1×10^4 .

1.5. - Rappel avant fusion

Le protocole le plus classique consiste en une dernière injection d'antigène 3 jours avant la fusion.

La voie intraveineuse, qui permet d'injecter en une seule fois une quantité importante d'antigène est préconisée (Lowe J. et al., 1982), mais délicate de réalisation, elle n'a pas été utilisée dans ce travail.

Le second protocole s'étale sur un laps de temps plus important et permet d'utiliser des souris immunisées antérieurement. Il consiste en un rappel au jour $j - 7$ par voie intrapéritoneale environ 6 mois après la dernière injection, suivi aux jours $j - 4$, $j - 3$, $j - 2$ et $j - 1$ d'injections en quantité plus élevée, j étant le jour de la fusion. Les quantités injectées varient de 25 à 150 μg d'immunoglobuline par souris et par injection.

2 - PROTOCOLE DE FUSION

La méthode utilisée est celle de HAMMERLING G. (1981), également décrite par FAZEKA S. de St GROTH S. et al. (1980), OI V.T. et al. (1980), GOLFRE G. et al. (1986), LANE R.D. et al. (1984, 1986).

Pour réussir les premières étapes d'une fusion, le myelome choisi doit présenter deux critères essentiels, le premier étant de ne pas sécréter lui-même d'immunoglobulines qui pourraient interférer avec les anticorps sécrétés dans le surnageant des hybridomes en culture.

Le deuxième critère est la déficience en une enzyme indispensable à la croissance cellulaire.

2.1. - Technique de sélection

Nous avons choisi de travailler avec la lignée de cellules myélomateuses Sp2/0, qui permet d'utiliser la sélection par le milieu HAT.

Une cellule normale synthétise par voie de novo ses nucléotides puriques. Cette voie peut être bloquée par l'aminoptérine, un antibiotique analogue de l'acide folique qui agit en inhibant la réaction de tétrahydrofolate reductase.

Les nucléotides puriques peuvent aussi être synthétisés par la voie dite de sauvetage. Cette voie, catalysée par l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase (HGPRT), permet la récupération des bases puriques libres (fig. 10).

Les cellules myélomateuses sont dépourvues d'HGPRT, aussi lorsqu'on les met en culture sur un milieu HAT (Hypoxanthine, aminoptérine et thymidine), elles meurent, ne pouvant plus assurer leur synthèse nucléotidique. Si des cellules normales, en l'occurrence les lymphocytes B, sont fusionnées avec des cellules HGPRT⁻, les cellules normales apportent l'enzyme nécessaire à la synthèse d'ADN et à la croissance sur un milieu HAT.

Comme la culture de lymphocytes se révèle en général impossible au-delà de quelques semaines, seules les cellules hybrides peuvent survivre sur ce milieu sélectif.

Afin de s'assurer que toutes les cellules myélomateuses sont HGPRT⁻ et afin d'éviter la croissance de révertant HGPRT⁺, il est déconseillé de maintenir ces cellules en culture par repiquages successifs. La conservation se fera par congélation. Un aliquot sera décongelé 3 semaines avant la fusion et cultivé dans du milieu RPMI - 10% SVF additionné de 4 µg/ml de thioguanine. Cette technique de sélection a été décrite par Littlefield J.W., (1964) et utilisée par Kohler et Milstein (1975).

Au bout de 2 semaines de croissance des hybridomes, le milieu utilisé pourra être du RPMI - 10% SVF additionné d'hypoxanthine et de thymidine (HT), toute cellule non hybride étant alors éliminée.

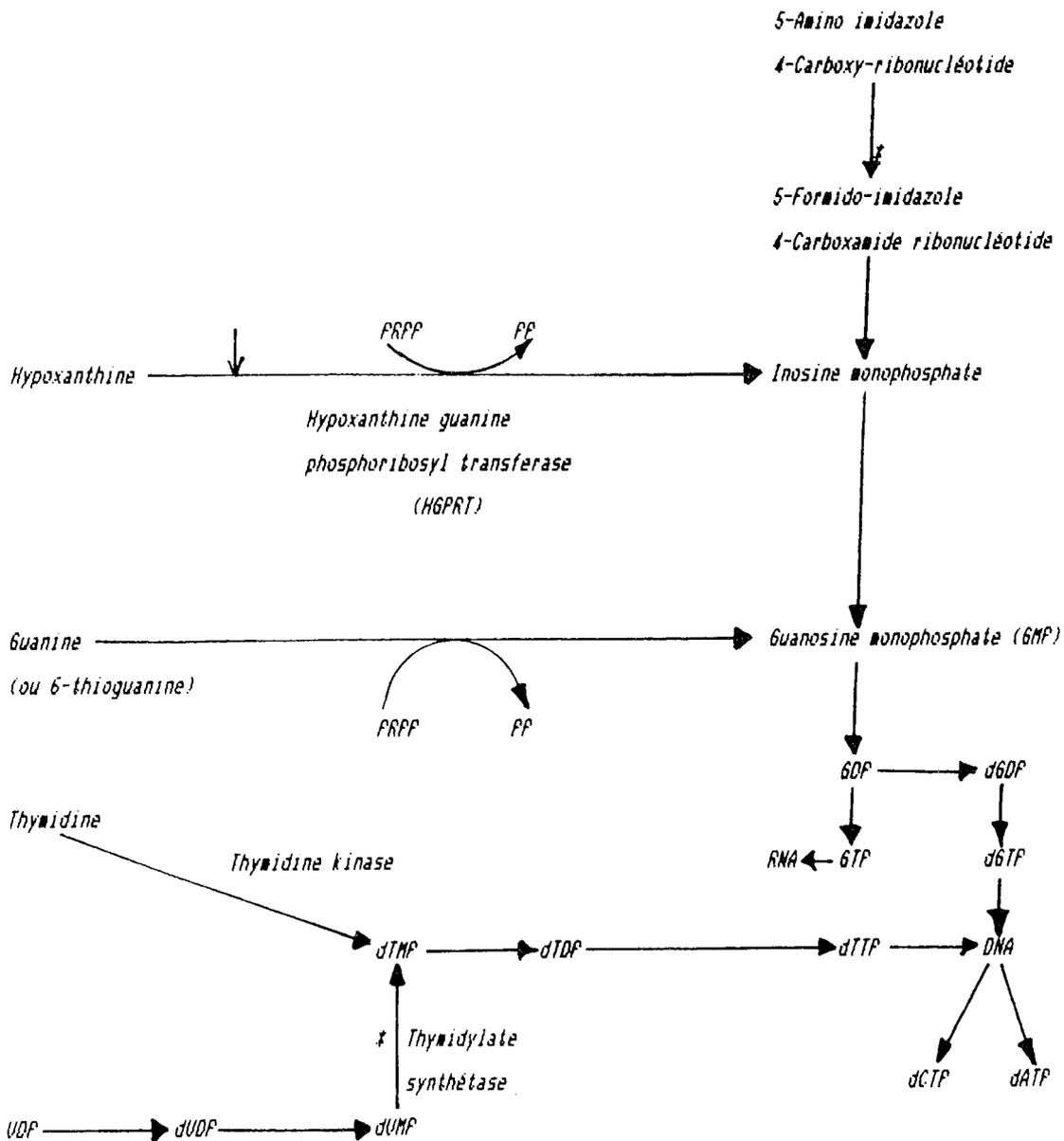


FIG 10 Voies métaboliques intervenant dans la synthèse des acides nucléiques.

Lorsque la voie principale est bloquée par un analogue de l'acide folique tel que l'aminoptérine (*), les cellules doivent emprunter la voie secondaire utilisant l'HGPRT et la thymidine kinase.

Les cellules HGPRT⁻ peuvent être sélectionnées avec du milieu contenant de la 8-azaguanine (↓), qui est incorporée par la voie de l'HGPRT (d'après Goding, 1986).

Après encore deux semaines, on peut utiliser du milieu RPMI - 10% SVF, et ce jusqu'à la fin des manipulations.

Cette technique permet de sélectionner des hybridomes contenant à la fois le chromosome X des lymphocytes B, portant le gène HGPRT et les chromosomes contenant les locus codant pour la sécrétion d'immunoglobulines.

2.1.1. - Cellules myélomateuses

La lignée cellulaire Sp2/0 de myelome de souris Balb/C provient de ATCC (American Type Culture Collection).

Les cellules sont conservées par congélation dans l'azote liquide. Après décongélation, elles sont cultivées sur du milieu de culture RPMI 1640 (SEROMED,, BIOCHROM K6, Berlin, RFA), additionné de $2 \times 10^{-3}M$ de glutamine, de $5.10^4 \mu g$ de streptomycine DIAMANT 608.4 (Diamant, Puteaux, F), de 5.10^4 unités de penicilline DIAMANT 4642, et de 10% de serum de veau foetal (SVF), (EUROBIO, Paris, France).

Ce myélome est non sécréteur d'immunoglobulines, sensible au HAT et HGPRT⁻. Les révertants HGPRT⁺ sont inhibés par culture pendant 1 à 2 semaines sur milieu additionné de thioguanine (4 $\mu g/ml$). Avant la fusion, les cellules sont cultivées sans thioguanine pendant 8 jours

2.1.2. - Splénocytes

Les lymphocytes théoriquement en phase exponentielle sont obtenus après prélèvement de la rate de l'animal sacrifié. La rate est broyée dans un potter, les cellules suspendues sont collectées et centrifugées dix min à 400 X g (centrifugeuse RC 1000 JOUAN). Le culot est alors dilué dans 10 ml de Dulbecco's PBS, pH 7,5, NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 5mM, KH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 0,6 mM, CaCl₂ 0,6 mM.

Les lymphocytes sont alors comptés grâce à une cellule de THOMA après coloration de Türk (violet de gentiane 200 X 10⁻³ g, acide acétique 98% 3,3 g, eau distillée q.s.p. 100 ml). Cette technique histologique permet un comptage aisé des lymphocytes et des macrophages, seules cellules intactes et légèrement colorées après la lyse des hématies par l'acide acétique.

2.1.3. - Macrophages péritonéaux

Deux ou trois souris Balb/C adultes sont sacrifiées, la peau de l'abdomen est passée à l'alcool à 70% V/V puis retirée. Environ 10 ml de RPMI sont injectés dans le péritoine puis réaspirés après massage doux de l'abdomen.

Le liquide récupéré est alors centrifugé 10 min à 400 X g (centrifugeuse RC 1000 JOUAN) à température ambiante. Les cellules du culot sont alors comptées grâce au colorant de Turk et conservées sur de la glace jusqu'à utilisation.

2.1.4. - Agent de fusion

L'agent fusogène est le Poly-éthylène-glycol pur type 4000 (PEG) (ROTH, Karlsruhe, RFA). 20 g de PEG sont autoclavés pendant 45 min afin de liquéfier le composé, puis ajoutés à 28 ml de DFBS à 15% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) (MERCK, Karlsruhe, RFA).

La solution est alors stable, stérile et utilisable pendant plusieurs mois.

2.1.5. - Milieux utilisés

La culture cellulaire des hybridomes se fait successivement sur RPMI, HAT et HT, dont la composition est décrite dans les tableaux VI et VII.

TABLEAU VI
RPMI 1640 - COMPOSITION DU MILIEU DE BASE

| <u>Acides aminés de forme levogyre</u> mg/l | | | |
|---|-------|--|-------|
| Acide aspartique | 20 | | |
| Acide glutamique | 20 | | |
| Arginine | 200 | | |
| Asparagine | 50 | | |
| Cystine | 50 | | |
| Glutamine | 300 | | |
| Glycine | 10 | | |
| Histidine | 15 | | |
| Hydroxypoline | 20 | | |
| Isoleucine | 50 | | |
| Leucine | 50 | | |
| Lysine HCl | 40 | | |
| Méthionine | 15 | <u>Autres composants</u> | mg/l |
| Phénylalanine | 15 | Glucose | 2 000 |
| Proline | 20 | Glutathion réduit | 1 |
| Sérine | 30 | Rouge phénol | 5 |
| Thréonine | 20 | | |
| Tryptophane | 5 | | |
| Tyrosine | 20 | | |
| Valine | 20 | | |
| <u>Vitamines</u> | | <u>Sels organiques</u> | |
| Acide folique | 1 | NaCl | 6 000 |
| Biotine | 0,2 | KCl | 400 |
| Vitamine B 12 | 0,005 | NO ₂ HPD ₄ , 7H ₂ O | 1 512 |
| Pantothenate de calcium | 0,25 | MgSD ₄ , 7H ₂ O | 100 |
| Chlorure de choline | 3 | NaH CO ₃ | 2 000 |
| Inositol | 35 | Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O | 100 |
| Nicotinamide | 1 | | |
| p-aminobenzoïque acide | 1 | | |
| Pydoxine HCl | 1 | | |
| Riboflavine | 0,2 | | |
| Thiamine HCl | 1 | | |

TABLEAU VII

Préparation du milieu de culture et des milieux de sélection

Solution HAT 50X (Flow Laboratories, UK)

| | |
|--------------|---------------|
| Hypoxanthine | 5 000 μ M |
| Aminoptérine | 20 μ M |
| Thymidine | 800 μ M |

Solution HT 50X (Flow Laboratories)

| | |
|--------------|---------------|
| Hypoxanthine | 5 000 μ M |
| Thymidine | 800 μ M |

RPMI 1640

| | |
|--------------------------------|---------------------------|
| RPMI 1640 | 500 ml |
| NaH CO ₃ (0,2% m/V) | 10 g |
| Streptomycine DIAMANT 6084 | 5,10 ⁴ μ g |
| Penicilline DIAMANT 4642 | 5,10 ⁴ UI |

Avant utilisation

| | |
|------------------------------|-----------|
| Pyruvate de sodium (Seromed) | 1% (V/V) |
| SVF chauffé à 56°C | 10% (V/V) |

Éventuellement

| | |
|---------------------|--|
| L-glutamine (Sigma) | 2 x 10 ⁻³ M (si le milieu est prêt depuis plus de 15 jours) |
| HAT 50X | 10 ml |
| HT 50X | 10 ml selon le cas |

2.1.6. - Déroulement de la fusion

La fusion s'effectue en milieu sterile, sous hotte à flux laminaire afin d'éviter tout risque d'infection fongique ou bacterienne. Avant la fusion, tous les milieux sont mis au bain marie à 37°C.

Suivant le cas (tab. V), différentes quantités (6×10^7 à $3,7 \times 10^8$) de lymphocytes sont melangees à des cellules myélomateuses de façon à avoir un rapport variant de 1/10 à 1/1000 dans un tube à centrifugation, qui est alors complète à 50 ml avec du DPBS prealablement chauffé à 37°C. Après une centrifugation de 5 min, à 400 X g et à 15°C, le surnageant est éliminé par retournement du tube. Le culot est alors doucement remis en suspension par tapotement dans 10 ml de milieu.

On ajoute alors aux cellules 1 ml de solution de fusion, goutte à goutte et sous agitation pendant 45 s. Le processus de fusion est alors stoppé par addition de 50 ml de DPBS en trois fois pendant 30 s afin d'éviter de brusques variations des conditions de pH. Après une centrifugation de 5 min à 15°C et 400 X g, les cellules sont remises en suspension dans un flacon avec 120 ml de milieu de selection HAT. On ajoute alors 6.10^6 macrophages péritonéaux dans les cas des fusions effectuées avec un apport de cellules nourricières. La suspension cellulaire est alors distribuée à raison de 100 µl par puits dans des microplaques de culture (96 puits, COSTAR, France), en prenant soin d'agiter la suspension régulièrement afin d'éviter que des cellules n'adhèrent au flacon.

Les cellules sont alors cultivées pendant une semaine dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

Les colonies cellulaires sont observables avec un microscope à contraste de phase inversé. 100 µl de milieu HAT sont alors ajoutés dans chaque puits, et les cellules sont remises dans l'incubateur. La culture se poursuit alors et des changements de milieu par aspiration et ajout de milieu neuf sont effectués tous les 2 jours.

A partir de 2 semaines de culture, le milieu prélevé dans chaque puits peut être testé par ELISA sur un revêtement d'immunoglobulines d'isotype recherché.

3 - METHODES DE CLONAGE

Le clonage est une étape essentielle à l'obtention d'anticorps monoclonaux secrétés par un clone, provenant de divisions successives d'une cellule mère indifférenciée et unique. Le clone ne contient donc que des cellules phénotypiquement et génétiquement identiques.

Un premier clonage sommaire s'effectue grâce à la séparation physique des cellules par la distribution dans un nombre important de puits de culture, variant ici entre 240 et 21 157.

La technique de dilution limite suivant une loi de Poisson (Coller H.A. et al., 1986), est la plus répandue pour l'obtention d'une lignée cellulaire homogène. C'est une méthode valable pour obtenir des hybridomes stables.

PROTOCOLE DE LA DILUTION LIMITE

Le but désiré est d'obtenir des clones cellulaires. Pour cela, les plaques de culture doivent présenter moins de 30% de puits avec une croissance cellulaire (Mac Kearn T.J., 1982). Les puits sont observés une semaine après la fusion au microscope inversé. Lorsqu'un ou plusieurs clones sont détectés dans un puits, celui-ci est mis en suspension dans du milieu de culture et un aliquot de 100 μ l est prélevé et déposé dans un hématimètre pour un comptage cellulaire. Un calcul permet alors de déterminer le volume de suspension cellulaire à prélever afin d'obtenir une concentration finale de $2,5 \times 10^2$ cellules/ml, grâce à deux dilutions successives de 10 en 10.

Les clonages s'effectuent sur des plaques de culture stériles de 96 puits (COSTAR). Chaque moitié de plaque estensemencée, soit avec 25 et 50 cellules au total. On aura donc en moyenne 0,5 cellule par puits dans une demi-plaque, et 1 cellule par puits dans l'autre demi-plaque. On dépose 200 μ l de suspension cellulaire par puits.

Après une dizaine de jours de culture pendant lesquels le milieu a été renouvelé par aspiration et remplacé par du milieu neuf toutes les 48 heures, une observation au microscope permet de détecter les puits où il y a croissance cellulaire. Lorsqu'il y a suffisamment de cellules, le surnageant de culture peut être prélevé stérilement afin de procéder au test ELISA qui permettra de détecter si la spécificité des AC sécrétés correspond à celle recherchée.

Trois clonages successifs sont nécessaires avant de pouvoir obtenir des clones spécifiques. Néanmoins, des clonages supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires. Le dépistage est une méthode permettant de vérifier la clonalité des cellules : lorsque tous les puits où une croissance cellulaire existe donnent des réponses positives, l'on peut considérer que le clonage est terminé.

A ce moment, on peut procéder à l'étape suivante qui consiste à étendre un clone par passage successif en puits de 3 ml puis en boîtes de 25 et 75 cm².

4 - DETECTION DES CLONES SECRETEURS

La principale technique que nous avons choisie d'employer est un immuno-dosage en phase solide dénommé E.L.I.S.A. (Enzyme linked immuno-sorbent-assay), la deuxième technique est celle des dot immunoblott qui repose sur le même principe de dosage immuno-enzymatique non compétitif.

Les deux techniques sont couramment utilisées pour la détection des anticorps monoclonaux (Brennaud D.M. et al., 1986) (Paolucci F., 1986).

Une précaution essentielle à cette étape du travail est le choix de l'anticorps que l'on fixe sur le support solide.

L'antigène d'immunisation provoque lui-même la formation d'anticorps dirigés contre ses propres épitopes, autrement dit des anticorps anti-idiotypes. Ceux-ci vont évidemment reconnaître la molécule qui a servi à l'immunisation. Il est donc évident que pour éviter des réponses positives abondantes et surprenantes, il faut choisir un anticorps différent de cette molécule pour le test de détection.

L'anticorps que l'on désire détecter est représenté par l'anticorps de souris secrété par les hybridomes. Il peut former un complexe anticorps antigène avec l'antigène adsorbé sur le support solide, polystyrène dans le cas du test ELISA, nitrocellulose dans le cas du blotting.

Le complexe AG/AC qui se forme est détecté grâce à un 2ème AC anti-anticorps de souris, couplé à une enzyme, la peroxydase de raifort.

Le complexe immuno-enzymatique qui se forme, donne une coloration proportionnelle à la quantité d'antigène présents dans le surnageant de culture (fig. 11).

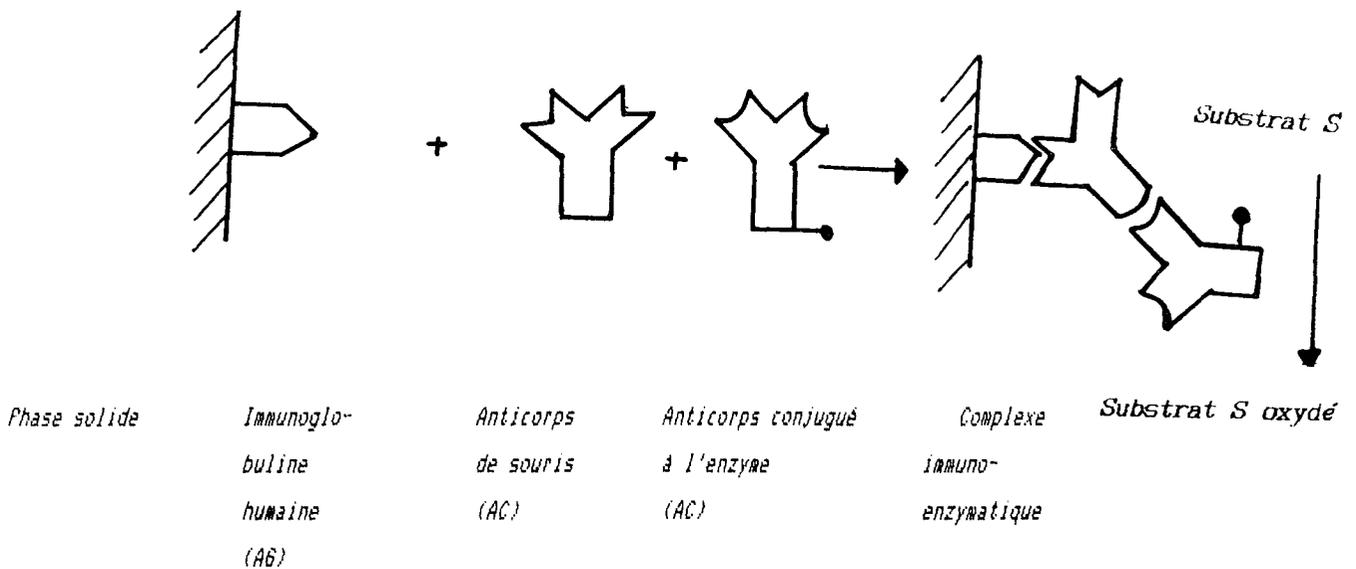


FIG. 11 SCHEMATISATION DE LA TECHNIQUE ELISA

4.1. - Test ELISA

4.1.1. - *Tampons et solutions utilisés*

* *Revêtements des plaques*

Les plaques de microtitration de 24 puits (COSTAR) sont revêtues avec une solution d'immunoglobulines humaines, dans du carbonate de sodium 50 mM, ajusté à pH 9,6 avec du NaHCO₃ solide, de concentration variable de 0,66 à 2,66 µg/ml. Les immunoglobulines employées sont des protéines purifiées provenant du laboratoire, dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau VIII.

Ces protéines sont stockées sous forme lyophilisée. Après dissolution dans le tampon carbonate, la concentration en protéines des solutions obtenues est vérifiée par spectrométrie d'absorbance à 280 nm.

La loi de Beer-Lambert permet de déterminer l'absorbance A connaissant le coefficient d'extinction des protéines pour un parcours optique (cuve de quartz) et une concentration de 1%(m/v).

$$A \frac{1\%}{1\text{cm}} = 14$$

Les diverses solutions utilisées pour le test sont rassemblées dans le tableau IX.

TABLEAU VIII - CARACTERISTIQUES DES IMMUNOGLOBULINES EMPLOYEES

| NOM | CLASSE | SOUS CLASSE | TYPE |
|--------|--------|-------------|------|
| GAZ | G | 1 | K |
| GIM | G | 1 | L |
| MCH | G | 1 | L |
| RAS | G | 1 | K |
| ZEG | G | 1 | K |
| JAM | G | 2 | K |
| NIC | G | 2 | K |
| RAD | G | 2 | L |
| RAI | G | 2 | L |
| BRI | G | 3 | L |
| MET | G | 3 | K |
| REN | G | 3 | K |
| SLA | G | 3 | K |
| CHA, 1 | G | 4 | L |
| BEN | G | 4 | K |
| FIN | G | 4 | L |
| HRU | G | 4 | K |
| HUI | G | 4 | L |
| PAI | G | 4 | K |
| POI | G | 4 | K |
| BER | G | 1 | K |
| CHE | G | 1 | K |
| LAR | G | 1 | L |
| THE | G | 1 | K |
| SIG | G | 1 et 2 | |
| BDU | A | 1 | K |
| LEM | A | 1 | K |
| LDP | A | 1 | K |
| RDB | A | 1 | K |
| TRQ | A | 1 | L |
| BIC | M | | L |
| BDN | M | | K |
| DES | M | | K |
| GAT | M | | K |
| LAT | M | | K |
| D1 | D | | K |
| D2 | D | | L |
| D3 | D | | L |
| LIN | D | | L |
| SAL | D | | L |
| LAN | D | | L |

(voir suite tableau page suivante)

Suite tableau VIII

| | | | |
|------------------------|------------|---------------------|----------|
| <hr/> | | | |
| <i>Chaines légères</i> | | <i>VOR</i> | <i>L</i> |
| | | <i>KEEN</i> | <i>L</i> |
| | | <i>NRIII</i> | <i>L</i> |
| <hr/> | | | |
| <i>Chaines légères</i> | | <i>ART</i> | <i>K</i> |
| | | <i>BOUN</i> | <i>K</i> |
| | | <i>CHE</i> | <i>K</i> |
| | | <i>HEN</i> | <i>K</i> |
| | | <i>ROUS</i> | <i>K</i> |
| <hr/> | | | |
| <i>Fragments</i> | <i>Fab</i> | <i>SOD</i> | <i>K</i> |
| | | <i>GEN</i> | <i>L</i> |
| <hr/> | | | |
| | <i>FC</i> | <i>FC + F'C BER</i> | |
| <hr/> | | | |
| <i>pep F'C</i> | | | |
| <hr/> | | | |

TABLEAU IX
SOLUTIONS UTILISÉES POUR LA MISE EN ŒUVRE DU TEST ELISA

Solutions de lavage

* P.B.S. (phosphate buffered saline) -- pH 7,4

| | | |
|----------------------------------|-----|----|
| NaCl | 130 | mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 5 | mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 | mM |

* P.B.S. Tween

P.B.S.

Tween 20 (Sewa) 0,05 % m/V

Solution de saturation

P.B.S.

B.S.A. 1 % m/V

Azothydrate de sodium 0,1 % m/V

Solution de l'anticorps conjugué à l'enzyme (TAGO, Burlingam, USA)

Anticorps de chèvre anti-anticorps de souris,

couplé à la peroxydase, anti -(IgG + IgM) (H + L), dilué au 20 000ème (V/V)
dans du PBS Tween

Solution de révélation pH 6

Pour le substrat 3, 3', 5, 5' tetraméthyl benzidine (TMB) : acétate de sodium 140 mM ajusté à pH 6 avec de l'acide citrique 100 mM

Pour le substrat OPD : phosphate bipotassique 100 mM ajusté à pH 6 avec de la soude 1N

Solution d'arrêt de la réaction

Acide sulfurique 2 M

Dans un premier temps, le substrat utilisé a été l'ortho-phenylène-diamine (OPD), (SIGMA) et l'H₂O₂ à 30% (V/V).

L'OPD étant un composé très volatile et réputé cancérogène, nous avons préféré utiliser pour la suite le TMB (FLUKA). Les performances des deux procédés ont été comparées par d'autres chercheurs du laboratoire et s'avèrent semblables.

* Solution extemporanée d'OPD : 10 ml par plaque OPD 1% (M/V) dans le tampon de révélation phosphate de potassium, 100 mM, pH 6 - Ajouter 4 µl d'H₂O₂ à 30% (V/V)

* Solution extemporanée de TMB : 10 ml par plaque. Préparer une solution Stock de TMB 10% (p/V) dans le DMSO (MERCCK, Karlsruhe, RFA). Se conserve 15 jours à + 4°C et à l'abri de la lumière.

Diluer extemporanément 100 µl de la solution Stock dans 10 ml de tampon de révélateur phosphate de potassium, 100 mM, pH 6.

Ajouter 4 µl d'H₂O₂ à 30% (V/V)

* Témoins de la réaction :

Témoin négatif : P.B.S. TWEEN

ou milieu de culture RPMI 1640 + SVF 10% V/V

ou sérum de souris non immunisée dilué au 1/500

Témoin positif : Concentré de surnageants de culture de différents clones connus pour leur positivité,

ou sérum de souris immunisée dilué au 1/500

ou anti-IgG3 27A à 0,91 mg/ml

(Madame Françoise GERARD, Centre de Transfusion de Liège, Belgique)

ou anti-IgG4 VBY4 14D 11 à 0,8 mg/ml

(Monsieur VALLET, Université LAVAL - Québec)

4.1.2. - Mode opératoire

4.1.2.1. - Revêtement des puits avec l'AG

On distribue 75 μ l par puits de solution de revêtement de concentration variant de 0,66 à 2,66 μ g/ml.

On laisse incuber les plaques une nuit à 4°C.

4.1.2.2. - Saturation des sites aspécifiques

La plaque est vidée par retournement puis lavée trois fois au P.B.S. Tween dans un laveur de plaques TITERTEK (Flow Laboratories, PUTEAUX, FRANCE).

On distribue alors 150 μ l par puits de solution de saturation. On incube 2 h à 37°C. Les plaques peuvent être conservées plusieurs semaines à + 4°C, recouvertes de manière hermétique. L'incubation peut aussi se faire une nuit à + 4°C.

4.1.2.3. - Incubation de la solution d'anticorps de souris

La plaque est à nouveau lavée 3 fois au P.B.S. Tween. On dépose la solution d'anticorps pure ou diluée dans le P.B.S. (surnageant de culture, liquide d'ascite éluats chromatographiques,...), à raison de 75 μ l par puits.

Chaque plaque reçoit un témoin positif et négatif. Chaque dilution est testée en double.

L'incubation peut se faire 2 H à + 37°C (ou 12 H à + 4°C)

4.1.2.4. - Réaction enzymatique - Révélation du complexe AG-AC

Après 3 lavages au P.B.S. Tween, on ajoute 100 μ l par puits de solution du conjugué. Les plaques sont mises à incuber à + 37°C, une heure exactement.

La plaque doit être lavée 5 fois au P.B.S. Tween et une dernière fois avec le tampon phosphate de potassium pour l'OPD ou avec le tampon acétate/citrate pour le TMB.

100 μ l de solution extemporanée de substrat sont ajoutés dans chaque puits.

La réaction enzymatique s'effectue, donnant un substrat oxydé, dont la coloration apparaît en une dizaine de minutes.

La réaction est stoppée par addition de 25 μ l par puits d'acide sulfurique 2 M.

La coloration est alors lue avec un spectrophotomètre TITERTEK avec un filtre adapté, 492 nm pour l'OPD, 450 nm pour le TMB.

4.1.3. - Mise au point du test

La spécificité de reconnaissance des Ig adsorbées a été contrôlée par les réponses obtenues avec l'incubation d'anti-IgG3 à 0,91 mg/ml et d'anti-IgG4 à 0,2 mg/ml et de témoins négatifs.

La sensibilité de l'ELISA a été déterminée en effectuant des tests avec les mêmes revêtements à différentes concentrations, ainsi que l'anti-IgG3 à 3 dilutions 10^{-4} , 2×10^{-4} et 10^{-5} . Les solutions mères d'immunoglobulines ont été diluées de manière à obtenir :

200 ng/puits - 100 ng/puits et 50 ng/puits

4.2. - Dot immunoblott

4.2.1. - Réactifs

Les réactifs utilisés sont rassemblés dans le tableau X

4.2.2. - Protocole du test

4.2.2.1. - Revêtement du support

Prendre un filtre de nitrocellulose quadrillée (Millipore). Travailler avec des gants afin d'éviter toute contamination de la nitrocellulose.

Déposer une goutte de 1 μ l d'antigène (anticorps humain) dans du T.B.S. à la dilution choisie, sur chaque carré du quadrillage.

Utiliser une pipette délivrant un μ l (HAMILTON).

Laisser sécher une heure à température ambiante

TABLEAU X
 REACTIFS UTILISES POUR LA MISE EN OEUVRE DU DOT-IMMUNOBLOTT

Solution de lavage

T.B.S. 50 mM, Tris HCl, pH 7,4

NaCl 200 mM

Solution de saturation

T.B.S. 50 mM, Tris HCl, pH 7,4

Caséine (FLUKA) 1,5% (M/V)

Solution de conjugué enzyme-anticorps

C'est un anticorps de chèvre anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase

Anti-IgG (H + L) (NORDIC) 1/500 (V/V)

T.B.S. 50 mM, Tris HCl, pH 7,4

Solution de révélation

* Solution Stock : (conservation quinze jours, 4°C, obscurité)

4-chloro, 1-naphtol à 3% (M/V) dans du méthanol

* Solution extemporanée

Solution Stock

T.B.S 6 % (V/V)

H₂O₂ 30% (V/V) 0,4‰ (V/V)

Anticorps monoclonaux de référence

Anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4 BIO-YEDA (Israël), anti-IgG UNIPATH-
 OXOID dilués à 1/1000 et 1/50000 dans du T.B.S.

4.2.2.2. - Saturation des sites aspécifiques

Additionner 3 ml de solution de saturation dans une boîte de Pétri ou est déposé le filtre. Laisser incuber 1 h à 37°C, puis aspirer l'excédent de solution de saturation.

4.2.2.3. - Incubation de la solution d'AC

Ajouter 1 ml de solution d'anticorps de souris, pure ou diluée dans le T.B.S., dans un tube de 2,5 ml.

Incuber une nuit à + 4°C (ou 2 h à température ambiante), sous agitation.

4.2.2.4. - Dépôt de l'anticorps conjugué à l'enzyme

Incuber 1 ml, 2 h à température ambiante et sous agitation. Eliminer l'excès par aspiration

4.2.2.5. - Réaction enzymatique

Laver quatre fois à trois min d'intervalle avec le tampon T.B.S.

Ajouter 1 ml de solution de révélation dans le tube.

Laisser incuber 20 min à température ambiante et aspirer la solution de révélation. Stopper la réaction par 3 lavages à l'eau distillée.

Laisser sécher.

Les filtres doivent être conservés à l'abri de la lumière. La coloration est évaluée à l'oeil ou par densitométrie (GRETAG, Regensdorf, Suisse).

4.2.3. - Mise au point du test

La sensibilité est testée par différentes quantités de revêtement :

500 ng par dot - 200 ng par dot - 100 ng par dot et 50 ng par dot

5 - SELECTION DES CLONES DESIRÉS

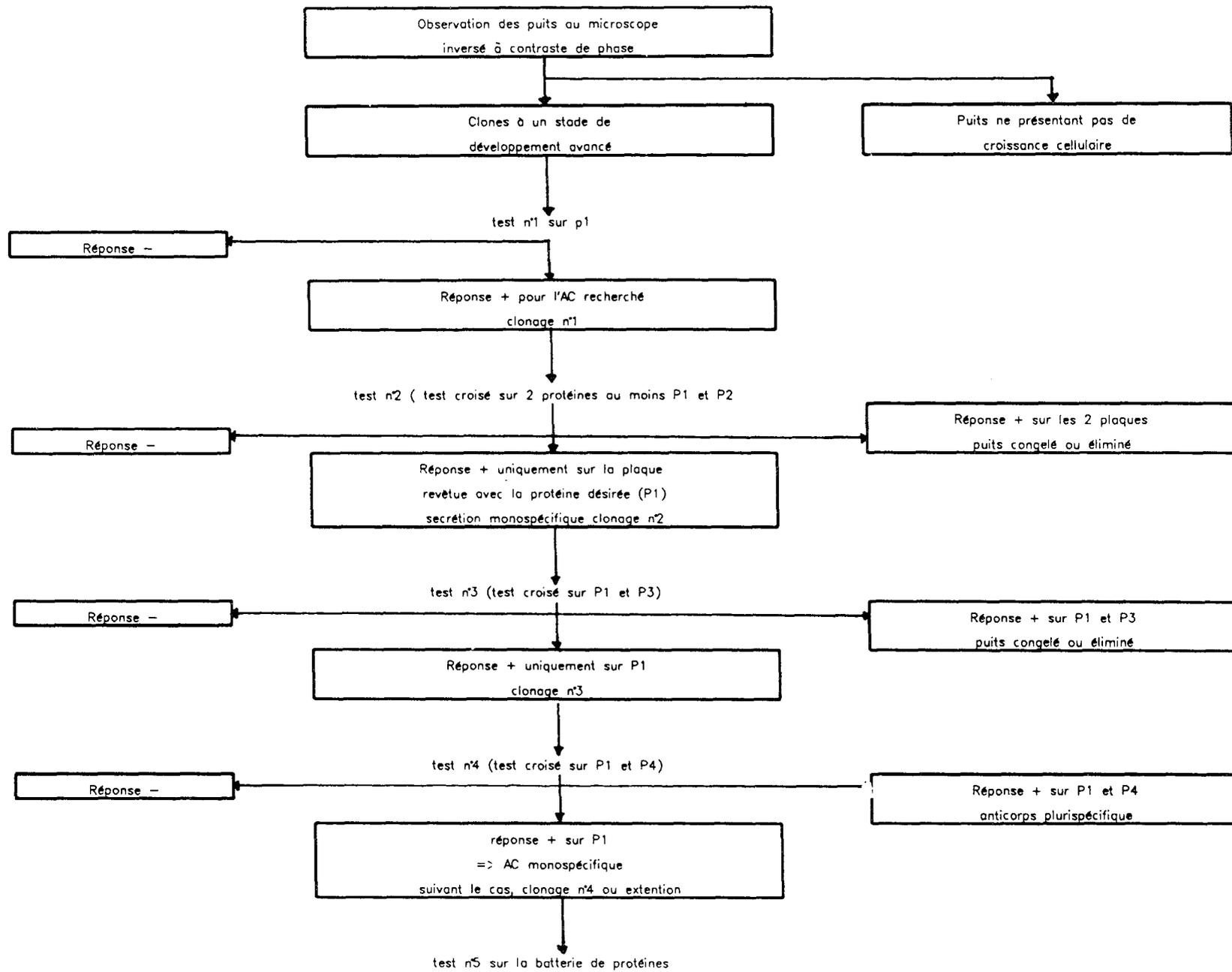
Lorsque des clones cellulaires sont observables dans les puits de culture, le surnageant peut être récolté afin d'être testé par la méthode choisie.

Le surnageant est prélevé sous hotte à flux laminaire afin de préserver la culture des micro-organismes et champignons.

Avec des micro-plaques de 96 puits, on récolte 150 μ l par puits, avec des plaques de 24 puits, on peut aspirer 1,5 ml de surnageant. La majeure partie de nos fusions ont été effectuées sur des microplaques de 96 puits, ce qui ne permet de tester les anticorps sécrétés que sur une seule spécificité (P1). Or des tests croisés s'avèrent nécessaires pour sélectionner des hybridomes monospécifiques. Afin de nous permettre de tester simultanément sur plusieurs protéines de revêtement P1 et P2 de sous-classes différentes, nous avons dilué les surnageants de culture de manière à avoir des volumes autorisant plusieurs tests.

Le 1er test permet d'éliminer les puits qui donnent des réponses positives dans les 2 cas, afin de ne garder qu'un clone potentiellement monospécifique.

Ce puits est alors cloné à nouveau et dès que son état de développement cellulaire le permet, testé à nouveau sur la protéine recherchée et sur une 3ème protéine (P3). La technique peut être aussi poursuivie par un test sur une quatrième protéine (P4) d'isotype différent de P1, P2 et P3 (fig. 12).



69

Figure 12

Schéma chronologique du clonage

P1, P2, P3 et P4 sont des protéines, immunoglobulines humaines d'isotype différent

Exemple de stratégie : recherche d'un anticorps anti-IgG1

*P1 = IgG1 différent de celui qui a servi à l'immunisation
P2 = IgG2 ; P3 = IgG3 ; P4 = IgG4*

6 - CULTURE - EXTENSION - CONSERVATION

En dehors de la semaine qui suit la fusion en elle-même, les hybridomes nécessitent une surveillance régulière avec changement de milieu toutes les 48 h, le temps de doublement étant très rapide.

Après les étapes de clonage, l'hybridome obtenu est étendu par passages successifs et progressifs dans des volumes de culture supérieurs (2, 10, 30 ml).

A ce moment, 2 méthodes sont possibles pour la culture du clone, in vivo ou in vitro.

6.1. - Méthode in vitro

La culture se poursuit en flacons de 75 cm³ et permet une récolte de 25 à 28 ml de surnageant tous les 2 jours.

6.2. - Méthode in vivo - technique des ascites

Des hybridomes, injectés intrapéritonéalement dans des souris, induisent la production de tumeur et de liquide d'ascite à concentration élevée en anticorps.

Les souris choisies doivent être de même espèce que celle dont dérive le myelome initial.

Des souris âgées de 6 à 8 semaines environ, reçoivent une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de pristane (2, 6, 10, 14 tétraméthylpentadécane) (SIGMA) (HOOGENRAAD N.J. et al., 1986).

10 jours après, on injecte par voie intrapéritonéale 0,5 ml de milieu de culture RPMI contenant $5 \cdot 10^6$ à 10^7 cellules.

Il se développe alors une ascite évaluée à l'oeil au bout de 10 à 15 jours. Le fluide ascitique peut alors être prélevé : les souris sont sacrifiées et la peau de l'abdomen découpée. Le liquide est prélevé stérilement dans le péritoine, puis centrifugé.

Le surnageant récupéré est immédiatement congelé afin d'éviter toute dégradation par des protéases endogènes.

On récupère environ 4 à 6 ml de liquide d'ascite par souris.

6.3. - Conservation

Par précaution, tout clone important doit être gardé en culture de façon continue. Un repiquage régulier en boîtes de 25 cm² assure une croissance régulière et permet d'effectuer un test de stabilité au cours du temps.

Deux jours avant la congélation, les hybridomes sont repiqués dans deux boîtes de 75 cm². Au jour de la congélation, les cellules sont théoriquement en phase exponentielle. Une observation au microscope permet d'évaluer leur état et d'éliminer toute suspicion d'infection par des micro-organismes. Un test de viabilité par exclusion du bleu Trypan peut être utilisé : ce test quantitatif permet de compter le pourcentage de cellules mortes qui sont identifiées par leur perméabilité à un colorant, le bleu Trypan. Cette méthode a été standardisée par Schreck (1943).

Les cellules sont mises en suspension et 10⁷ à 10⁸ cellules sont récupérées puis transférées dans un tube conique stérile de 50 ml. Il sera centrifugé 5 min à 400 X g.

Le culot est remis en suspension dans 2,5 ml de SVF. On aura pris soin de préparer 5 cryotubes dans un portoir spécial, permettant de travailler sur de la glace pilée.

500 µl de suspension cellulaire sont délivrés dans chaque cryotube. Un volume identique de SVF contenant 10% de DMSO (V/V) est ajouté rapidement, amenant la concentration finale de DMSO à 5%. Les cryotubes sont alors placés dans une boîte de polystyrène à - 70°C pendant 12 heures, puis transférés dans l'azote liquide, ceci afin d'effectuer une baisse progressive de la température.

Le DMSO est un agent cryoprotecteur qui se révèle toxique pour les cellules à concentration supérieure à 5% et à température ambiante.

On prendra donc soin de travailler à + 4°C pendant toute cette manipulation. Les cellules peuvent être conservées ainsi pendant de longues périodes. Le processus de *décongélation* est une opération délicate, qui doit être menée rapidement.

Le culot doit être décollé le plus rapidement possible en plongeant le cryotube dans un bain marie à 37°C, puis transvasé dans un volume important de RPMI, dans un tube conique qui sera alors complété à 50 ml. Une centrifugation de 5 min à 400 X g permet de laver les cellules et de les débarrasser de toute trace de DMSO. Après élimination du surnageant, les cellules sont resuspendues dans 2 à 3 ml de milieu RPMI + SVF.

Plusieurs puits de culture sont alors préparés dans une plaque de 24 puits afin d'augmenter les chances d'avoir une concentration de cellules optimale : 0,5, 1 et 1,5 ml de cellules sont déposés. La plaque est placée dans l'incubateur pour une nuit. Le milieu est changé le lendemain.

7 - CARACTERISATION DES HYBRIDOMES APRES CLONAGE

Un test ELISA effectuée avec 30 protéines, des fragments d'immunoglobulines et des chaînes légères permet de déterminer la spécificité de l'anticorps sécrété. Il reste à ce moment à caractériser son isotype. Cela est possible par une méthode de double diffusion selon *Ouchterlony* (1962).

7.1. - Principe

Anticorps et antigènes diffusent spontanément dans la gélose.

Il se forme au point d'équilibre entre AG et AC, un arc de précipitation, visible directement ou par coloration.

L'apparition de l'arc de précipitation n'est possible que lorsqu'on se trouve dans la zone d'équivalence, sans excès de l'un ou l'autre des réactifs.

7.2. - Protocole

7.2.1. - Réactifs

Gelose : Agar noble (DIFCO), à 1,3% (p/V) dans du tampon veronal 50 mM pH 8,4

Antigenes

Anticorps de lapin anti-IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgM de souris (TAGO, Burlingam, USA).

Ils sont utilisés dilués au quart dans du PBS.

Anticorps

Ce sont les AC secrétées dans le surnageant de culture. Celui-ci est concentré environ 20 fois sur Centriscart (SARTORIUS, Gottingen, RFA), par une centrifugation de 30 min à 2000 t/min.

7.2.2. - Déroulement de la manipulation

Les lames de gelose sont couées sur des lames de microscope.

6 puits périphériques autour d'un puits central sont découpés à l'emporte-pièce.

10 µl d'antisérum sont déposés dans le puits central.

Les puits périphériques sont remplis avec 10 µl de l'antigène à caractériser (anticorps de souris), à différentes concentrations allant du pur au 1/32 par dilution de demi. La lame est mise à incuber 48 h au moins à température ambiante et en atmosphère humide. La migration est lente. Les zones de précipitation sont observables sur fond noir.

Les lames peuvent être colorées à l'amido-schwarz :

| | | |
|---|-------|----|
| amido-schwarz 10 B | 1 | g |
| CH ₃ COO Na, 3H ₂ O | 6,12 | g |
| acide acétique | 27 | ml |
| glycerine | 100 | ml |
| eau distillée q.s.p. | 1 000 | ml |

et décolorées à l'acide acétique dilué au 1/10ème.

8 - PURIFICATION DES ANTICORPS

Le choix de la méthode de purification de l'anticorps de souris est dicté par la classe à laquelle appartient l'anticorps de souris.

Les anticorps de classe G seront purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose 4B.

Les anticorps de classe M seront purifiés par chromatographie d'affinité sur Concanavaline A-Sepharose.

8.1. - Purification des IgG sur protéine A-Sepharose 4B

8.1.1. - Principe

La chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose 4B est une méthode simple de purification des immunoglobulines de souris.

La protéine A est connue pour adsorber spécifiquement les IgG2a, IgG2b, IgG3 et avec une moindre affinité, les IgG1, IgM et IgA (EY P.L. et al., 1978).

Dans des conditions de pH définies, les anticorps de classe G se fixent par leur partie Fc à la protéine A. Une élution séquentielle créant un gradient de pH, permet d'éluer les IgG1, qui sont le plus faiblement liés, puis les IgG2a, IgG3 et IgG2b.

8.1.2. - Méthode

8.1.2.1. - Protéine A-Sepharose 4B (Pharmacia LKB, Uppsala, Suède)

4 ml de gel sont utilisés, dans une colonne 8 X 80 mm. Toutes les manipulations sont effectuées en chambre froide, à + 4°C.

8.1.2.2. - Tampons utilisés

Tampon A : phosphate de sodium 0,1 M - pH 8,1

Tampon B à E : citrate de sodium/acide citrique 0,1 M - pH variant de 5,5 à 3

Les tampons sont filtrés préalablement sur une membrane 0,22 μ m. Les fractions recueillies sont neutralisées par une solution de phosphate dipotassique 1 M.

8.1.2.3. - Protocole

* Injection de l'échantillon

L'échantillon à purifier peut être du liquide d'ascite ou du surnageant de culture. Son pH doit être ajusté à 8,1 avec de la soude 1 M ou par dialyse, une nuit contre le tampon d'équilibrage (tampon A).

La colonne est préalablement équilibrée avec le tampon A, pendant une nuit avec un débit de 6 ml/h ou 2 h à 18 ml/h. Pendant la phase de dépôt de l'échantillon, le débit est réglé à 6 ml/h. Pour les phases d'élutions, il sera stabilisé à 18 ml/h.

La colonne est ensuite lavée avec le tampon A, jusqu'à ce que la D.O. des éluats, lue par spectrométrie d'absorption à 280 nm, atteigne 0. Ceci permet d'éliminer les protéines contaminantes, dont les IgM et les IgA qui ne se lient pas au support.

* Elution des IgG

Cette elution est séquentielle et permet de séparer facilement les sous-classes. Les valeurs de pH utilisées sont récapitulées dans le tableau XI.

TABLEAU XI
ELUTION SEQUENTIELLE PAR PALIERS DE pH UTILISEE POUR LA SEPARATION
DES IgG DE SOURIS SUR COLONNE DE PROTEINE A

| | IgG1 | IgG2a | IgG3 | IgG2b |
|-------------------------------------|------|-------|------|-------|
| <i>pH recommandé pour l'élution</i> | 5,5 | 4 | 3,5 | 3 |
| <i>Tampon utilisé</i> | B | C | D | E |

* *Regénération de la colonne*

La colonne est régénérée par passage pendant 2 h du tampon E, avec un débit de 18 ml/h.

Le cycle se termine par un rééquilibrage de la colonne à pH 8,1 avec le tampon A. Elle est prête pour une nouvelle utilisation. Elle peut être utilisée pour 50 cycles si elle est utilisée avec les précautions nécessaires.

Les éluats correspondants aux différents pics sont rassemblés, ajustés à pH 7 avec de la soude 1 N, puis concentrés par ultrafiltration sur membrane AMICON de 10 000.

Ils sont conservés à -20°C par fractions de 1 ml.

8.2. - Purification des IgM sur Con A - Ultrogel

8.2.1. - Principe

La chromatographie d'affinité sur Con A - Ultrogel permet de purifier les glycoprotéines et les polyoses. Elle peut donc être utilisée pour la purification des IgM.

La concanavaline A est une lectine qui présente une affinité pour les résidus α -D-mannopyranosyl, et α -D-glucopyranosyl et des produits de configuration tridimensionnelle voisine.

Les IgM comportant de nombreux résidus glycosyles, se fixent spécifiquement sur Con A-Ultrogel. La fixation est réversible et les IgM adsorbés peuvent être libérés par une substance compétitive, tel α -D-méthylmannose.

8.2.2. - Méthode

8.2.2.1. - Concanavaline A-Ultrogel (IBF, Villeneuve la Garenne, France)

38 ml de gel sont utilisés dans une colonne (16 X 190 mm). La manipulation s'effectue à l'abri de la lumière.

8.2.2.2. - Tampons utilisés

Tampon A : 50 mM Tris HCl - pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM MnCl₂

1 mM CaCl₂

Tampon B : 50 mM Tris HCl - pH 7,4

100 mM NaCl

1 mM MnCl₂

1 mM CaCl₂

Tampon C : 50 mM Tris HCl - pH 7,4

100 mM NaCl

1 mM MnCl₂

1 mM CaCl₂

30 mM α -D-méthylmannose

Tampon D : 200 mM Tris HCl - pH 8,5

500 mM NaCl

Tampon E : Citrate trisodique 150 mM ajusté à pH 4 avec de l'acide citrique

150 mM.

Les tampons sont filtrés préalablement sur une membrane 0,22 μm .

3.2.2.3. - Protocole

* Injection de l'échantillon

La colonne est équilibrée avec le tampon A une nuit avec un débit de 20 ml/h ou 4 h avec un débit de 64 ml/h.

L'échantillon à purifier peut être du liquide d'ascite injecté après clarification par centrifugation ou du surnageant de culture concentré par ultra-filtration sur membrane AMICON 10 000. Il est injecté dans la colonne par volume de 8 ml. Le débit est ajusté à 64 ml/h.

Le tampon A est passé pendant environ 3 h, de telle manière que l'échantillon soit en contact avec toute la hauteur de colonne.

La chromatographie est alors arrêtée 30 min pour permettre une interaction lectine-glycoconjugue satisfaisante. Le gel est ensuite lavé avec le tampon A afin d'éliminer les protéines contaminantes, jusqu'à ce que la D.O. de l'éluat, mesurée par spectrométrie d'absorption à 280 nm, revienne à 0, et de même manière avec le tampon B.

* Elution des IgM

L'elution des IgM se fait par adjonction dans le tampon d' α -méthylmannose. On utilise donc le tampon C, jusqu'à ce que la D.O. de l'éluat reviennent à 0.

* Régénération de la colonne

La colonne est ensuite lavée une nuit avec le tampon A, avec un débit de 20 ml/h puis 6 h avec chaque tampon D et E, avec un débit de 64 ml/h.

Elle est alors rééquilibrée avec le tampon A, une nuit avec un débit de 20 ml/h. Elle est prête pour un nouveau cycle de chromatographie.

Les éluats correspondants au pic d'IgM sont rassemblés, dialysés une nuit contre du PBS, et stockés à - 20 °C.

8.3. - Contrôle de la purification

8.3.1. - Electrophorèse

La détermination de la pureté des anticorps se fait par électrophorèse en gel de polyacrylamide sodium dodecylsulfate (SDS-PAGE) dans le procédé Phast System (Pharmacia, LKB, Uppsala, Suède).

Les protéines sont mises en contact avec un détergent, le SDS, qui se lie aux régions hydrophobes des immunoglobulines, ce qui leur confère une charge globale négative. Dans un gel réticulé tel que le polyacrylamide, les protéines migrent sous l'action d'un champ électrique vers l'électrode positive. La mobilité électrophoretique est inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire, chaque molécule ayant la même densité de charge et ne migrant qu'en fonction de sa taille moléculaire.

8.3.2. - Protocole

8.3.2.1. - Réactifs

- 1 gel de gradient linéaire 8 à 25% (Phost-Gel gradient, Pharmacia)
- 2 bandes tampon SDS Buffer strips (Pharmacia)

8.3.2.2. - Solutions de développement et de coloration

Tous les pourcentages sont exprimés en volume par volume. On prépare 80 ml de chaque solution.

Solution 1 - Lavage

Ethanol 50% et acide acétique 10% dans de l'eau

Solution 2

Ethanol 10% et acide acétique 5% dans de l'eau

Solution 3 - Sensibilisant

Glutaraldehyde 8,3% dans de l'eau

*Solution 4 - Lavage**Eau**Solution 5 - Coloration**Nitrate d'argent 0,25% (p/V) dans de l'eau**Solution 6 - Développement**Solution extemporanée 0,04% formaldéhyde dans du carbonate de sodium à 2,5%**Solution 7 - Arrêt réaction**5% d'acide acétique dans de l'eau**Solution 8 - Conservation**10% acide acétique et 5% glycérol dans de l'eau**8.3.2.3. - Méthode*

La concentration de l'échantillon est déterminée par absorbance à 280 nm, et amenée à 0,5 mg/ml par dilution dans un tampon Tris/HCl - 10 mM - EDTA 1mM - pH 8,0

9 µl d'échantillon sont ajoutés à 1 µl de solution de SDS à 25% préchauffée à 37°C.

Les dépôts sont de 1 µl par puits

La migration de l'échantillon se fait automatiquement grâce à une méthode de séparation programmée, dont les paramètres optimisés sont 250 V, 10 mA, 30 W, 15°C et 60 Vh.

Le développement et la coloration du gel, étapes suivantes, se font également automatiquement.

Successivement, on a une fixation puis un lavage des ions du tampon, une sensibilisation des protéines au glutaraldéhyde, un lavage suivi d'une réaction avec des ions argent, un développement dans une solution de formaldéhyde.

La réaction est arrêtée avec de l'acide acétique, puis un dernier rinçage avec une solution de glutaraldéhyde permet une bonne conservation du gel.

9 - VERIFICATION DE LA PURETE DES PROTEINES DE LA "PROTEINOTHEQUE"

9.1. - *Principe*

Préalablement à l'injection de ces protéines aux souris et à leur utilisation pour le revêtement des plaques pour l'ELISA, nous avons choisi de vérifier si les protéines étaient exemptes de contaminations.

Pour séparer les constituants protéiques d'un mélange, l'immuno-électrophorèse, qui combine l'électrophorèse à l'immuno-diffusion radiale, est une méthode appropriée.

Les protéines du mélange sont tout d'abord séparées par électrophorèse. Dans un deuxième temps, l'antisérum est déposé dans la gouttière latérale. Par diffusion dans le gel, on constate l'apparition de complexes A6-AC sous forme d'arcs de précipitation.

9.2. - *Réactifs*

Tampon véronal - pH 8,4

Diéthylmalonylurée sodée 50 mM

Diéthylmalonylurée 10 mM

Gel de fixation

Agar noble Difco à 3% (p/V) dans de l'eau distillée

Gel de migration

Agar noble Difco 1,3% (p/V)

70 ml de tampon véronal

30 ml d'eau distillée

Colorant

Amido-Schwartz 10 B 0,79% (m/V)

Acétate de sodium 5 mM

27 ml d'acide acétique

100 ml de glycérine

873 ml d'eau distillée

Décolorant

Acide acétique dilué au 1/10ème

Lavage

Eau physiologique tamponnée à pH 6,8

9.3. - Protocole

Une couche légère d'Agar de fixation est étendue au doigt sur des lames de microscope 76 X 26 mm, qui sont ensuite mises à sécher à l'étuve à 37°C.

Les lames sont posées sur un portoir de 6 lames et bordées par le gel de migration, dont 30 ml seront ensuite coulés par châssis. Après un repos de 1 h à 4°C, les puits sont creusés à l'aide d'un emporte-pièce "gel punch".

Les solutions de protéines à tester sont déposées et mises à migrer dans le bac à électrophorèse pendant 1 h sous une intensité de 20 mA.

La gouttière centrale est alors évidée, et les antisérums sont déposés. La migration se fait par diffusion une nuit en atmosphère humide.

Les lames sont ensuite lavées 3 jours avec de l'eau physiologique tamponnée, puis une dernière fois à l'eau distillée pendant 1 h.

Elles sont enfin séchées sur du papier Whatman n° 1 à 37°C puis colorées.

RESULTATS

1 - MISE AU POINT DU TEST ELISA

Pour cette mise au point, deux anticorps de réactivité et de concentration déterminées ont été utilisés. Le substrat utilisé pour révéler le complexe AG-AC a été l'OPD, les réponses représentées par des histogrammes sur les figures 13 et 14, sont lues à 492 nm.

1.1. - Détermination de la quantité de revêtement nécessaire

Différentes plaques de microtitration ont été préparées : des revêtements en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 et IgA sont déposés à trois concentrations variant de 0,66 à 2,66 g/ml.

L'anti-IgG3 27A est utilisé aux dilutions 10^{-4} , 2×10^{-4} , et 10^{-3} .

La différence de DO entre T+ (plaques revêtues d'IgG3) et T- (plaques revêtues d'IgG1, d'IgG2, d'IgG4 et d'IgA) est supérieure à 0,9 nm, ce qui est largement supérieur aux DO obtenues avec les T-, et ceci avec les trois types de revêtements (fig. 14). La concentration de revêtement utilisable est donc celle correspondant à une quantité de 50 ng par puits.

1.2. - Contrôle de la spécificité du test

Sur la figure 13 sont représentés les résultats obtenus avec deux types d'expériences.

D'une part, trois dilutions (10^{-4} , 10^{-3} et 10^{-2}) d'anti-IgG3 27A ont été déposées sur des plaques T+ (200 ng d'IgG3 MET) et des plaques T- (IgG1, IgG2, IgG4 et IgA à 200 ng par puits).

D'autre part, trois dilutions (10^{-1} , 5×10^{-2} et 10^{-2}) d'anti-IgG4 ont été déposées sur des plaques T+ (100 ng d'IgG4 HUI) et des plaques T- (IgG1, IgG2, IgG3 et IgA à 100 ng par puits).

On s'aperçoit que l'anti-IgG3 n'est reconnu que par l'IgG3, et que l'anti-IgG4 n'est reconnu que par l'IgG4. L'anti-IgG3 peut être employé à la dilution 10^{-4} (90 ng/ml), l'anti-IgG4 à la dilution 5×10^{-2} (40 µg/ml) avec les types de revêtements utilisés.

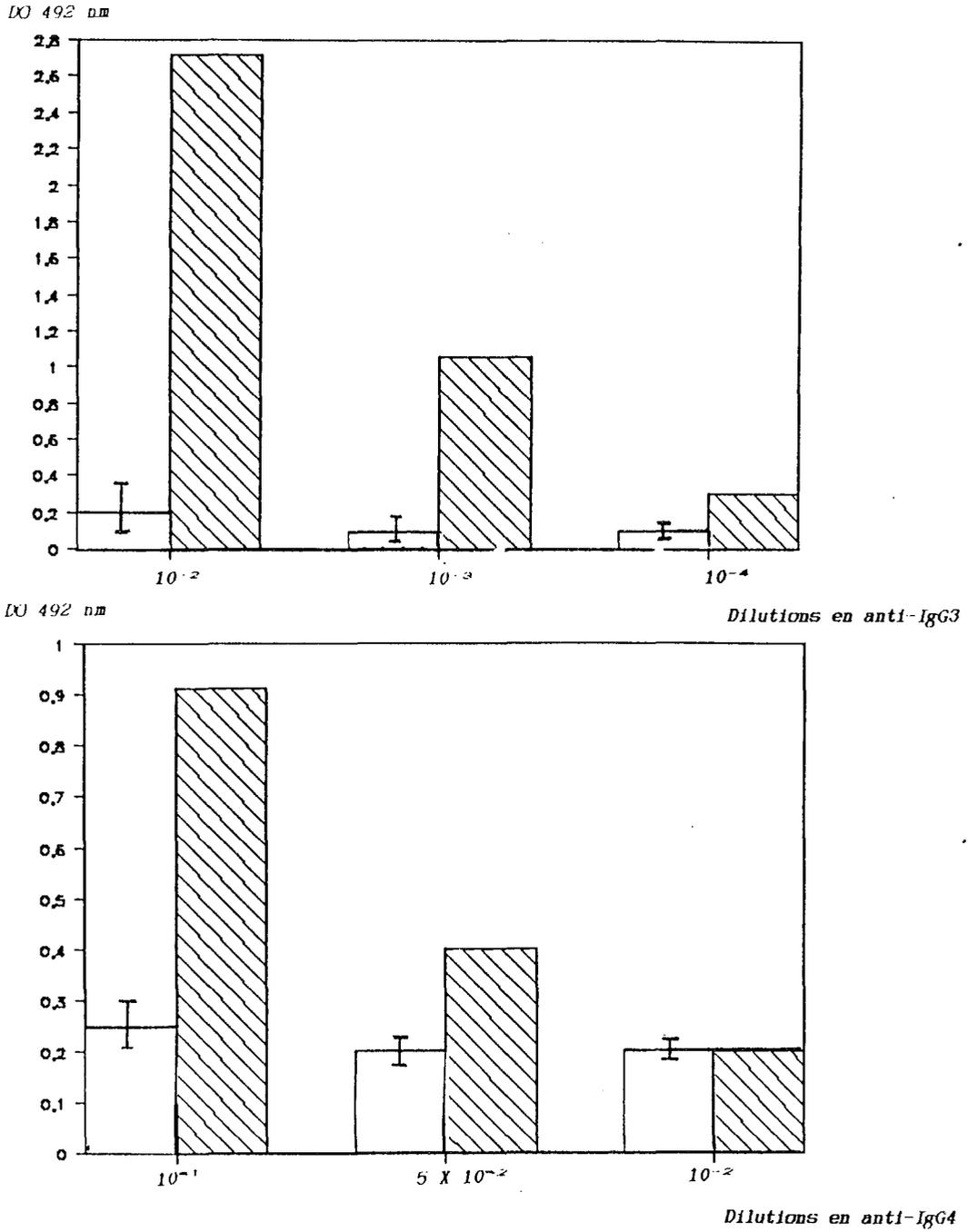


FIG. 13 - Contrôle de la spécificité du test ELISA

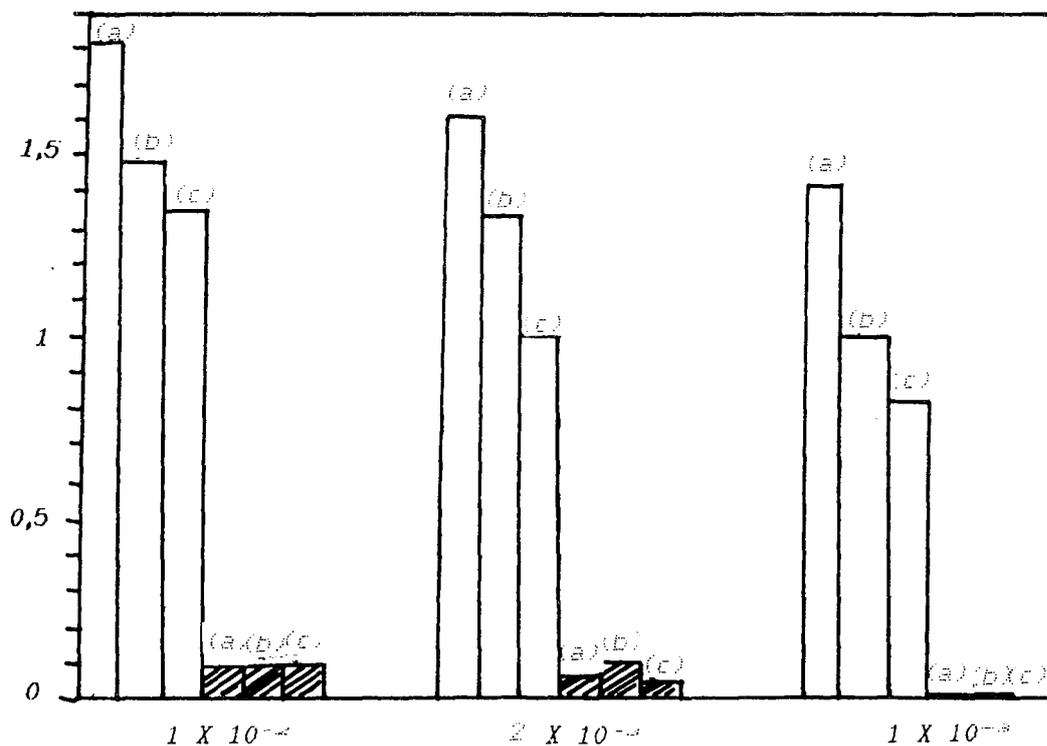
| Pour anti-IgG3 | | Témoins positifs | Quantité de revêtements/puits |
|----------------|---|-----------------------|-------------------------------|
| Positif |  | IgG3 MEI | 200 ng |
| Négatif |  | IgG1, IgG2, IgG4, IgA | 200 ng |
| Pour anti-IgG4 | | Témoins positifs | Quantité de revêtements/puits |
| Positif |  | IgG4 HUI | 100 ng |
| Négatif |  | IgG1, IgG2, IgG3, IgA | 100 ng |

1.3. - Contrôle de la sensibilité du test

Le test ELISA sert à détecter les AC monoclonaux murins produits par nos hybridomes. Sa sensibilité a donc été testée pour voir quelle quantité minimale d'AC il pouvait détecter.

Sur des revêtements en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 et IgA de 50 ng par puits, trois dilutions (10^{-2} , 2×10^{-3} , et 10^{-3}) d'anti-IgG3 sont déposées. Le test est capable de détecter une quantité de 0,9 $\mu\text{g/ml}$ (dilution de 10^{-3}). Ces résultats sont représentés sur la figure 14.

DO 492 nm



Revêtement en IgG3 Met à 200 (a), 100 (b) et 50 (c) ng/puits

en (IgG1 + IgG2 + IgG4 + IgA) à 200 (a), 200 (b), et 50 (c) ng/puits

FIG. 14 Contrôle de la sensibilité du test ELISA grâce à l'anti-IgG3 27A.

2 - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DES "DOT BINDING IMMUNO-ASSAYS"

2.1. - *Optimisation*

Plusieurs paramètres des conditions expérimentales utilisées aux laboratoires des Stallergènes ont été testés, les conditions initiales utilisant de trop grandes quantités d'antigène et se déroulant sur deux jours.

Chaque paramètre a été modifié individuellement au cours des manipulations. Les meilleurs résultats obtenus sont ceux consignés dans le tableau XII.

Les résultats permettent d'envisager une réduction de la durée du temps d'incubation des immunoglobulines de souris de 8 à 2 heures, ainsi qu'une dilution de celles-ci à 10^{-2} . Le revêtement en immunoglobulines peut être constitué par une goutte (dot) contenant 50 ng au lieu de 500 ng, permettant ainsi d'économiser ce matériel précieux.

TABLEAU XII
OPTIMISATION DES CONDITIONS DE MISE EN OEUVRE DE
LA TECHNIQUE DES "DOT BINDING IMMUNO-ASSAYS"

| CONDITIONS | DOT | SATURATION | | INCUBATION IMMUNOGLOBU- DE SOURIS | | | INCUBATION CONJUGUE | |
|------------|--------|------------|-------------|--------------------------------------|-------------|-----------|---------------------|-------------|
| | | DUREE | TEMPERATURE | DUREE | TEMPERATURE | DILUTION | DUREE | TEMPERATURE |
| Initiales | 500 ng | 1 h | Ambiante | 8 h | Ambiante | Pur | 2 h | Ambiante |
| Optimales | 50 ng | 1 h | Ambiante | 2 h | Ambiante | 10^{-2} | 2 h | Ambiante |

2.2. - Contrôle de la spécificité du test

La spécificité du test a été vérifiée avec certaines immunoglobulines utilisées également pour le revêtement du test ELISA.

Les IgG SIG sont un mélange commercial d'immunoglobulines, vraisemblablement constitué d'une majorité d'IgG1 et IgG2, ainsi que le montrent les résultats dans le tableau XIII.

La seule distorsion semble être une réponse de l'IgG2 RAI avec l'anti-IgG3 et de l'IgG4 HUI avec l'anti-IgG1

TABLEAU XIII

CONTROLE DE LA SPECIFICITE DU TEST DES "DOT BINDING IMMUNO-ASSAY"

| AG = DOT | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgG | IgG | IgG | IgG | IgG | IgG |
|-----------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AC | SIM | RAI | BR1 | HUI | BER | CHE | LAR | THE | ZEE | SIG |
| Anti IgG1 | + | | | + | + | + | + | + | + | + |
| Anti IgG2 | | + | | | | | | | | + |
| Anti IgG3 | | + | + | | | | | | | |
| Anti IgG4 | | | | + | | | | | | |
| Anti IgG | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

DOT de 500 ng

Anti-IgG dilués à 10^{-3} et 2×10^{-4} de la caseïne à 1,5 mg/ml

3 - CONTRÔLE DU TITRE EN ANTICORPS DES SOURIS IMMUNISÉES

Afin de déterminer l'efficacité de l'immunisation, les anticorps contenus dans le sérum des souris sont évalués par la technique ELISA. Le sérum est dilué de 10 en 10 et testé en double dépôt sur deux types de plaques :

Contrôle positif : revêtement de la plaque de microtitration avec une immunoglobuline de même classe et sous-classe que la protéine immunisante.

Contrôle négatif : revêtement de la plaque de microtitration avec des immunoglobulines de classe ou sous-classe différente de celle de la protéine immunisante.

Les réponses obtenues pour les différentes Ig étant comparables en intensité, une courbe représentant la moyenne des valeurs a été tracée pour illustrer ces résultats en figure 15.

En dehors des deux premières fusions, où la souris utilisée a été choisie au hasard dans le lot, en supposant une immunisation homogène du lot entier, le choix de l'animal sacrifié a été décidé en faveur de celui qui possède le titre le plus élevé.

Chaque sérum de souris a donc été testé vis à vis d'une protéine de même classe que celle choisie pour l'immunisation et de protéines de contrôle négatif. Un exemple est donné par la figure 16, représentant la réponse immune de trois souris immunisées avec l'IgG4 FOI dans un lot de souris Biozzi.

Le sérum témoin négatif est prélevé chez une souris n'ayant pas subi d'immunisation.

Les trois souris testées présentent toutes un état d'immunisation convenable, celle présentant la réponse la plus élevée au cours des dilutions a été choisie (souris 1).

Une ébauche de comparaison interspécifique a été réalisée entre 5 souris Balb/C et Biozzi.

DO 492 nm

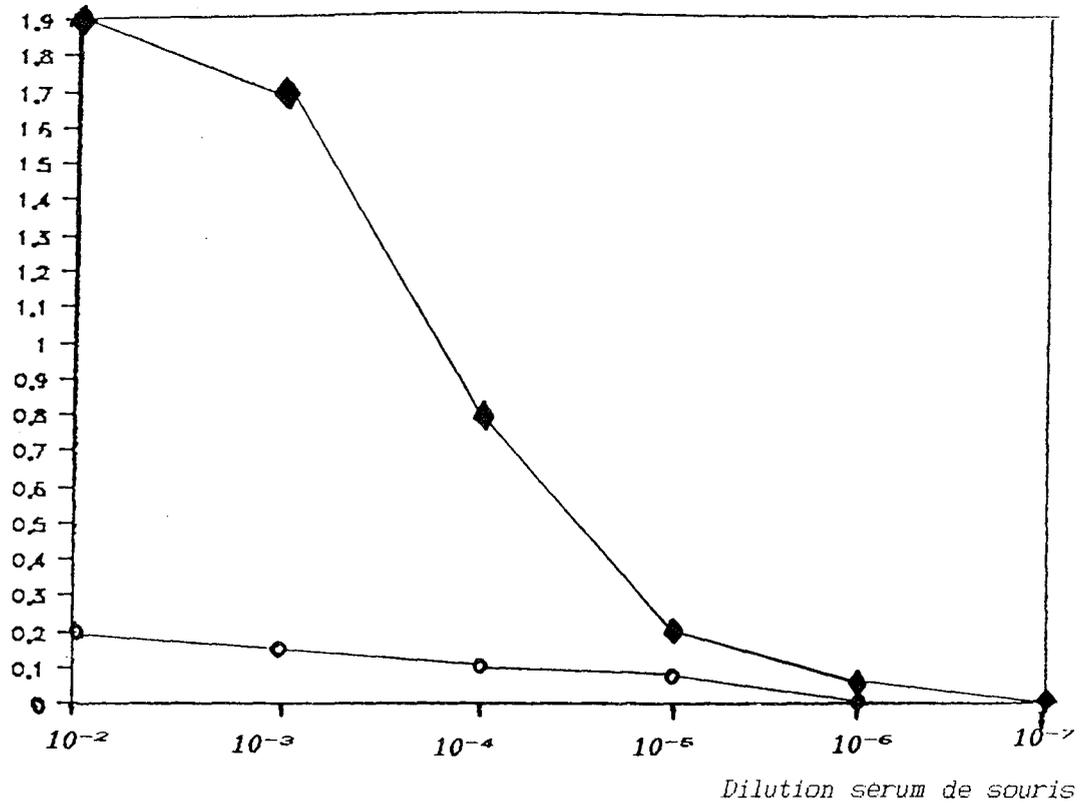


FIG 15 Réponse immune d'une souris prise au hasard dans un lot Balb/C

Revêtement IgG3 MET 100 ng/puits

Sérum de souris immunisée avec IgG3 BRI

◆

Sérum de souris n'ayant pas subi d'immunisation

○

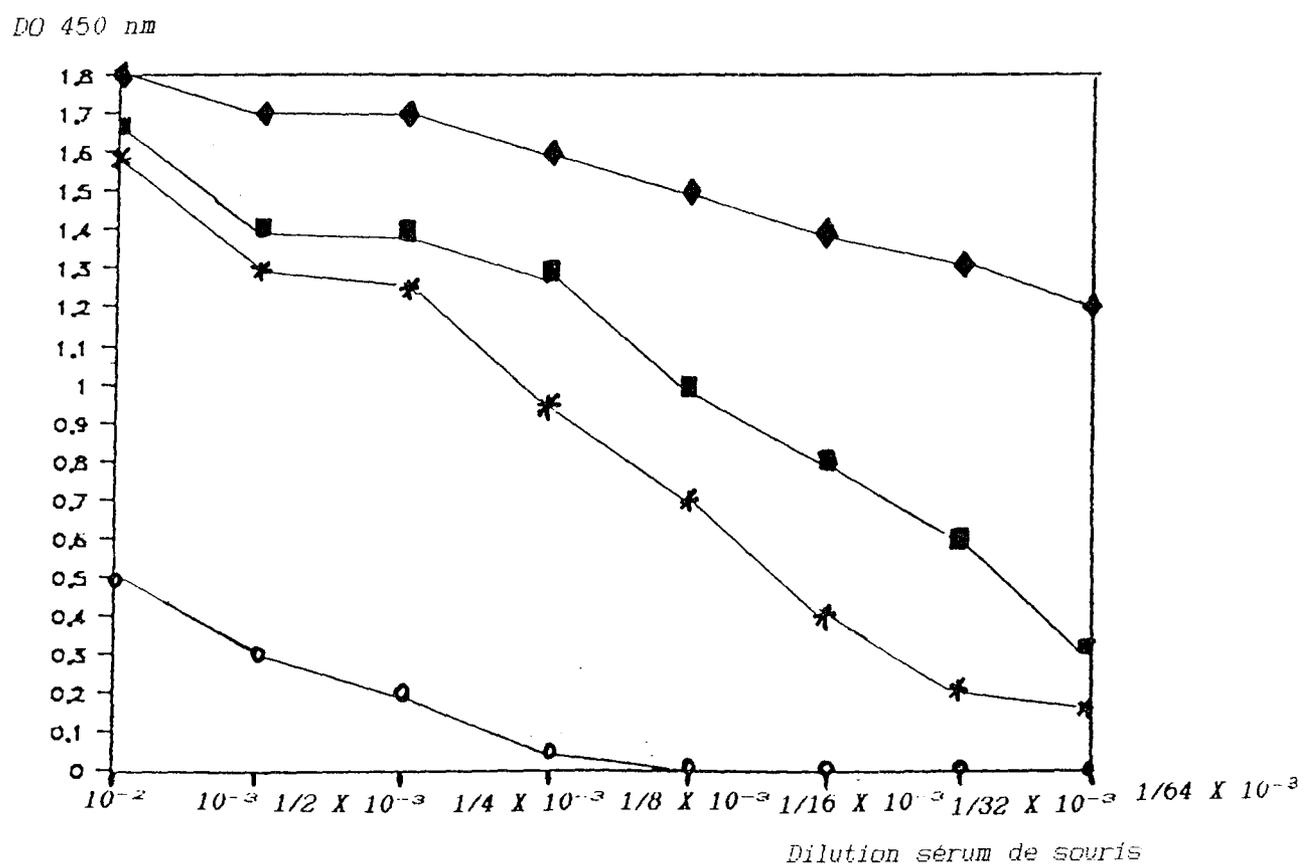


FIG 16 Réponse immune de 3 souris d'un lot Biozzi

Revêtement IgG GAZ 100 ng/puits

Souris 1, 2, 3 immunisation avec IgG4 FOI

| | |
|--------------------|---|
| souris 1 | ◆ |
| souris 2 | ■ |
| souris 3 | * |
| pas d'immunisation | ○ |

La figure 17 montre une réponse immune nettement supérieure pour la souris Biozzi. (Ceci semblerait donc corroborer l'appellation de "bonnes répondeuses" des souris de l'espèce Biozzi).

Néanmoins, ces résultats doivent être nuancés par l'existence de variations inter-individuelles mises en évidence par la figure 16, et qui ont pu introduire un biais dans les résultats. Une étude statistique devrait être entreprise afin de confirmer ces résultats.

L'expérience n'a pas été dénuée d'intérêt, puisqu'elle a permis de choisir pour la fusion G4.9 la souris la mieux immunisée, en l'occurrence une souris Biozzi.

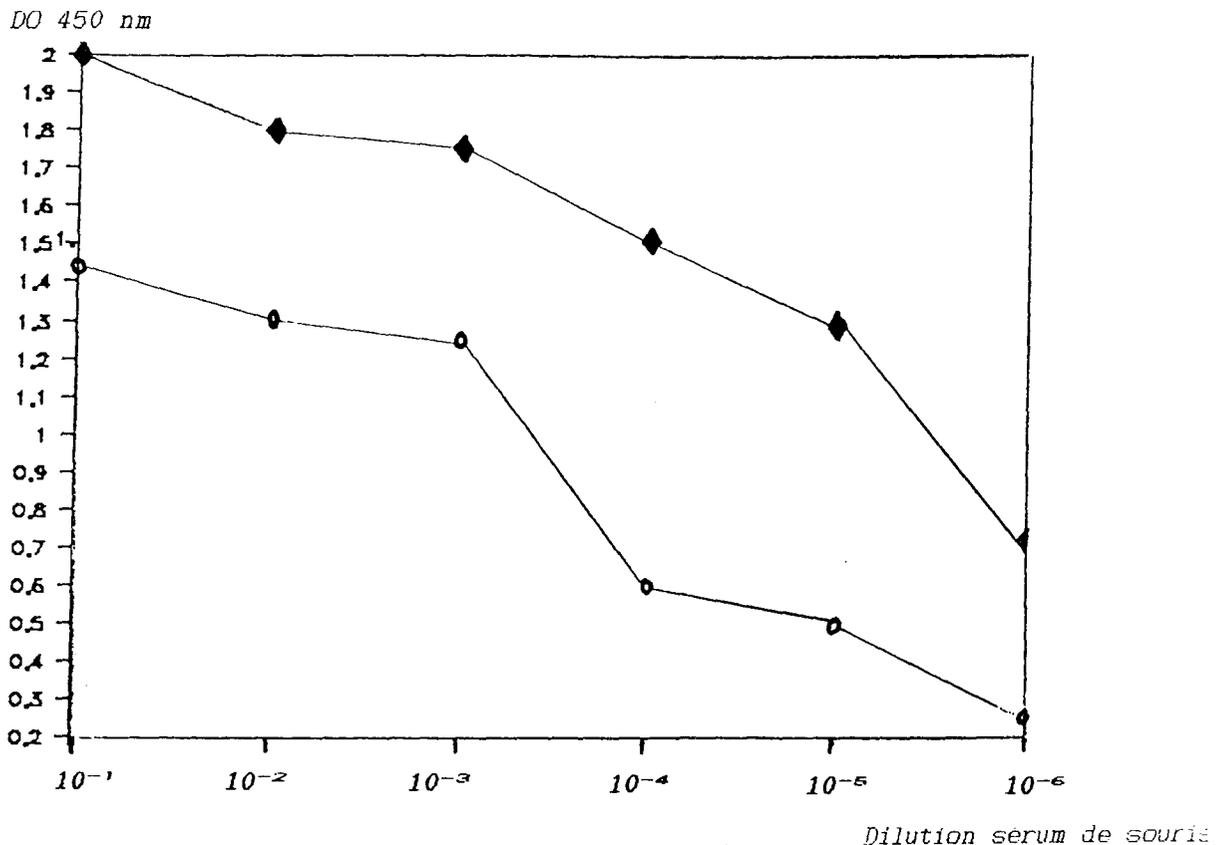


FIG. 17 Comparaison de la réponse immune interspécifique

Revêtement IgG4 HVI 100 ng/puits

Souris immunisées avec IgG4 FOI

Espèce Biozzi —◆—

Espèce Balb/C —○—

4 - RECAPITULATIF DES DIFFERENTES FUSIONS ET DENOMINATION DES CLONES OBTENUS

L'explication du cheminement des différentes étapes de clonage est nécessaire pour comprendre l'appellation des clones.

Après une première observation des clones au microscope, les puits présentant une croissance cellulaire suffisante sont testés par la technique ELISA sur un revêtement donné.

Les puits positifs sont alors clonés.

Le clonage se poursuit jusqu'à ce que tous les puits issus de ces sous-clones présentent une réponse positive homogène. La manipulation se poursuit alors par une extension des clones sécréteurs.

Par exemple, le clone M1.8/A2 H7 B6 C4 est issu de la fusion M1 (anti-IgM), de la 8ème plaque de 96 puits où le puits A2 a été cloné et cultivé dans une nouvelle plaque de 96 puits. Les puits H7, B6 ont été successivement clonés. Finalement, le puits C4 de la 3ème plaque de clonage a été évendu.

Le tableau XIV permet de visualiser les rendements obtenus au cours des différentes étapes du travail.

Légende du tableau XIV

P1 : Pourcentage de clones positifs

Exprimé en fonction du nombre total de puits testés, présentant une croissance cellulaire.

P2 : Pourcentage de clones positifs exprimés en fonction des 96 puits de la plaque de microtitration du clonage précédent.

% de clonage : Calculés par rapport au nombre total de puits initiauxensemencés au moment de la répartition de la suspension de cellules fusionnées

Exemple : Fusion n° 5

960 puits ont étéensemencés

% de croissance = $(672 \times 100)/960 = 70$

car 672 puits ont présenté une croissance cellulaire.

1er clonage :

% de clonage = $(19 \times 100)/960 = 1,9$

car 19 ont été choisis pour être clonés.

2ème clonage :

% de clonage = $(16 \times 100)/960 = 1,6$

car 16 puits ont été choisis pour être clonés

$P2 = (16 \times 100)/19 = 84$

84% des premiers clonages ont donné naissance à des puits présentant une positivité intéressante.

3ème clonage :

% de clonage = $(7 \times 100)/960 = 0,73$

$P2 = (7 \times 100)/16 = 43,7$

Extension

% des puits étendus $(2 \times 100)/960 = 0,2$. Le rendement de la fusion par rapport aux 960 puitsensemencés est de 0,2%.

TABLEAU XIV Récapitulatif des fusions effectuées, avec les différents rendements obtenus a chaque étape

| Fusion | | Injection | Revêtement de détection | % de croissance | %+ P1 | % de Clonage | %+ P2 | Hybridomes obtenus | |
|--------|--------|-----------|--------------------------|--------------------------------|-------|---|----------------------|--|--|
| Numéro | Nom | | | | | | | | |
| 1 | G | IgG3 BRI | IgG3 MET | 80 | 39 | 1. 13,2 2. 3,7 3. 3,7 4. | 29 100 | anti-IgG anti-(IgG+IgA) anti-Lambda | |
| 2 | G bis | IgG4 HRU | IgG4 HUI | 28 | 26 | 1. 5,8 2. 2,9 3. 0,8 | 50 28,5 | un anti-Lambda | |
| 3 | G.4.1 | IgG4 HRU | IgG4 HUI | 9,6 | 0 | 0 | 0 | | |
| 4 | G.4.2 | IgG4 HRU | IgG4 HUI | 1 | 0,1 | | | | |
| 5 | G.4.3 | IgG4 HRU | IgG4 HUI | 70 | 14 | 1. 1,9 2. 1,6 3. 0,73 4. 0,2 | 84 43,7 28,6 | 4.3 5E9B5E2C7 Anti-IgG4 4.3 5F8E6B9H9 Anti-IgG4 | |
| 6 | M.1 | IgM LAT | IgM BON | 38 | 11 | 1. 2,5 2. 1,4 3. 1,1 4. 1,1 | 58,3 78,6 100 | M1 & M13 -> M8 : anti IgM | |
| 7 | G.4.4 | IgG4 HRU | IgG4 HUI | 27 | 2 | 1. 0,52 2. 0,1 3. 0 4. | 25 - - - | | |
| 8 | G.4.5 | IgG4 POI | IgG4 HUI | 72 | 4,5 | 1. 2,7 2. 0,41 3. 0 4. | 15,4 - - - | | |
| 9 | G.4.6 | IgG4 POI | IgG4 HUI | 30 | 17 | 1. 2,1 2. contaminée 3. - 4. | | | |
| 10 | G.4.7 | IgG4 POI | IgG4 HUI | 98 | 40 | 1. 1,9 2. - 3. - 4. | 1,7 - - - | | |
| 11 | A.1 | IgA LEM | IgA BOU | 81 | 20 | 1. 4,9 2. 3,5 3. 2,6 4. 1,9 | 72,3 73,5 72 | A1 & A18 -> A10 : anti IgA | |
| 12 | G.3.1 | IgG3 BRI | IgG3 MET | contaminée dès les puits-mères | | | | | |
| 13 | G.4.8 | IgG4 POI | IgG4 HRU | 85 | 4 | 1. 2 2. contaminée 3. 4. | | | |
| 14 | G.4.9 | IgG4 POI | mélange synthétique IgG4 | 96 | 30 | 1. 3 2. 0,4 3. 0,2 4. 0,1 | 13 50 50 | 4.9 4F6B9 -> anti-IgG4 | |
| 15 | G.4.10 | IgG4 POI | mélange synthétique IgG4 | 74 | 18 | 1. 1,6 2. 0,3 3. contaminée 4. | 17,6 | Anti-IgG | |
| 16 | D.1 | IgD SAL | IgD LIN | 81 | 16 | 1. 3,3 2. 0,18 3. 1,6 4. 1,3 | 56,2 83,3 86,6 | 30 clones -> anti-IgD | |

Au travers de ce tableau, on s'aperçoit que 9 fusions ont un pourcentage de croissance élevée, compris entre 70 et 98%, 4 fusions ont une croissance moyenne de 30%, et 3 fusions ont une croissance très faible, voire nulle. Une fusion a avorté dès le début, par contamination des puits mères. Ces pourcentages de croissance sont à discuter en fonction des conditions opératoires (présence ou non de cellules nourricières, quantité de splénocytes utilisés, rapport lymphocytes/splénocytes), exposées dans le tableau IV. Cette discussion sera abordée dans le chapitre 4.

On peut remarquer qu'il n'existe pas de lien évident entre le pourcentage de croissance élevée, le pourcentage de positifs P1 et le rendement final de la fusion.

A la dernière étape de la fusion, qui met en jeu un procédé d'extension des cellules en boîtes de 24 puits, puis en flacons de 25 cm², on procède à une caractérisation des surnageants de culture sur toute la protéinothèque disponible. Ce test est pratiqué avec un revêtement de 100 ng/puits, le substrat utilisé est le TMB (lecture à 450 nm).

Le témoin positif est constitué d'un pool de surnageants de culture, le témoin négatif est soit du milieu de culture neuf, soit du PBS-Tween.

5 - CARACTERISTIQUES DES CLONES ANTI-IgG

Deux fusions sur les 16 effectuées ont donné naissance à des clones anti-IgG, répondant de manière homogène vis à vis de chaque sous-classe.

Ce sont les fusions G (n° 1) et G 4.10 (n° 15).

Un exemple des résultats obtenus est donné par le tableau XV pour les clones G 7.1, G 7.2 et G 4.10.

Dans un premier temps, la spécificité des immunoglobulines secrétées est déterminée sur des surnageants purs ou dilués au 1/2.

TABLEAU XV Caractéristiques du surnageant des clones G7.1, G7.2, G4.10

| NOM | CLASSE | SOUS CLASSE | TYPE ch. leg. | G4.10 | G7.1 G7.2 |
|-----|--------|-------------|---------------|-------|-----------|
| GAZ | G | 1 | K | +++ | nd |
| GIM | G | 1 | L | +++ | ++ |
| MCH | G | 1 | L | + | nd |
| RAS | G | 1 | K | +++ | + |
| JAN | G | 2 | K | +++ | + |
| NIC | G | 2 | K | +++ | ++ |
| RAD | G | 2 | L | +++ | + |
| RAI | G | 2 | L | +++ | 0 |
| BRI | G | 3 | L | 0 | +++ |
| MET | G | 3 | K | ++ | ++ |
| SLA | G | 3 | K | +++ | ++ |
| CHA | G | 4 | L | + | nd |
| HRU | G | 4 | K | ++ | nd |
| HUI | G | 4 | L | ++ | +++ |
| POI | G | 4 | K | +++ | +++ |
| BOU | A | 1 | K | 0 | 0 |
| LEM | A | 1 | K | 0 | 0 |
| LOP | A | 1 | K | 0 | 0 |
| ROB | A | 1 | K | 0 | 0 |
| TRO | A | 1 | L | 0 | 0 |
| BIC | M | | K | 0 | 0 |
| BON | M | | L | 0 | 0 |
| DES | M | | K | 0 | 0 |
| GAT | M | | K | 0 | 0 |
| LAT | M | | K | 0 | 0 |

| |
|----------------------|
| DO de 0 à 0.5 : 0 |
| DO de 0.5 à 0.75 : + |
| DO de 0.75 à 1 : ++ |
| Do de 1 à 1.5 : +++ |

nd : non déterminé - Valeur T+ : 1,71 - Valeur T- : 0,1 - Surnageant de culture dilué au 1/2

Sont considérées comme négatives, les clones donnant une réponse inférieure à une D.O de 0,5. Cette limite a été déterminée en fonction de la valeur du témoin négatif et du nombre relativement élevé de clones donnant des réponses supérieures au T - (0,3 environ) et inférieure à 0,5. Les premiers tests ont été effectués, pour la fusion G, sur l'IgG3 MET et sur un mélange de 4 IgG4 à parts égales. Le mélange avait pour but d'optimiser la détection des clones sécrétant des anticorps anti-IgG4.

Par la suite, une caractérisation approfondie est entreprise. Les surnageants, dilués en cascade de 10 en 10, sont testés sur toute la batterie d'immunoglobulines de revêtement. Le résultat final est exprimé par la dernière dilution donnant une réponse qualifiée de moyenne (DO de 0,5 à 0,75) par rapport au témoin négatif, par exemple la dilution 10^{-4} . Le titre est l'inverse de cette dernière dilution, 10^4 dans l'exemple donné.

La caractérisation a été poursuivie par une étude de la réactivité vis à vis de fragments d'immunoglobulines, obtenus par dégradation enzymatique d'IgG1, et de chaînes légères kappa et lambda.

Les résultats de ces différents tests sont donnés par les tableaux XVI et XVII.

Détermination du titre en Anticorps des surnageants de culture des Fusions G et G bis vis à vis des immunoglobulines non fragmentées

| NOM | CLASSE | SOUS CLASSE | TYPE ch. leg. | G39 G39.2 | G76.1 G76.3 | G110.1 G110.2 G110.3 | G125 | G173.1 G173.2 | G199.2 G199.3 | G223.1 G223.2 | Gb127 |
|-----|--------|-------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| GAZ | G | 1 | K | 10 ¹ | 10 ⁴ | 10 ³ | 0 | | 10 ⁴ | | |
| GIM | G | 1 | L | 10 ³ | 10 ⁴ | | 10 ³ | | | 10 ⁴ | |
| MCH | G | 1 | L | 10 ⁴ | 10 ⁴ | | | 10 ³ | | | 10 ⁵ |
| RAS | G | 1 | K | 10 ² | 10 ⁴ | | | | | | 10 ⁴ |
| JAN | G | 2 | K | 10 ² | 10 ³ | 10 ³ | | 10 ³ | 10 ² | | |
| NIC | G | 2 | K | 10 ⁴ | 10 ³ | | 0 | | | | |
| RAD | G | 2 | L | 10 ⁴ | 10 ³ | | 10 ³ | | | 10 ⁴ | 10 ⁴ |
| RAI | G | 2 | L | 10 ² | 10 ³ | | | | | | 10 ² |
| BRI | G | 3 | L | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ² | 10 ³ | 10 ⁴ | 10 ⁴ | 10 ⁴ |
| MET | G | 3 | K | 10 ² | 10 ³ | | | | | | 10 ² |
| SLA | G | 3 | K | 10 ² | 10 ³ | | 10 ⁴ | | | | |
| CHA | G | 4 | L | 10 ³ | 10 ³ | | | | | | 10 ⁴ |
| HRU | G | 4 | K | 10 ² | 10 ³ | 10 ² | 0 | 10 ³ | | pur | 10 ⁴ |
| HUI | G | 4 | L | 10 ⁴ | 10 ³ | | 10 | | pur | | |
| POI | G | 4 | K | 10 ⁴ | 10 ³ | | | | | | |
| BOU | A | 1 | K | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| LEM | A | 1 | K | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| LOP | A | 1 | K | 0 | 0 | | | 10 ⁴ | | | |
| ROB | A | 1 | K | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| TRO | A | 1 | L | 10 ⁴ | 10 ¹ | | 10 ³ | | 10 ⁴ | 10 ⁴ | 10 ⁴ |
| BIC | M | | K | pur | 10 ⁴ | | | 10 ⁴ | | | |
| BON | M | | K | 10 ⁴ | 10 ² | | | | 10 ⁴ | 10 ⁴ | 10 ² |
| DES | M | | K | 0 | pur | | 0 | | | | |
| LAT | M | | K | 10 ⁴ | 10 ⁴ | 10 ¹ | | | | | |

TABLEAU XVII Caractérisation du titre en anticorps des surnageants des clones des fusions G et G bis vis à vis de fragments d'immunoglobulines et de chaînes légères

| | G39 | G76.1 | G110.3 | G125 | G173.1 | G199.2 | G223 | Gb127 |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 100 ng/puits | G39.2 | G76.3 | | | | | | |
| FAB GEN (L) | 10 ³ | 10 ¹ | pur | 10 ¹ | 10 ¹ | 10 ⁴ | 0 | 10 ¹ |
| FAB SOD (K) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 ⁴ | 0 | 0 |
| FC+F'C BER | 0 | 10 ³ | 10 ³ | 0 | 10 ⁴ | 0 | 10 ³ | 10 ⁴ |
| PEP F'C REN | 10 ² | 10 ¹ | 10 ¹ | pur | 10 ¹ | pur | pur | 10 ¹ |
| Ch.leg. L VOR | 10 ⁴ | pur | 0 | 10 ² | 10 ¹ | 0 | 0 | 10 ¹ |
| Ch. leg. BJK ART | pur | 0 | 0 | 0 | 10 ¹ | 0 | 0 | 10 ¹ |

TABLEAU XVIII Caractéristiques des clones des fusions G et G bis

| | G7.1 | G39.1 G39.2 | G76.1 G76.3 | G110.1 G110.2 | G125 | G173.1 | G199.1 G199.3 | Gb127 |
|-------------|------|----------------|----------------|------------------|------|--------|------------------|-------|
| IgG1L | + | + | ++ | + | - | 0 | + | + |
| IgG1K | 0 | 0 | ++ | + | - | 0 | 0 | - |
| IgG1K | + | + | ++ | + | + | ++ | + | + |
| IgG3K | + | + | ++ | + | + | ++ | ++ | + |
| IgG4L | + | ++ | ++ | + | ++ | + | - | + |
| IgG1 CHE(K) | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | + |
| IgG1 THE(K) | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | ++ |
| IgG1 LAR(L) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| IgG1 BER(K) | + | ++ | ++ | ++ | 0 | ++ | + | + |
| IgG SIG | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| IgG1 ZEG(K) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| IgA(L) | ++ | ++ | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ | ++ |
| IgM(L) | ++ | ++ | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ | ++ |
| BJK HEN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BJK ROU | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Test en dot binding immuno assay:

dot de 100 ou 200 ng
surnageants dilués de 10^{-2}

DO de 0 à 0.5 : 0

DO de 0.5 à 0.75 : +

DO de 0.75 à 1 : ++

Do de 1 à 1.5 : +++

Chaque clone provenant d'un même puits mère, par exemple le puits 110, peut, grâce à ces résultats être identifiée : G 110.1, G 110.2, G 110.3, malgré des variations d'intensité de réponses au cours des tests, ne formant qu'un seul et même clone.

G 7.1, G 7.2, G 76.1, G 76.3, G 110.1, G 110.2, G 110.3, G 173.1, G 173.2, G 223.1, G 223.2 et G 4.10 6 F8 E1 sont donc des clones sécrétant des immunoglobulines dirigées contre les IgG.

La spécificité des clones des fusions n° 1 et n° 2 (G et G bis) a été confirmée par des tests en "dot binding immuno-assays" effectués suivant les conditions optimales déterminées auparavant : G 76.1, G 76.3, G 110.1, G 110.2, G 173.1 présentant les mêmes caractéristiques qu'avec le test ELISA. Par contre G 7.1 donne une forte réponse en IgA et IgM (L) (voir tableau XVIII)

Certains clones ont donné naissance à des anticorps à spécificité restreinte à une chaîne légère, tels les clones G 125, G 39 et Gb 127. Un exemple est donné par la figure 18 qui illustre la réponse de G 125, clone anti-chaîne légère lambda.

G 199 est un cas particulier, qui se caractérise par une spécificité restreinte aux IgG1 de type lambda et IgG3, si l'on suppose que l'IgA utilisé pour le test est de type lambda.

Les résultats obtenus en dot binding immuno-assay pour ces derniers clones sont difficilement interprétables à cause des inconnues liées à certaines immunoglobulines employées.

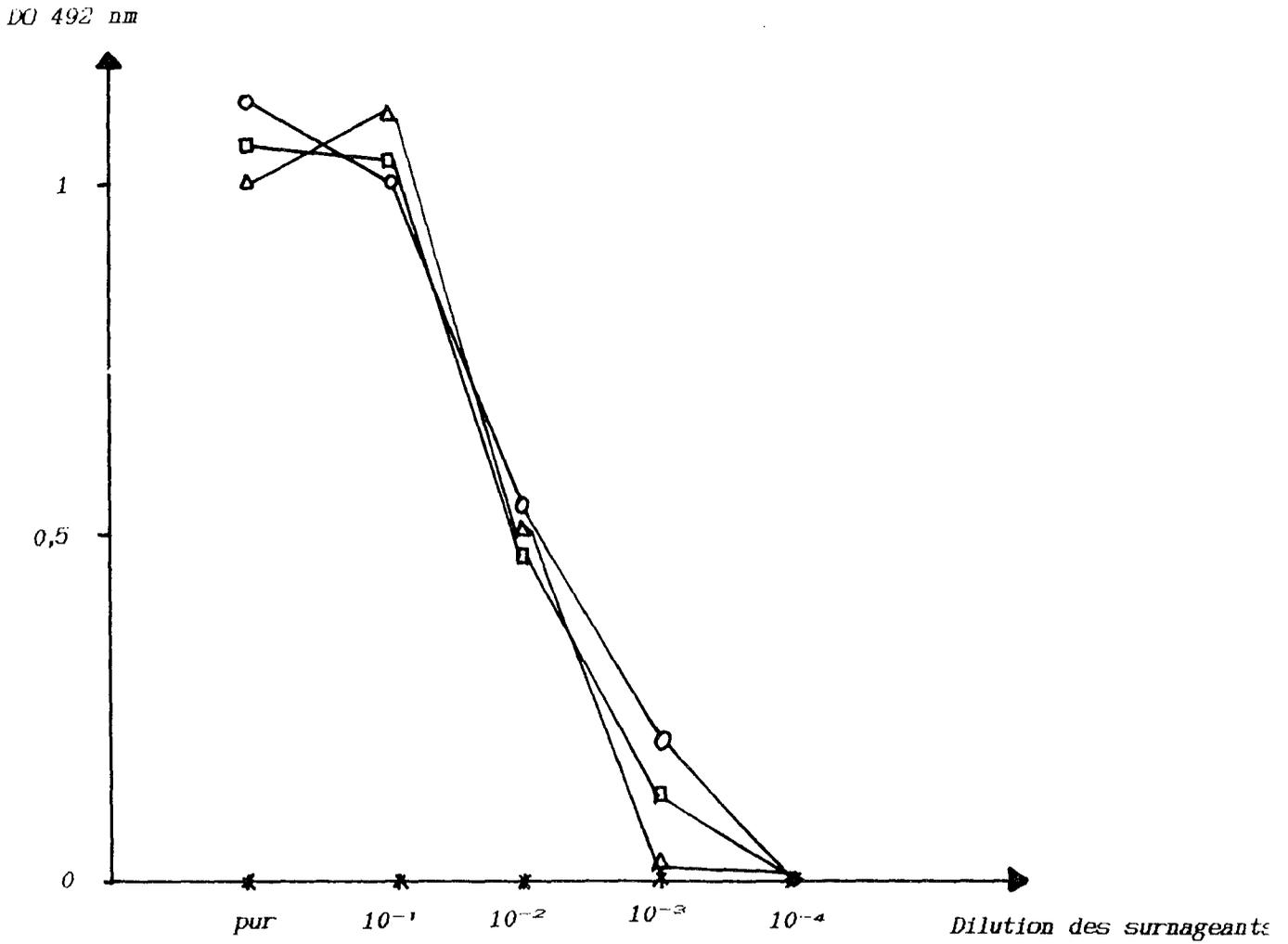


Fig. 18 Dilution du surnageant de culture du clone G 125
 Test ELISA
 Plaques revêtues de 50 ng d'Ig par puits

□ — □ IgG1 (L)
 × — × IgG2 (K)
 + — + IgG3 (K)
 ○ — ○ IgG4 (L)
 △ — △ Ig A (L)

6 - CARACTERISTIQUES DU CLONE 8 G1 G5A 1H3, DENOMME A10

La fusion n° 11 a été faite à partir de la rate d'une souris Balb/C, immunisée avec l'IgA LEM (chaîne légère K).

Elle a produit 17 anticorps monoclonaux qui ont été cultivés plusieurs mois, au bout desquels plusieurs clones instables ont été perdus.

Après une série de congelations-décongelations, les surnageants cellulaires ont été testés sur toute la batterie d'anticorps, en réalisant des dilutions successives de 2 en 2, à partir d'une dilution au 100ème. Les résultats ont toujours été interprétés en comparaison avec les valeurs obtenues pour les T+ et T-. Ils sont consignés dans le tableau XIX.

Les autres hybridomes avaient, soit perdus leur capacité de sécréter des immunoglobulines anti-IgA, soit acquis une spécificité dirigée contre un déterminant commun aux IgM et IgA. A9 et A10 ont alors été cultivés et congelés à nouveau. Seul A10 s'est révélé stable. A9 aurait perdu ses gènes de sécrétion au cours du temps.

7 - CARACTERISTIQUES DU CLONE 3D7 E9 H7 B4, DENOMME M8

La fusion n° 6 a été réalisée à partir de la rate d'une souris Balb/C, immunisée avec l'IgM LAT (chaîne légère K).

Le même protocole de cycles de congelations-décongelations, de culture à long terme et de dilutions en cascades utilisé pour caractériser les clones anti-IgA a été repris ici.

Douze anticorps monoclonaux ont été produits; à terme, seul le clone M8 s'est révélé intéressant par sa stabilité au cours du temps et des manipulations. Les résultats sont donnés par le tableau XX.

TABLEAU XIX Caractéristiques des réponses obtenues avec les surnageants de culture des clones de la fusion A1. et particulièrement avec le clone A10

| non des clones | | | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | A9 | A10 | A12 | A13 | A14 | A15 | A16 | A17 | A18 | |
|-------------------|-----|---|-----|------|------|------|------|------|-----|----|----|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|
| Revêtement 100 ng | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG1 | GAZ | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | GIM | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | MCH | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RAS | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | ZEG | K | - | - | - | - | - | 800 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgG2 | JAN | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | NIC | K | - | - | - | - | 6400 | - | - | - | - | - | 6400 | 400 | - | - | - | - | - | - |
| | RAD | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RAI | L | - | - | - | - | - | 400 | 400 | - | - | - | 6400 | - | - | - | - | - | - | - |
| IgG3 | BRI | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | MET | K | - | - | - | - | + | 200 | 200 | - | - | - | 3200 | - | - | - | - | - | - | - |
| | REN | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | SLA | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgG4 | CHA | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BEN | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1600 | - | - | - | 100 | - | - | - |
| | FIN | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | HRU | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1600 | - | - | - | - | - | - | - |
| | HUI | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | PAI | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | POI | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgA | BOU | K | 200 | 6400 | 6400 | 1600 | 800 | 1600 | 400 | - | - | 400 | 6400 | 1600 | 1400 | 800 | - | - | - | 100 |
| | LEM | K | - | 400 | 6400 | - | 400 | 800 | 100 | - | - | 200 | 6400 | 400 | 800 | 3200 | - | - | - | - |
| | LOP | K | - | 100 | 100 | - | - | - | 100 | - | - | 200 | - | 100 | - | - | - | - | - | - |
| | ROB | K | - | 200 | 100 | 1600 | - | - | 100 | - | - | 100 | 200 | 100 | 200 | 800 | - | - | - | - |
| | TRO | L | - | 1600 | 6400 | - | - | - | 100 | - | - | 400 | - | 1600 | - | - | - | - | - | - |
| IgM | LAT | K | - | 800 | 1600 | 6400 | 400 | - | - | - | - | - | 6400 | 100 | 6400 | 6400 | - | - | - | + |
| | BIC | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | - | - |
| | BON | K | - | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 | 400 | - | - | - | 6400 | 100 | 6400 | 6400 | - | - | - | 6400 |
| | DES | K | - | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 | - | 400 | - | - | - | - | 200 | 6400 | 6400 | - | - | - | 1600 |
| | GAT | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6400 | 6400 | - | - | - | - |

Valeur T+ = 1,10

Valeur T- = 0,3

Les valeurs représentent le titre

TABLEAU XX

Caractéristiques des réponses obtenues avec les surnageants de culture des clones de la fusion M1, et particulièrement avec le clone M8

| Non des clones | | | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 | M10 | M11 | M12 |
|-------------------|-----|---|------|------|------|------|----|------|------|------|----|------|------|------|
| Revêtement 100 ng | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG1 | GAZ | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | GIM | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | MCH | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RAS | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | ZEG | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgG2 | JAN | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | NIC | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RAD | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RAI | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgG3 | BRI | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | MET | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | REN | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | SLA | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgG4 | CHA | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BEN | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | FIN | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | HRU | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | HUI | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | PAI | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | POI | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgA | BOU | K | 800 | 3200 | 1600 | 1600 | - | 6400 | 800 | 100 | - | 3200 | 200 | 200 |
| | LEM | K | 3200 | 6400 | 6400 | - | - | 6400 | 1600 | 100 | - | 6400 | 200 | 800 |
| | LOP | K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | ROB | K | 800 | 1600 | 1600 | 1600 | - | 3200 | 1600 | 100 | - | 1600 | 100 | 100 |
| | TRO | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IgM | LAT | K | - | 6400 | 6400 | 6400 | - | 6400 | 6400 | 400 | - | 6400 | 6400 | 6400 |
| | BIC | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BON | K | - | 6400 | 6400 | 6400 | - | 6400 | 6400 | 400 | - | 6400 | 6400 | 6400 |
| | DES | K | - | 6400 | 6400 | 6400 | - | 6400 | 6400 | 200 | - | 6400 | 6400 | 6400 |
| | GAT | K | - | 6400 | 6400 | 6400 | - | 6400 | 6400 | 1600 | - | 6400 | 6400 | 6400 |

Valeur T+ = 1,10

Valeur T- = 0,3

Les valeurs représentent le titre

Cet hybridome a eu une sécrétion variable au cours du temps. On a pu y remédier par des clonages répétés qui ont abouti au clone final stable. Un aperçu de cette amélioration est illustré dans le tableau XXI.

TABLEAU XXI
AMÉLIORATION DU TITRE EN ANTICORPS DU
SURNAGEANT DE CULTURE DU CLONE M8 AU COURS DES
CLONAGES SUCCESSIFS

| Revêtement en IgM à 100 ng/puits | Clone intermédiaire | Clone final |
|-------------------------------------|---------------------|------------------|
| IgM BON | 2×10^2 | 4×10^2 |
| IgM DES | 1 | 2×10^2 |
| IgM GAT | 1×10^2 | 16×10^2 |
| IgM LAT | 1×10^2 | 4×10^2 |

Les chiffres représentent les valeurs des titres en anticorps.

8 - CARACTÉRISTIQUES DES CLONES ANTI-IgG4 : G4 III et G IX

La fusion n° 5, réalisée avec la rate d'une souris Balb/C immunisée avec l'IgG4 HRU (chaîne légère K) n'a produit qu'un seul clone, 5B9 B5 E2 C7, dénommé G4 III. Après plusieurs mois de culture en boîtes de 24 puits, puis en flacons de 25 cm², les tests effectués montrent un changement de spécificité des anticorps sécrétés : la réactivité devient nulle vis à vis des IgG4 et non négligeable vis à vis des IgA et des IgM.

Ces résultats sont résumés dans le tableau XXII.

TABLEAU XXII
REACTIVITE DU CLONE G4 III

| Revêtement en Ig à 100 ng/puits | G4 III | G4 III après plusieurs mois de culture |
|------------------------------------|--------|---|
| IgG1 | 0 | 0 |
| IgG2 | 0 | 0 |
| IgG3 | 0 | 0 |
| IgG4 HVI | +++ | 0 |
| IgM | 0 | ++ |
| IgA | 0 | + |

DO de 0 à 0,5 : 0

DO de 0,5 à 0,75 : +

DO de 0,75 à 1 : ++

DO de 1 à 1,5 : +++

La fusion n° 14 a été réalisée avec la rate d'une souris Biozzi immunisée avec l'IgG4 FOI (chaîne légère K). Les tests de détection ont été faits sur un mélange à parts égales de 4 IgG4 (25% de chaque) Tous les clones ne donnant pas une réponse monospécifique après des tests croisés sur des protéines d'isotype différent, ont été éliminés.

De ce fait, un anticorps uniquement a été retenu, il est de spécificité anti-IgG4, comme le montrent les résultats dans le tableau XXIII.

TABLEAU XXIII
 CARACTERISTIQUES DES REPONSES OBTENUES AVEC LE
 CLONE ANTI-IgG4, G4 IX

| NOM DU CLONE | | | |
|-------------------|-----|---|-----|
| 4. IX | | | |
| Revêtement 100 ng | | | |
| IgG1 | GAZ | K | 0 |
| | GIM | L | 0 |
| | MCH | L | 0 |
| | KAS | K | 0 |
| | ZEG | K | 0 |
| IgG2 | JAN | K | 0 |
| | NIC | K | 0 |
| | RAD | L | 0 |
| | RAI | L | 0 |
| IgG3 | BRI | L | 0 |
| | MET | K | 0 |
| | REN | K | 0 |
| | SLA | K | 0 |
| IgG4 | CHA | L | + |
| | BEN | K | +++ |
| | FIN | L | 0 |
| | HRU | K | +++ |
| | HUI | L | +++ |
| | FAI | K | 0 |
| | FOI | K | +++ |
| IgA | BOU | K | 0 |
| | LEN | K | 0 |
| | LOP | K | 0 |
| | ROB | K | 0 |
| | TRO | L | 0 |
| IgM | LAT | K | 0 |
| | BIC | L | 0 |
| | BON | K | 0 |
| | DES | K | 0 |
| | GAT | K | 0 |

Valeur T+ = 1,71

DO 0 à 0,5 : 0

DO 0,5 à 0,75 : +

Valeur T- = 0,1

DO 0,75 à 1 : ++

DO 1 à 1,5 : +++

9 - CARACTERISTIQUES DES CLONES ANTI-IgD

La fusion n° 16 a été réalisée avec la rate d'une souris Biozzi immunisée avec l'IgD SA L (chaîne légère L).

Une trentaine d'anticorps monoclonaux ont été produits, tous de spécificité anti-IgD. Tous sont négatifs vis à vis des IgG, IgM et IgA.

Les tests ont été réalisés suivant le même protocole que pour les clones anti-IgA et anti-IgM. Les résultats sont donnés par le tableau XXIV.

Neuf d'entre eux, DC2, DC8, DC11, DC13, DC15, DF1, DF2, DF4 et DF5, présentant des titres élevés, ont été choisis afin d'être produits en ascites et purifiés.

Au cours du temps, leur réactivité n'a pas faibli.

Parmi les autres clones, un seul a perdu ses capacités sécrétoires, et 5 autres montrent une réponse décroissante au cours des mois.

Une courbe de dilution, fig. 19, réalisée pour le clone DC15, montre sa forte activité, et l'homogénéité de ses réponses vis à vis des différents revêtements.

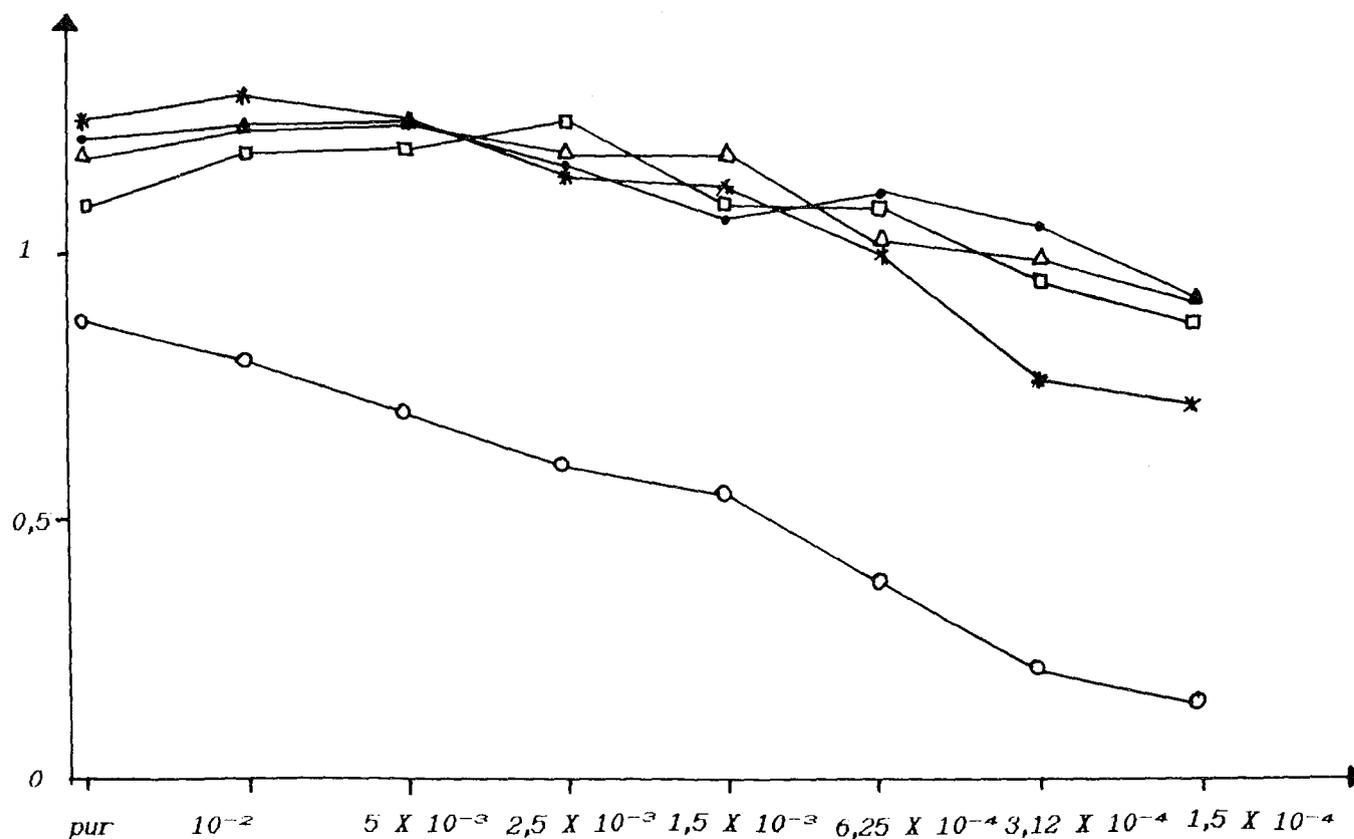
TABLEAU XXIV
 DETERMINATION DU TITRE EN ANTICORPS DES SURNAGEANTS
 DE CULTURE DES CLONES ISSUS DE LA FUSION D

| Revêtement à 100 ng/puits | DF1 | DF2 | DF3 | DF4 | DF5 | DF6 | DF7 | DF8 | DF9 | DF10 | DF11 | DF12 | DF13 | DF14 | DF15 |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| D1 (K) | 6400 | 800 | 6400 | 6400 | 6400 | 3200 | 3200 | 6400 | - | - | 1600 | pur | - | 1600 | 1600 |
| D2 (L) | 6400 | 800 | 6400 | 6400 | 6400 | 3200 | 1600 | 3200 | - | - | 800 | - | - | 1600 | 800 |
| D3 (L) | 1600 | 100 | 200 | 1600 | 3200 | 3200 | 100 | 800 | - | - | 800 | - | - | 1600 | 100 |
| DLIN (L) | 3200 | 3200 | 3200 | 6400 | 6400 | 1600 | 400 | 800 | - | - | 1600 | 200 | 800 | 200 | 1600 |
| DSAL (L) | 3200 | 3200 | 3200 | 6400 | 6400 | 1600 | 400 | 800 | pur | pur | 1600 | 200 | 800 | 200 | 1600 |

| Revêtements à 100 ng/puits | DC1 | DC2 | DC3 | DC4 | DC5 | DC6 | DC7 | DC8 | DC9 | DC10 | DC11 | DC12 | DC13 | DC15 |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| D1 (K) | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 6400 | 3200 | 3200 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 |
| D2 (L) | 1600 | 3200 | 3200 | 3200 | 1600 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 | 3200 | 6400 | 3200 | 6400 | 6400 |
| D3 (L) | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 3200 | 6400 | 6400 | 3200 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 |
| DLIN (L) | 800 | 800 | 1600 | 1600 | 1600 | 1600 | 1600 | 1600 | 1600 | 3200 | 6400 | 800 | 3200 | 800 |
| DSAL (L) | 1600 | 6400 | 6400 | 3200 | 3200 | 6400 | 3200 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 | 6400 |

Les valeurs obtenues avec les IgG, IgA et IgM sont analogues à celles obtenues avec les T -
 Valeur T + : 1,05
 Valeur T - : 0,2

DO 450 nm



Dilution des surnageant.

FIG 19 Courbe de dilution du clone Dc15
 Revêtement 400 ng par puits sur des plaques T+ revêtues en IgD.
 Les résultats obtenus sur des plaques T- revêtues en IgG1, IgG2, IgG3,
 IgG4, IgM et IgA sont proches de 0.

- — ● D1
- * — * D2
- ▲ — ▲ D3
- — □ D SALLE
- — ○ D LIN

10 - CONTROLE DE LA STABILITE DES CLONES

La stabilité des clones obtenus est vérifiée par deux critères essentiels, la viabilité et la sécrétion d'anticorps de spécificité désirée.

La viabilité est testée sur des cultures continues de 2 à 3 mois en flacon de 75 cm³ et au cours des cycles de congélation-décongélation.

La mise en évidence de la sécrétion des clones et la caractérisation de cette sécrétion est réalisée plusieurs fois au cours des cultures continues et après 7 cycles de congélation-décongélation. Des dilutions de 10 en 10 sont testées sur la batterie d'anticorps de la protéinothèque.

Les clones anti-IgG sont stables, et trois d'entre eux, G 76.1, G 173.2 et G 223 ont été choisis afin d'être cultivés à plus grande échelle.

Farmi les clones anti-IgA, seul A10 s'est révélé stable au cours des cycles de congélation-décongélation. Néanmoins comme le clone M8 anti-IgM, il nécessite une série de sous-clonages afin de conserver de fortes capacités sécrétoires. Ces sous-clonages se sont révélés efficaces pour ce dernier clone.

Les clones de spécificité anti-IgG4 ont été perdus, l'un G4 III, par changement de spécificité des anticorps sécrétés, l'autre, G4 IX, par mort cellulaire après une décongélation. Les clones anti-IgD se montrent très stables au cours du temps. La figure 20 montre un exemple de l'activité du clone Dc15 au cours des semaines de culture.

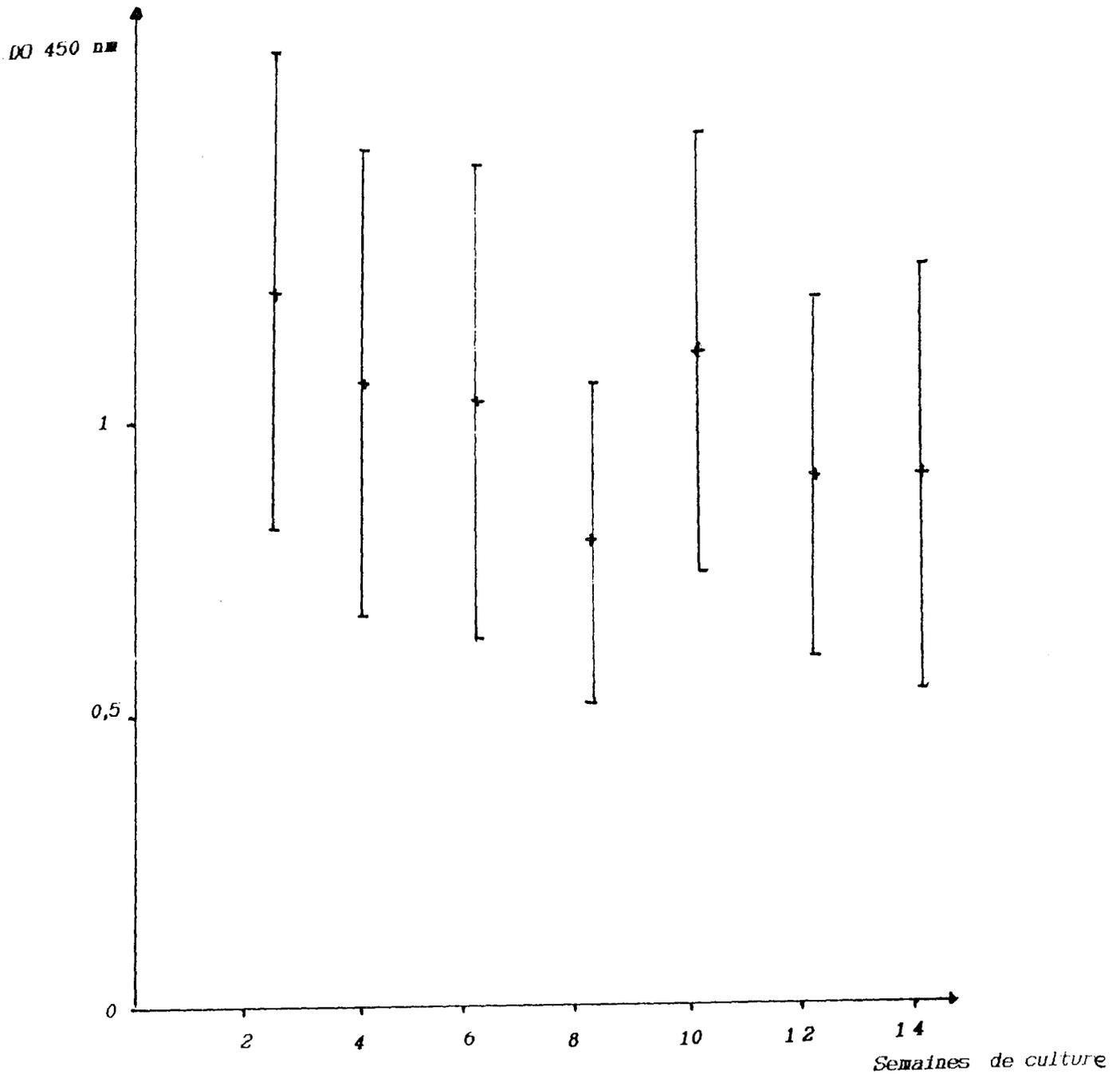


Fig. 20 *Stabilité au cours du temps :*
Exemple du clone Dc15, moyenne des valeurs obtenues sur
chacun des 5 revêtements en IgD
IgD à 100 ng/puits, surnageant au 1/100, T+ = 0,90, T- = 0,1.

11 - PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES DE SOURIS OBTENUES

La détermination de la classe et de la sous-classe des anticorps murins permet de choisir la méthode de purification à employer.

Cette détermination se fait grâce à la technique d'Ouchterlony, au cours de laquelle l'anticorps murin concentré est mis en présence d'antisérum de souris anti-Ig (G1, G2a, G2b, G3, M).

La formation d'un arc de précipitation observable sur fond noir, permet de classer l'anticorps murin.

Les résultats de cette détermination sont donnés dans le tableau XXV;

Un exemple de purification sur protéine A-Sepharose est donné par la figure 21. Pour les surnageants de culture, 50 ml concentrés environ 15 fois sur une membrane de 10 000 sont injectés dans la colonne de chromatographie 8 X 80 mm. Les liquides d'ascites, quant à eux, ont été traités par aliquots de 5 ml injectés dans la colonne après clarification par centrifugation.

Les profils d'éluion permettent de distinguer 4 pics dont le contenu a été identifié par OUCHTERLONY.

Pic pH 8,1 : Protéines aspécifiques, non fixées sur le gel

Pic pH 5,5 : IgG1 élués spécifiquement à ce pH

Pic pH 4,5 : IgG2a

Pic pH 3,5 : IgG3

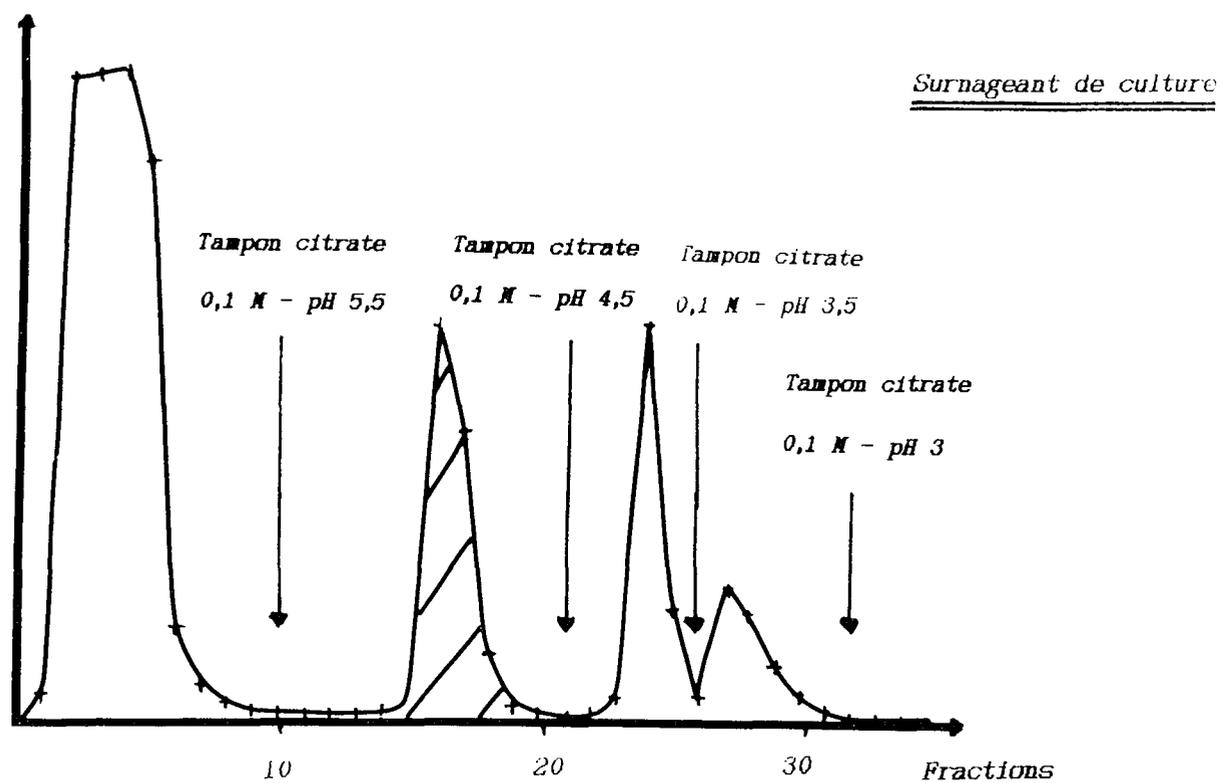
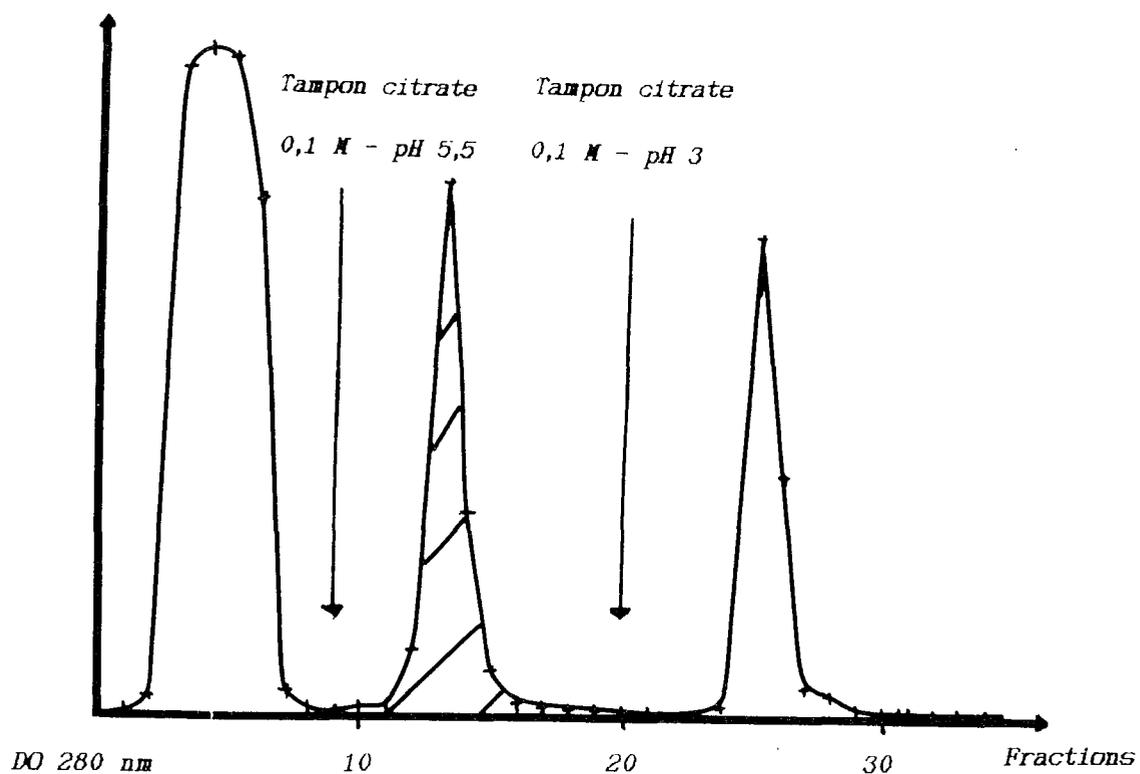
Pic pH 3 : Léger epaulement correspondant aux fragments restés fixés sur la colonne et désorbés par ce pH acide.

Pour la purification des IgM, 100 ml de surnageant de culture concentrés 5 fois par ultrafiltration sur membrane Amicon 10 000, sont injectés par aliquots de 8 ml. Les ascites sont clarifiées par ultracentrifugation et filtration avant d'être injectées. Ainsi que le montre la figure 22, on obtient trois pics, deux premiers pics d'éluion des protéines contaminantes et un troisième pic contenant les IgM recherchées.

TABLEAU XXV

Méthode de purification retenue après détermination de l'isotype de l'anticorps murin par la technique d'Ouchterlony

| Non du clone | Spécificité | Classe et sous classe de l'AC murin | Méthode de purification à employer |
|--------------|-------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| G76.1 | anti IgG | IgG1 | protéine A-Sepharose |
| G173.2 | | | |
| G223 | | | |
| G41X | anti IgG4 | IgG1 | protéine A-Sepharose |
| A10 | anti IgA | IgG1 | protéine A-Sepharose |
| A9 | | IgG1 | protéine A-Sepharose |
| M8 | anti IgM | IgG2b | protéine A-Sepharose |
| DC8 | anti IgD | IgM | Concanavoline A-Ultrogel |
| DC11 | | | |
| DC13 | | | |
| DC15 | | | |
| DF1 | | | |
| DF2 | | | |
| DF4 | | | |
| DF5 | | | |



Liquide d'ascite

FIG 21 PROFIL D'ELUTION DE L'ANTICOPRS MURIN A10 D'ISOTYPE IgG1 PAR CHROMATOGRPAHIE D'AFFINITE SUR PROTELNE A-SEPHAROSE

Le tampon initial est à pH 8,1.

La partie hachurée représente les IgG1 récupérés.

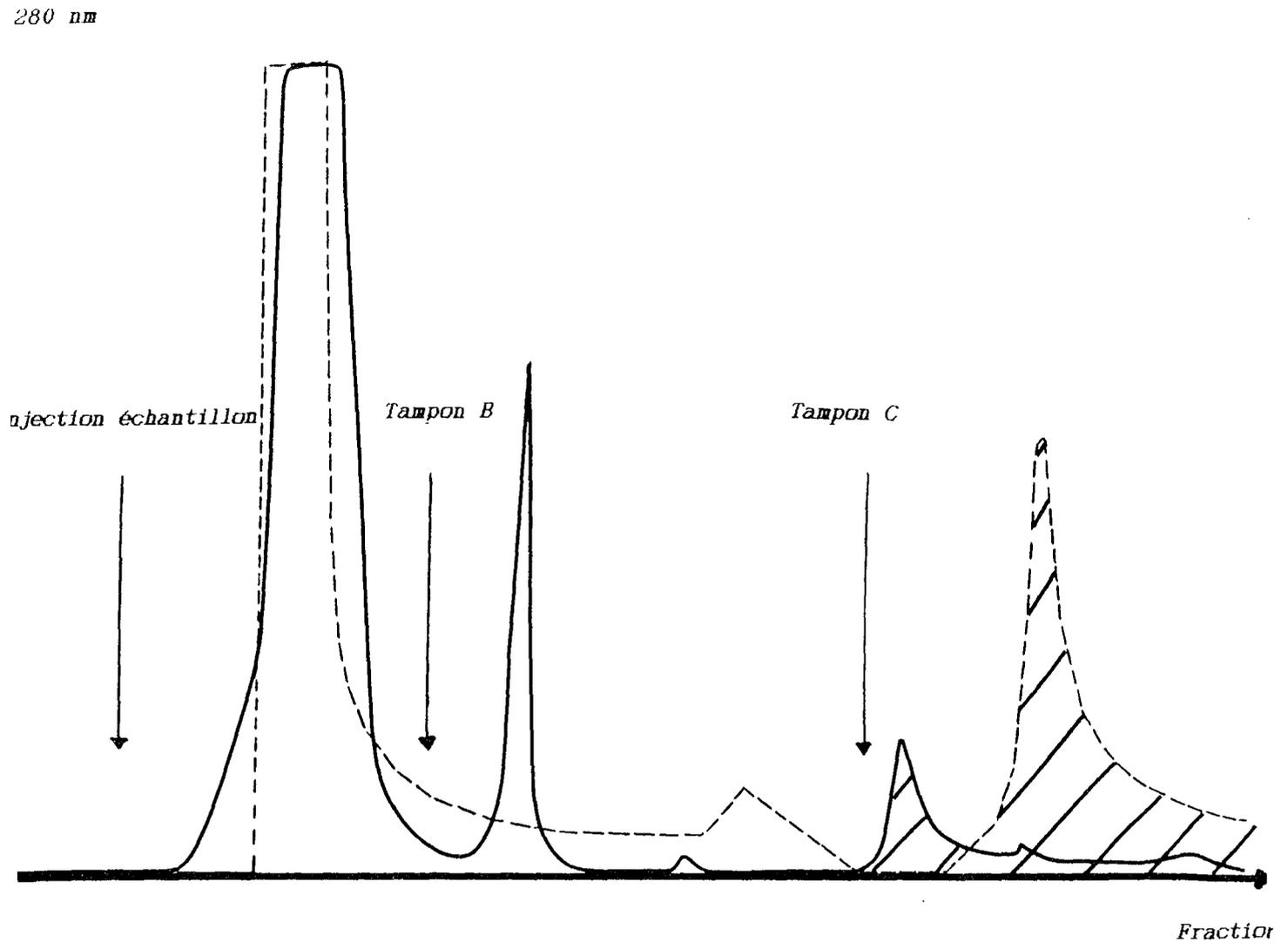


FIG 22 PROFIL D'ELUTION DE L'ANTICORPS MURIN DC13 D'ISOTYPE IgM PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR CONCAVALINE A-ULTROGEL

La partie hachurée représente les IgM récupérés.

Le tampon initial est à pH 7,4

Le tampon B est du Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 contenant :

100 mM NaCl

1 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

Le tampon C est du tampon B contenant de l' α -D-méthylmannose

Surnageant de culture ———

Liquide d'ascite - - - -

Les quantités d'anticorps recueillies par ces deux types de purification sont déterminées par spectrométrie d'absorption à 280 nm. Elles sont récapitulées dans le tableau XXVI.

TABLEAU XXVI
QUANTITES D'ANTICORPS OBTENUES PAR PURIFICATION
PAR CHROMATOGRAPHIE

| NOM DU CLONE | ISOTYPE | PRODUCTION | |
|-----------------|---------|--------------------------------|--------------------------|
| | | SURNAGEANT $\mu\text{g/ml}$ | ASCITE ng/ml |
| 676 E12 E10 | IgG1 | 17 | 0,89 |
| 6173 H1 612 | IgG1 | 18 | 1,3 |
| 6223 F5 C10 | IgG1 | 18 | 0,76 |
| 64 9 4F6 B9 | IgG1 | 11 | 0,56 |
| A10 | IgG1 | 10 | 0,47 |
| A9 | IgG1 | 10 | 0,28 |
| M8 | IgG2b | 13 | 0,23 |
| DC15 | IgM | 87 | 1,8 |
| DC13 | IgM | 77 | 1,02 |
| DF4 | IgM | 80 | 3,75 |

Les concentrations sont calculées en fonction des quantités initiales de surnageant de culture et d'ascite.

Tous les pics recueillis sont ainsi testés afin de détecter une éventuelle activité résiduelle. Dans le cas où celle-ci s'avère importante dans un pic ne devant pas contenir les anticorps recherchés, par exemple si le pic élué à pH 3 répond positivement sur une plaque T⁺, les éluats collectés sont alors repassés une deuxième fois sur la colonne de chromatographie.

L'activité des anticorps après purification est évaluée par technique ELISA, utilisant des dilutions en cascade, chaque test étant réalisé en double. Des plaques T⁺ revêtues de différents isotypes d'IgG pour les anti-IgG, d'IgM pour les anti-IgM, d'IgA pour les anti-IgA et d'IgD pour les anti-IgD sont utilisées. Les plaques T⁻ sont revêtues d'IgM et d'IgA pour les anti-IgG et d'IgG pour les anti-IgM, anti-IgA, et anti-IgD. Dans tous les cas, les réponses sont en accord avec la spécificité pour laquelle l'anticorps a été sélectionné.

La pureté des anticorps, ainsi purifiés, s'avère satisfaisante.

Après vérification par la méthode d'Ouchterlony, un seul arc de précipitation est visible. L'électrophorèse en gel SDS-PAGE en gradient linéaire 8 à 25% ne laisse apparaître qu'une bande pour les IgG1 et IgG2_b de souris, les IgM quant à elles sont de masse moléculaire trop élevée pour pénétrer dans le réseau de réticulation du gel.

DISCUSSION

Divers paramètres peuvent influencer le résultat final d'une fusion cellulaire. La plupart seront discutés dans les paragraphes suivants, ce sont notamment l'immunisation des souris, la technique de fusion en elle-même, les méthodes de détection et de clonage utilisées, la production des immunoglobulines et leur purification.

Deux critères sont déterminants pour le choix d'un myelome murin : il ne doit pas sécréter par lui-même d'immunoglobulines, pour ne pas avoir à séparer du milieu de culture ces anticorps de ceux produits par l'hybridome, et il doit être déficient en une enzyme essentielle à la croissance cellulaire et permettant d'utiliser un mode de sélection afin que les cellules non fusionnées soient éliminées.

Cette enzyme, l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) (E.C. 2.4.2.8.), catalyse la formation de nucléotides par la voie alterne utilisant l'hypoxanthine, lorsque la voie principale de synthèse est bloquée par de l'aminoptérine. La souche myelomateuse Sp 2/0 ou Sp 2/0-Ag 14 (ATCC - CRL 1581) est déficiente en HGPRT. Elle possède environ 73 chromosomes, dont le chromosome X normalement porteur du gène HGPRT.

Un hybridome, pour pouvoir survivre sur un milieu de sélection HAT, doit contenir le chromosome X HGPRT + apporté par le lymphocyte B, le chromosome 12 codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines, et un des chromosomes 6 ou 16, codant respectivement pour la chaîne lambda et kappa.

Les lymphocytes B de rate de souris contiennent 40 chromosomes. Les cellules hybrides en contiennent en moyenne entre 88 et 98, chiffre inférieur à la somme des chromosomes parentaux, mais néanmoins supérieur au double du nombre de chromosomes des cellules Balb/C.

Ceci indique que nous avons affaire à une fusion hybride entre 2 cellules différentes, et que le choix des chromosomes restant s'effectue suivant un mécanisme de perte génétique non élucidé à l'heure actuelle, ce qui donne naissance à une variété d'hybridomes qu'il faut cloner et sélectionner par culture sur le milieu approprié.

Cette sélection s'effectue ainsi qu'indiqué dans le chapitre "**Matériel et Méthodes**", pour un milieu HAT, initialement décrit par Littlefield J.W., (1964).

Le choix de l'animal quant à lui, a été orienté vers la souris, notre laboratoire possédant un élevage conséquent et adapté.

Les premiers travaux ont été effectués sur des souris Balb/C, fréquemment utilisées dans les techniques de production d'anticorps monoclonaux de la littérature. Les souris de l'espèce Biozzi, sélectionnées pour leur bonne réponse immune, par les gènes *Ir* (Immune réponse) du complexe d'histo-compatibilité majeur de classe II situé sur le chromosome 17, ont été utilisées pour les trois dernières fusions. Une étude ponctuelle, menée entre 2 lots de souris Balb/C et Biozzi, immunisées de la même manière, semble étayer cette hypothèse de différence de patrimoine génétique, qui pourrait procurer une réponse immune supérieure pour l'espèce Biozzi.

Toutefois, l'intensité de cette réponse immune n'est pas en rapport direct avec la valeur potentielle des lymphocytes produits. En effet, les résultats finaux de ces 3 fusions, mis à part ceux de la fusion n° 15 qui était contaminée, ne semblent pas être supérieurs. En comparaison, les fusions n° 6 (produisant des anti-IgM) et n° 11 (produisant des anti-IgA) s'avèrent aussi productives, dans un premier temps, que la fusion n° 15 (produisant des anti-IgD). La spécificité des anticorps produits par les lymphocytes B de rate de souris Biozzi n'apparaît donc pas, de prime abord, supérieure à celle des souris Balb/C.

L'âge des souris utilisées pour la fusion peut également avoir une importance. En effet, l'apparition d'immunoglobuline à la surface des lymphocytes B dépend d'une expression séquentielle en rapport avec l'état de développement (Aspinall R. et al., 1983).

Les lymphocytes B subissent une cyto différenciation qui leur permet d'exprimer uniquement des anticorps d'isotype IgM dans un premier temps, puis peuvent acquérir des anticorps d'isotype IgD à leur surface cellulaire. Ce développement post-natal, observe sur des tissus lymphoïdes de souris foetales, jeunes et adultes, se traduit par l'expression d'anticorps de surface d'autres isotypes, par un mécanisme de commutation de l'ADM, et uniquement à partir de IGM initiaux (Fig. n° 23).

La stimulation antigénique se traduit également par une différenciation de ces lymphocytes. Ce mécanisme d'ontogénèse des lymphocytes B illustre bien l'importance de l'âge de la souris du point de vue de la réponse immune. L'administration d'antigène active et permet la multiplication des cellules B, à partir du répertoire de cellules de l'animal immunisé (Benjamini B. et al., 1988). L'âge des souris utilisées lors de la fusion n° 16, en vue de l'obtention d'anticorps anti-IgD pourrait donc expliquer le fait que les anticorps monoclonaux obtenus sont tous de classe IgM. En effet, l'immunisation des souris a été effectuée sur un temps très court et sur des souris âgées de 4 semaines.

Les valeurs des isotypes d'immunoglobulines du serum des souris sont évaluées qualitativement par un test ELISA avant la fusion.

Les taux normaux donnés par la littérature montrent une expression maximale en IgG1 et IgG2a, puis IgM, ce qui expliquerait que la plupart des anticorps monoclonaux obtenus au cours de ce travail soient des IgG1 (Tab. XXVII).

L'anti-IgM de classe IgG2b avait quant à lui moins de probabilité d'apparaître.

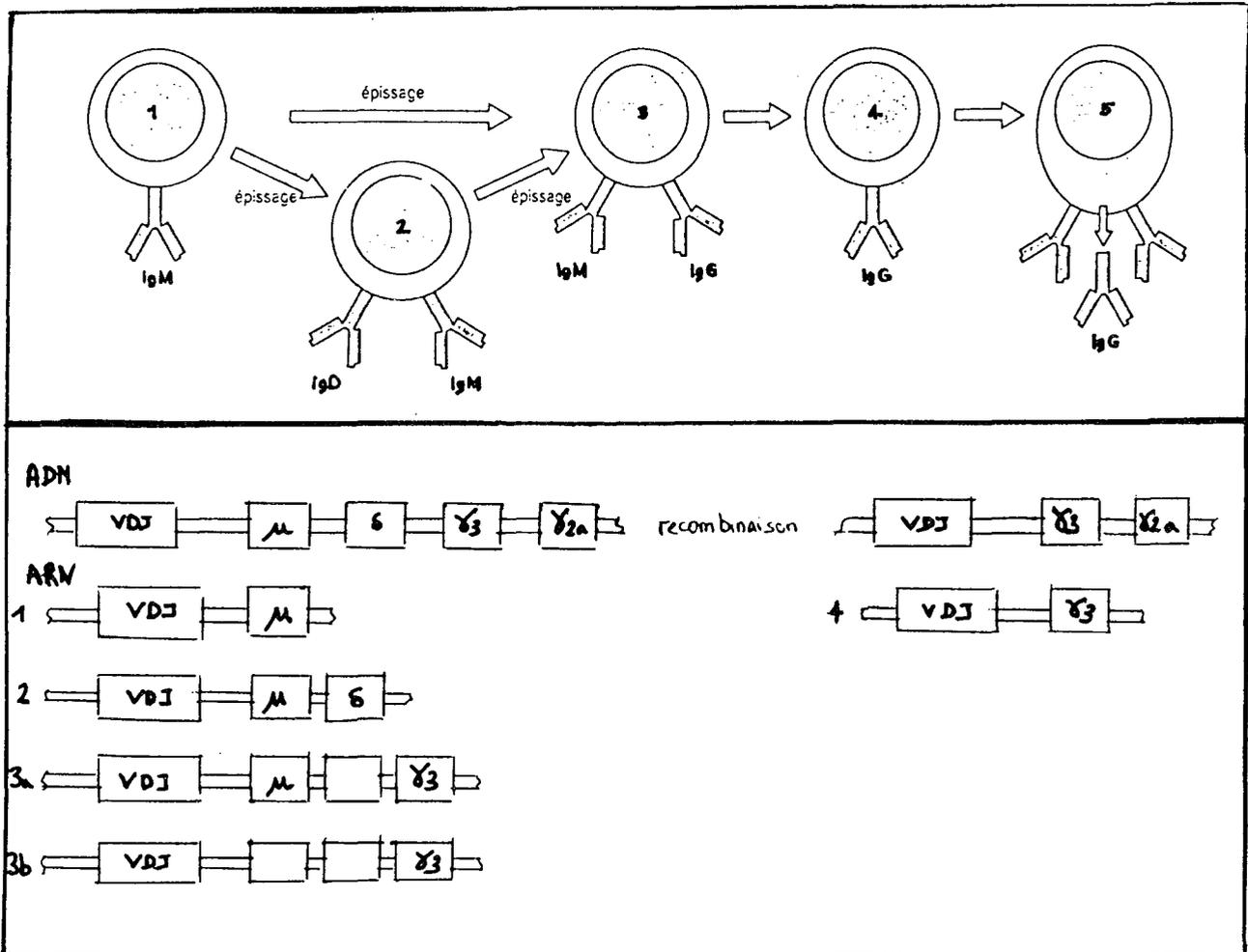


Fig. N° 23 - Mécanismes de la commutation de classe

La partie supérieure du schéma illustre les différentes possibilités d'expression des Ig de membrane se produisant au cours de l'ontogénie des cellules B. Néanmoins, cette différence structurale des Ig de membrane ne se traduit pas pour une différence de spécificité : les IgM et IgG peuvent coexister, mais sont dirigés contre le même épitope.

La partie inférieure montre les transcrits d'ARN conduisant à l'expression des chaînes H à chaque étape de la différenciation

- (1) B précoces exprimant des IgM
- (2) Expression d'IgM et IgD
- (3 a) IgG représenté par des $\gamma 3$: expression d'IgM ou IgG
- (3 b) Commutation sans perte des gènes codant pour IgM et IgD
- (4) Recombinaison irréversible

D'après MALE D. et al. (1988)

TAB XXVII - Concentration sérique d'Ig de souris âgées de 12 semaines

| Isotype | Concentration sérique d'Ig en $\mu\text{g/l}$ |
|---------|--|
| IgM | 284 \pm 35 |
| IgG1 | 441 \pm 44 |
| IgG2a | 384 \pm 109 |
| IgG2b | 111 \pm 36 |
| IgG3 | 101 \pm 21 |
| IgA | 40 \pm 5 |

(d'après Bos A.N. et al., 1989)

D'après Bos A.N. et al. (1989), l'expression isotypique est différente dans le sérum et la rate. En effet, les IgG prédominent dans le sérum, alors que les IgM sont les plus nombreux dans la rate.

L'utilisation de sérum pour le test de l'état d'immunisation des souris est donc valable, mais ne peut présumer du type d'anticorps le plus fréquent qui sera mis en jeu dans la fusion en elle-même.

Il semble évident que les possibilités d'obtenir un hybridome sécrétant un anticorps à la spécificité désirée sont directement liées au nombre de lymphocytes B susceptibles de fusionner avec les cellules myelomateuses. Une bonne stimulation par l'antigène est donc une étape très importante.

La réponse immune de souris immunisées par un antigène qui sera, suivant les fusions, IgG3 BR1, IgG4 FOI ou HRU, IgA LEM, IgM LAT ou IgD SAL, a été suivie par un test ELISA. La comparaison des anticorps sériques d'une souris immunisée et d'une souris non immunisée laisse apparaître une différence remarquable (DO variant de 0,2 à 2), mais variable entre individus de la même espèce. Il est donc nécessaire de tester chaque individu d'un lot de souris, après de déterminer lequel est immunisé au mieux. Néanmoins, pour une souris immunisée avec l'IgG4 FOI, on observe une réponse d'intensité comparable pour les 4 types d'IgG. Ceci s'explique par plusieurs raisons.

D'une part, la solution d'antigène injectée n'est jamais parfaitement pure. Des contaminants, même sous forme de traces, peuvent s'avérer suffisants pour stimuler des lymphocytes B. En effet, la réponse immune dépend en grande partie de l'immunogénicité de l'antigène introduit et est toujours polyclonale. Une grande variété de lymphocytes B produisant des anticorps à spécificités différentes peut donc être produite, ceci diminuant statistiquement la probabilité d'obtenir des lymphocytes dirigés contre la molécule désirée.

D'autre part, les homologues structurales existantes entre les immunoglobulines expliqueraient également le phénomène observé lors du test du sérum.

En effet, puisque sept acides aminés semblent suffisants pour déclencher une réponse immune, celle-ci peut s'effectuer contre différentes parties de la molécule d'immunoglobuline. On peut donc obtenir des anticorps dirigés contre des chaînes légères ou lourdes en totalité ou en partie, contre des déterminants antigéniques des parties variables ou constantes, contre un épitope formé de l'association d'une ou plusieurs des parties évoquées ci-dessus.

La structure tri-dimensionnelle de la molécule antigénique, le positionnement des épitopes sont également primordiaux. Au total, de très nombreux anticorps peuvent être produits, chacun dirigé contre un site particulier. Il faut ensuite qu'un maximum d'anticorps dirigés contre un enchaînement bien spécifique de l'immunoglobuline désirée fusionnent avec les cellules myelomateuses. Ici également intervient la statistique : plus le nombre de lymphocytes correctement stimulés sera grand, plus on aura de chance de retrouver une spécificité bien particulière dans les hybridomes secrétés.

L'étape d'immunisation est donc importante. Plusieurs protocoles ont été choisis au cours des différentes fusions effectuées. Certains sont associés à un ajout, à l'antigène, d'adjuvants de Freund complet ou incomplet. Le rôle des adjuvants immunitaires est de permettre une libération progressive de l'antigène et de provoquer une réaction inflammatoire, amplifiant ainsi la réponse immunitaire. Cet effet ne semblant pas toutefois affecter la réponse immune des souris utilisées, les adjuvants n'ont pas été toujours utilisés.

Parmi les différents protocoles mis en oeuvre, l'un, classique, consiste à injecter 25 µg d'antigène par souris, à 3 semaines d'intervalle, et de faire une dernière injection de rappel 3 jours avant la fusion.

D'après BORREBAECK C.A. et al. (1989), des immunisations répétées avant la fusion permettent une prolifération des cellules spléniques, ce qui a été mise à profit en utilisant un lot de souris Balb/C immunisées depuis près d'un an. Une stimulation de l'activité immunitaire a été effectuée par des injections rapprochées de quantités supérieures d'antigène (100 µg), puis journalières, les 4 jours précédant la fusion. Cette méthode a donné de bons résultats avec des rendements de clones positifs équivalents à ceux des autres fusions. Il semble qu'un protocole peut être retenu, qui consiste en 3 injections de 25 µg. Le lot de souris Biozzi immunisé rapidement, à 10 jours d'intervalle, donne également des résultats satisfaisants.

Le rappel avant fusion peut, quant à lui, être administré par voie intraveineuse trois jours avant fusion. Cette manipulation étant techniquement délicate, des injections répétées chaque jour avant fusion, par voie intrapéritonéale, ont été choisies, et semblent avoir le même effet de stimulation de la multiplication des lymphocytes B, ceci en comparaison avec des résultats obtenus par d'autres chercheurs du laboratoire .

Bazin et al. (1988) ont montré que le temps écoulé entre le dernier rappel et la fusion dicte, en partie, la spécificité des anticorps monoclonaux produits et également le nombre d'hybridomes sécréteurs.

En général, ce type d'immunisation est suffisant chez des souris, pour obtenir des suspensions cellulaires adéquates pour être fusionnées avec des cellules myelomateuses.

Un titre sérique de 1×10^5 , mesure par test ELISA est témoin de cette immunisation.

Certains auteurs préconisent néanmoins des stratégies visant à développer cette réponse antigénique (Lane et al., 1986). Un antigène peu immunogène peut être adsorbé sur une matrice de nitrocellulose et injecté ainsi à la souris. Des splénocytes d'une souris immunisée peuvent être réinjectés à une autre souris de même souche, préalablement irradiée par rayons X. Des lymphocytes B de souris immunisées, peuvent être cultivés quelques jours avant la fusion en présence de l'agent antigénique.

Une autre façon d'augmenter les chances d'obtenir des hybridomes désirés, est d'améliorer la technique de fusion. Il est connu que le type d'agent fusogène utilisé est un élément déterminant. Suivant la procédure de Hammerling (1981), le PEG 4000 ROTH a été utilisé au cours des manipulations. Il est additionné de DMSO qui augmente le rendement de la fusion par modification de la structure membranaire (Fazekas de St. Groth et al., 1980)

Les agents de fusion créent un changement dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et modifient la tension superficielle (Lucy J.A., 1970, Oster G.F. et al., 1989, BURGESS S.W. et al. 1991).

Le type de PEG utilisé, sa concentration et son pH dans la solution de fusion sont des éléments importants. Néanmoins, le PEG est connu pour sa cytotoxicité, il est donc vital de limiter au minimum le temps d'exposition des cellules à ce fusogène, d'effectuer la manipulation en une minute environ et constamment à 4°C. (Lane R. et al., 1986).

D'autres méthodes sont applicables, dont la plus ancienne d'après Köhler et Milstein, utilisant le virus de Sendai, mais produisant des hybridomes moins stables (Winter G. et al., 1994). Plus tard, des méthodes d'électrofusion se sont développées, mais, leur utilisation est peu fréquente, vraisemblablement à cause du coût de l'équipement.

Afin d'optimiser le rendement de la fusion, il faut mettre en présence une quantité correcte des deux partenaires de la fusion.

Plusieurs rapports ont été utilisés durant ce travail, le meilleur semble être celui préconisé par plusieurs auteurs, dont Kohler et Milstein en 1975, et qui est d'une cellule myelomateuse pour 10 cellules spléniques.

Un autre élément de la production d'hybridomes est l'utilisation de cellules nourricières, conseillée par Hammerling (1981), à la concentration de 10^4 cellules/ml. En théorie, elles servent à minimiser les effets de coopération entre les cellules par augmentation de la densité cellulaire (Coller et al., 1986) de ces premières étapes de la fusion. Néanmoins, les fusions effectuées sans cet apport ne montrent pas de diminution du rendement du pourcentage de croissance cellulaire, ni du pourcentage de puits positifs (voir les fusions 13, 15, 16). D'autre part, l'apport de cellules nourricières augmente les possibilités de contamination des cultures (Samoilovich S.R. et al., 1987). Un milieu conditionné, constitué de surnageant de culture pourrait les remplacer, en apportant aux cellules des facteurs de croissance (Orlik O. et al., 1988). Un autre avantage de l'utilisation de ce milieu conditionné est de permettre d'augmenter le laps de temps entre des changements de milieu, les macrophages péritonéaux en culture ayant un métabolisme très élevé (Newsholme P. et al., 1989).

Le milieu de base des cultures cellulaires doit apporter des sels pour assurer l'isotonicité, des oligoéléments, du glucose, des vitamines, les acides aminés essentiels et des cofacteurs tels le glutathion. Les hormones (insuline) les facteurs de croissance, les protéines de transport (transferrine, albumine), sont apportés par le sérum de veau foetal.

Ce sérum, préparé dans les conditions d'aseptie les plus complètes, à partir de sang frais collecté sur des foetus de veau par ponction cardiaque, est soumis à des contrôles d'identité, de pureté et d'activité.

Néanmoins, avant utilisation, des clonages de cellules $Sp^2/0$ sont effectués en présence de plusieurs lots de sérum et celui où la croissance cellulaire est maximale est choisi. Le sérum correspondant est alors chauffé à 56°C pendant 30 min, et filtré par passage sur membrane stérilisante de $0,22\ \mu\text{m}$ (Milex, Sartorius). Il faut toutefois noter que certains auteurs décrivent une augmentation de la croissance cellulaire d'hybridomes en milieu supplémenté en SVF, mais avec une tendance à la baisse de la production en anticorps.

En dernier lieu, le milieu est additionné de L-glutamine, composé instable, et d'antibiotiques limitant les risques d'infection.

Après la fusion proprement dite, intervient la répartition des cellules dans les plaques de culture.

Il est logique de penser qu'un nombre de plaques élevé permettra un pré-clonage par une distribution physique des hybridomes. De plus, l'utilisation de plaques de culture de 96 puits au lieu de 24, multiplie cette répartition et diminue le laps de temps nécessaire avant le premier test de détection. En effet, le milieu de culture, moins grand dans des puits de faible contenance, aura plus rapidement une concentration en anticorps suffisante pour pratiquer un test.

Obtenir et maintenir la monoclonalité d'un hybridome sécréteur est l'objectif désiré. Pour y parvenir, une méthode adoptée par la majorité des laboratoires, est celle de la dilution limite. Une méthode de clonage en milieu semi-solide d'Agarose a également été décrite (Kennet R.H., 1982), mais des cellules adaptées à un milieu liquide ne se multiplient pas de façon optimale dans de l'agar.

La population cellulaire résultant d'une fusion est hétérogène : elle contient des hétérocaryons qui pourront devenir des hybridomes, des lymphocytes et des cellules myelomateuses qui seront peu à peu éliminés par un processus de mort naturelle pour les uns, par la sélection HAT pour les autres.

Néanmoins, chaque hybridome n'est malheureusement pas un clone sécréteur, et encore moins un clone sécréteur d'anticorps de spécificité voulue. L'application de la méthode de dilution limite suivant une équation binominale de probabilité d'une loi de Poisson (Coller H.A. et al., 1986), permet de sélectionner en trois clonages ou plus l'hybridome désiré.

L'évaluation d'un clonage se fait dans un premier temps par l'estimation du nombre de puits ne contenant qu'une colonie cellulaire. Ce nombre doit être environ de 30%. Ensuite, par la méthode de test choisi, les capacités sécrétoires de ces cellules sont testées, et celles intéressant le manipulateur sont alors clonées encore deux fois. Un clonage est sensé être terminé lorsque tous les puits présentant une croissance cellulaire secrètent des anticorps de même spécificité et de même affinité.

Le clone ainsi sélectionné est alors cultivé plusieurs semaines, voire plusieurs mois afin de tester sa stabilité génétique. Parfois, il peut être supplanté par la croissance supérieure d'hybridomes ayant perdu leur propriété sécrétoire.

La méthode de dilution limite est alors souvent efficace afin de restaurer sa stabilité. Cette méthode a été appliquée plusieurs fois au cours de ce travail, notamment pour les clones A1 à A18, M1 à M12, G4 IX, G4 III. Seuls A10, M8, 44 IX ont pu être récupérés ainsi. L'instabilité génétique est l'explication la plus souvent avancée pour ce phénomène. En effet, l'hybride sécréteur doit être porteur des gènes du lymphocyte B permettant la synthèse des chaînes légères et lourdes des anticorps. L'expression génétique est modulée par des mécanismes de répression/dérépression du DNA.

Des éléments de régulation négative peuvent inactiver, dans les hybrides, l'activateur de transcription des chaînes lourdes. **Tripputi et al., (1988)** avancent l'hypothèse d'un élément appelé "silencer" qui reprimerait, par une régulation négative en cis, le promoteur du gène de l'hormone de croissance de cellules de mammifères hybridées. **Köhler et Milstein (1975)** suggèrent un mécanisme d'extinction de gènes par perte génétique, pour aboutir, suivant la lignée myelomateuse choisie, à un nombre de chromosomes par cellule supérieur à celui de chaque parent, mais inférieur à la somme des deux.

Cette méthode de clonage a donc un intérêt dans la culture à long terme des hybridomes. Dès qu'une perte sensible de production d'anticorps est détectée, il faut recourir à des dilutions limites.

La culture à long terme étant nécessaire pour tester la stabilité d'un clone, des conditions de culture régulières sont primordiales. Tout stress par manque de nutriments, par variation de pH ou de température doit être évité aux cellules qui y sont très sensibles. Les changements de milieu doivent donc être réguliers, les puits arrivés à confluence doivent être repiqués. De mauvaises conditions de culture peuvent expliquer la perte de certains hybridomes.

Un autre stress peut être celui provoqué par des contaminations bactériennes ou mycoplasmatiques. Elles peuvent se produire malgré toutes les précautions et peuvent mener à la perte de lignées cellulaires. Une méthode pour essayer d'enrayer ces infections, consiste à laver plusieurs fois les puits avec du milieu neuf contenant antibiotiques (penicilline, streptomycine et éventuellement amphotéricine B entre 2 à 20 µg/ml), puis à les remettre en culture avec du milieu contenant du SVF (Singh G. et al., 1988). Carrol K. et al. (1987) suggèrent d'épurer les cellules infectées par des mycoplasmes par fabrication d'ascite chez des souris pristanisées pendant une quinzaine de jours, avant de les remettre en culture dans des conditions d'aseptie. Ce protocole n'a pas été testé ici, mais mérite d'être signalé. Les fusions perdues au cours de ce travail ont été infectées de façon massive, les rares clones récupérés ayant perdu leur capacité sécrétoire.

Après avoir mis en oeuvre toutes les conditions pour obtenir des hybridomes, il faut choisir une méthode de détection valable pour mener à bien les clonages. Plusieurs qualités sont nécessaires à ce test : il doit tout d'abord être fiable et sensible, il doit être rapide pour tester au plus vite les innombrables cellules produites par certaines fusions, être reproductible, et évidemment, pour des questions économiques, peu coûteux. Il doit enfin permettre de distinguer les faux positifs produits par des anticorps anti-idiotype. Pour cela, l'antigène servant au test doit impérativement être différent de celui ayant servi à l'immunisation.

L'existence, dans notre laboratoire, d'une importante "protéinothèque" d'immunoglobulines humaines purifiées et caractérisées, nous a orienté dans un premier temps, vers une méthode courante de détection d'hybridomes spécifiques. Nous avons choisi l'Enzyme Linked Immuno-Sorbent-Assay, communément appelé E.L.I.S.A.

Par la suite, en collaboration avec le Laboratoire des Stallergènes, une méthode de dot-binding immuno-assay a été mise au point et certains hybridomes ont pu ainsi être testés de deux manières. Ces deux techniques présentent l'avantage d'être de réalisation rapide (48 h ou 24 h) et reproductible. Elles permettent donc de tester chaque clone pouvant être intéressant.

La première étape de l'utilisation d'un test est sa mise au point. Celle-ci porte sur les conditions de manipulation, la spécificité et la sensibilité de la détection. Dans un premier temps, la spécificité de ces tests a été vérifiée.

Comme il l'a été décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes", la spécificité du test ELISA a été contrôlée par incubation d'anti-IgG3 et d'anti-IgG4 sur des plaques revêtues de divers IgG3 et IgG4, celles-ci servant de témoin positif. Les témoins négatifs étaient constitués d'immunoglobulines des 3 autres isotypes (IgG1, IgG2, IgG4 pour l'anti-IgG3) et d'IgA. La différence de DO (toujours supérieure au double de la DO du T-) atteste bien de la spécificité de la réponse. Néanmoins, des variations existent entre diverses immunoglobulines d'une même sous-classe, témoins de la différence de sensibilité et d'avidité des anticorps (Bird P. et al., 1987).

Cette sensibilité a été vérifiée par incubation de 3 dilutions différentes d'anti-IgG3 sur des plaques revêtues avec des quantités différentes d'antigène (200, 100 et 50 ng par puits). La réponse optimale est obtenue avec le revêtement de 200 ng, quelque soit la dilution d'anti-IgG3. Néanmoins, par souci d'économie, le revêtement de 50 ng, donnant par ailleurs des résultats fort convenables (différence de DO entre T+ et T- \approx 0,9 en valeur absolue), a été choisi. Ce revêtement permet de détecter 0,9 μ g/ml d'AC, ce qui est très inférieur aux quantités contenues dans les surnageants de culture.

Des expériences similaires, menées en augmentant de 2 heures à une nuit, le temps d'incubation de l'anti-IgG3, montrent une augmentation du bruit de fond.

Celui-ci peut être dû à des interactions aspécifiques, avec des protéines contenues dans le milieu de culture, des interactions dues aux homologies structurales existantes entre les divers isotypes d'IgG.

Ces interactions moléculaires peuvent potentialiser une réponse ou vice-versa la diminuer.

Borrebaeck C.A.K. et al. (1989) suggerent, pour les minimiser, d'utiliser du surnageant cellulaire dilué au demi. Les faibles quantités de surnageant récoltées sur les plaques de culture, nous ont imposé ces dilutions, souvent de manière plus forte (jusqu'à $1/64 \times 10^{-4}$). Les réponses ainsi obtenues traduisent les fixations spécifiques antigène/anticorps et ont permis d'utiliser une stratégie particulière de clonage.

Dans un premier temps, les clones sont testés sur un isotype correspondant à la spécificité recherchée (ex. IgG4 pour des clones anti-IgG4). Cette première vérification permet de sélectionner les cellules sécrétrices. Dans un deuxième temps, le premier clonage étant arrivé à confluence, une dilution du surnageant cellulaire permet de le tester sur chaque isotype et sur des IgM et IgA. Ainsi peuvent être sélectionnés les éventuels hybridomes sécréteurs d'anticorps monospécifiques.

Les dilutions du surnageant permettent également de vérifier la spécificité de l'anticorps sécrété, éliminant donc les interactions dues à des homologues structurales. Finalement, dans une culture à long terme, une courbe de dilution présentant une chute brutale de la réponse spécifique, laissera presumer d'une baisse d'activité due à un des phénomènes évoqués précédemment, et conduire à effectuer des clonages successifs, afin de restaurer cette activité et de conserver le clone cellulaire.

Néanmoins, ces tests simultanés sur une série d'immunoglobulines représentent un travail fastidieux, renouvelé constamment sur de nombreux puits. Au cours de ce travail, a donc été testé un palliatif permettant d'accélérer ce processus de détection. Un mélange synthétique d'IgG4, en quantités égales, a été revêtu sur des plaques servant de plaques positives. Un autre mélange, contenant cette fois des IgG1, IgG2, IgG3, IgM et IgA, a été utilisé pour les plaques négatives. Les différents clonages ont ainsi été testés. A l'étape finale, les clones sélectionnés, ont été vérifiés sur chaque revêtement utilisé pur. Des erreurs ont ainsi été détectées, des clones supposés être anti-IgG4 montraient une spécificité pour les IgG1. Les molécules d'IgM présentant un encombrement stérique supérieur ont pu, par compétition au moment de la fixation sur le polystyrène, monopoliser la surface disponible et créer ainsi les faux positifs. Ceci montre encore, la nécessité d'utiliser des puits non revêtus, ou revêtus, mais incubés avec du milieu de culture neuf comme témoin négatif.

Des anti-IgG et des mélanges de serum de souris immunisées, ou de surnageants cellulaires positifs peuvent, quant à eux, servir de témoin positif.

Dans ce test immunoenzymatique, l'anticorps est toujours appliqué en solution, tandis que l'antigène est immobilisé sur une surface solide.

La chimie de la fixation est évidemment d'une importance considérable, et les résultats obtenus avec un anticorps ne peuvent en aucun cas, donner lieu à une extrapolation pour les autres (Jefferis et al., 1985). La quantité de matériel fixe à la surface de la plaque de microtitration dépend à la fois des caractéristiques de la surface et de l'antigène solubilisé. Les plaques de polystyrène et de chlorure de polyvinyl sont les plus répandues. Une qualité essentielle de l'antigène fixe, est de conserver son activité. La façon dont cet antigène se fixe à la surface est source d'erreurs dans l'ELISA, pouvant varier d'une proportion de 10 à 70 (Flemming J.O. et al., 1987). Certains auteurs conseillent de prévenir cet artefact, en saturant au préalable la surface de polystyrène par un film hydrophile de B.S.A. (Papadea C. et al., 1985).

L'adsorption au polystyrène peut modifier la structure antigénique d'un épitope, ce qui est encore plus gênant lorsque la molécule fixée est un anticorps monoclonal. En effet, la diversité des anticorps polyclonaux permet statistiquement d'obtenir des épitopes correctement positionnés (Hussain R. et al., 1986). Les changements structuraux intervenant au cours de cette adsorption, peuvent occasionner différentes formes de présentation d'un épitope, et même révéler des épitopes qui n'étaient pas présents sur la molécule native et modifier ainsi l'affinité des fixations antigènes-anticorps (Schats A. et al., 1988).

Pour illustration, on peut envisager que les résidus glutamine 272 et lysine 274, spécifiques des isotypes IgG1, puissent, par leur proximité et leur exposition, contribuer à la formation d'un site antigénique. Une étude faite par Jefferis R. (1986), montre que deux anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes distincts du domaine C_H2 des IgG1, réagissent en fait, différemment suivant le protocole d'immobilisation des IgG1.

Au cours des différentes manipulations effectuées, il peut être observé que, malgré un revêtement similaire à celui des autres sous-classes d'IgG, les courbes de réactivité obtenues avec les IgG2 sont toujours les plus basses. Il semble alors évident que l'étape de revêtement a, ici, une importance considérable, soit par un taux d'adsorption plus faible, soit par une réduction de la capacité antigénique. D'après Jefferis R., les IgG2 sont faiblement antigéniques et l'immobilisation réduit fortement l'expression des épitopes.

Les molécules d'IgG3, quant à elles, bénéficient d'une particularité structurale dans la région charnière : une succession de 62 acides aminés, riche en cystéine et proline. Cette région doit permettre l'accessibilité aux anticorps monoclonaux.

Les IgG4 portent des épitopes sur chaque domaine C_{Y1}, C_{Y2} et C_{Y3}. Essayés avec une variété de protocoles d'adsorption, la majorité montre une bonne stabilité conformationnelle.

Cette étude de Jefferis R. montre que le type d'immobilisation utilisé est essentiel à l'expression des résultats. Il suggère d'effectuer une carte épitopique et ainsi, de déterminer le protocole adapté. Il est donc important, si l'on veut être rigoureux, d'utiliser les anticorps monoclonaux produits par une fusion avec le même test que celui qui a servi à leur détection.

Afin d'élargir ces possibilités, les anti-IgG et anti-chaîne légère lambda produits au tout début de ces travaux, ont été également testés par dot-binding-immunoassay. Le processus d'adsorption est en effet différent, bien que la technique soit analogue. L'immobilisation au polystyrène se fait grâce à des interactions ioniques, alors que les interactions de type hydrophobe sont majoritaires dans une immobilisation à la nitrocellulose (Brennan D .M. et al., 1986).

Les résultats obtenus par comparaison des deux méthodes sont, en majorité, semblables : G 76, G 110 et G 173 sont des anti-IgG. G 125 et G bis 127 restent anti-lambda dans les deux cas, même si une, sur le mélange commercial d'IgG, SIG, la réponse est assez forte. Elle peut s'expliquer par la nature même de ce mélange.

Par contre, G 7.1 répond positivement aux IgG, aux IgM et IgA, alors qu'on le caractérise comme étant un anti-IgG par ELISA.

Il faut garder à l'esprit, une différence notable dans les deux procédés, outre le mode d'immobilisation. En effet, l'anticorps couplé à la peroxydase est, dans le cas du dot-immuno-binding assay, un anti-IgG (H + L) et dans le cas de l'ELISA, un anti-(IgG + IgM) (H + L).

Ceci peut expliquer les variations existant entre les réponses, variations qui, néanmoins, s'atténuent au cours des dilutions du surnageant de culture. Hawkes R. et al. (1982) considèrent que le dot-immuno-binding assay possède l'avantage de visualiser des spots colorés sur un fond de nitrocellulose qui doit toujours rester blanc, et que ceci augmente son pouvoir discriminatoire. En fait, les témoins positifs et négatifs utilisés pour l'ELISA et l'utilisation d'un lecteur automatique, permettent également une interprétation aisée des résultats, ceci dans la limite de bonnes conditions expérimentales :

- * solution de révélation au bon pH pour permettre l'apparition d'une coloration,
- * bonne quantité d' H_2O_2 pour permettre une activité enzymatique optimale sans augmenter le bruit de fond,
- * temps d'incubation de l'enzyme marquée strictement limité à 1 heure

La légère augmentation de bruit de fond obtenue lors d'une incubation d'une nuit à 4°C des anticorps présents dans les surnageants cellulaires ou les ascites, ne donne pas une interprétation faussée des résultats. Elle a, d'autre part, l'avantage de permettre un étalement des étapes du travail lors de grandes séries de détection.

Les deux méthodes semblent donc équivalentes en qualité de l'interprétation des résultats, en facilité de mise en œuvre et en reproductibilité. L'intérêt d'une utilisation en parallèle des deux méthodes pour la détection des clones sécréteurs est, néanmoins, évident.

Finalement, les résultats obtenus par ELISA permettant de décrire plusieurs clones à spécificité chaîne lourde gamma : ce sont les clones G 39, G 76.3, G 223, GH 173.1 et G 110.3 et G 4.10. Néanmoins, G 76.3, G 223, G 173.1 et G 110.3 répondent positivement à des titres peu élevés à certains IgM et à l'IgA TRO.

La pureté des antigènes pouvant être mise en cause, ceux-ci ont été vérifiés par immunoelectrophorèse. L'IgM EOM et l'IgA IRO révèlent effectivement des traces d'IgG qui peuvent expliquer ces réactions. Le titre peu élevé auquel les réponses sont obtenues, peuvent laisser penser à des réactions non spécifiques. Sur la base de leur stabilité au cours des cycles de congélation et de décongélation, et de leur réactivité élevée, G 76.1, G 76.3, G 110.3 et G 22.3 ont subi des tests plus poussés.

A un titre de 10, donc une dilution au 1/10, leur réponse est négative vis à vis des IgA et des IgM. Ils ont été testés sur des fragments d'anticorps obtenus par dégradation enzymatique. Tous sont négatifs vis à vis des fragments Fab issus d'IgG1 à chaîne légère lambda ou kappa, et vis à vis de pep F'c REN. Par contre, ils présentent une forte réaction positive pour les fragments Fc + F'c BER, qui sont composés des domaines constants C_Y2 et C_Y3 des chaînes lourdes des IgG.

Pep F'c REN n'est composé que du domaine C_Y3. On peut donc affiner la spécificité de ces anticorps et penser que ce sont des anti-chaînes lourdes gamma, dirigées spécifiquement contre des épitopes du domaine C_Y2.

Une première caractérisation de G 125 et G bis 127 sur la batterie d'antigène est confirmée pour une étude affinée sur des fragments. G 125 est en effet négatif avec des fragments Fc + F'c BER et le Fab SOD issu d'une IgG1 de chaîne légère kappa. Il est aussi négatif avec une chaîne légère Bence Jones Kappa. Par contre, une réponse positive est observée avec une chaîne légère lambda VOR et le fragment Fab GEN issu d'une IgG1 de chaîne légère lambda. G 125 est donc bien une anti-chaîne légère lambda. G bis 127, quant à lui, est positif avec le Fab GEN, et Fc + F'c BER. Il nécessiterait donc une molécule native entière pour exprimer sa spécificité. En effet, il faut imaginer que la complexité structurale des molécules d'immunoglobulines met en jeu des mécanismes non encore élucidés pour le processus de reconnaissance de l'antigène ou l'expression des propriétés biologiques, tels que la stabilisation conformationnelle due aux structures inter-domaines (résidus glucidiques, ponts disulfure), la flexibilité de la région charnière, ou encore des coopérativités allostériques (Winkelhake J., 1978).

Deux anti-IgG4 ont été produits au cours de ce travail. Vraisemblablement, le clone G 4III était contaminé par un autre clone de spécificité IgM qui l'aurait supplanté par une croissance supérieure. Les clonages par dilution limite n'ont pas permis de récupérer une spécificité anti-IgG4. Une autre alternative à ce phénomène pourrait être un phénomène d'instabilité génétique, qui, par mutation du DNA, expliquerait la modification de la spécificité du clone.

Le clone G 4IX, quant à lui, était bien de spécificité anti-IgG4. Les résultats ne montrent jamais de réponse positive à l'IgG4 FIN (λ). Il y a certainement un problème d'adsorption de cette IgG au polystyrène. Malheureusement, ce clone présente une reactivité déclinante, que seuls des clonages répétés pourraient permettre de stabiliser.

Parmi les nombreux clones anti-IgA produits, un seul possède les qualités essentielles d'un bon clone : sécrétion stable et dirigée uniquement contre les IgA. Les autres clones, au cours des cycles de décongélation, perdent leur activité ou acquièrent une spécificité IgM. Le même problème est rencontré avec les clones anti-IgM. A des titres élevés (6400), ils répondent positivement aux IgA, qui sont, il faut le remarquer, tous de chaîne légère kappa, ainsi que la protéine immunisante (IgM LAT).

Seul M8 présente une sécrétion à caractère monospécifique. Il a néanmoins été instable, problème qui a été détecté par des courbes de dilution du surnageant, qui ont montré une perte de la reactivité.

Des reclonages par dilution limite ont permis de récupérer une bonne activité anti-IgM.

Parmi les nombreux clones anti-IgD produits, on ne détecte pas de problème de stabilité. Tous sont monospécifiques.

Les réponses négatives obtenues avec l'IgD LAN révèlent un problème d'adsorption, puisque du sérum de souris immunisée par l'IgD SAL ne met en évidence qu'une réponse affaiblie. Une mauvaise adsorption ou un masquage de l'épitope explique ce phénomène.

La caractérisation finale des anticorps de souris produits est la détermination de l'isotype. Elle se fait par la technique d'Ouchterlony. La prédominance d'anticorps de classe IgG1 est logique, vu la composition en anticorps du sérum de souris. Le fait que tous les anti-IgD soient de classe IgM s'explique fort bien par le protocole d'immunisation suivi (immunisation rapide avec de petites quantités d'antigène) et l'âge des souris.

Finalement, l'utilisation de ces anticorps pour divers tests, nécessite une production importante. Celle-ci peut être réalisée *in vitro*, par des extensions successives ou *in vivo* en ascite.

Les extensions des clones cellulaires se font progressivement jusqu'à l'utilisation de flacons de 75 cm³.

Quelquefois, elles posent des problèmes techniques. Les cellules transférées dans ces contenants plus grands, semblent avoir des difficultés à arriver à confluence. De plus, la production en anticorps peut stagner. Néanmoins, ces difficultés résolues, la production est autour de 14 µg/ml pour les anti-IgG, anti-IgA et anti-IgM. Elle peut s'élever à 80 µg/ml pour les anti-IgD. Ces valeurs sont conformes à celles de la littérature qui sont comprises entre 1 à 100 µg/ml suivant les souches cellulaires.

Le passage à grande échelle ne se fait généralement pas à l'échelle du laboratoire et nécessite d'approfondir les conditions de culture tant au point de vue du type de réacteur choisi que de la composition du milieu de culture. En laboratoire, une méthode productive est celle des ascites. Elles ont été réalisées avec des souris de même espèce que celles immunisées pour la fusion cellulaire. Cette technique a permis une production comprise entre 0,5 et 4 mg/ml, alors que la littérature parle de 2 à 4 mg/l.

La phase terminale de ces opérations est la purification des anticorps du surnageant de culture ou du liquide ascitique. L'utilisation de protéine A est couramment décrite et a été utilisée avec succès pour les IgG1 et IgG2b. La vérification de l'activité des pics d'éluion sur différents anticorps et l'électrophorèse gel SDS ont permis de vérifier qu'un seul cycle chromatographique était souvent suffisant. Une éluion séquentielle par variation de pH permet d'obtenir des isotypes séparés.

Bien que la protéine A soit décrite pour la purification des IgM de souris (Mariani M., 1989), la chromatographie par Con A-Sepharose a été choisie et donne de bons résultats, sans effectuer, au préalable, de précipitation au sulfate d'ammonium (Séné C. et al., 1985).

Les anticorps ainsi purifiés sont conservés par congélation de petits échantillons afin de limiter des cycles de congélation-décongélation qui risqueraient d'abîmer les molécules. Hazen H. et al., 1988, préconisent l'addition de cations divalents qui exerceraient une cryoprotection.

Devant les multiples paramètres pouvant affecter le rendement d'une fusion, il serait intéressant d'envisager quels sont les points susceptibles d'être facilement améliorés.

Nombreux sont les points difficilement contrôlables :

- L'état de cytodifférenciation des lymphocytes B est important, il est variable en fonction de l'âge de la souris, du mode d'inoculation de l'antigène et de la quantité injectée, de l'utilisation d'un adjuvant immunitaire.
- Le nombre de lymphocytes possédant l'équipement génétique conduisant à la production des épitopes des anticorps recherchés est aléatoire, mais à l'évidence, il dirige la réussite d'une fusion. Face à ces variables, il est important de choisir une stratégie de travail donnant toutes les chances de réussite d'une fusion.

L'immunisation peut être plus sélective qu'elle ne l'est, par l'utilisation d'immunoglobulines humaines purifiées. En effet, la détermination d'une carte épitopique permet d'envisager différents sites immunogènes (Lorenzo F. et al., 1988). L'injection d'un polypeptide synthétique et spécifique d'une sous-classe donnée, éventuellement si tel est le but recherché, spécifique d'un marqueur allotypique, permettrait de minimiser les réponses dues à des réactions croisées, à des immunisations contre des sites non spécifiques.

On considère actuellement qu'une protéine est immunogène, à partir d'un poids moléculaire de 5 000 daltons. Un déterminant antigénique de 4 à 7 amino-acides couplé à une molécule porteuse formerait un site antigénique comportant au moins deux épitopes différents, conduisant à une réaction immunitaire.

Cette approche est envisageable, mais coûteuse, et nécessite une étude approfondie de la relation existant entre la séquence amino-acide désormais connue, de chaque classe et sous-classe d'immunoglobuline et la conformation spatiale de la molécule qui détermine finalement l'antigenicité de tel ou tel épitope. L'enlèvement d'un site antigénique ou au contraire son exposition doit être connue afin de déterminer son antigenicité. La détermination de séquences spécifiques et immunogènes se révèle être délicate à cause de la forte homologie structurale des sous-classes IgG. Elle peut néanmoins affiner la technique d'immunisation.

La culture cellulaire doit être réalisée dans les conditions les plus constantes possibles. Il a été montré que le principal agent limitant la prolifération cellulaire est la glutamine, immédiatement suivie par les amino-acides et le glucose (Duval D. et al., 1988). La sécrétion d'IgG peut en être dépendante et varier ainsi de 4 à 5 fois.

La culture en masse de cellules sélectionnées en vue d'une production importante d'immunoglobulines est optimisable par différents paramètres. Des hybridomes cultivés en milieu contenant du SVF peuvent montrer une baisse de productivité (Schneider Y.J., 1989). Une solution est d'adapter progressivement ces cellules à une culture sans SVF, éventuellement à un milieu défini. L'utilisation de procédés de culture en batch, en semi-continu ou en continu, est également un moyen d'augmenter cette productivité. Récemment, un procédé en batch utilisant une séparation entre chambre de culture et réservoir à nutriments, a permis d'obtenir une sécrétion d'IgG, 25 fois supérieure à celle obtenue par des cellules à confluence dans des flacons conventionnels (Vogler E.A., 1989).

La congélation des clones à diverses étapes des manipulations est une précaution nécessaire afin de limiter les pertes par mort cellulaire. Elle peut s'effectuer conventionnellement dans du SVF additionné de 5% de DMSO, ou directement par plaques de 96 puits (Wells D.E. et al., 1986). Effectuée de façon précoce, elle peut être un moyen de sélection des cellules. En effet, des problèmes existent quelquefois à la décongélation, où toutes les lignées cellulaires ne repoussent pas. Seuls les cellules résistant à la congélation seront récupérées, et une fois clonées, elles ne présenteront plus de problème de perte de sécrétion ou de défaut de croissance après décongélation.

Le test ELISA et ses variantes (méthodes radio-immunologiques, immunofluorescence) est l'un des plus courants pour la détection de la production d'hybridomes spécifiques.

Comme il est très improbable d'obtenir des immunoglobulines purifiées à 100%, un palliatif peut être envisagé par test ELISA en méthode sandwich (Alfa M.J. and al., 1987).

Les plaques de polyéthylène sont revêtues avec un anti-immunoglobuline du commerce, les sites aspécifiques avec de la B S A. L'immunoglobuline choisie est alors incubée et se fixe spécifiquement sur les anti-immunoglobulines.

Le surnageant de culture est ensuite ajouté, après un lavage des plaques, et révèle par la méthode d'incubation avec un conjugué anti-IgG (L + H) couplé à la peroxydase et un substrat classique (OPD ou TMB).

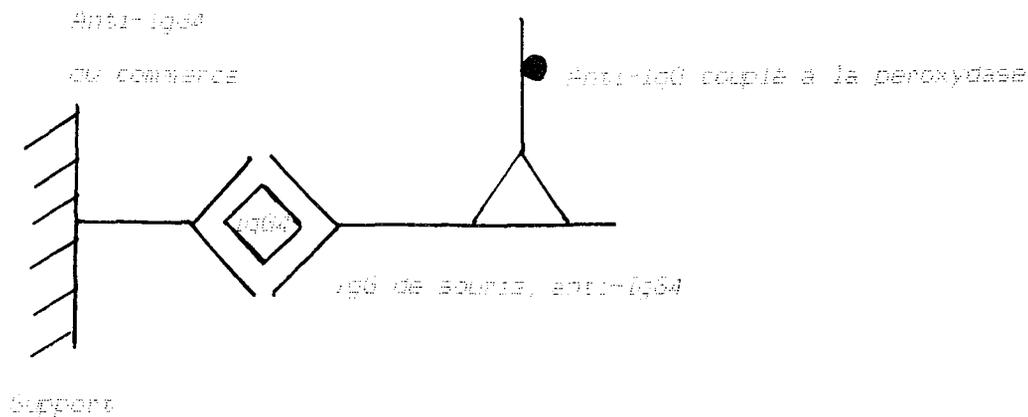


Schéma d'un ELISA sandwich possible pour la détection d'anti-IgG4

Cette méthode peut être envisagée, mais une utilisation en parallèle d'une deuxième méthode de détection est souhaitable.

La cytométrie de flux est un processus élégant de sélection et de clonage d'hybridomes spécifiques. Grâce à une sonde fluorescente correspondant à l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps recherché, on peut séparer une à une les cellules. Néanmoins se posent deux problèmes.

Le premier, technique, nécessite un équipement totalement stérile permettant la réutilisation des cellules ainsi sélectionnées, le deuxième théorique, est encore une fois dû aux homologies structurales existant entre les divers isotypes. La réussite de la méthode étant liée à l'antigène, celui-ci doit être spécifique et ne pas présenter d'homologie avec les autres sous-classes. Une autre application de cette technique, est le suivi de la population d'hybridomes.

Au cours des cycles de culture, une population de cellules hypochromosomiques, au contenu en DNA déclinant, est le signe d'une perte génétique et est souvent associée à la viabilité cellulaire ou à une perte de la capacité sécrétoire (Byl V. et al., 1988). Une deuxième amélioration peut être appliquée enfin au procédé de purification des anticorps, nécessaire quel que soit leur mode de production. Les chromatographies d'affinité utilisées peuvent être remplacées par une technique d'immuno-affinité plus spécifique. Il suffirait de coupler à la matrice activée par du glutaraldéhyde ou du bromure de cyanogène l'immunoglobuline humaine désirée. Cette technique permettrait d'isoler des populations d'anticorps dont toutes les molécules sont dirigées contre l'immunoglobuline recherchée.

En guise de conclusion, le tableau XXVIII résume les conditions optimales déterminées par les résultats obtenus au cours des différentes fusions et des suggestions d'améliorations permettant d'optimiser les étapes du travail.



TABLEAU XXVIII
OPTIMISATION PROPOSEE DE LA METHODE DE TRAVAIL

| | Conditions optimales | Améliorations envisageables |
|----------------------------------|--|---|
| Immunisations | 25 µg en 4 injections par litre tous les 10 jours Puis, tous les jours pendant 3 jours avant fusion | - fragments d'Ig - enchainements synthétiques d'acides aminés - état de tolérance vis à vis des autres sous-classes |
| Distribution des cellules | Maximale, dans des plaques de 96 puits | |
| Apport Sp2/0/lymphocytes | 1/10 | |
| Fusogène | PEG + DMSO 4°C, 1 min 30 au maximum | |
| Culture | Régulière HAT, HT, SVF | Adaptation des cellules à un milieu défini sans SVF |
| Extension | Ascites Flacons 75 cm ² | Rollers, batch, semi-continu, ... |
| Purification | Protéine A Concanavaline A | Immuno-adsorbant |
| Test détection | ELISA dot-binding-immuno-assay | ELISA méthode sandwich en parallèle avec une autre méthode |
| Congélation des immunoglobulines | Aliquots | Cryoprotecteur |



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - ALFA M.J., DEMBINSKI J.J., JAY F.T.
Production of monoclonal antibodies against recombinant Human interferon - gamma : screening of hybridances without purified antigen
Hybridoma, 1987, 6, 509-520

- 2 - ASPINALL R., OWEN J.J.T.
Kinetics of sequential appearance of IgM and IgD on B lymphocytes in the bone marrow of the adult mouse.
Immunology, 1983, 48, 309-313

- 3 - BAUGHN R.E., JORIZZO J.L., ADAMS C.B., MUSER D.M.
Ig class and IgG subclass responses to Treponema pallidum in patient with syphilis
J. Clin. Immunol., 1988, 8, 128-139

- 4 - BAZIN R., LEMIEUX R.
Effect of the elapsed time after the final antigen boost on the specificity of monoclonal antibodies produced by B cell hybridomas.
J. Immunol. Methods, 1988, 112, 53-56

- 5 - BENJAMINI E., ANDRIA M.L., ESTIN C.D., NORTON F.L., LEUNG C.Y.
Studies on the clonality of the response to an epitope of a protein antigen
J. Immunol., 1988, 141, 55-63

- 6 - BIRD P., CALVERT J.E., LOWE J., DUGGAN-KEEN M., FOROUHI N.G., SEPPALA I., LING N.R.
ELISA measurement of IgG subclass production in culture supernatants using monoclonal antibodies
J. Immunol. Methods, 1987, 104, 149-158

- 7 - HORREBAECK C.A.K., GLAD C.
Cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies produced by in vitro or in vivo immunization
Immunol. Lett., 1989, 20, 255-260
- 8 - BOS A.N., KIMURA H., MEEUWSTEN C.G., DEVISSER ., HAZENBERG M.P., WOSTMANN B.S., PLEASANTS J.R., BENNE R., MARCUS D.M.
Serum Ig levels in "antigen free" mice
Eur. J. Immunol., 1989, 19, 2335-2339
- 9 - BOUSQUET J., MAASCH H., MARTINOT B., HEJJAOUI A., WAHL R., MICHEL F.B.
Double-blind, placebo controlled immunotherapy with mixed grass-pollen aller-goids
J. Allergy Clin. Immunol., 1988, 82, 439-446
- 10 - BRENNAND D.M., DANSON M.J., HOUGH D.W.
A comparison of ELISA screening methods for the production of monoclonal antibodies against soluble protein antigens
J. Immunol. Methods, 1986, 93, 9-14
- 11 - BRGDEUR B.R., TSANG P., LAROSE Y.
Parameters affecting ascites tumour formation in mice and monoclonal antibody production
J. Immunol. Methods, 1984, 71, 265-272
- 12 - BURTON D.R., GREGORY L., JEFFERIS R.
Aspects of the molecular structure of IgG subclasses
Monogr. Allergy, 1986, 19, 7-35
- 13 - Burgess S.W., MASSENBURG D., YATES J., LENTZ B.R.
Poly (ethylene glycol)-induced lipid mixing but not fusion between synthetic phosphatidylcholine large unilamellar vesicles
Biochemistry, 1991, 30, 4193-42000

- 14 - BUTTERWORTH A., DUNNE D., FULFORD A., CAPRON M., KHALIFE J., CAPRON A., KOECH D., OUMA J., STURROCK R.
immunity in human schistosomiasis mansoni : cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity
Biochimie, 1988, 70, 1053-1063
- 15 - CARROLL K., O'KENNEDY R.
The elimination of mycoplasma from infected hybridomas by passaging in BALB/c mice
J. Immunol. Methods, 1988, 108, 189-193
- 16 - CHAPEL H., HAENEY
in "Essentiels of clinical immunology"
Blackwell scientific publications eds, Oxford, 1988, 467 p.
- 17 - CHEVAILLER A., RENIER G.
Les immunoglobulines A sériques et sécrétaires. Aspects moléculaires et cellulaires de leur biosynthèse et de leur fonction
Ann. Med. Interne, 1989, 140, 4, 299-313
- 18 - COHEN P.L., CHEEK R.L., HADLER J.A., YOUNT W.J., EISENBERG K.A.
The subclass distribution of human IgG rheumatoid factor.
J. Immunol., 1987, 139, 1466-1471
- 19 - COLLER H.A., COLLER B.S.
Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. In "Methods in enzymology" J.J. Langone, H. Van Vunakis eds
Academic Press, London, 1986, 121, 412-422
- 20 - COURTENAY-LUCK N.S., EPEMETOS A.A., SIVOLAPENKO G.B., LARCHE M., BARKANS J.R., RITTER M.A.
Development of anti-idiotypic antibodies against tumour antigens and auto-antigens in ovarian cancer patients treated intraperitoneally with mouse monoclonal antibodies
Lancet, 1988, 894-896

- 21 - CRYZ S.J., CROSS A.S., SADOFF G.C., QUE J.U.
Human IgG and IgA subclass response following immunization with a polyvalent Klebsiella capsular polysaccharide vaccine
Eur. J. Immunol., 1988, 18, 2073-2075
- 22 - DODET B.
Vaccins : les nouvelles perspectives
Biofutur, 1984, 9, 23-31
- 23 - DUVAL D., GEHREL I., DUFAY A.F., HACHE J.
Improvement of the strategy for hybridoma cell feeding (resume)
"In vitro culture of animal cells"
Abbaye des Fremontres, Font A Mousson, 1988
- 24 - EYL V., VOISIN P., DONNER M., MAUGRAS M., STOLTZ J.F.
Evolution of hybridoma cell culture by flow cytofluorometry (resume)
"In vitro culture of animal cells"
Abbaye des Fremontres, Font A Mousson, 1988
- 25 - BY P.L., PROWSE S.J., JENKIN C.R.
Isolation of pure IgG1, IgG2 and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose
Immunochemistry, 1978,15, 429-436
- 26 - FAZEKAS de ST GROTH S., SCHEIDEGGER D.
Production of monoclonal antibodies, strategy and tactics
J. Immunol. Methods, 1980, 35, 1-21
- 27 - FLENNING J.O., PEN L.B.
Measurement of the concentration of murine IgG monoclonal antibody in hybridoma supernatants and ascites in absolute units by sensitive and reliable enzyme linked immunosorbent assays
J. Immunol. Methods, 1988, 110, 11-18

- 28 - FRAISSE P., NORTH M.L., DUWI F.L., KIEFFER P., DIETEMANN A., QUOIX E.,
PETITJEAN R., VANDIEVENNE A., LAUSTRIAT D.
*Déficits en sous classes des immunoglobulines G associées aux pneumopathies
infectieuses primitives de l'adulte*
Presse médicale, 1988, 17, 1704
- 29 - FUJIWARA K., MATSUMOTO N., YAGISAWA S., TANIMORI H., KITAGAWA T., HIROTA N.,
HIRATANI K., FUKUSHIMA K., TOMONOGA A., HARA K., YAMAMOTO K.
*Sandwich enzyme immunoassay of tumor-associated antigen sialosylated
Lewis using beta-D-galactosidase coupled to a monoclonal antibody of IgM
isotype*
J. Immunol. Methods, 1988, 112, 76-83
- 30 - GALFRE G., MILSTEIN C.
Preparation of monoclonal antibodies - Strategies and procedures
In "Methods in enzymology"
J.J.LANGONE, H. Van VUNACKIS eds., vol 15
Immunochemical techniques, Part B (Academic Press, New York) p. 3
- 31 - GODING J.W.
In "Monoclonal antibodies. Principle and practice"
Harcourt B. Jovanovitch ed.
Academic press, London, 1986, 1, 1-313
- 32 - GREGORY L., DAVIS K.G., SHETH B., BOYD J., JEFFERTS R., MAVE C., BURTON D.R.
*The solution conformations of the subclasses of human IgG deduced from
sedimentation and small angle X-ray scattering studies.*
Mol. Immunol., 1986, 24, 821-823
- 33 - HA-BAIK LEE, ADKINSON F.
*Measurement of IgG blocking antibody in human serum : comparison of ELISA
with monoclonal antibody and fluorogenic substrate and *Staphylococcus*
protein*
A solid-phase RIA
J. Allergy Clin. Immunol., 1988, 32, 11-19

- 34 - HAMILTON R.G.
Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory
Clin. Chem., 1987, 33, 1707-1725
- 35 - HAMILTON R.G., BAUM H., ADKINSON M.F.
Immunoassay characterization of human IgG subclass immune responses in insulin therapy and ragweed immunotherapy
J. Clin. Immunoassay, 1988, 11, 24-30
- 36 - HAMMERLING G., HAMMERLING V., KEARNEY J.F.
in "Monoclonal antibodies in T-cell hybridomas"
Elsevier ed., North Holland, 1981, 1
- 37 - HANSON L.A., BJORKANDER J., ROBBINS J.B., SCNHEERSON R., SODERSTROM R., SODERSTROM T.
IgG subclass deficiencies
Vox Sang., 1986, 51, 50-56
- 38 - HAWKES R., MIDAY E., GORDON J.
A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies
Analytical Biochem., 1982, 119, 142-147
- 39 - HAZEM K.C., BOURGEOIS L.D., CARPENTER J.F.
Cryoprotection of antibody by organic solutes and organic solute/divalent cation mixtures
Arch. Biochem. Biophys., 1988, 267, 363-371
- 40 - HEILMANN C., BARINGTON T., JIGSGAARD T.
Subclass of individual IgA-secreting human lymphocytes
J. Immunol., 1988, 140, 1496-1499
- 41 - HEINER D.C., LEE S.I., SHORT J.A.
IgG4 subclass deficiency syndromes
Monogr. Allergy, 1986, 20, 149-156

- 42 - HERMAN J.
 in "Monographie sur l'immunotherapie specifique en allergologie"
 institut Français de Recherche en Allergologie Eds, 1985
- 43 - HOOGENRAAD N.J., WRAIGHT C.J.
 The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody
 production in "Methods in enzymology" J.J. Langone, H. Van Vunakis eds
 Academy Press, London, 1986, 121, 375-381
- 44 - HUSSAIN R., POINDEXTER R.W., WISTAR R., REIMER C.B.
 Use of monoclonal antibodies to quantify subclasses of human IgG
 J. Immunol. Methods, 1986, 93, 89-96
- 45 - JEFFERIS R.
 Human IgG subclass-specific epitopes recognised by murine monoclonal anti-
 bodies
 Monogr. Allergy, 1986, 20, 26-33
- 46 - JEFFERIS R., REIMER C.B., SKVARIL F., DE LANGE G., LING N.R., LOWE J., WALKER
 M.R., PHILLIPS D.J., ALOISIO C.H., WELLS T.W., VAERMAN J.P. et Coll.
 Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-
 classes : results of an IVIS/WHO collaborative study
 Immunol. Lett., 1985, 10, 223-252
- 47 - JEGANATHAN S., UFOMATA D., HOBKIRK J.A., IVANYI L.
 Immunoglobulin A1 and A2 subclass of salivary antibodies to Candida
albicans in patients with oral candidosis
 Clin. Exp. Immunol., 1987, 70, 316-321
- 48 - KABAT E.A., WU T.T.
 Immunoglobulins
 Ann. N.Y., Acad. Sci., 1971, 190, 382
- 49 - KATKA K., ESKOLA J., GRANFORS K., KOISTINEN J., TOIVANEN A.
 Serum IgA deficiency and anti-IgA antibodies in pernicious anemia
 Clin. Immunol. Immunopathol., 1988, 46, 55-60

- 50 - KENNET R.H.
*Cloning of hybridomas
in "Monoclonal antibodies"*
Harcourt B., Jovanovitch eds. Plenum Press, New York, 1982, p 372
- 51 - KIENLE E., BUSCHMANN H.G.
*Specificity, cross-reactivity and competition profile of monoclonal anti-
bodies to staphylococcal enterotoxins B and C1 detected by indirect enzyme
linked immunosorbent assays*
Med. Microbiol. Immunol., 1989, 178, 127-133
- 52 - KITT S., CHANG WOO LEE, FINK J.N., CALVANICO M.J.
immunoglobulin G4 in pigeon breeder's disease
J. Lab. Clin. Med., 1986, 108, 442-447
- 53 - KOHLER G., MILSTEIN C.
*Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predetined
specificity*
Nature, 1975, 256, 495-497
- 54 - LANE R.D., CRISSMAN R.S., GINN J.
*High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies
against weak immunogens*
in "Methods in enzymology" - J.J. Langone, H. Van Vunakis eds
Academic Press. London, 1986, 121, 182-192
- 55 - LANE R.D., CRISSMAN R.S., LACHMAN M.F.
*Comparison of polyethylene glycols as fusogens for producing splenocyte
myeloma hybrids*
J. Immunol. Methods, 1984, 72, 71-75

- 56 - LEDER J.
L'origine génétique de la diversité des anticorps
Four la science, 1983, 5, 81-91
- 57 - LEVINSON A.I., TAR L.
In vitro IgM, rheumatoid-factor production induced by tetanus toxoid
J. Allergy Clin. Immunol., 1988, 81, 730-736
- 58 - LINDE G.A., GRANSTROM M., ORWELL C.
Immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass enzyme-linked immunosorbent assays compared with microneutralization assay for serodiagnosis of mumps infection and determination of immunity
J. Clin. microbiol., 1987, 25, 1653-1658
- 59 - LITTLEFIELD J.W.
Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinations
Science, 1964, 145, 709
- 60 - LJUNGGREN K., BRÖLIDEN P.A., MORFELDT-MANSON L., SONDAL M., WAHREN B.
IgG subclass response to HIV in relation to antibody-dependent cellular cytotoxicity at different clinical stages
Clin. Exp. Immunol., 1988, 72, 434-447
- 61 - LORENZO F., JOLIVET A., LOOSFELT H., THU VO HAI M., BRAILLY S., PERROT-APPLANAT M., MILGROM E.
A rapid method of epitope mapping
Eur. J. Biochem., 1988, 176, 53-60
- 62 - LOWE J., BIRD P., HARDIE D., JEFFERIS R., LING N.R.
Monoclonal antibodies to determinants on human gamma chains : properties of antibodies showing subclass restriction or subclass specificity
Immunology, 1982, 47, 329-336

- 63 - LUCKENBACH G.A.
Developpement des anticorps monoclonaux et des anticorps anti-idiotypiques pour le traitement des tumeurs solides
Triangle, 1987, 27, 105-111
- 64 - LUCY J.A.
The fusion of biological membranes
Nature, 1970, 227, 815-817
- 65 - LUE C., TARKOWSKI A., MESTECKY J.
Systemic immunization with pneumococcal polysaccharide vaccin induce a predominant IgA2 response of peripheral blood lymphocytes and increases of both serum and secretory anti-pneumococcal antibodies
J. Immunol., 1988, 140, 3793-3800
- 66 - MAGNUSSON G.G.M., CESBRON J.Y., DJURUP R., CAPRONA., JOHANSSON S.G.O.
Raised serum IgG4 levels in patients with atopy and filariasis : application of an automated particle-counting immunoassay using monoclonal antibody
Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 1986, 81, 238-244
- 67 - MAKLER M.T., BAKKE A.C., PIPER R.C.
An enzyme immuno assay for the flow cytometer (FEIA)
J. Immunol. Methods, 1988, 108, 137-143
- 68 - MALE D., CHAMPION B., COOKE A.
in "Immunologie : le système immunitaire et sa régulation" - W.H.Fridman Ed.
MEDSI, McGraw-Hill, Paris, 1988, 1, 2-212
- 69 - MARIANI N., CIANFRIGLIA M., CASSONE A.
Is mouse IgM purification on protein A possible ?
Immunol. Today, 1989; 10, 115-116

- 70 - MARK J.
Learning how to bottle the immune system
Science, 1989, 246, 1250-1251
- 71 - MASUHO Y.
Human monoclonal antibodies : prospects for use as passive immunotherapy
Serodiagnosis and immunotherapy in infectious disease, 1988, 2, 319-340
- 72 - Mc KEARN T.J.
Method for growing hybridomas in rats or mice
in "Monoclonal antibodies" - New York - Plenum Press, Ed. Harcourt B. Janovich, 1982, p 374
- 73 - MERLINI G., FARHANGI M., OSSERMAN E.F.
Monoclonal immunoglobulins with antibody activity in myeloma, macroglobulinemia and related plasma cell dyscrasias
Semin. Oncology, 1986, 13, 350-365
- 74 - MERRETT J., BARNETSON R. ST C., BURR M.L., MERRETT T.G.
Total and specific IgG4 antibody levels in atopic eczema
Clin. Exp. Immunol., 1984, 56, 645-652
- 75 - MIYAZAWA H., INOUE S., SAKAGUCHI M., KOIZUMI K.
A reverse-sandwich ELISA for IgG antibody to a pollen allergen
J. Allergy. Clin. Immunol., 1988, 82, 407-413
- 76 - MULLER F., MOSKOPHIDIS M., BORKHARDT H.L.
*Detection of immunoglobulin antibodies to *Treponema pallidum* in a modified enzyme-linked immunosorbent assay*
Eur. J. Clin. Microbiol., 1987, 6, 35-39
- 77 - NEWSHOLME P., NEWSHOLME E.A.
Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture
Biochem. J., 1989, 261, 211-218

- 78 - OCHS B.D., WEDGWOOD R.J.
 IgG subclass deficiencies
 Ann. Rev. Med., 1987, 38, 325-340
- 79 - OGAWA T., Mc GHEE M.L., MOLDOVEANU Z., HAMADA S., MESTECKY J., Mc GHEE J.R.
Bacteroides specific IgG and IgA subclass antibody - secreting cells
 isolated from chronically inflamed gingival tissues
 Clin. Exp. Immunol., 1989, 76, 103-110
- 80 - OI V.T., HERZENBERG A.
 Immunoglobulin-producing hybrid cell lines
 in "Selected methods in cellular immunology"
 Mishell B.E., Shingi S.M. eds -
 Freeman W.H, San Francisco, California, 1980, p 351
- 81 - ORLIK O., ALTAMER C.
 Modifications of hybridoma technology which improve the yield of mono-
 clonal antibody producing cells
 J. Immunol. Methods, 1988, 115, 55-59
- 82 - OSTBERG L.
 Utilisation therapeutique des anticorps monoclonaux
 Triangle, 1987, 22, 113-116
- 83 - OSTER G.F., CHENG L.Y., MOORES H-P. II., PERELSON A.S.
 Vesicle formation in the Golgi apparatus
 J. Theor. Biol., 1989, 141, 463-504
- 84 - OUCHTERLONY O.
 Diffusion in gel methods for immunological analysis
 in "Progress in Allergy"
 Kallos F., Waksman B.H. eds
 Karger, Basel/New York, 1962, 6, 30-154

- 85 - FALLAVACINI M.G., HAENDEL S., ROSETTE C., BARLETT R.
Rapid screening and selection of monoclonal antibodies by bivariate flow cytometric analyses
J. Immunol. Methods, 1989, 117, 99-106
- 86 - PAOLUCCI F.
Monoclonal antibody screening by ELISA
Method. enzym. Anal., 1986
- 87 - PAPADEA C., CHECK I., REIMER C.
Monoclonal antibody based solid-phase immuno enzymometric assays for quantifying human immunoglobulin G and its subclasses in serum
Clin. Chem., 1985, 31, 1940-1945
- 88 - PERSSON M.A.A., BROWN S.E., STEWARD M.W., HAMMARSTROM L., SMITH C.I.E., HOWARD C.R., WAHL M., RYNNEL-DAGOO B., LEFRANC G., CARBONARA A.O.
IgG subclass-associated affinity differences of specific antibodies in humans
J. Immunol., 1988, 140, 3875-3879
- 89 - FOULSEN L.K., STAHL SKOV P., MOSBECH H., WEBKE B.
Role of IgG4 in histamine release from human basophil leucocytes
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1988, 80, 383-390
- 90 - RUBIN R.L., TANG F.L., LUCAS A.H., SPIEGELBERG H.L., TAN E.M.
IgG subclasses of anti tetanus toxoid antibodies in adult and newborn normalsubjects and in patients with systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and drug-induced autoimmunity
J. Immunol., 1986, 137, 2522-2527
- 91 - SAMOILOVICH S.R., DUGAN C.B., MACARIO A.J.L.
Hybridoma technology : new developments of practical interest
J. Immunol. Methods, 1987, 101, 153-170

- 92 - SAMOSZUK M.K., SHOLLY S., GUPTA S., LUKES R.J.
Enzyme immunoassay for detection of monoclonal immunoglobulin in lymph nodes
Cancer, 1987, 60, 2721-2726
- 93 - SANZ I., KELLY P., WILLIAMS C., SCHOLL S., TUCKER P., CAPRA J.D.
The smaller human V α gene families display remarkably little polymorphism
EMBO J., 1989, 8, 3741-3748
- 94 - SAVILAHTI E., KLEMOLA T., CARLSSON B., MELLANDER L., STENVIK M., HOVI T.
Inadequacy of mucosal IgM antibodies in selective IgA deficiency : excretion of attenuated Polio viruses is prolonged
J. Clin. Immunol., 1988, 8, 89-94
- 95 - SCHNEIDER Y.J.
Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum- and protein-free culture medium
J. Immunol. Methods, 1989, 116, 65-77
- 96 - SCHOTS A., VAN DER LEEDE B., DE JONGH E., EGBERTS E.
A method for the determination of antibody affinity using a direct ELISA
J. Immunol. Methods, 1988, 109, 225-233
- 97 - SCHREK R.
The effect of high temperature and of moccasin venom on the viability of rabbit lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes as determined by the method of unstained cell counts
Arch. Path. (Lab. Med.), 1943, 35, 857
- 98 - SENE C., BOSCHETTI E., MOROUX Y.
Purification des anticorps monoclonaux extraits du surnageant de culture des hybridomes par chromatographie liquide
Bio-Sciences, 1985, 4, 145-147

- 99 - SHACKELFORD P.G., GRANOFF D.M., NELSON S.J., SCOTT M.G., SMITH D.S.,
NANN M.H.
*Subclass distribution of human antibodies to Haemophilus influenzae type b
capsular polysaccharide*
J. Immunol., 1987, 138, 587-592
- 100 - SHAKIB F., MORROW BROWN H., PHELPS A., REDHEAD R.
Study of IgG subclass antibodies in patients with milk intolerance
Clin. Allergy, 1986, 16, 451-458
- 101 - SHOEMAKER H., WALL M., ZURAWSKI V.
Diagnostics : le challenge des anticorps monoclonaux sondes ADN
Biofutur, 1985, 3, 57-59
- 102 - SINGH G., KUBIAS S.
Rescue of hybrids from infected cultures
J. Immunol. Methods, 1988, 107, 289-290
- 103 - SMITH D.J., KING W.F., TAUBMAN M.A.
*Isotype subclass and molecular size of immunoglobulins in salivas from
young infants*
Clin. Exp. Immunol., 1989, 76, 97-102
- 104 - SUBNAGA R., ABDQU N.I.
*Private idiotypes on human polyclonal IgG anti-DNA antibodies are not
expressed on coexisting IgM anti-DNA antibodies in systemic lupus
anythematosus*
Clin. Immunol. Immunopathol., 1988, 49, 251-260
- 105 - TEH J.G., THOMSON C.H., MCKENZIE I.F.C.
*Production of monoclonal antibodies to serum antigens in colorectal
carcinoma*
J. Immunol. Methods, 1988, 110, 101-109

- 106 - THOMAS J.P.
Etude des différents mécanismes d'hypersensibilité spécifique susceptibles d'intervenir dans les maladies paradontales
Thèse de doctorat chirurgie dentaire, 1981, Nancy-Metz
- 107 - THORSTEINSSON L., OGMUNSDOTTIR H.M., SIGFUSSON A., ARNASON A.,
EIJOLFSSON G., JENSSON O.
*The first Icelandic family with x-linked agammaglobulinaemia :
studies of genetic markers and immune function*
Scand. J. Immunol., 1990, 32, 273-280
- 108 - TOMITA M., TSUNG T.Y.
*Selective production of hybridoma cells : antigenic-based pre-selection of
B lymphocytes for electrofusion with myeloma cells*
Biochem. Biophys. Acta, 1990, 1055, 199-206
- 109 - TRIPUTTI F., GUERIN S.L., MOORE D.D.
Two mechanisms for the extinction of gene expression in hybrid cells
Science, 1983, 241, 1205-1207
- 110 - TYMOWSKI A.
Milieux de cultures cellulaires animales
Biofutur, 1985, 4, 35-37
- 111 - URBANEK R.
IgG subclasses and subclass distribution in allergic disorders
Monogr. Allergy, 1988, 23, 33-40
- 112 - VOGLER E.A.
A compartmentalized device for the culture of animal cells
Biomat., Act. Cells, Act. org., 1989, 17, 597-610

- 113 - WAGNER D.K., NELSON D.L., WALSH E.E., REINER C.B., HENDERSON F.W., MURPHY B.R.
Differential immunoglobulin G subclass antibody titers to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins in adults
J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 748-750
- 114 - WALKER L.C., DHUT S., GREGORY W.M., HABERSHAW J.A.
Cross-reactive variable-region associated epitopes of human IgG1 lambda para- protein detected by a monoclonal antibody panel
Immunology, 1987, 61, 247-254
- 115 - WATT P.J., ZARDIS M., LAMBDEN P.R.
Age related IgG subclass response to respiratory syncytial virus fusion protein in infected infants
Clin. Exp. Immunol., 1986, 64, 503-509
- 116 - WEETMAN A.P., COHEN S.
The IgG subclass distribution of thyroid autoantibodies
Immunol. Lett., 1986, 13, 335-341
- 117 - WEHMEIER U., RILKE H., PATZOLD U., SCHEDEL I., DEICHER H.
Crossreacting idiotypes of kappa-monoclonal immunoglobulins M in sera of patients with Waldenstrom's macroglobulinemia
Immunobiology., 1987, 176, 144-153
- 118 - WELLS D.E., BIBB W.F.
A method for freezing hybridoma clones in 96-wells microculture plates
in "Methods in enzymology". J.J. Langone, H. Van Vunakis eds
Academic Press, London, 1986, 121, 416-422
- 119 - WILLIAMSON A.R., TURNER M.W.
in "Essential Immunogenetics"
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987, 432 p.



- 120 - WINDEBANK K.P., FAUX J.A., CHAPEL H.M.
ELISA determination of IgG antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides in a group of children
J. Immunol. Methods, 1987, **140**, 143-148
- 121 - WINKELHAKKE J.L.
Immunoglobulin structure and effector functions
Immunochemistry, 1978; **15**, 695-714
- 122 - WINTER G., MILSTEIN C.
Man-made antibodies
Nature, 1991, **349**, 293-299
- 123 - ZEE Van der J.S., SVIETEN P., AALBERSE R.C.
Serologic aspects of IgG4 antibodies
J. Immunol., 1986, **137**, 3566-3571
- 124 - ZOUALI M., DRUILHE P., EYQUEM A.
IgG subclass expression of anti-DNA and anti-ribonucleoprotein autoantibodies in human malaria
Clin. Exp. Immunol., 1986, **66**, 273-278

