

25001510

212

REPUBLIQUE DU SENEGAL

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
B.P 2057, DAKAR-HANN

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

21940001

15.10

**RAPPORT DE STAGE SUR LA PREPARATION
ET L'EVALUATION DES ANTICORPS
MONOCLONAUX EFFECTUE AU CIRAD-EMVT,
MAISONS-ALFORT, FRANCE,
DU 1er AU 28 DECEMBRE 1993**

Par Mamadou SEYE*

RAPPORT N° 001 PATHO. ANIM.
Janvier 1994

* : Assistant de Recherches, Laboratoire de Parasitologie.

v

**RAPPORT DE STAGE SUR LA PREPARATION
ET L'EVALUATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX
EFFECTUE AU CIRAD-EMVT, MAISONS-ALFORT, FRANCE,
DU 1^{er} AU 28 DECEMBRE 1993**

—
Par Mamadou SEYE*
(Janvier 1994)

INTRODUCTION

Les techniques modernes d'analyse sérologique utilisent de plus en plus des anticorps monoclonaux. Ces anticorps, plus que les polyclonaux, offrent une haute spécificité et permettent d'obtenir des résultats sérologiques plus précis et souvent plus fiables. Cependant, de tels anticorps, outre qu'ils coûtent cher sur le marché, sont fragiles et requièrent des conditions de transport appropriées pour garder leurs propriétés séro-immunologiques. De plus, il est toujours difficile de faire venir de l'extérieur les réactifs que l'on désire dans les délais voulus. Le mieux est d'être en mesure de les préparer sur place, avec le double avantage d'en avoir une connaissance précise et de pouvoir leur assurer une conservation adéquate afin d'en disposer à tout moment. C'est à cette fin que nous avons effectué un stage d'initiation aux techniques de production et d'évaluation des anticorps monoclonaux au Laboratoire de "PATHOTROP" du Département Elevage et Médecine Vétérinaire Tropicale du Centre de Coopération internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD/EMVT) à Maisons-Alfort, du 1^{er} au 28 décembre 1993. Le stage a eu lieu à l'initiative du Directeur des Recherches sur les Productions et la Santé animales de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA/DRPSA), avec une allocation de stage attribuée par le CIRAD.

L'objet de ce rapport est de rendre compte de ce stage. Dans un premier temps, un bref rappel sera fait sur les caractéristiques immunobiologiques qui expliquent la spécificité des anticorps monoclonaux et justifient leur mode de production; dans un deuxième temps, les techniques que nous avons apprises au cours du stage seront résumées avant d'en tirer les principales conclusions.

1. FONDEMENTS IMMUNOBIOLOGIQUES DE: LA PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

L'organisme d'un être vivant immuno-compétent renferme toute une population de cellules sécrétrices d'anticorps élaborés pour réagir avec des antigènes ou des épitopes différents. C'est pourquoi, dans un sérum donné, les types d'anticorps circulants spécifiques d'un même antigène sont extrêmement rares (de l'ordre de 1/10). De tels anticorps, dits polyclonaux, offrent donc une spécificité souvent insuffisante et peuvent de ce fait donner des résultats sérologiques difficiles à interpréter.

Par contre, les anticorps monoclonaux sont des immunoglobulines exclusivement spécifiques d'un immunogène donné ou d'un épitope précis. Ils sont sécrétés à perpétuité par une cellule unique (et ses descendants), laquelle cellule ayant été sélectionnée et entretenue *in vitro* en raison de cette aptitude particulière.

—
* : Assistant de Recherches, ISRA/DRPSA/LNERV, B.P. 2057, Dakar, Sénégal

Ces définitions très sommaires dissimulent cependant la complexité des phénomènes immunobiologiques qui entrent en jeu et les multiples manipulations requises, qu'il faut maîtriser et intégrer dans un système cohérent pour obtenir les anticorps désirés. L'on sait en effet que la production des immunoglobulines est du domaine de l'immunité de type humorale, et qu'elle incombe aux lymphocytes de la lignée B. Ces cellules, générées à partir de la moelle osseuse, sont présentes en grand nombre dans les organes lymphoïdes (rate et ganglions lymphatiques chez les mammifères). Elles se mobilisent à la suite de l'introduction répétée d'un immunogène dans l'organisme, avec cette importante particularité que chaque cellule reconnaîtra et réagira avec un antigène et un seul. Malheureusement, ces lymphocytes sont à durée de vie très limitée (3 à 4 jours) après leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. De plus, on ne peut pas les cultiver seules *in vitro*. Il a fallu recourir à des artifices biochimiques pour contourner ces difficultés. L'option ici est de fusionner ces cellules sécrétrices avec des myélomes non sécréteurs mais pouvant être multipliés par culture. La production des anticorps monoclonaux résulte finalement de la mise au point et de la combinaison réussie de techniques performantes en vue des résultats ci-dessous:

- induction d'une immunité humorale de niveau satisfaisant chez des animaux de laboratoire;
- identification de la nature de la réponse immunitaire;
- fusion des cellules sécrétrices d'anticorps avec des myélomes, puis culture cellulaire *in vitro* assurant la survie des cellules fusionnées ainsi qu'une sécrétion pérenne;
- élimination des cellules non fusionnées;
- évaluation de la spécificité des anticorps produits;
- sélection et maintien en vie de cellules **individuelles** sécrétrices d'anticorps spécifiques;
- purification éventuelle de ces anticorps;
- enfin, stockage adéquat des réactifs finaux ainsi obtenus.

Le paragraphe qui suit décrit les méthodes et techniques apprises à cette fin au cours de ce stage.

II. PRODUCTION ET EVALUATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Le principe de base de la production des anticorps monoclonaux se résume comme suit: après **sensibilisation d'un animal de laboratoire** avec un antigène donné et s'être assuré par criblage sérologique que l'animal a donné une réponse immunitaire à cette sensibilisation, prélever la rate, libérer et **recueillir les lymphocytes** censés sécréter les anticorps désirés. **Fusionner ces** cellules de rate **avec des myélomes non sécréteurs**. Ainsi on obtient des **hybrides** capables de se multiplier *in vitro* (gène de multiplication apporté par le myélome) tout en continuant leur sécrétion (gène de sécrétion du lymphocyte de souris immunisée). Les myélomes non fusionnés seront éliminés par un milieu de sélection approprié. **Après identification sérologique des hybrides sécréteurs** d'anticorps spécifiques de l'antigène de sensibilisation, effectuer un **clonage** permettant d'obtenir des cellules individuelles. La sécrétion de **chaque clone est alors testée** avant d'être éventuellement retenue et conservée comme anticorps monoclonal spécifique.

2.1- Immunisation d'animaux de laboratoire

Il s'agit de sensibiliser un animal immuno-compétent avec l'antigène contre lequel on souhaite qu'il élabore des anticorps spécifiques. Ici s'opère un choix concernant l'espèce animale à immuniser, selon des critères déterminés (immuno-compétence bien connue, bonne santé, etc.). A l'EMVT, des souris BALB/CBY JICO élevées dans de bonnes conditions sanitaires et hygiéniques sont utilisées pour ce type de travail et ont presque toujours donné satisfaction. Le protocole d'immunisation appliqué est le suivant:

- Jour 0 : Injection intra-péritonéale (I.P.) de 0,3 ml d'une émulsion à parties égales de l'antigène et d'adjuvant **complet** de Freund, l'antigène devant renfermer 40 à 50 µg de protéines.

- **Jour 0 + 30** : Injection en sous-cutané (S.C.) de la même quantité de protéines antigéniques mais contenue dans 0,2 ml d'une émulsion à parties égales de l'antigène et d'adjuvant **incomplet** de Freund.

- Jour 0 + 60 : Injection intraveineuse (I.V.) de 0,1 ml d'antigène renfermant 20 µg de protéines, mais **sans adjuvant**. A noter que la voie veineuse, bien que préférable, n'est pas impérative: en cas de difficulté, injecter en I.P. En outre, cette injection de rappel final est faite 3 à 5 jours avant l'étape suivante: la fusion. Enfin il est important de surveiller de temps à autre la souris dans les heures qui suivent l'injection pour s'assurer qu'elle n'est pas morte d'un choc anaphylactique.

2.2- Fusion

Comme indiqué plus haut, les cellules de rate sécrétrices d'anticorps ont une durée de vie très limitée et elles ne peuvent pas être cultivées seules *in vitro*. Il est nécessaire de les coupler avec d'autres cellules qui, elles, peuvent se **multiplier** en culture, pour obtenir des hybrides capables de se multiplier et de sécréter. Ce couplage est appelé fusion. Les étapes de la **fusion** sont indiquées ci-dessous.

2.2.1- Préparation des myélomes partenaires de fusion

On utilise ici de cellules NS1 générées par des souris BALB/C à la suite d'injection d'huiles minérales dans le péritoine. Ces cellules ont été reconnues non sécrétrices et capables de fusionner avec des lymphocytes sécréteurs d'anticorps.

Quatre à cinq jours avant la fusion, le tube de NS1 congelé dans l'azote liquide en est sorti et décongelé rapidement dans un bain d'eau chauffée à 37°C environ. Reprendre les cellules dans du milieu essentiel minimum (MEM) préparé la veille et additionné d'Azagadine et de sérum de veau foetal (SVF). Centrifuger pour éliminer le DMSO qui avait servi de milieu de conservation dans l'azote, puis **transférer** les cellules dans une petite boîte de culture cellulaire. Ajouter quelques ml de milieu. Placer à l'étuve réglée à 37°C et 5% de CO₂. Contrôler tous les jours la multiplication des cellules, en effectuant plusieurs repiquages.

La veille de la fusion, repiquer mais en utilisant du MEM additionné d'Hypoxanthine-Thymidine (HT), de SVF et d'une solution antibiotique.

2.2.2- Préparation des cellules de rate de souris immunisée

La souris immunisée est sacrifiée et la rate prélevée stérilement et lavée 3 fois dans des boîtes de Pétri contenant une petite quantité de MEM. A l'aide d'aiguilles à injection stériles montées sur deux seringues, dilacérer la rate pour en libérer les cellules qui sont ensuite déposées dans de la glace pilée pour laisser sédimenter les grosses particules tissulaires non désirées.

Après sédimentation, prélever la suspension de cellules de rate et la déposer délicatement dans un tube à centrifuger conique, sur un coussin de 2 ml de SVF. Laver les cellules à deux reprises par centrifugations successives, en reprenant à chaque fois le culot dans du MEM.

Ces manipulations sont faites le jour même de la fusion; il est nécessaire de travailler assez vite en raison de la fragilité des cellules de rate.

2.2.3- Réalisation de la fusion

Le produit chimique utilisé ici pour fusionner les NS1 avec les cellules de rate est le Polyéthylène glycol 1500 (PEG) en solution à 50% dans de l'Hépes.

- Sortir les boîtes de culture de myélomes, décoller à la pipette les cellules adhérentes, transférer dans des tubes coniques et centrifuger. Reprendre le culot dans du MEM sans SVF; conserver ce premier surnageant. Laver à deux reprises les NS1 dans le milieu MEM sans additif Le culot de la dernière centrifugation est repris dans le même milieu MEM.

- Effectuer un comptage du nombre de NS1 contenues dans la préparation, en utilisant une cellule de Malassez et en tenant compte du volume total de la suspension cellulaire, ainsi que de la dilution éventuellement faite pour faciliter le comptage. Faire un décompte identique pour les cellules de rate de la souris immunisée.

- Une fois les nombres de NS1 et de cellules de rate connus, calculer le volume à prélever dans chaque suspension cellulaire pour que le nombre de cellules de rate soit 5 à 6 fois celui des NS 1. Mélanger les deux préparations en respectant ces proportions, centrifuger la mixture, puis écarter soigneusement le surnageant en égouttant parfaitement.

- Homogénéiser le culot par petites secousses ou par glissement de l'extrémité du tube sur une surface rugueuse, puis y déposer goutte à goutte, en 30 secondes, 0,5 ml de solution de PEG. La durée totale du contact avec le PEG est de 2 minutes. Au bout de ce temps, stopper la réaction avec du MEM additionné de 5% de SVF. Déposer le milieu goutte à goutte, puis ml par ml, en agitant doucement. Compléter avec le même milieu pour obtenir une quantité égale à celle du premier surnageant de NS 1. Ajouter ce surnageant après avoir mis du SVF de manière à en obtenir une concentration finale de 20%. Enfin compléter avec la solution antibiotique.

- Répartir dans des plaques de culture cellulaire à 96 cupules à fond plat, à raison de 100 μ l par cupule. Incuber à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'au soir ou au plus tard le lendemain matin.

2.3. Sélection et culture des cellules fusionnées

Les manipulations précédentes (2.2.3) permettent en principe d'obtenir la fusion des NS 1 avec les cellules de rate de la souris immunisée. En réalité, il existe toujours un nombre plus ou moins important des unes et des autres qui n'auront pas fusionné. Les cellules de rate, on l'a vu, ne peuvent pas vivre seules *in vitro*. Quant aux NS1 non fusionnés, ils n'offrent plus d'intérêt et doivent être éliminés. Un milieu spécial est nécessaire pour cela. Ce milieu est à base de MEM à 20% de SVF, additionné de 2% de HT contenant cette fois de l'Aminoptérine (HAT), de 1% d'Oxaloacétate Pyruvate Insuline (OPI), de 0,5 ng/ml d'Interleukine (IL6), sans oublier la solution antibiotique (1%).

Prélever en partie le surnageant des cupules des plaques incubées le matin ou la veille et le remplacer par 200 µl par cupule du milieu spécial ci-dessus indiqué. Incuber à nouveau dans les mêmes conditions, en changeant le milieu tous les quatre à cinq jours, en fonction de l'aspect des cellules. Identifier au fur et à mesure, par des numéros, les cupules où apparaissent des hybrides et surveiller la croissance de ceux-ci.

2.4. Caractérisation des hybrides matures

Cette étape, réalisée lorsque l'évolution des colonies dans les cupules est jugée suffisante (à partir d'une semaine après la fusion), consiste à identifier les hybrides qui sécrètent des anticorps spécifiques de l'antigène de sensibilisation injecté à la souris. Plusieurs techniques sérologiques sont disponibles à cette fin, et le choix dépendra des performances respectives des systèmes d'analyse sérologique implantés au laboratoire. Signalons pour mémoire qu'à l'EMVT nous avons effectué ce criblage par la technique ELISA de détection des anticorps sur micro plaques. Dans tous les cas, le test inclura un anticorps monoclonal reconnu spécifique de l'antigène, ainsi qu'un témoin négatif, qui permettront d'apprécier les réactions des surnageants testés.

2.5. Clonage des hybrides sécréteurs.

Là il s'agit d'obtenir des cupules à hybride unique, par dilutions successives. La méthode de dilution est variable et dépend des indications fournies par la littérature scientifique sur la question ainsi que de l'expérience personnelle du technicien. Le principe est de prélever une colonie d'hybrides à la fois, à partir des cupules à résultat sérologique satisfaisant et de cultiver chacun dans 1 ml de milieu spécial, dans une cupule d'une plaque de 24 puits. Chaque colonie ciblée sera ensuite déposée dans la cupule A1 d'une plaque de culture à 96 cupules contenant le milieu spécial. Le système de dilution adopté est alors appliqué de manière à obtenir une cellule (un clone) dans chaque cupule de la rangée horizontale inférieure de la plaque (rangée H). Le calcul des quantités respectives de suspension cellulaire et de milieu spécial par cupule dépendra du nombre de cellules comptées par ml. Ces plaques de clonage sont ensuite incubées à 37°C et 5% de CO₂ et sont examinées régulièrement pour apprécier l'état des clones éventuels.

2.6. Identification des clones sécréteurs et caractérisation des sécrétions.

Cette manipulation vise à obtenir des réactions antigène-anticorps spécifiques en utilisant l'antigène de sensibilisation de la souris d'une part, les surnageants des clones d'autre part. Une étude plus poussée permet de déterminer les sous-classes d'immunoglobulines sécrétées par chaque clone. Dans ce cas compléter la réaction Ag-Ac avec des anti sous-classes (anti IgM, anti IgG1, IgG2a, IgG2b, etc.) Cette étape est alors suivie de l'adjonction d'un conjugué spécifique pour chaque anti sous-classe avant la révélation. Là aussi, les techniques sérologiques appliquées varient d'un laboratoire à un autre. A l'EMVT, la technique ELISA sur membrane nitrocellulose est utilisée avec succès.

A l'issue de ce test, la nature de chaque anticorps monoclonal obtenu est connue. La production proprement dite est terminée. Les étapes suivantes comportent l'entretien des clones, la collecte des surnageants renfermant les anticorps, la purification éventuelle et la conservation. Nous n'avons pas eu l'occasion de suivre ces étapes, le stage étant arrivé à sa fin.

CONCLUSIONS

Il faut dire d'emblée que ce stage s'est déroulé dans d'excellentes conditions d'encadrement et a débouché sur d'importantes acquisitions.

Pour ce qui est de l'application des techniques apprises, il y a lieu de souligner que les différents protocoles exécutés font appel à de nombreux réactifs biochimiques pour préparer les tampons de travail et autres milieux de culture. Ces produits coûtent cher et la plupart ne sont pas commercialisés sur le marché local. Une planification précoce est nécessaire pour en disposer en temps voulu. L'expression anticipée des besoins en prévision des recherches envisagées dans ce domaine aiderait beaucoup à lever cette contrainte.

Concernant le matériel et la verrerie, les équipements habituellement utilisés en Microbiologie et en Virologie sont requis (hotte à flux laminaire, pompe à air, flacons et plaques de culture, pipettes sous emballage individuel stérile, etc.).

Par ailleurs, un soin particulier est requis quant à l'entretien de l'animalerie qui abrite les souris à immuniser. Faute de quoi, il y aurait le risque de manipuler **des** animaux malades et ayant déjà développé des anticorps autres que ceux que l'on désire.

Pour terminer, rappelons que l'usage des anticorps monoclonaux dans les tests sérologiques représente aujourd'hui une option largement répandue. Cela s'explique par la qualité des résultats qu'ils permettent d'obtenir et le type d'information scientifique que l'on peut en tirer. En outre, une fois le réactif final préparé, de très petites quantités (quelques microlitres) en sont souvent **suffisantes** pour tester plusieurs centaines de sérums. Le temps et les coûts de production des anticorps monoclonaux sont donc finalement amortis par leur extrême économie et leurs remarquables performances.

REMERCIEMENTS

▪ Les autorités du CIRAD/EMVT ont bien voulu prendre en charge la totalité du financement de ce stage, et le Centre international des Etudiants et Stagiaires (CIES) en a assuré la gestion;

▪ M. Le Directeur de l'EMVT a accepté que son Institut abrite le stage;

▪ M. Le Directeur général de l'ISRA a bien voulu donner son autorisation pour effectuer ce stage

▪ M. Le Directeur des Recherches sur les Productions et la Santé animales de l'ISRA a pris l'initiative du stage et a déployé beaucoup d'efforts pour sa réalisation;

▪ M. le docteur P.C. LEFEBVRE, alors chef du Laboratoire de PATHOTROP de l'EMVT, m'a aimablement accueilli dans son service;

▪ Les docteurs Geneviève LIBEAU et **Christian LE GOFF** m'ont encadré à la perfection et m'ont intégré avec courtoisie dans leur équipe de travail;

▪ Madame Martine GLADY, chargée des stages à l'EMVT, a abattu un travail opiniâtre pour l'aboutissement de ce stage et, avec son personnel, en a assuré une parfaite organisation;

▪ Madame SOHAKHA, Secrétaire au Laboratoire de PATHOTROP, ainsi que le personnel du Secrétariat et l'ensemble des techniciens du Laboratoire, m'ont offert une hospitalité constante.

Je tiens à transmettre aux uns et aux autres mes sincères et chaleureux remerciements.