



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

**U.F.R. : Sciences et Techniques Biologiques**  
**Groupe de Formation Doctorale : Biologie**  
et Biochimie structurales, métaboliques,  
moléculaires et nutritionnelles.

**Université de Nancy I**



**Thèse**  
présentée pour l'obtention du

## **Diplôme de Recherches Doctorales en Biochimie**

Soutenue publiquement le 15 juin 1992 par

**Josette VIN CAPIAUMONT**

**UNE EXPERIENCE EN CULTURE DE CELLULES ANIMALES :  
A PROPOS DE LA FABRICATION D'HYBRIDOMES ET DE LA  
PRODUCTION EN MASSE D'ANTICORPS MONOCLONAUX.  
ESSAIS D'AMELIORATION DE LA TECHNOLOGIE**

Travaux effectués au laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine de Nancy sous la  
direction de Monsieur le Professeur Pierre NABET

**Membres du jury :**

Président : M. le Professeur P. NABET :  
Mme le Professeur F. BELLEVILLE NABET :  
M. le Professeur H. BAZIN :  
M le Professeur D. THOMAS :  
M le Docteur A. ROSSINOT :  
Mme le Docteur A. MARC :

Université de Nancy I  
Université de Nancy I  
Université de Médecine de Bruxelles  
Université de Technologie de Compiègne  
Université de Nancy I  
CNRS ENSIC Nancy I

***L'imagination pratique est  
culturellement aussi belle  
que l'imagination fondamentale.***

***Professeur G. de Gennes***

***Prix Nobel de Physique - 1991.***

***A Francis,***

***Céline***

***et Alexandre***

***A mes parents,***

***A ma soeur***

## **REMERCIEMENTS**

***A monsieur le Président du Jury, Monsieur le Professeur Pierre NABET.***

***Par cette thèse, je tiens à lui témoigner ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son laboratoire il y a onze ans aujourd'hui précisément et pour avoir accepté de présider ce jury.***

***Grâce à la considération qu'il a bien voulu me porter et à la confiance qu'il m'a toujours accordée, grâce aussi à ses encouragements, j'ai pu réaliser un travail passionnant qu'il a suivi avec beaucoup d'intérêt.***

***J'ai appris à son contact ce qu'était la recherche et j'ai pu non seulement bénéficier de son enseignement mais aussi de ses hautes qualités humaines.***

***Qu'il trouve ici la modeste expression de ma respectueuse gratitude.***

***A Madame le Professeur Francine BELLEVILLE-NABET.***

***Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance pour ses précieux conseils, sa disponibilité, sa bienveillance et sa parfaite gentillesse à mon égard.***

***Sa présence à mes côtés m'a permis, tout au long de l'élaboration de ce travail, de demeurer vigilante et persévérante.***

***Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de mon profond respect.***

***A Monsieur le Professeur Hervé Bazin.***

***Qui m'a accueillie avec beaucoup de convivialité lors d'un stage aussi passionnant qu'enrichissant dans son laboratoire de la Faculté de Médecine de Bruxelles-Louvain et qui me fait aujourd'hui l'honneur de m'accorder une partie de son temps si compté, en revenant à Nancy pour y juger ce travail.***

***Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance pour sa collaboration avec notre laboratoire et l'aide précieuse qu'il m'a personnellement apportée.***

***A Monsieur le Professeur Daniel Thomas,***

***Qui m'honore aujourd'hui de sa présence dans ce jury. Je suis très heureuse de pouvoir bénéficier de son avis éclairé et de sa très grande expérience dans le domaine des biotechnologies.***

***Je le remercie d'avoir un temps abandonné, et son laboratoire de l'Université Compiègne et, ses charges à la DGRT.***

***Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de mes remerciements les plus sincères.***

***A Monsieur le Docteur André Rossinot, député Maire de la Ville de Nancy***

***Que je ne saurais jamais assez remercier d'avoir bien voulu laisser ce matin les obligations de la vie publique afin de participer à ce jury.***

***Qu'il trouve ici l'expression de ma fidèle et dévouée amitié.***

***A Madame le Docteur Annie Marc.***

***Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté de juger ce travail et pour la fidèle et enrichissante collaboration qui s'est établie entre l'INPL et notre laboratoire.***

***A Madame le Docteur Marie-Andrée Gelot.***

***Qui a bien voulu se rendre disponible pour participer à de nombreuses analyses qui ont contribué à faire avancer ces recherches.  
Qu'elle accepte l'expression de ma reconnaissance.***

***A mes amis,***

***\* Madame le Docteur Brigitte Dousset.***

***Qui par sa présence à mes côtés, ses connaissances et ses encouragements, m'a permis de mener à bien ce travail.***

***Qu'elle trouve ici l'expression sincère de mon admiration et de ma profonde amitié.***

***\* Mademoiselle le Docteur Christine Jacob.***

***Dont la gentillesse, le savoir et la conviction m'ont apporté un réel enrichissement.***

***Qu'elle accepte l'expression de ma sincère amitié.***

***\* Mademoiselle le Docteur Christine Legrand.***

***Qui, avec beaucoup de patience et de pédagogie, m'a souvent permis de me rappeler ce que de nombreuses années passées, m'avaient fait oublier.***

***Au nom d'un long travail en commun, qu'elle soit assurée de toute mon amitié.***

***\* Monsieur Claude Chaigneau.***

***Que j'ai tant de fois sollicité et qui a toujours répondu présent avec beaucoup d'enthousiasme et d'imagination pour m'aider à résoudre mes petits problèmes techniques.***

***Qu'il soit assuré de ma gratitude.***

**Qu'il me soit permis de remercier aussi les personnes qui ont contribué à ce travail et de leur témoigner ma reconnaissance.**

**Tout d'abord Madame Roulland-Dussoix de l'Institut Pasteur qui m'a accueillie avec beaucoup d'attention dans son laboratoire où j'ai appris les techniques de détection des mycoplasmes.**

**A Mademoiselle Catelle et à ses techniciennes pour leur gentillesse et leur grande disponibilité.**

**A Monsieur le Professeur Floquet et à Madame Okart qui nous ont permis de réaliser au laboratoire d'Anatomie Pathologique, le suivi de nos cellules.**

**A tous mes collègues du laboratoire de chimie de l'Hôpital Central qui ont contribué avec beaucoup de patience à la réalisation de ce travail et plus particulièrement Mesdames Didiergeorges, Lausch, Lionnet et Schivi.**

**Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements.**

**A Mademoiselle Valérie Thiefain et Monsieur Eric Guesney qui, avec beaucoup de patience et de gentillesse, ont collaboré à la présentation de ce mémoire.**

**Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sympathie et de ma reconnaissance.**

**Je ne saurais conclure ces remerciements sans une pensée toute particulière pour Farzine Sarem qui a su me communiquer le "virus" de la culture cellulaire, pour Rose Line Hoffman avec qui j'ai travaillé dans la bonne humeur malgré toutes les difficultés que nous avons rencontrées, et pour Jean-Michel Bour qui sera toujours pour moi un "super camarade" en dépit -ou à cause- de nos différences...**



## ABBREVIATIONS

$\alpha$ 1 ATT	alpha 1 antitrypsine
$\alpha$ FP	alpha foeto proteine
$\beta$ glu	B glucuronidase
Ala	Alanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ac	Anticorps
ACE	Antigène carcino embryonnaire
Ac Mc	Anticorps monoclonal
Ag	Antigène
$\mathcal{C}$	Cellules
[C]	Concentration
CD	Clusters of differentiation
CFA	Compete Freund adjuvant
Da	Dalton
DAPI	4-6 Diamine 2 phényl indol dihydrochlorure
DMEM	Milieu essentiel minimum de Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide
D.O.	Densité optique
EBV	Epstein Barr Virus
ELISA	Enzyme linked immuno substrate assay
$\gamma$ GT	Gamma glutamine transférase
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
GOT	Glutamyl oxaloacétate transaminase
HAT	Hypoxanthine -aminoptérine -thymidine
HCG	Hormone gonadotropique chorionique
HGPRT	Hypoxanthine - guanine - phosphoribosyl transférase
HLA	Human leucocyte antigène
hPL	Hormone placentaire lactogène humaine
HT	Hypoxanthine-thymidine
IFA	Incomplete Freund adjuvant
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine

IRMA	Immuno radiometric assay
KLH	Keyhole limpet hemocyanine
LCR	Liquide céphalo rachidien
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
LS	Lactosérum
MDP	Muramyl dipeptide
MEM	Milieu essentiel minimum
NH <sub>3</sub>	Ammoniaque
Pal	Phosphatase alcaline
PBS	Phosphate buffer saline
PEG	Polyéthylène glycol
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluoride
RIA	Radioimmunoassay
RPMI	Roosvelt Park Medical Institute
SCH	Sérum de cheval
SCHTO	Sérum de cheval de Toul
SDMEM	Milieu DMEM supplémenté
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SVF	Sérum de veau foetal
TCM	Milieu conditionné en thymocytes
TCRF	T cell replacing factor
TK	Thymidine kinase

# PLAN

## I - INTRODUCTION

<b>1 - 1 HISTORIQUE</b>	p 1
1 - 1 - 1 La culture de cellules animales	p 1
1 - 1 - 2 Les hybridomes	p 2
<b>1 - 2 OBTENTION DES HYBRIDOMES</b>	p 3
<b>1 - 2 - 1 Généralités</b>	p 3
<b>1 - 2 - 2 Les cellules mères</b>	p 4
1 - 2 - 2 - 1 Les cellules myélomateuses	p 4
1 - 2 - 2 - 2 Les lymphocytes	p 8
<b>1 - 2 - 3 L'immunisation</b>	p 8
1 - 2 - 3 - 1 Immunisation in vivo	p 10
1 - 2 - 3 - 1 - 1 <i>Choix de l'animal</i>	p 10
1 - 2 - 3 - 1 - 2 <i>Antigène</i>	p 10
1 - 2 - 3 - 1 - 3 <i>Dose antigène</i>	p 10
1 - 2 - 3 - 1 - 4 <i>Voies d'injection</i>	p 11
1 - 2 - 3 - 1 - 5 <i>Les adjuvants</i>	p 12
1 - 2 - 3 - 1 - 6 <i>Protocole d'immunisation</i>	p 13
1 - 2 - 3 - 2 Immunisation " <i>in vitro</i> "	p 14
<b>1 - 2 - 4 La fusion</b>	p 15
1 - 2 - 4 - 1 Les différents types d'agents fusionnants	p 15
1 - 2 - 4 - 2 L'électrofusion	p 16
<b>1 - 2 - 5 La culture des hybrides</b>	p 18
<b>1 - 2 - 6 La détection des anticorps monoclonaux</b>	p 19
1 - 2 - 6 - 1 Détection directe sans marqueurs	p 19
1 - 2 - 6 - 2 Les détection indirectes	p 20
1 - 2 - 6 - 3 La technique ELISA	p 20
<b>1 - 2 - 7 Le clonage</b>	p 23
<b>1 - 2 - 8 La conservation des hybrides</b>	p 24
<b>1 - 2 - 9 Les différents types d'hybridomes</b>	p 24
1 - 2 - 9 - 1 Hybridomes souris-souris	p 24
1 - 2 - 9 - 2 Hybridomes rat-rat	p 25
1 - 2 - 9 - 3 Hybridomes croisés	p 25
1 - 2 - 9 - 4 Hybridomes humains-humains	p 26

<b>1 - 3 LA MULTIPLICATION DES HYBRIDOMES</b>	p 28
<b>1 - 3 - 1 La production "in vivo"</b>	p 29
<b>1 - 3 - 2 La production "in vitro"</b>	p 30
1 - 3 - 2 - 1 Les bioréacteurs : principe	p 31
1 - 3 - 2 - 2 Les cultures à cellules immobilisées	p 32
* les matrices en céramique	p 32
* les fibres creuses	p 33
* les microcapsules	p 34
* les systèmes à lit fluidisé	p 35
* les microporteurs	p 36
* les lits spongieux	p 37
1 - 3 - 2 - 3 Les cultures de cellules en suspension	p 38
<b>1 - 3 - 3 Les coûts de production</b>	p42
1 - 3 - 3 - 1 Substitution partielle du sérum par un composé non défini	p 44
1 - 3 - 3 - 2 Substitution partielle du sérum par des composés définis	p 44
1 - 3 - 3 - 3 Substitution totale du sérum	p 47
<b>1 - 4 LES ANTICORPS MONOCLONAUX</b>	p 48
<b>1 - 4 - 1 Notions de base sur le système immunitaire</b>	p 48
<b>1 - 4 - 2 Notions de base sur les anticorps</b>	p 50
1 - 4 - 2 - 1 Structure	p 50
1 - 4 - 2 - 2 Variabilité	p 52
1 - 4 - 2 - 2 - 1 Variabilité isotypique	p 52
1 - 4 - 2 - 2 - 2 Variabilité allotypique	p 52
1 - 4 - 2 - 2 - 3 Variabilité idiotypique	p 52
1 - 4 - 2 - 3 Fonctions	p 53
1 - 4 - 2 - 3 - 1 Immunoglobulines G	p 53
1 - 4 - 2 - 3 - 2 Immunoglobulines A	p 53
1 - 4 - 2 - 3 - 3 Immunoglobulines M	p 53
1 - 4 - 2 - 3 - 4 Immunoglobulines D	p 54
1 - 4 - 2 - 3 - 5 Immunoglobulines E	p 54
<b>1 - 4 - 3 Rappels sur les anticorps monoclonaux</b>	p 55
<b>1 - 4 - 4 Le marché des anticorps monoclonaux</b>	p 56

<b>1 - 4 - 5 Leurs applications</b>	p 59
1 - 4 - 5 - 1 Dans les domaines diagnostique et fondamental	p 59
1 - 4 - 5 - 1 - 1 <i>Purification d'antigènes précieux</i>	p 59
1 - 4 - 5 - 1 - 2 <i>Imagerie médicale</i>	p 59
1 - 4 - 5 - 1 - 3 <i>Biologie</i>	p 60
1 - 4 - 5 - 1 - 4 <i>Pharmacologie - Toxicologie</i>	p 61
1 - 4 - 5 - 1 - 5 <i>Immunologie</i>	p 61
1 - 4 - 5 - 1 - 6 <i>Identification des agents infectieux</i>	p 64
1 - 4 - 5 - 2 Dans le domaine thérapeutique	p 66
1 - 4 - 5 - 2 - 1 <i>Immunothérapie</i>	p 66
1 - 4 - 5 - 2 - 2 <i>Cancérologie</i>	p 68
1 - 4 - 5 - 2 - 3 <i>Thérapeutique anti-HIV</i>	p 70
<b>1-5 OBJECTIF PERSONNEL : OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX</b>	p 72
<b>1 - 5 - 1 OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-hPL</b>	p 72
1 - 5 - 1 - 1 L'hormone placentaire lactogène	p 72
1 - 5 - 1 - 1 - 1 <i>Généralités</i>	p 72
1 - 5 - 1 - 1 - 2 <i>Son rôle</i>	p 72
1 - 5 - 1 - 1 - 3 <i>Intérêt du dosage</i>	p 73
<b>1 - 5 - 2 OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-B LACTOGLOBULINE</b>	p 75
<b>1 - 5 - 3 OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-<math>\alpha</math> 1 ANTITRYPSINE</b>	p 75
1 - 5 - 3 - 1 Généralités	p 75
1 - 5 - 3 - 2 Purification	p 75
<b><u>2 - MATERIEL ET METHODES</u></b>	p 76
<b>2 - 1 LA CULTURE CELLULAIRE</b>	p 76
<b>2 - 1 -1 La chambre de culture et son matériel</b>	p 76
<b>2 - 1 - 2 La détection des mycoplasmes</b>	p 77
2 - 1 - 2 - 1 Culture directe	p 77
2 - 1 - 2 - 1 - 1 <i>Préparation du milieu de base</i>	p 77
2 - 1 - 2 - 1 - 2 <i>Mode opératoire</i>	p 77

2 - 1 - 2 - 2	Technique enzymatique	p 79
2 - 1 - 2 - 2 - 1	<i>Préparation des réactifs</i>	p 79
2 - 1 - 2 - 2 - 2	<i>Mode opératoire</i>	p 80
2 - 1 - 2 - 3	Technique DAPI	p 80
2 - 1 - 2 - 3 - 1	<i>Préparation des réactifs</i>	p 81
2 - 1 - 2 - 3 - 2	<i>Mise en culture</i>	p 81
2 - 1 - 2 - 3 - 3	<i>Technique de révélation de la fluorescence</i>	p 81
2 - 1 - 2 - 4	Interprétation	p 83
<b>2 - 1 - 3</b>	<b>Les milieux de culture</b>	p 84
2 - 1 - 3 - 1	Les milieux de base	p 84
2 - 1 - 3 - 2	Les compléments de milieu	p 84
2 - 1 - 3 - 2 - 1	<i>Le sérum de veau foetal</i>	p 84
2 - 1 - 3 - 2 - 2	<i>Le sérum de cheval</i>	p 87
2 - 1 - 3 - 2 - 3	<i>Le lactosérum</i>	p 87
2 - 1 - 3 - 3	Les contrôles des compléments de milieu	p 91
2 - 1 - 3 - 3 - 1	<i>Recherche de pyrogènes</i>	p 93
2 - 1 - 3 - 3 - 2	<i>Recherche de virus animaux</i>	p 94
2 - 1 - 3 - 3 - 3	<i>Contrôles de stérilité selon les normes de la Pharmacopée Française</i>	p 94
2 - 1 - 3 - 3 - 4	<i>Autres contrôles de stérilité</i>	p 95
2 - 1 - 3 - 3 - 5	<i>Tests de croissance cellulaire</i>	p 96
<b>2 - 2</b>	<b>LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMMUNISATION</b>	p 98
2 - 2 - 1	<b>Le choix des animaux</b>	p 98
2 - 2 - 2	<b>Le choix de l'antigène</b>	p 99
2 - 2 - 2 - 1	L' 1 antitrypsine	p 99
2 - 2 - 2 - 2	L'hPL préparée au laboratoire	p 99
2 - 2 - 2 - 3	L'hPL commerciale	p 100
2 - 2 - 2 - 4	La B lactoglobuline	p 100
2 - 2 - 3	<b>L'immunisation</b>	p 101
2 - 2 - 3 - 1	L'immunisation " <i>in vivo</i> "	p 101
2 - 2 - 3 - 2	L'immunisation " <i>in vitro</i> "	p 101
2 - 2 - 3 - 2 - 1	<i>Le milieu de base</i>	p 101
2 - 2 - 3 - 2 - 2	<i>Préparation du milieu thymocytes</i>	p 102
2 - 2 - 3 - 2 - 3	<i>Récupération des splénocytes</i>	p 102
2 - 2 - 3 - 2 - 4	<i>Le milieu d'immunisation</i>	p 103
2 - 2 - 3 - 2 - 5	<i>Le milieu d'immunisation enrichi</i>	p 103
2 - 2 - 3 - 3	L'immunisation mixte	p 104

<b>2 - 3 LA FUSION CELLULAIRE</b>	p 105
<b>2 - 3 - 1 La culture des cellules de myélomes</b>	p 105
<b>2 - 3 - 2 Les différents modes de fusion</b>	p 106
2 - 3 - 2 - 1 La fusion au PEG	p 106
2 - 3 - 2 - 1 - 1 <i>Préparation des macrophages</i>	p 106
2 - 3 - 2 - 1 - 2 <i>Préparation du PEG</i>	p 107
2 - 3 - 2 - 1 - 3 <i>Préparation du milieu de fusion</i>	p 107
2 - 3 - 2 - 1 - 4 <i>Fusion</i>	p 108
2 - 3 - 2 - 2 L'électrofusion	p 109
<b>2 - 4 LA SELECTION DES HYBRIDOMES</b>	p 111
<b>2 - 4 - 1 Le test ELISA</b>	p 112
2 - 4 - 1 - 1 Les réactifs	p 112
2 - 4 - 1 - 2 Mode opératoire	p 113
2 - 4 - 1 - 3 Remarques	p 114
<b>2 - 4 - 2 Le clonage</b>	p 114
2 - 4 - 2 - 1 Principe	p 114
2 - 4 - 2 - 2 Protocole	p 115
2 - 4 - 2 - 3 Clonage après fusion	p 115
<b>2 - 5 LA SAUVEGARDE DES HYBRIDOMES</b>	p 117
<b>2 - 5 - 1 La congélation</b>	p 117
<b>2 - 5 - 2 La décongélation</b>	p 118
<b>2 - 5 - 3 Le passage en ascite</b>	p 119
2 - 5 - 3 - 1 Protocole	p 119
2 - 5 - 3 - 2 La congélation des liquides d'ascite	p 119
2 - 5 - 3 - 2 - 1 <i>Réactifs</i>	p 119
2 - 5 - 3 - 2 - 2 <i>Protocole</i>	p 120
<b>2 - 6 LA MULTIPLICATION DES HYBRIDOMES "IN VITRO"</b>	p 120
<b>2 - 6 - 1 La culture en spinner</b>	p 120
<b>2 - 6 - 2 La culture en bioréacteur</b>	p 121
2 - 6 - 2 - 1 Description du système	p 122
2 - 6 - 2 - 2 Régulations dans le cytotacteur	p 123
2 - 6 - 2 - 3 Démarrage d'une culture	p 124
2 - 6 - 2 - 3 - 1 <i>Montage du système</i>	p 124
2 - 6 - 2 - 3 - 2 <i>Ensemencement</i>	p 125

2 - 6 - 2 - 4 Le suivi de la culture	p 125
2 - 6 - 2 - 5 Le comptage des cellules	p 127
2 - 6 - 2 - 6 La répartition des cellules à l'intérieur de l'éponge	p 128
<b>2 - 7 LA PURIFICATION DES ANTICORPS</b>	p 129
2 - 7 - 1 Purification à partir du liquide d'ascite	p 129
2 - 7 - 2 Purification à partir des surnageants de culture	p 129
<b><u>3 - RESULTATS DISCUSSION</u></b>	p 130
<b>3 - 1 FABRICATION DE DIFFERENTES SOUCHES D'HYBRIDOMES</b>	p 130
3 - 1 - 1 Fabrication d'hybridomes anti alpha 1 antitrypsine	p 130
3 - 1 - 2 Fabrication d'hybridomes anti beta lactoglobuline	p 133
3 - 1 - 2 - 1 Fusion après immunisation ""in vivo"	p 133
3 - 1 - 2 - 1 - 1 <i>Protocole</i>	p 133
3 - 1 - 2 - 1 - 2 <i>Incidence de la durée de l'immunisation et du milieu de fusion</i>	p 137
3 - 1 - 2 - 2 Fusion après immunisation "in vitro"	p 139
3 - 1 - 2 - 2 - 1 <i>Etude de la relation concentration en antigène/nombre de puits sécrétants</i>	p 139
3 - 1 - 2 - 2 - 2 <i>Première fusion "in vitro"</i>	p 141
3 - 1 - 2 - 2 - 3 <i>Essai de restimulation des clones</i>	p 144
3 - 1 - 2 - 2 - 4 <i>Essai de diminution du temps d'incubation des lymphocytes</i>	p 144
3 - 1 - 2 - 2 - 5 <i>Essai d'augmentation de la dose d'antigène</i>	p 144
3 - 1 - 2 - 2 - 6 <i>Fusion après ajout de MDP</i>	p 145
3 - 1 - 2 - 3 Fusion après immunisation mixte	p 147
3 - 1 - 3 Fabrication d'hybridomes anti-hormone placentaire lactogène	p 148
3 - 1 - 4 Synthèse des résultats des différentes fusions et discussion	p 153



3 - 3 - 3 - 2 Etude comparative du SVF et du LS comme substituts de milieu de culture	p 196
3 - 3 - 3 - 2 - 1 <i>Essai d'estimation de la pousse cellulaire</i>	p 198
3 - 3 - 3 - 2 - 2 <i>Etude de l'évolution de la consommation de glucose</i>	p 200
3 - 3 - 3 - 2 - 3 <i>Etude de la production de lactate</i>	p 201
3 - 3 - 3 - 2 - 4 <i>Etude de la consommation de glutamine</i>	p 202
3 - 3 - 3 - 2 - 5 <i>Etude de la production d'NH3</i>	p 202
3 - 3 - 3 - 2 - 6 <i>Etude de la production d'alanine</i>	p 205
3 - 3 - 3 - 2 - 7 <i>Etude de l'évolution de la LDH</i>	p 205
3 - 3 - 3 - 2 - 8 <i>Etude des enzymes marqueurs de la viabilité cellulaire</i>	p 207
3 - 3 - 3 - 2 - 9 <i>Etude de la production d'anticorps</i>	p 208
3 - 3 - 3 - 3 Etude comparative de différents mode de culture	p 210
3 - 3 - 3 - 3 - 1 <i>Etude de la concentration cellulaire de départ</i>	p 213
3 - 3 - 3 - 3 - 2 <i>Effet du temps de culture</i>	p 214
3 - 3 - 3 - 3 - 3 <i>Effet de la concentration en SVF</i>	p 216
3 - 3 - 3 - 3 - 4 <i>Comparaison des modes de culture</i>	p 216
3 - 3 - 3 - 3 - 5 <i>Comparaison du complément de milieu de culture</i>	p 218
3 - 3 - 3 - 3 - 6 <i>Intérêt du système "éponge"</i>	p 219
3 - 3 - 3 - 3 - 7 <i>Essais de stimulation de la sécrétion</i>	p 219
3 - 3 - 3 - 4 Discussion	p 220
3 - 3 - 3 - 4 - 1 <i>Influence du taux d'ensemencement</i>	p 220
3 - 3 - 3 - 4 - 2 <i>Influence de la concentration en SVF</i>	p 222
3 - 3 - 3 - 4 - 3 <i>Cellules piégées ou en suspension</i>	p 223
3 - 3 - 3 - 4 - 4 <i>Mode d'alimentation</i>	p 224

#### **4 - CONCLUSION**

p 228



## I - INTRODUCTION

### 1 - 1 HISTORIQUE

#### 1 - 1 - 1 La culture de cellules animales

Les étapes les plus marquantes en sont résumées dans le tableau 1.

1879	Claude BERNARD énonce les principes de la création d'un système artificiel, dans lequel les organes pourraient survivre indépendamment d'un organisme entier.
1885	ROUX réalise la première explantation des cellules d'embryon de poulet.
1905	HARRISON cultive une crête neuronale d'amphibien dans de la lymphe coagulée.
1910	ROUS induit une tumeur en utilisant un extrait filtré de cellules tumorales de poulet et montre que ces cellules contiennent le virus du sarcome de Rous.
1913	CARREL montre que les cellules peuvent pousser en culture pendant de très longues périodes quand elles sont nourries aseptiquement par un milieu nutritif.
1946	WHITE développe le premier milieu à composition définie.
1948	GEY établit la lignée cellulaire "Hela".
1950	MORGAN développe le premier milieu chimiquement défini : M-199.

- |      |   |
|------|---|
| 1955 | EAGLE développe le premier Milieu Essentiel Minimum : MEM.  |
| 1958 | TEMIN et RUBIN développent une méthode quantitative d'infection des cellules de poulet par le virus du sarcome de Rous purifié. |
| 1961 | HAYFLICK et MOORHEAD montrent que les fibroblastes humains meurent après un nombre de divisions déterminé.                      |
| 1964 | LITTLEFIELD introduit le milieu HAT pour la sélection d'hybrides cellulaires somatiques.  |
| 1965 | HAM développe un milieu de culture sans sérum dans lequel plusieurs lignées cellulaires peuvent être cultivées.                 |
| 1967 | MOORE et son équipe mettent au point le milieu RPMI 1640 pour la culture des cellules de la lignée lymphoblastoïde.             |
| 1975 | KÖHLER et MILSTEIN produisent le premier hybridome sécrétant un anticorps monoclonal.   |
| 1976 | Premiers développements des milieux contenant des hormones et des facteurs de croissance.                                       |
| 1980 | Production à grande échelle d'interféron et de lymphokines.   |

Tableau 1 : Les principales étapes dans le développement de la culture cellulaire selon MIZRAHI et LAZAR (1988).

## 1 - 1 - 2 Les hybridomes

Mais la date la plus importante est sans doute celle de la parution dans l'hebdomadaire "Nature" de l'article de KÖHLER et MILSTEIN (1975) sur l'obtention, au Medical Research Council laboratory de Cambridge, par fusion cellulaire, d'une cellule capable de se multiplier indéfiniment "*in vitro*" et de sécréter une immunoglobuline, anticorps correspondant à un antigène préalablement choisi : c'est la première cellule hybride sécrétant un anticorps monoclonal, superbe réussite technologique qui leur valu le Prix Nobel en 1984.

## 1 - 2 OBTENTION DES HYBRIDOMES

### 1 - 2 - 1 Généralités

Durant ces dix dernières années, un développement explosif des technologies d'hybridation cellulaire a pris place dans de nombreux laboratoires afin de produire, "*in vitro*", des anticorps monoclonaux.

Un hybridome est une cellule résultant de la fusion "*in vitro*" d'une lignée maligne de plasmocytes, capable de se multiplier indéfiniment et de lymphocytes B provenant de la rate d'un animal préalablement immunisé par des injections successives d'un antigène. Ceci aboutit à la formation d'hétérocaryons qui, après mitose, donneront naissance à des cellules hybrides à noyau unique, rassemblant tout ou partie du matériel chromosomique des deux cellules parentales.

Cette hybridation cellulaire est induite soit par un virus soit par un agent physique ou chimique permettant la fluidification des membranes. Un milieu sélectif permet la survie des seules cellules hybrides qui seront alors multipliées. Ensuite, il est nécessaire, par dilutions successives, de sélectionner parmi les nombreuses cellules filles celles qui sécréteront l'anticorps souhaité qui sera alors recherché dans le surnageant de culture par un test immunologique très sensible. Cette cellule fille sécrétant un anticorps monoclonal particulier, aura hérité des caractères d'immortalité de la cellule maligne plasmocytaire dont elle est issue, et pourra donc se multiplier indéfiniment pour produire l'anticorps monoclonal en permanence.

## 1 - 2 - 2 Les cellules mères

### 1 - 2 - 2 - 1 Les cellules myélomateuses

Il existe maintenant de nombreuses lignées myélomateuses couramment utilisées pour la production d'hybridomes. Elles furent d'abord prélevées chez la souris ou le rat. Depuis peu, elles peuvent être d'origine humaine, issues de plasmocytes ou provenant de cellules lymphoblastoïdes.

Le "système" souris est historiquement le premier à avoir été développé. Les myélomes spontanés, chez la souris, sont très rares. Mais, en 1962 POTTER et al. ont réussi à provoquer le développement de myélomes chez la souris Balb/ C par injection intrapéritonéale de pristane.

Le "système" rat est maintenant souvent préféré. En 1979, GALFRE et MILSTEIN ont établi une lignée de myélomes de rat et BAZIN produit depuis 1980 et commercialise des anticorps monoclonaux de rat obtenus avec une lignée de myélomes IR983 F non sécrétante issue d'une souche de rat LOU.

Dans le tableau 2 sont rassemblés quelques exemples de lignées cellulaires couramment utilisées

#### \* La sélection du myélome

Le myélome utilisé pour la fusion ne doit pas sécréter d'immunoglobulines pour que celles-ci n'interfèrent pas sur les tests effectués après la fusion. De nombreuses souches non sécrétantes sont maintenant commercialisées.

De plus, ce myélome ne doit pas se multiplier après la fusion car il masquerait par sa prolifération la présence des jeunes hybridomes obtenus. Il faut donc éliminer les cellules myélomateuses après la fusion. Pour ce faire, KÖHLER et MILSTEIN ont réussi à obtenir des myélomes mutants (HGPRT-) déficients en une enzyme impliquée dans la "voie de secours" des nucléotides puriques.

LIGNEES CELLULAIRES DE MYELOMES DE RAT ET DE SOURIS  
UTILISES POUR LA FUSION CELLULAIRE

NOM	TUMEUR PARENTALE	DERIVE DE	PHENOTYPE		AUTEURS
			Ig	Résistance	
Souris 4T0.2	MPC-11	45.6TG 1.7	IgG2b (K)	6-Thioguanine 1.0 mM ouabaine	Margulies et al., 1976
P3-X63/Ag8	MOPC 21	P3K	IgG1 (K)	8-Azaguanine	Köhler and Milstein, 1975
NSI/1.Ag4.1	MOPC 21	P3-X63/Ag8	Non sécrétante	8-Azaguanine	Köhler et al., 1978b
FOX-NY	MOPC 21	NS-1	0	8-Azaguanine 2,6-Diaminopurine	Taggart and Samloff, 1983
SP2/O	MOPC 21	P3-X63/Ag8	0	8-Azaguanine	Shulman et al., 1978
X63-Ag8.653	MOPC 21	P3-X63/Ag	0	8-Azaguanine	Kearney et al., 1979
Rat Y3-Ag1.2.3	SR 210	210.RCY3.Ag1	(K)	8-Azaguanine	Galfré et al., 1979
IR938F	SR 210	Y3.Ag1.2.3	0	8-Azaguanine	Bazin, 1983

Tableau 2: D'après REGINE et WESTERWONDT (1986)

Il existe en effet deux voies de synthèse de l'ADN :

- La première dite voie "*de novo*" s'effectue à partir de ribose 5P, d'acides aminés et de CO<sub>2</sub>.

- La seconde dite "voie de sauvetage" permet la synthèse des nucléotides à partir des bases puriques et pyrimidiques libres et du phosphoribose 5 pyrophosphate (PRPP). Les enzymes impliquées sont l'Hypoxanthine-Guanine-phosphoribosyl-Tansférase (HGPRT) et la Thymidine-Kinase (TK).

Une cellule normale est capable d'utiliser les deux voies.

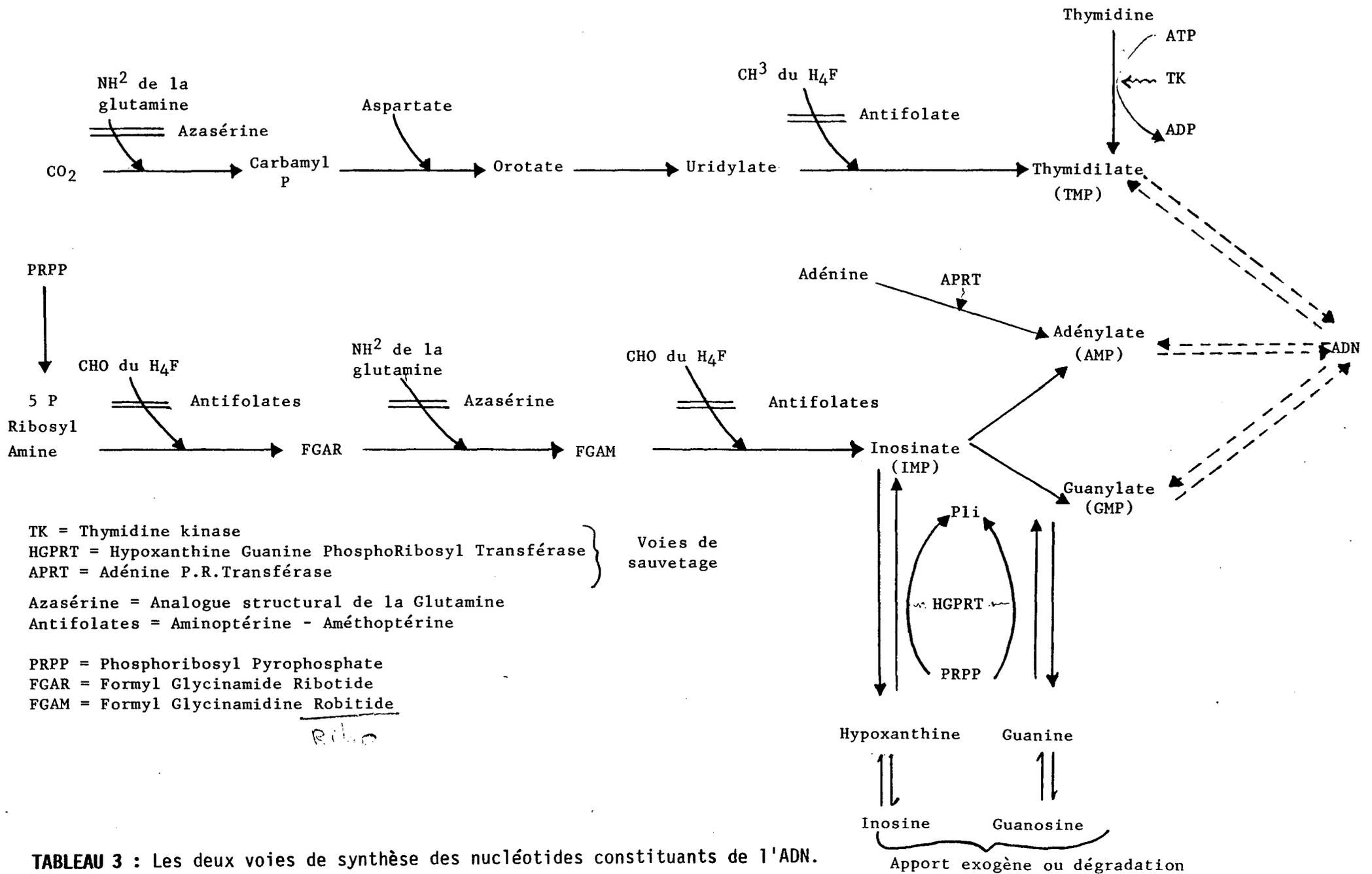
Pour éliminer les cellules de myélome après la fusion, on utilise le milieu HAT qui contient de l'hypoxanthine, de la thymidine et de l'aminoptérine. Les myélomes sélectionnés par KÖLHER et MILSTEIN, étant déficients en enzyme HGPRT, ne peuvent plus utiliser la "voie de sauvetage" malgré l'excès d'hypoxanthine et de thymidine du milieu HAT et essayent de survivre grâce à la voie "*de novo*". L'aminoptérine ajoutée au milieu de culture étant inhibitrice de cette voie, les cellules de myélomes sont donc incapables de synthétiser les nucléotides et donc l'ADN et meurent (Tableau 3).

Il est possible, mais beaucoup plus délicat, d'obtenir des myélomes TK<sup>-</sup>. Le processus reste le même avec toujours la "voie de sauvetage" bloquée et la voie "*de novo*" interrompue par l'aminoptérine.

Pour être certains avant une fusion d'avoir seulement des cellules de myélome HGPRT<sup>-</sup>, il est conseillé de les cultiver sur un milieu contenant de la 8 azaguanine, analogue létal de l'hypoxanthine. Dans ce cas, les cellules myélomateuses HGPRT<sup>-</sup> ne pourront utiliser que la voie "*de novo*" pour synthétiser leur ADN, et donc se multiplier, alors que les cellules de myélome HGPRT<sup>+</sup> utilisant la "voie de sauvetage", incorporeront l'azaguanine grâce à leur enzyme HGPRT, ce qui provoquera automatiquement leur mort.

Cette étape va donc permettre de conserver uniquement les myélomes HGPRT<sup>-</sup>.

Dans le cas de myélomes TK<sup>-</sup>, l'agent sélectif létal est la bromodésoxyuridine.



**TABEAU 3 :** Les deux voies de synthèse des nucléotides constituant de l'ADN.

### 1 - 2 - 2 - 2 Les lymphocytes

Les lymphocytes, après différenciation dans les organes lymphoïdes primaires, migrent dans les organes lymphoïdes périphériques comme la rate, les ganglions et les tissus lymphoïdes associés à l'intestin. C'est dans ces organes périphériques que les cellules T et B entrent en contact avec l'antigène. Chez les animaux, la rate est l'organe de choix dans les techniques d'hybridation car elle est riche en lymphocytes et facile à prélever.

### 1 - 2 - 3 L'immunisation

C'est la première étape d'obtention des anticorps (Figure 1) selon Milstein (1980).

Elle peut se faire "*in vivo*" ou "*in vitro*".

L'obtention de lymphocytes B immunocompétents est rendue possible par injection d'un antigène à un animal. Cette molécule antigénique va induire la formation d'anticorps dirigés vers l'un des motifs antigéniques (épitope) de la molécule. La réponse immunitaire est très complexe et dépend de nombreux facteurs.

La stimulation antigénique déclenche la mitose des cellules. Une observation au microscope permet d'estimer assez facilement la proportion de blastes présents (leur taille est deux à trois fois supérieure à celle d'une cellule normale).

Cette étude préalable est très importante car il semble bien qu'il y ait une relation entre le nombre de blastes et celui des hybridomes sécrétants obtenus. (STAHLI et al. 1983).

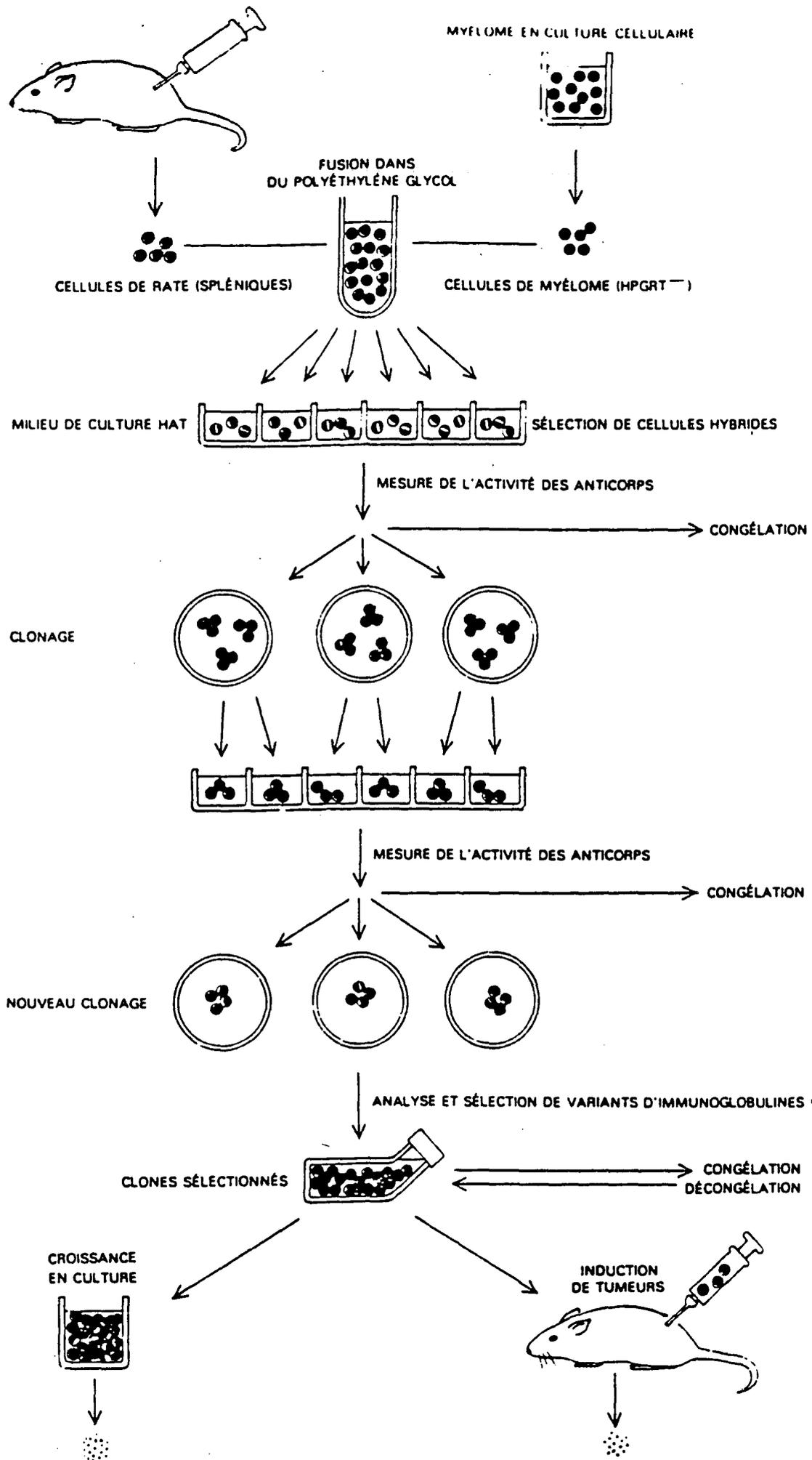


Figure 1 SCHEMA CHRONOLOGIQUE DE L'HYBRIDATION LYMPHOCYTAIRE

### 1 - 2 - 3 - 1 L'immunisation "*in vivo*"

L'efficacité de l'immunisation dépend :

- de l'animal
- de l'antigène
- des doses d'antigène
- des voies d'injection
- des adjuvants utilisés
- du protocole d'immunisation

#### 1 - 2 - 3 - 1 - 1 Le choix de l' animal

En règle générale, que ce soit pour les souris ou pour les rats, les femelles sont communément préférées aux mâles. Il est dit qu'elles produiraient plus d'anticorps que les mâles mais cette affirmation est assez difficile à démontrer.

De plus, les femelles Balb C sont plus faciles à élever que les mâles car malgré la promiscuité dans les cages, elles se battent beaucoup moins.

L'âge des animaux est aussi très important dans la réussite de l'immunisation. En général, on utilise des souris ayant 6 à 8 semaines à la première immunisation et des rats de 8 à 10 semaines.

Différentes souches animales ou leurs hybrides F1 sont établies :

- \* Balb C, Swiss, C 57 ou leurs hybrides pour les souris
- \* Lou C, Lou M ou leurs hybrides pour les rats.

#### 1 - 2 - 3 - 1 - 2 L'antigène

En général, la capacité de l'induction de la réponse immunitaire est proportionnelle à la taille de l'antigène. Les protéines de haut poids moléculaire sont souvent de bons immunogènes, alors que des substances de poids moléculaire inférieur à 1000 D ne sont normalement pas ou peu antigéniques (ERLANGER et al. 1980) et doivent être liées à des protéines porteuses pour le devenir. Les molécules porteuses généralement utilisées sont l'albumine, l'ovalbumine, la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

Il semble que les molécules insolubles soient plus immunogènes que les solubles et qu'il faille pour celles-ci recourir à des protocoles d'immunisation particuliers ou à l'addition d'adjuvant (molécule qui, administrée en même temps et au même site qu'un antigène, accroît la réponse immunitaire de ce dernier).

### *1 - 2 - 3 - 1 - 3 Les doses d'antigène*

La quantité d'antigène susceptible d'induire une réponse immunitaire est probablement la même pour un lymphocyte B que pour un lymphocyte T "helper".

Les doses d'antigène nécessaires à l'immunisation d'un rat sont les mêmes que celles utilisées pour les souris à condition que l'antigène puisse atteindre facilement un organe lymphoïde (ACKERMANN et al. 1990).

Les doses à injecter dépendent bien sûr de l'antigène mais elles sont généralement comprises entre 50 et 500 µg. Les antigènes sont dilués dans du PBS ou dans un adjuvant.

Des doses trop élevées peuvent induire une tolérance. Des doses inférieures ou égales à 1 µg peuvent être utilisées pour l'induction d'IgE, mais nécessitent l'utilisation d'un adjuvant.

### *1 - 2 - 3 - 1 - 4 Les différentes voies d'injection*

L'efficacité de la réponse immunitaire et le type d'immunoglobulines obtenu dépendent souvent du site d'inoculation.

\* La voie intrapéritonéale est peut-être la plus utilisée parce qu'elle est la moins délicate. De plus, elle est utilisable pour les antigènes solubles et insolubles et peut être employée avec n'importe quel type d'adjuvant. Tous les isotypes peuvent être retrouvés après ce mode d'immunisation avec une nette prédominance des IgG et des IgM.

\* Les voies intraveineuse et intracardiaque : La majorité des antigènes atteignent ainsi la rate mais l'injection dans la veine de la queue de la souris n'est pas chose facile et l'injection intracardiaque demande une bonne habitude.

\* La voie sous-cutanée : Elle peut être utilisée à la place de la voie intrapéritonéale.

\* Les injections dans les coussinets de la patte : Bien que peu utilisée cette technique est assez efficace. Elle permet d'obtenir une production d'IgE à condition d'utiliser un adjuvant un peu particulier (*Bordetella pertussis*) qui peut être injecté séparément ou en même temps que l'antigène. L'apparition de ces IgE est d'ailleurs favorisée par irradiation préalable de la souris qui réduit l'effet inhibiteur des cellules T suppresses (BAZIN et al., 1981).

\* La voie intrasplénique : Elle donne une bonne réponse immunitaire primaire avec pratiquement que des IgM. Cette technique est rapide et nécessite peu d'antigène (20 µg).

\* La voie orale : Elle est particulièrement intéressante pour la production d'IgA (ACKERMANS et al, 1970). De plus, l'administration de l'antigène peut être facilement prolongée dans le temps.

### 1 - 2 - 3 - 1 - 5 Les adjuvants

Ce sont des substances qui augmentent de manière non spécifique, la réponse immunitaire à un antigène. Ils peuvent avoir plusieurs mécanismes d'action.

\* Ils augmentent la persistance de l'antigène dans l'hôte en le protégeant de la dégradation par les protéases environnantes.

\* Ils stimulent les cellules réticulo-endothéliales, attirent les cellules mono-nuclées au niveau du site d'injection et présentent l'immunogène aux macrophages sous forme particulaire ou partiellement agglomérée (ASCONAS et al, 1969).

\* Ils accélèrent la circulation des lymphocytes, ce qui augmente leur possibilité de contact avec l'antigène.

Les adjuvants utilisés sont très divers :

- Le plus utilisé est l'adjuvant de FREUND. Il sert d'ailleurs maintenant de référence vis-à-vis des autres adjuvants. Il est classiquement utilisé volume à volume avec l'antigène. Il est composé de neuf volumes d'huile minérale et d'un volume de détergent (généralement l'ARLACEL A) qui, contient de nombreux groupes hydroxyliques et lipophyliques qui facilite la dispersion des phases aqueuses et huileuses et permet la formation d'une émulsion stable. Il est appelé incomplet (IFA) s'il ne contient que ces éléments et devient complet (CFA) si on lui incorpore un *mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum* inactivé.

- L'hydroxyde d'alumine est lui aussi un adjuvant utilisé depuis longtemps dans la préparation de vaccins mais il n'est pas efficace avec tous les antigènes (NICHOLSON et al, 1979).

En 1989, KENNEY et al. ont comparé plusieurs adjuvants au CFA, particulièrement le IFA (Adjuvant Incomplet de Freund), l'hydroxyde d'alumine, des produits d'origine bactérienne tels que les lipopolysaccharides (LPS), le muramyldipeptide (MDP) et ont conclu qu'à tout antigène correspond un adjuvant le mieux approprié.

### 1 - 2 - 3 - 1 - 6 Le protocole d'immunisation

Il n'y a pas de méthode universelle d'immunisation. De nombreux protocoles ont été publiés et leur diversité prouve à elle seule la difficulté. Pourtant, on peut tirer de toutes ces techniques des points communs et établir un protocole général en ce qui concerne les antigènes solubles.

Le jeune rongeur est immunisé par 2 à 3 injections d'antigène (environ 100 µg) plus adjuvant à 10 ou 15 jours d'intervalle.

Deux semaines après la 2ème ou 3ème injection, on effectue un prélèvement sanguin près du sinus rétro-orbital pour tester la réponse immunitaire. Les animaux présentant la réponse la plus élevée sont sélectionnés et après 3 à 4 mois, quand le taux d'anticorps diminue, on restimule l'immunisation de l'animal par une injection de rappel par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. Le dernier rappel conditionne fortement le nombre de blastes obtenus.

3 à 4 jours après la fusion est effectuée.

### 1 - 2 - 3 - 2 L'immunisation "*in vitro*"

Les immunisations "*in vivo*", sont longues et coûteuses en antigène. Ces problèmes ont amené de nombreux chercheurs à établir des protocoles d'immunisation "*in vitro*" qui durent seulement 3 à 4 jours et utilisent beaucoup moins d'antigène. De plus, ce mode d'immunisation permet de surmonter les problèmes d'éthique en ce qui concerne l'immunisation chez l'homme. C'est en 1978 que HENGARTNER rapporte la première utilisation de cellules spléniques, immunisées "*in vitro*", en vue de l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques.

En 1980, LUBEN et MOLLER montrent qu'un milieu conditionné par des thymocytes de souris de 10 jours peut remplacer les cellules T nécessaires à la réponse immunitaire primaire.

En 1983, BORREBAECK et al. utilisent le TCRF (T cell replacing factor) comme support d'une immunisation *in vitro* de cellules de rate de souris et obtiennent 3 % de puits contenant des clones sécrétant avec une concentration d'antigène approchant le mg / ml.

Il semblerait que le sérum de veau foetal ou de nouveau né soient inhibiteurs de la réponse primaire "*in vitro*" et il est fréquemment remplacé par des sérums humains ou de lapin (TAKAHASKI et al, 1987). On arrive maintenant à obtenir des anticorps monoclonaux après une immunisation "*in vitro*" dans un milieu sans sérum (FERRY et OSSENDORP, 1986) et de nombreux anticorps humains sont maintenant obtenus par ce protocole (BORREBAECK, 1989).

Il est d'ailleurs possible de trouver aujourd'hui sur le marché des kits pour immunisation "*in vitro*".

Les lymphocytes étant stimulés et les cellules de myélome en phase exponentielle de croissance, il est alors possible de fusionner ces cellules afin d'obtenir l'hybride qui possédera les propriétés de pousse continue de la cellule maligne et qui sécrétera un anticorps dirigé contre l'antigène préalablement choisi.

## 1 - 2 - 4 La fusion

La membrane cellulaire joue un rôle considérable dans le contrôle de l'activité des cellules. Sa perméabilité sélective permet l'accumulation de nutriments indispensables et la protège d'éventuelles agressions d'agents exogènes. Elle joue aussi un rôle de défense et permet la conservation du patrimoine génétique.

Mais cette membrane est aussi un handicap à la fusion cellulaire, c'est-à-dire à la mise en commun des contenus cellulaires des deux cellules qui doit se réaliser en préservant l'intégrité des membranes fusionnées afin que la cellule hybride résultante soit viable.

Le phénomène de fusion englobe l'aggrégation des cellules, la fusion des membranes puis des noyaux.

Après le rapprochement des cellules, une barrière hydrique entre les membranes les empêchent de fusionner. Il est donc nécessaire d'utiliser différents moyens pour induire cette fusion en permettant aux membranes de former une membrane continue. Ces agents peuvent être viraux, chimiques ou physiques.

### 1 - 2 - 4 - 1 Les différents types d'agents fusionnants

\* Le virus de Sendaï : Ce virus inactivé fut un des premiers agents fusionnants, mais sa préparation et son inactivation posent des problèmes de standardisation. Cette technique est aujourd'hui pratiquement abandonnée.

\*Le polyéthylène glycol (PEG) : Le PEG est un agglutinogène supposé lier les molécules d'eau de la membrane des cellules en déstabilisant la bi-couche lipidique des membranes (BLAIS et al, 1978). Il induit la fusion des cellules en favorisant la fluidité des membranes et en réduisant la distance entre les cellules à 4 ou 5 Å (LITTELFIELD, 1964).

HONDA et al. (1981) ont suggéré que certaines impuretés du PEG, en se fixant sur la membrane agiraient comme pont entre les cellules adjacentes et faciliteraient la fusion.

Cette technique est couramment utilisée bien que parallèlement à sa haute efficacité d'induction de la fusion membranaire, le PEG soit extrêmement toxique. GEFTER et al (1977) ont d'ailleurs montré qu'il y avait lyse cellulaire après un temps de contact avec le PEG de plus d'une minute et il faut donc établir un compromis efficacité-toxicité. Comme l'a montré NORDWOOD (1976), ce qui a été confirmé par FAZEBAS de GROTH et SCHEIDES (1980), l'addition de DMSO (Dimethyl sulfoxide) réduirait la toxicité et augmenterait le taux de réussite de la fusion.

Mais le fait que certaines lignées cellulaires, en particulier des lignées humaines soient particulièrement sensibles au PEG et au milieu H.A.T. utilisé lors de la sélection des hybrides, ont amené les chercheurs à mettre au point une autre technique de fusion cellulaire sans agent chimique.

#### 1 - 2 - 4 - 2 L'électrofusion

ZIMMERMANN et al. (1982) ont réussi à provoquer la fusion membranaire grâce à un champ électrique. Le champ électrique induit un potentiel perméabilisant la membrane cellulaire de façon réversible. Cette perméabilisation permet la fusion cellulaire par mise en commun des contenus cellulaires. Il semblerait que l'on puisse obtenir ainsi des rendements plus élevés en ce qui concerne les hybrides sécrétants car même si les clones obtenus sont moins nombreux qu'avec le PEG, ils seraient tous sécrétants.

De plus, ce procédé de fusion peut être observé puisqu'il s'effectue dans une "chambre de fusion" peu encombrante qui peut se placer facilement sur la platine d'un microscope.

L'électrofusion peut-être divisée en 2 étapes :

\* La formation de "Pearl chain" : Les cellules sont mises en contact par application d'un champ électrique alternatif non uniforme de 100 à 250 V/cm de faible intensité (1 à 3 MHz). Elles migrent alors dans le champ électrique non uniforme car l'intensité du champ n'étant pas égale des deux côtés de la membrane, elles se dirigent vers l'intensité la plus élevée. On assiste alors à leur alignement (Figure 2 d'après GRAVEHAMP et al. Rotterdam Radio Institute).

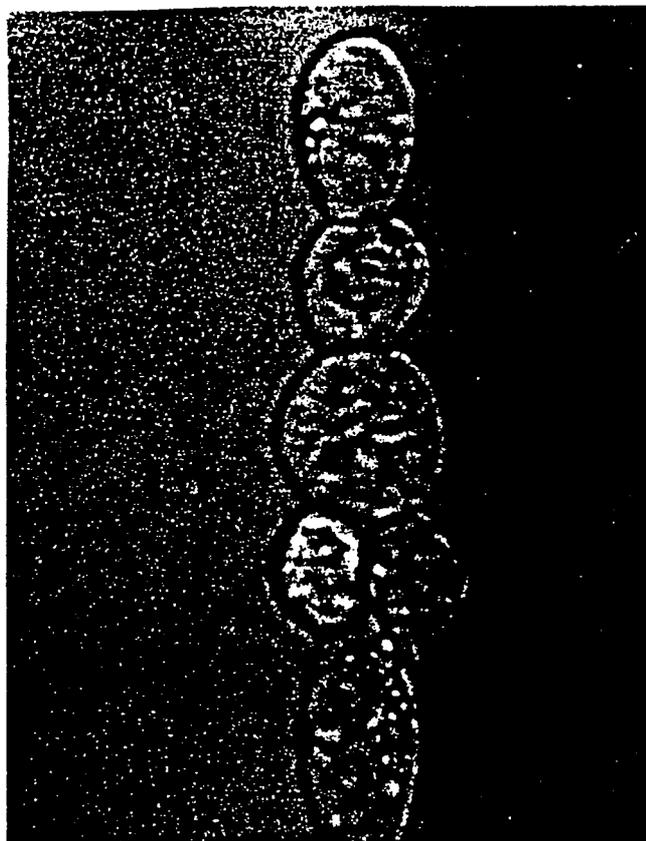


Figure 2 : Formation de "Pearl Chain" dans un champ alternatif non uniforme.

\* La fusion proprement dite : Elle est induite par application de pulses de haut voltage (3000 à 5000 V/cm) et de faible durée (10 à 50 sec) qui entraînent des ruptures électriques de la membrane cellulaire au niveau de la couche lipidique alors que les cellules sont en contact les unes avec les autres. Chaque pulse électrique permet le rapprochement des cellules qui peuvent ensuite fusionner lorsque le courant est interrompu.

La réussite d'une fusion électrique dépend avant tout de l'équilibre entre tous ces paramètres et de la composition du milieu de fusion. Lorsque toutes ces conditions sont établies, le rendement de l'électrofusion peut être beaucoup plus élevé que celui des autres techniques. De plus l'électrofusion peut être utilisée pour tous les types de cellules vivantes.

Quelque soit la technique de fusion utilisée, les cellules fusionnées doivent ensuite être mises en culture dans un milieu approprié afin d'être sélectionnées.

## 1 - 2 - 5 La culture des hybrides

Les cellules hybrides, en plus du HAT ajouté pour détruire les myélomes, doivent trouver un milieu riche en nutriments nécessaires à leur multiplication, additionnés de quelques stimulateurs de croissance.

Le milieu DMEM supplémenté en glutamine, en pyruvate de sodium et en acides aminés non essentiels, couvre leurs besoins de base (Ravo et Bazin, 1990). La concentration en CO<sub>2</sub> de l'incubateur étant réglée à 5 ou 6 %, l'équilibre HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> s'effectue correctement à 37°C. L'addition d'au moins 10 % de sérum est absolument nécessaire car il apporte des hormones, des facteurs de croissance et des protéines qui ont un effet protecteur.

De plus, il a été observé que la présence de "feeder layers", cellules nourricières était très favorable à la pousse des nouveaux hybrides formés.

Les cellules péritonéales de rat ou de souris, faciles à récupérer, donnent des résultats très satisfaisants. Elles contiennent des macrophages et des fibroblastes qui secrètent des facteurs de croissance essentiels et des macrophages détruisant les érythrocytes de la rate par endocytose.

Ces cellules ne peuvent pratiquement pas se multiplier "in vitro", mais survivent environ une semaine, temps nécessaire au bon "démarrage" des jeunes hybridomes.

Les cellules fusionnées sont placées, dans ces conditions, dans des microplaques pendant 4 à 5 jours.

Au 5ème jour, une observation au microscope permet de "repérer" parmi les puits où les cellules poussent bien, ceux où l'on identifie la présence d'un seul clone, ( Figure 3 ) afin de tester leur sécrétion spécifique à l'antigène utilisé lors de l'immunisation.

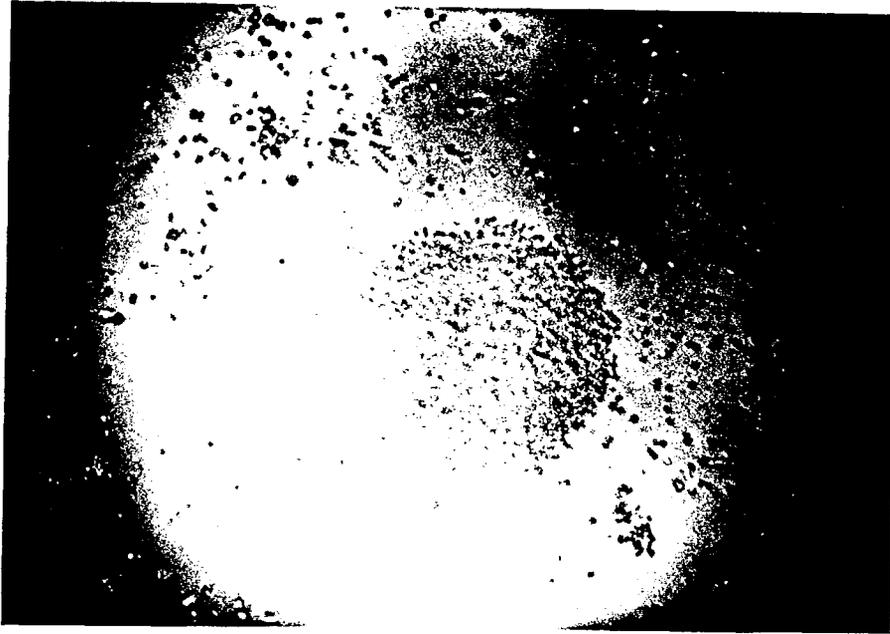


Figure 3 : Un clone issu de la fusion de lymphocytes et de cellules de myélome PIAO.

### **1 - 2 - 6 La détection des anticorps monoclonaux**

La sélection des clones sécrétant l'anticorps correspondant à l'antigène de départ, est l'une des étapes les plus importantes dans la technologie des hybridomes.

Différentes techniques reposant sur le principe des réactions antigène-anticorps sont utilisés. On peut les classer selon le mode de détection du complexe antigène-anticorps.

#### **1 - 2 - 6 - 1 La détection directe sans marqueur**

Elle est basée sur la précipitation spontanée du complexe Ag / Ac dans un milieu gélifié comme dans la technique d'immunodiffusion d'Ouchterlony.

### 1 - 2 - 6 - 2 Les détections indirectes

Le complexe est détecté à l'aide d'un second anticorps sur lequel est fixé un marqueur dont le comportement est modifié lorsque cet anticorps se fixe. Le marqueur peut être de nature très diverse.

\* Si c'est un composé fluorescent, on mesure l'intensité de la fluorescence qui sera proportionnelle à la quantité d'antigène (ELING et al. 1983).

\* Si c'est un métal (mercure, platine, cobalt), sa présence est détectée par spectrométrie d'absorption atomique (CAIS, 1983).

\* Si ce sont des hématies, la formation du complexe antigène anticorps induit soit leur lyse (HENRY, 1980) soit leur agglutination (MANN et al. 1970), soit leur absorption autour des cellules sécrétantes (technique de rosettes) (LEGRAN et al. 1983).

\* Si le marqueur est un isotope radioactif, on utilise des techniques radioimmunologiques RIA (radioimmunoassay) ou IRMA (Immuno Radio metric Assay).

\* Si c'est une enzyme, on a affaire à la technique ELISA ( Enzyme Linked Immuno Assay).

### 1 - 2 - 6 - 3 La technique ELISA

C'est de loin la technique de détection d'anticorps monoclonaux la plus utilisée.

En effet, elle atteint maintenant la sensibilité des techniques radioimmunologiques sans en avoir les inconvénients de manipulation de produits radioactifs. Les réactifs sont plus stables et elle ne nécessite pas d'équipement onéreux.

C'est une technique non compétitive où l'antigène est absorbé sur une surface solide. Le surnageant de culture est mis en contact avec l'antigène.

Les anticorps spécifiques de l'antigène vont être fixés à leur tour sur le support par l'intermédiaire de l'antigène.

Un deuxième anticorps anti-immunoglobuline de souris (pour la recherche des immunoglobulines de souris) marqué à la peroxydase va ensuite se fixer sur le complexe précédent. L'addition d'un substrat provoque alors une réaction colorimétrique dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans le surnageant (DOUILLARD et HOFFMAN, 1983).

Parfois, on utilise l'ELISA de façon compétitive ; dans ce cas, la quantité d'immunoglobulines marquées est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps monoclonaux contenus dans le surnageant (HUNTER et BOSWORTH, 1986). En effet, on ajoute un anticorps ( anticorps monoclonal) reconnaissant à la fois l'antigène marqué et l'antigène non marqué. Ces deux molécules possèdent la même antigénicité vis à vis de l'anticorps et celui-ci étant en quantité limitée, il y aura compétition entre l'antigène marqué et l'antigène froid (molécule à doser) pour se lier à l'anticorps.

La technique ELISA a subi de nombreuses adaptations au cours du temps en particulier en ce qui concerne le support de "coating".

Les premiers tests s'effectuaient sur des membranes de nitrocellulose sur lesquelles était fixé 0,1 à 0,5 ul d'antigène et où l'on déposait le milieu de culture. Il se formait une tache d'environ 0,3 mm de diamètre. La révélation se faisait grâce à un deuxième anticorps marqué. On observait une coloration des complexes formés dont l'intensité était grossièrement proportionnelle à la quantité d'anticorps monoclonaux présente. Cette technique avait le désavantage d'être uniquement qualitative et elle a été rapidement supplantée par une méthode quantitative (devenue possible grâce à l'apparition sur le marché de microplaques de 96 puits traitées pour favoriser la fixation de l'antigène et des lecteurs de plaques) donnant simultanément les densités optiques de tous les puits.

1) Absorption de l'antigène sur la phase solide



Antigène fixé sur un site actif



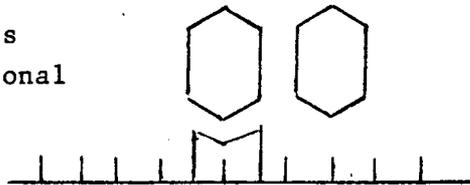
Site actif du support



Site actif neutralisé par la saturation

2) Addition du premier anticorps (surnageant de culture ou immunoglobulines purifiées)

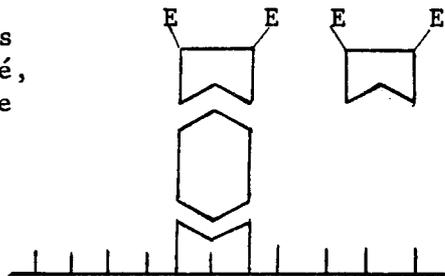
Premier anticorps (anticorps monoclonal recherché)



Anticorps en excès éliminé par le lavage

3) Addition du deuxième anticorps marqué à la peroxydase

Deuxième anticorps en excès, non fixé, éliminé par lavage



4) Addition du substrat de la peroxydase

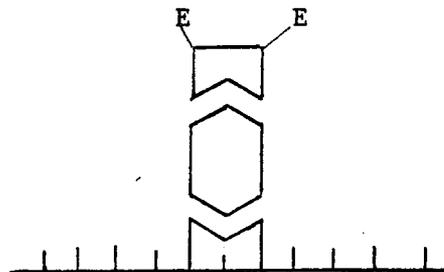


Figure 4 : Schéma du principe de la technique ELISA.

## 1 - 2 - 7 Le clonage

Avant de considérer que les anticorps sont bien monoclonaux, il faut s'assurer que le clone identifié dans le puits a bien une seule cellule pour origine.

Les tests de sécrétion ayant permis de sélectionner les clones sécrétant l'anticorps recherché, il est nécessaire de procéder à des clonages successifs entre lesquels un nouveau test ELISA sera intercalé.

En effet, lors de la fusion, deux ou plusieurs cellules ont pu être distribuées dans un même puits.

De plus, il est possible qu'à l'intérieur d'un même clone, une cellule cesse de sécréter. Or, généralement, les cellules non sécrétantes, poussent plus vite que les autres, et si on n'y prend garde, elles sont rapidement les plus nombreuses et risquent de masquer la sécrétion des cellules intéressantes.

Le clonage est généralement effectué en présence de cellules nourricières (macrophages le plus souvent) dans un milieu classique de culture des hybridomes, mais peut se faire aussi en milieu agar qui permet l'individualisation des clones.

Il s'effectue le plus généralement en plaques de 96 puits selon une technique classique de dilution limite qui permet de distribuer en théorie une cellule par puits. Après quelques jours d'incubation des plaques, il suffit de repérer les puits positifs et ne contenant qu'un clone (à l'observation microscopique), de laisser le clone envahir le puits et d'effectuer un nouveau test de détection.

La perte de sécrétion d'un hybridome, due à des réarrangements chromosomiques, est chose assez classique et il est conseillé d'effectuer 4 à 5 clonages pour s'assurer de sa stabilité.

## **1 - 2 - 8 La conservation des cellules hybrides**

Lorsqu'une lignée cellulaire est stabilisée et que l'anticorps qu'elle sécrète est intéressant, il est fortement conseillé de la stocker. Cette précaution permet de se prémunir contre les risques de perte de sécrétion de la cellule au cours du temps ou de la perte totale des hybridomes par contamination, le plus souvent de type bactérien, fongique ou mycoplasmatique.

On réalise donc une congélation qui s'effectue dans un milieu de culture complété en sérum humain ou animal (SANDLER et al., 1987), ou en lactosérum et additionné de DMSO (Diméthylsulfoxyde), agent cryoprotecteur, très hygroscopique qui traverse la membrane et assure une protection intracellulaire en entrant en liaison avec les molécules d'eau contenue dans les protéines et empêcherait leur dénaturation.

Le stockage en azote liquide (à  $-196^{\circ}\text{C}$ ) est généralement considéré comme la meilleure technique de préservation des cellules (FRESHNEY, 1987), la conservation des cellules à  $-80^{\circ}\text{C}$  ne pouvant être utilisée que pour des durées de l'ordre de quelques mois. Cependant, nous avons montré qu'en remplaçant le sérum de veau par du lactosérum, les hybridomes pouvaient être conservés au moins deux ans à  $-80^{\circ}\text{C}$  (DEROUICHE et al. 1989).

## **1 - 2 - 9 Les différents types d'hybridomes**

### **1 - 2 - 9 - 1 Les hybridomes souris-souris**

Les premiers hybridomes obtenus étaient d'origine murine. La souris est un animal facile à élever, qui présente l'avantage d'un temps de gestation de 21 jours et d'un cycle de reproduction de 6 à 8 semaines seulement.

Mais les anticorps monoclonaux obtenus présentent quelques inconvénients dont l'un est fondamental : ils ne permettent pas de traitement prolongé chez l'homme car celui-ci les neutralise et on observe rapidement des réactions de rejet.

De plus, lorsqu'on utilise la souris pour la production *in vivo* de grosses quantités d'anticorps, sa petite taille devient un facteur limitant. Pour palier ce dernier inconvénient, des souches de myélomes de rat ont été élaborées afin de créer des hybridomes rat-rat.

#### 1 - 2 - 9 - 2 Les hybridomes rat-rat

L'hybridation rat-rat a l'avantage de pouvoir répondre à une gamme d'antigènes différente de celle du modèle précédent. De plus, il est possible, de par leur taille, d'obtenir "*in vivo*" des quantités d'anticorps plus importantes même si le taux de succès de l'obtention d'une ascite est moins important.

Mais ce modèle ne résoud pas plus les problèmes d'utilisation de ces anticorps chez l'homme (LEVY et al, 1983).

#### 1 - 2 - 9 - 3 Les hybridomes "croisés"

D'autres types d'hybridomes ont été obtenus par croisement de lymphocytes de rat et de myélomes de souris. Ces fusions interspécifiques produisent des hybridomes stables avec une production d'anticorps équivalente à celle des hybridomes murins (MAC KEARN et al, 1981).

Des lymphocytes de hamster fusionnés avec des myélomes de souris ont, eux aussi, donné des hybrides sécrétants et stables (SANCHEZ-MADRID et SPRINGER, 1986).

De même, des hybrides inter-spécifiques bovins -souris ont été également obtenus (ALBERT, 1986).

Les lymphocytes B humains peuvent être aussi fusionnés avec les myélomes de souris. Le rendement de la fusion est satisfaisant et les cellules hybrides obtenues peuvent sécréter un anticorps humain mais rapidement la plupart des chromosomes humains sont éliminés et plus particulièrement le chromosome 2 de la chaîne légère K des immunoglobulines.

La perte de ce chromosome portant le ou les gènes codant pour une partie de l'immunoglobuline va entraîner la production d'un anticorps "amputé" ayant perdu tout ou partie de ses propriétés immunologiques.

L' "humanisation" des myélomes de souris peut alors être une solution. Ces myélomes hybrides souris-homme, appelés hétéromyélomes permettent de conserver les qualités des myélomes de souris et d'obtenir des hybridomes plus stables grâce à la présence de chromosomes humains à l'intérieur de l'hétéromyélome.

#### 1 - 2 - 9 - 4 Les hybridomes humain-humain

Toutes ces difficultés ont amené, dans les années 80, les chercheurs à établir des lignées d'hybridomes humains-humains (GROSE et al., 1980 ; OLSON et KAPLAN, 1980).

Pour cela, deux méthodes peuvent être employées :

1°) L'hybridation cellulaire ou fusion de lymphocytes humains préalablement immunisés " *in vitro*" avec un myélome d'origine humaine.

Cette technique présente deux difficultés principales : d'une part, l'efficacité réduite de l'immunisation " *in vitro*" rendue obligatoire pour des problèmes d'éthique. D'autre part, la faible quantité de lignées de myélomes humains actuellement disponibles.

Lignées d'origine	Dérivés
RPMI-8226 ( $\lambda$ ) Plasmocytome	8226-8 AG
U 266 ( $\epsilon, \lambda$ ) Plasmocytome	SKO-007 (U-266 ARI)
	U-266 (8 AG)
	FU-266
GM 1500 ( $\gamma_2, \kappa$ ) Lymphoblastoïde	GM 1500-6TG-A 1-2
	GM 1500-6TG-A1-1
	GM A672
	GK-5
ARH-77 ( $\gamma, \lambda$ ) Lymphoplastoïde	LICR-LON-HMY-2
	LICR-LON-HMY-2/CAM 1
WIL 2 ( $\gamma, \kappa$ ) Lymphoblastoïde	UC 7296
	UC 729-6-HF2
	LTR 228
	H 351.1
PGLC 33 H ( $\mu, \lambda$ )	GMO 467
MC-CAR ( $\gamma, \kappa$ )	MC/MNS-1, 2, 3

Tableau 4 : Quelques exemples d'hybridomes humains - humains d'après KOZBOR et al. (1986)

2°) La fusion d'un lymphocyte humain naturellement immunisé avec des cellules lymphoblastoïdes issues de tissus hématopoïétiques comme la rate de malades atteints de maladie de Hodgkin.

Dans ce cas, il est nécessaire d'immortaliser ces dernières par transfection d'un virus (généralement le virus d'Epstein Barr ou le virus SV40 (STEINITZ et al. 1977).

Il est à noter que l'on peut aussi obtenir des anticorps monoclonaux d'origine humaine grâce à des lymphocytes immunisés, immortalisés par transformation virale (SV40 ou EBV) (SHAY, 1985). Cette dernière technique a l'avantage d'éliminer l'étape toujours délicate de l'hybridation. Mais les plasmocytes sont difficiles à maintenir en culture "*in vitro*" et leur croissance est lente (temps de doublement de 36 à 72 h).

Quant aux cellules lymphoblastoïdes, elles sont encore plus difficiles à cultiver, mais leur temps de doublement est de 30 h seulement.

Tout cela fait que ces technologies sont difficiles à mettre au point et l'utilisation des anticorps monoclonaux obtenus par ces cellules transformées reste restreinte, particulièrement en thérapie humaine.

Pourtant les champs d'application de ces anticorps sont tellement vastes que chaque jour apporte de nouvelles souches d'hybridomes humains-humains, même si l'on sait qu'ils secrètent de faibles quantités d'immunoglobulines généralement de type IgM. (Tableau 4)

### **1 - 3 LA MULTIPLICATION DES HYBRIDOMES**

Les souches d'hybridomes une fois établies, après quatre à cinq clonages successifs, doivent être multipliées afin de produire les anticorps monoclonaux. Cette production peut être réalisée par 2 voies différentes : "*in vivo*" et "*in vitro*".

### 1 - 3 - 1 La production " *in vivo* "

Une injection intrapéritonéale d'une quantité importante de cellules d'hybridomes, induit chez un animal histocompatible la formation d'une ascite qui contiendra des anticorps en forte concentration.

La souris est, là encore, un hôte de choix. Elle est encore beaucoup utilisée, bien que le rat, de par sa taille plus importante, permette d'obtenir environ 10 fois plus de volume de liquide d'ascite.

Les hybridomes injectés seuls déclenchent plutôt la formation de tumeurs solides. La production de liquide d'ascite, plus facile à prélever, peut être favorisée par des pré-traitements de l'animal avec soit du pristane (2-6-10-14, tétraméthylpentadécane) (HOOGEURAAD et al., 1983) soit de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) (MULLER et al., 1986). Certains auteurs remplacent ce prétraitement par une injection du produit au moment de l'injection des cellules. Il n'est pas possible de mélanger l'IFA ou le pristane aux cellules qui seraient tuées. Il est donc nécessaire de faire 2 injections sur le flan gauche de l'animal (à droite, on a toujours le risque de piquer dans la rate).

Le premier liquide d'ascite peut être prélevé une dizaine de jours après l'injection et il est généralement possible de répéter l'opération une ou deux fois. Les liquides d'ascites sont rassemblés et stockés à -80°C dans l'attente de leur purification .

Cette technique permet de récupérer chez la souris, 5 à 20 ml de liquide d'ascite contenant de 5 à 50 mg/ml d'anticorps monoclonaux (Tableau 5).

La concentration en hybridomes dans le liquide est de l'ordre de  $10^8$  cellules/ml.

concentration en AcM* (en mg / ml)	volume de liquide d'ascite recueilli par souris (en ml)	quantité d'AcM obtenus par souris (en mg)	références
/	/	10	(12)
/	/	50	(11)
10	10 - 20	100 - 200	(10)
10 - 50	3 - 5	30 - 250	(7)
5 - 20	15	75 - 300	(13)

Tableau 5 : Quantités d'anticorps monoclonaux récupérés dans des liquides d'ascite, selon différents auteurs (DEA CARRONNEI 1988)

Chez le rat, les volumes d'ascite obtenus sont 10 fois plus importants, mais dans les deux cas, les anticorps monoclonaux se trouvent mélangés aux immunoglobulines de l'animal et à des enzymes protéolytiques et de ce fait leur purification n'est pas toujours aisée.

Pour éviter ce mélange des anticorps recherchés avec ceux de l'hôte, une autre alternative consiste à utiliser des souris "nudes". Ces animaux présentent plusieurs anomalies héréditaires qui font qu'outre leur absence de poils, elles sont dépourvues de thymus (PAUTELORIS, 1968). Elles sont donc immunodéficientes et ne synthétisent pas d'immunoglobulines. Cette particularité présente bien sûr un avantage lors de la purification mais elle complique beaucoup leur élevage. Ces animaux ayant de mauvaises défenses immunitaires sont extrêmement fragiles et doivent être élevés dans des conditions de stérilité lourdes à mettre en place.

Des tentatives de prolifération d'hybridomes chez d'autres animaux de taille plus importante placés sous traitement immunosuppresseur ont jusqu'alors complètement échoué.

L'injection et les ponctions restent des gestes délicats et non automatisables et une solution n'ayant plus recours à l'animal a rapidement fait son chemin : des réacteurs ont été conçus afin d'obtenir, *in vitro*, de fortes concentrations cellulaires.

### **1 - 3 - 2 La production "*in vitro*"**

Dans ces techniques, les hybridomes prolifèrent et secrètent directement dans le milieu de culture et même si la concentration en anticorps est seulement de l'ordre de 10 à 1000 ug/ml, il est possible maintenant de concevoir des systèmes ayant des volumes allant jusqu'à plusieurs milliers de litres (Tableau 6).

Ces systèmes sont appelés bioréacteurs ou cytoculteurs.

type de culture	concentration en AcM* ( $\mu\text{g/ml}$ )	références
CULTURES IN VITRO	1 - 10	(9)
	10 - 20	(13)
CULTURES CLASSIQUES		
Flacons roulants ou plats	9 - 127	(11)
CULTURES EN SUSPENSION	10 - 50	(12)
"Airlift"	73 - 350	(11)
perfusion	800	(24)
CULTURES AVEC CELLULES IMMOBILISEES		
fibres creuses	740	(31)
	6000 - 8000	(13)
encapsulation	1000 - 10 000	(30)

Tableau 6 : Concentration en anticorps monoclonaux obtenus en culture "in vitro", selon différents auteurs. DEA CARBONNEL (1988)

### 1 - 3 - 2 - 1 Les bioréacteurs : principe

Les cellules y sont cultivées dans des conditions les plus proches possibles de "l'in vivo" (le corps des mammifères est le bioréacteur idéal, ayant une concentration cellulaire de  $10^9$  cellules/ml).

Elles sont soit nourries et maintenues en suspension homogène grâce à un dispositif d'agitation (RANDERSON, 1985), soit immobilisées par des systèmes au travers desquels diffusent nutriments et déchets métaboliques (GRIFFITHS, 1986).

Ces systèmes visent à :

- maintenir constants la température, le pH, l'osmolarité, l'alimentation en oxygène et en  $\text{CO}_2$ ,
- satisfaire aux besoins nutritionnels des cellules,
- éliminer leurs déchets métaboliques.

Ils permettent d'obtenir des concentrations cellulaires de l'ordre de  $10^6$  à  $10^7$  cellules/ml.

### 1 - 3 - 2 - 2 Les cultures à cellules immobilisées.

Cette technique permet de renouveler le milieu et d'éliminer les déchets sans éliminer les cellules qui sont "piégées". Elles sont ainsi protégées des contraintes mécaniques imposées par les systèmes de régulation qui peuvent s'effectuer à l'extérieur de la chambre de culture. Ces systèmes peuvent fonctionner pendant des périodes prolongées en perfusion continue (BIRCH, 1986).

Les principaux systèmes d'immobilisation des cellules sont :

\* Les matrices en céramique : Le système est constitué d'une matrice cylindrique comportant un réseau longitudinal de canaux rugueux à section carrée (FAMILLETI, 1983). Le milieu de culture circule à l'intérieur des canaux à la surface desquels les cellules sont "accrochées". Ces céramiques sont inertes et bon marché et l'association en parallèle de plusieurs de ces unités est tout à fait réalisable ( Figure 5).

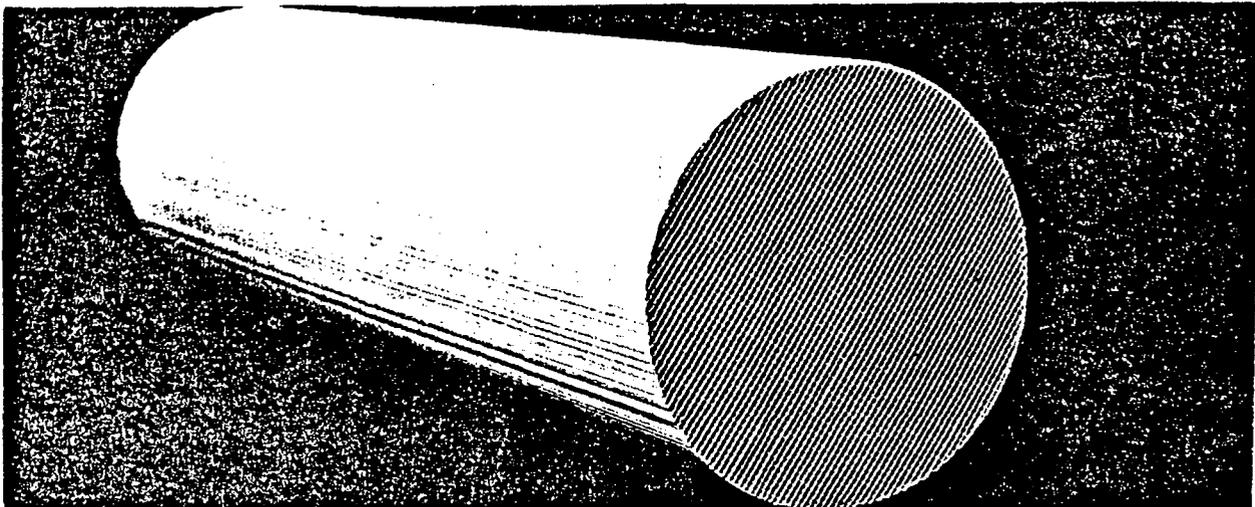


Figure 5 : Matrice en céramique utilisée pour la culture de cellules animales. Avec un rayon de 4,1 cm et une longueur de 30 cm, la surface réservée à la croissance cellulaire est de 4,25 m<sup>2</sup>.

\*Les fibres creuses : Une chambre de culture cylindrique renferme un faisceau central de fibres creuses longitudinales. Les gaz et le milieu de culture circulent à l'intérieur des fibres alors que les cellules sont retenues dans l'espace extracapillaire (VAN BRUNT, 1986).

Les fibres étant en fait des membranes d'ultrafiltration à seuil de coupure de 10 000 à 100 000 D, les nutriments et les déchets métaboliques passent à travers les membranes, alors que les cellules et le produit de leur sécrétion ayant des poids moléculaires élevés, sont retenus dans l'espace extracapillaire.

Ce système permet la culture à long terme de quantités importantes de cellules à condition que celles-ci, en se multipliant, ne colmatent pas les membranes (Figure 6).

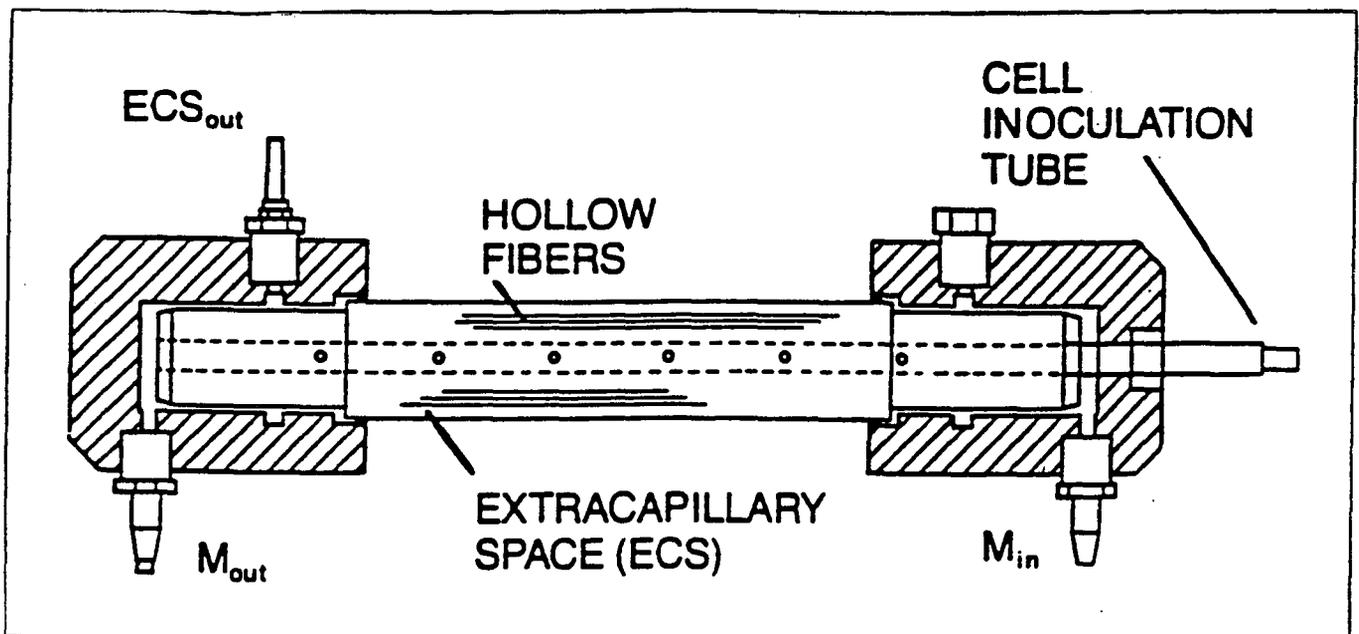


Figure 6 : schéma d'un système de fibres creuses (Biotechnology vol.3 Mars 1985)

Il existe des variantes de ce système :

- le lit plat de fibres creuses où le milieu est envoyé perpendiculairement à l'axe des fibres,
- le système à fibres mixtes où gaz et milieu circulent dans des fibres différentes,
- le système de ADEMA où les cellules se développent à l'intérieur des fibres.

\* Les microcapsules : Les cellules sont dans ce cas, retenues à l'intérieur de microbilles poreuses, maintenues en suspension dans des systèmes de culture classiques (HU, 1985). Les microbilles sont constituées par des membranes de polymères au travers desquelles, oxygène et nutriments diffusent alors que les produits cellulaires sont retenus à l'intérieur des microcapsules. Les coûts de l'encapsulation et de la récupération des produits sont élevés, mais les densités cellulaires atteignent  $10^8$  cellules/ml (Figure 7).

La biomasse concentrée à l'intérieur des microcapsules forme un écran aux échanges.

La microencapsulation s'effectue selon deux techniques :

- Avec un alginate de calcium :

Les cellules sont mises en suspension dans une solution d'alginate et tombent goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium où elles se "gélatisent", puis sont trempées dans une solution de poly-L-lysine qui polymérise à leur surface. Enfin, l'intérieur des billes est reliquéfié par une solution de citrate de sodium. Les cellules se trouvent alors à l'intérieur de capsules microporeuses.

- Avec une émulsion agarose / paraffine :

Les cellules sont placées en présence d'agarose dans un tube à centrifuger contenant de l'huile de paraffine. Un vibromélangeur provoque l'émulsion.

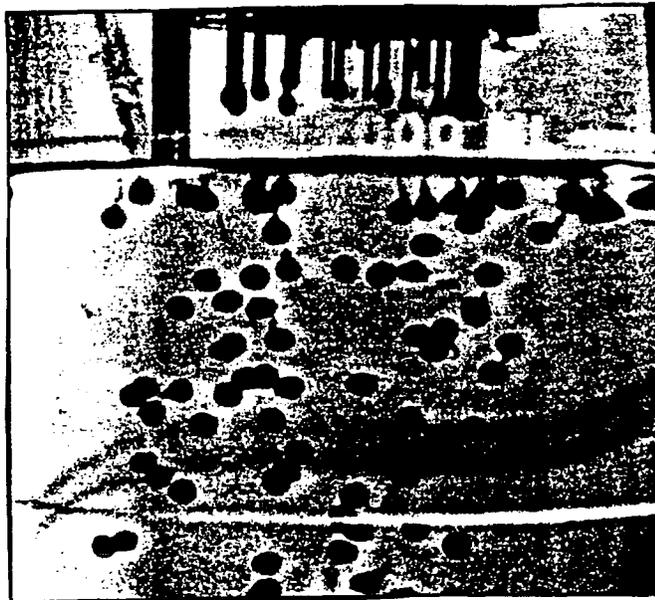


Figure 7 : Les cellules sont immobilisées à l'intérieur des billes. Nilsson (1980)

\* Les systèmes à lit fluidisé : (Figure 8)

Dans ce procédé appelé VERAX, les cellules sont là aussi immobilisées dans des microbilles de collagène, lestées avec des particules d'inox et agitées par un lit fluidisé (DEAN , 1987)

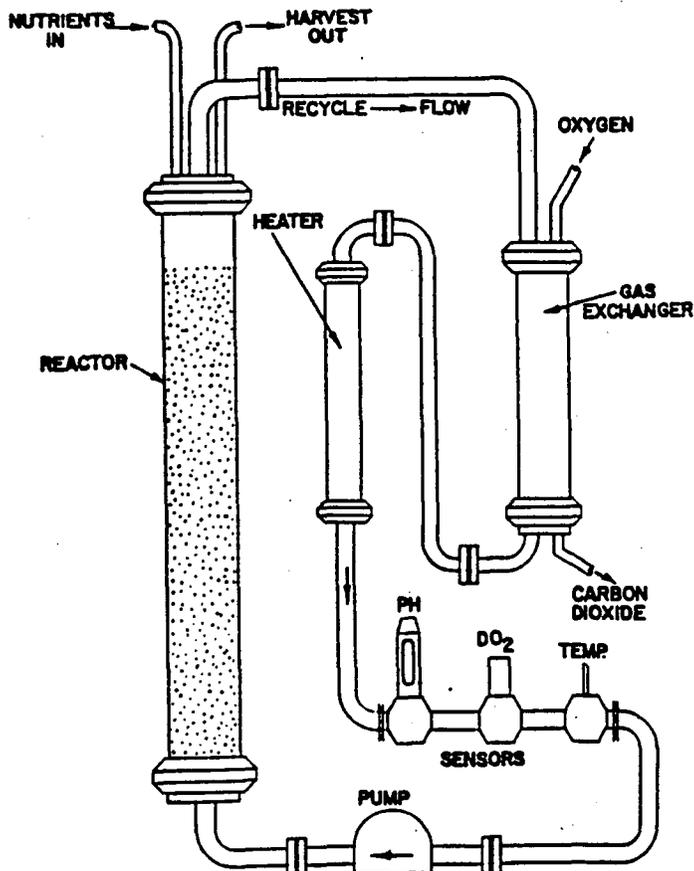


Figure 8 : Dans le système de lit fluidisé, les cellules sont immobilisées.

\* Les microporteurs :

2 à 3 grammes de microbilles poreuses de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre constituées de membranes de polymères sont déposés dans le milieu de culture. Après quelques heures, les cellules se fixent à l'extérieur des billes. (Figure 9).



Figure 9 : cellules CHO fixées à la surface du microporteur.

\* Les lits spongieux :

Les cellules sont piégées dans une mousse de polyéther. Elles nichent dans les lumières de l'éponge et s'y développent alors que toutes les régulations du milieu se font dans un bioréacteur connecté en série. Une pompe péristaltique permet l'arrivée du milieu neuf et l'expulsion du milieu utilisé.

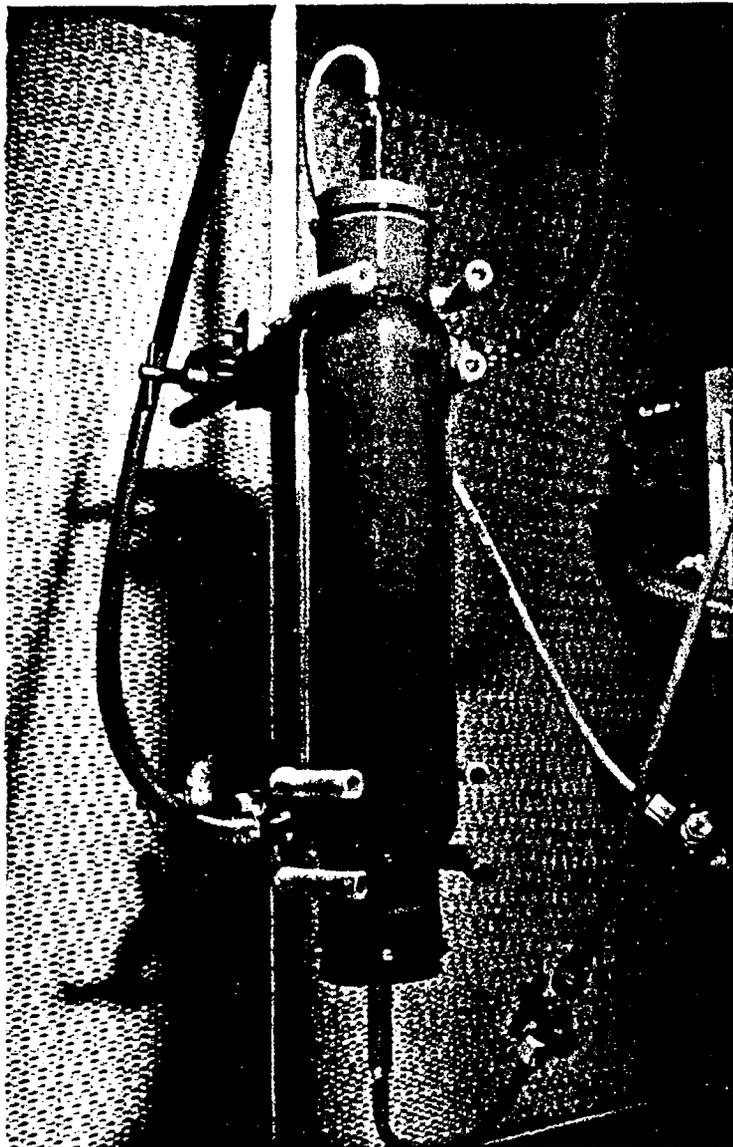


Figure10: Le système à cellules piégées dans un lit spongieux utilisé au laboratoire

### 1 - 3 - 2 - 3 Culture de cellules en suspension

Ce sont des systèmes agités où les cellules poussent en suspension homogène dans un milieu de culture contrôlé et régulé en permanence. Ce principe est très intéressant et son automatisation est relativement aisée (BIRCH, 1986).

Des prélèvements réguliers permettent différents dosages en fonction desquels on peut apporter telle ou telle modification aux conditions de culture en fonction du métabolisme cellulaire.

La capacité de la cuve du réacteur peut aller de quelques litres au laboratoire, à plusieurs milliers dans l'industrie et ainsi compenser par des volumes importants, la concentration cellulaire qui reste relativement faible ( $10^6$  cellules/ml).

Plusieurs techniques de culture peuvent être adoptées :

- Soit le "batch" qui consiste àensemencer le bioréacteur et à laisser la culture évoluer sans ajouter ni soutirer du milieu. Les cellules se trouvent dans un environnement variant en permanence. L'épuisement des nutriments et l'accumulation des déchets toxiques entraînent assez rapidement l'inhibition de la croissance ou de la production cellulaire (GLACKEN et al., 1983): La culture ne peut se poursuivre que 4 à 5 jours mais la consommation de milieu n'est pas très importante.

- Soit le "Fed-batch" dans lequel on apporte des nutriments en fonction des besoins des cellules. La concentration en éléments nutritifs est ainsi maintenue constante mais les déchets métaboliques s'accumulent au cours du temps. Le temps de la culture s'en trouve tout de même un peu prolongé (12 à 15 jours).

- Soit la culture dite en perfusion ou continue qui consiste à injecter en continu du milieu frais et à soutirer un volume équivalent de milieu usé. La densité cellulaire peut ainsi atteindre  $3 \cdot 10^7$  cellules/ml pendant un temps de culture qui peut aller jusqu'à quelques mois (MARTIN et al., 1986).

Mais ces différents modes de culture comportent toutefois quelques inconvénients :

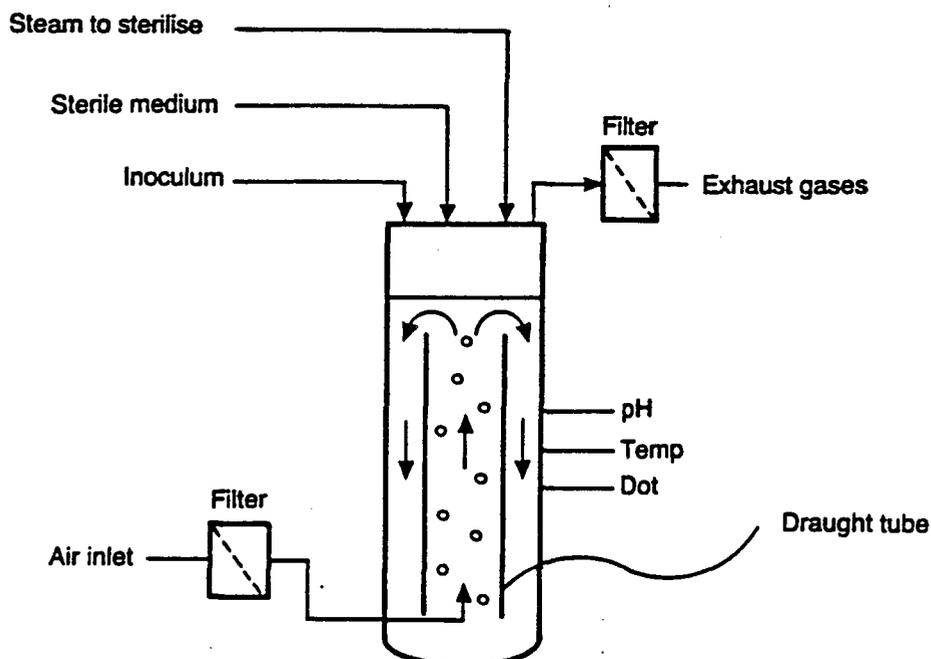
\* Les cellules se trouvent en proie à des forces de cisaillement dues aux pales qui agitent en permanence le milieu de culture. Aussi, de nombreux systèmes ont été mis au point pour palier ces inconvénients (FEDER et TOLBERT, 1983 ; GRIFFITHS, 1986).

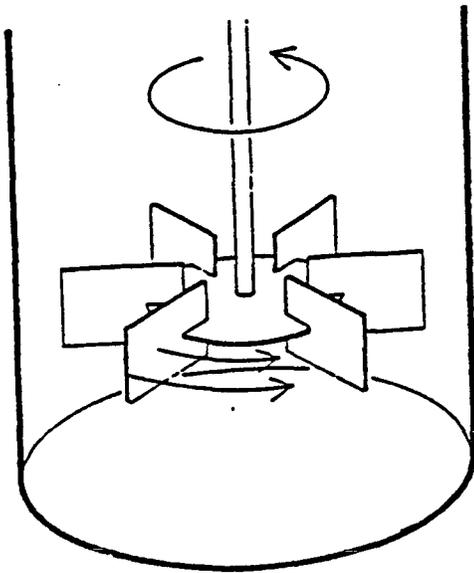
Des hélices marines ont remplacées les turbines à pales rigides. Elles favorisent l'écoulement axial qui assure une homogénéité correcte, même à faible vitesse.

- Des agitateurs à pales souples de plus grande surface permettent de diminuer les forces de cisaillement.

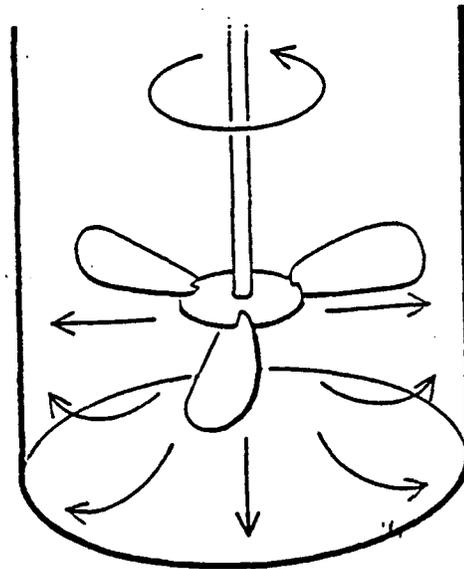
- des vibromélangeurs constitués d'un disque perforé animé d'un mouvement vertical de va-et-vient ;(Figure 12 )

- des agitateurs à circulation d'air (procédé Air lift), utilisés pour des réacteurs de gros volumes (BIRCH et al., 1986). Le gaz est introduit à la base d'un tube vertical. Il provoque une circulation du milieu qui monte à l'intérieur du tube puis redescend le long de ses parois externes (BIRCH, 1986) (Figure 11).

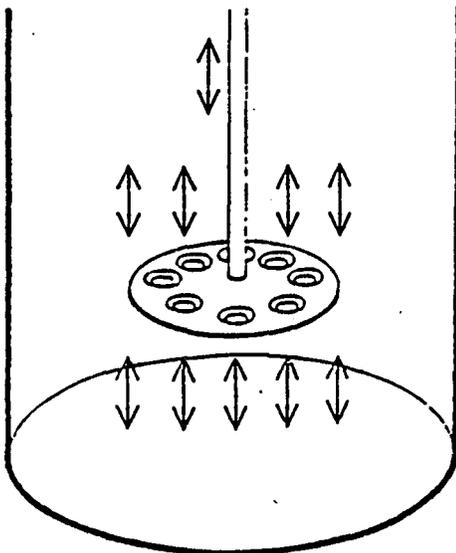




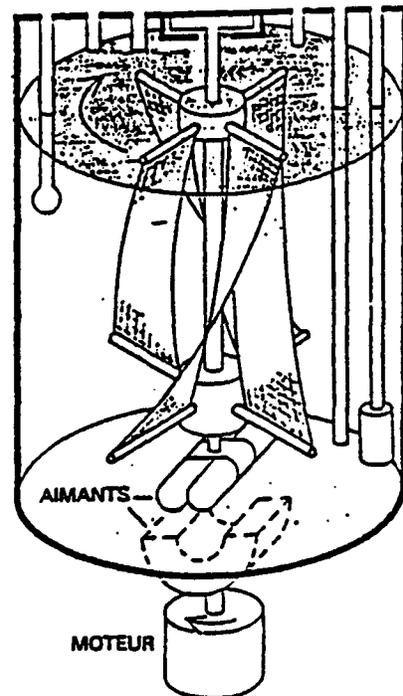
turbine à pales rigides



hélice marine



vibromélangeur



Agitateur à pales souples

Figure 12 : Différents systèmes d'agitation pour cultures en suspension d'après FEDER et al.(1983).

\* Dans le système en perfusion, le milieu usé est éliminé en permanence ainsi qu'une partie des cellules qui s'y trouvent en suspension. Pour venir à bout de ce problème, il suffit, en théorie, de placer un filtre capable de retenir les cellules juste avant la sortie du milieu usé. Les hybridomes souris-souris ayant un diamètre de  $15\ \mu\text{m}$ , un filtre (Spin-filter) ayant une porosité de  $10\ \mu\text{m}$  devrait être la solution (Figure 13). Mais les colmatages du filtre provoqués par la présence de protéines apportées par le sérum et les cellules et par l'amoncellement des cellules mortes à sa surface sont fréquents. Le phénomène se produit quelque soit la texture ou la forme du spin-filter. Avec un renouvellement de  $120\ \text{ml/h}$ , le colmatage commence au 4 ou 5ème jour pour arriver à une obturation complète au 7ème jour (LAURENT et al., 1991). Par contre des spin-filter de taille supérieure à  $10\ \mu\text{m}$  colmatent moins mais laissent passer les cellules.

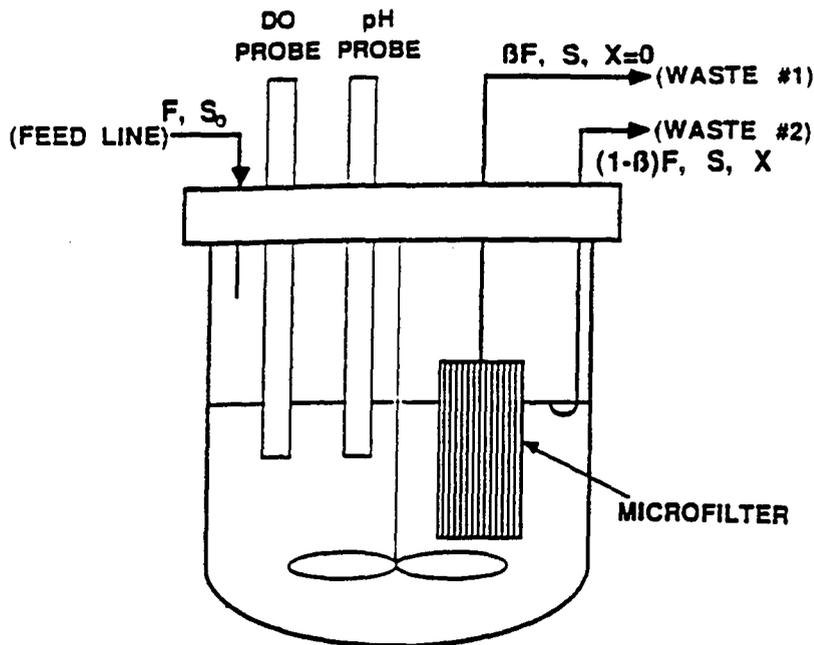


Figure 13: Schéma du système de rétention des cellules par "spin filter" d'après SEAMANS et HU (1990).

\* Ces systèmes sont de gros consommateurs de milieu de culture. Or celui-ci est l'un des éléments majeurs entrant en ligne de compte lors du calcul des coûts de production des anticorps. C'est surtout le sérum de veau foetal, classiquement ajouté à raison de 10 % au milieu, qui est le responsable de ce coût. Pour une culture à grande échelle, il peut représenter 84 % du prix de revient des produits finaux (GRIFFITHS, 1990). Ceci a amené de nombreux laboratoires à mettre au point des substituts à composition plus ou moins définie.

### 1 - 3 - 3 Les substituts du sérum

L'ajout de sérum aux milieux de base est indispensable pour assurer la croissance des cellules. Selon les besoins de la souche, sa concentration peut aller de 5 à 15 % du milieu. Le sérum le plus couramment employé est le sérum de veau foetal (SVF). Très riche, il contient :

- des sels minéraux,
- des vitamines,
- des acides aminés,
- des sources de carbone,
- des facteurs de croissance stimulant la croissance et les fonctions spécifiques des cellules,
- des protéines,
- des facteurs d'adhérence,
- des inhibiteurs de protéases,
- des immunoglobulines (Tableau 7).

Mais outre son coût, il présente d'autres inconvénients :

- sa composition biochimique n'est pas totalement connue et varie d'un lot à l'autre.
- Il peut contenir des inhibiteurs de croissance ou des toxines bactériennes qui contrarient la pousse cellulaire.
- Il est sujet à des contaminations virales, mycoplasmaïques ou bactériophagiques qui, elles aussi, perturbent la croissance des cellules.
- Sa forte concentration en protéines peut être un handicap lors de la purification ultérieure des anticorps obtenus dans les cultures.

COMPOSES		FONCTIONS PRINCIPALES
Protéines	Albumine	Transporte les lipides, les hormones et les minéraux. Maintient la pression osmotique. A un rôle tampon.
	Fibronectine	Adhérence cellulaire.
	$\alpha_2$ -macroglobuline	Inhibe la trypsine.
	Fétuine	Attachement des cellules.
Polypeptide et facteurs de croissance	Transferrine	Transporte le fer $Fe^{2+}$ .
	Insuline	Prépare la cellule à absorber le glucose et les acides aminés.
	IGF, somatomédine A et C, MSA	Mitogènes
Peptide	PDGF, EGF, ECGF, EDGF	Mitogènes.
	Glutathion	Réaction redox.
Autres hormones	Cortisol (hydrocortisone)	Induit l'attachement de la cellule.
	Oestrogène, androgène	Mitogènes.
	Hormones thyroïdiennes ( $T_3$ et $T_4$ )	Métabolisme énergétique, consommation d'oxygène. Induit la croissance et la différenciation des cellules très variées.
Lipides	Acide linoléique	
	Prostaglandines	Biosynthèse de la membrane.
	Cholestérol	
Métabolites	Acides aminés	
	Pyruvate	Prolifération cellulaire.
	Polyamines	
	$Fe^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $SeO_3^{2+}$ , $Co^{2+}$ .	Activation des enzymes.

Tableau 7 : Principaux constituants du sérum essentiels à la croissance cellulaire "in vitro" (MAURER 1986).

### **1 - 3 - 3 - 1 Substitution partielle du sérum par un composé non défini**

De nombreux milieux contiennent des substituts non définis.

En 1982, RODER a remplacé le SVF par des émulsions de jaune d'oeuf pour entretenir en culture des cellules épithéliales. En 1988, des fractions protéiques du plasma ont permis à MAC LEOD de cultiver des hybridomes alors que des protéoses peptones ont été utilisées par HASEGAIVA et al., en 1988. Shintani en 1989 a utilisé un produit dérivé du sérum de porc pour la culture d'hybridomes mais dans ce domaine, ce sont sans doute les dérivés du lait, utilisés depuis longtemps, qui ont donné les résultats les plus intéressants.

Le colostrum bovin a été employé à de nombreuses reprises (KLAGSBRUN et NEUMANN, 1979 ; RAMIREZ et al., 1990) alors que DARFLER et al. en 1988 ont mis au point le milieu CITTIL à base de caséine et que DAMERDJI et al. (1988) ont utilisé un lactosérum pour la culture d'hybridomes et de fibroblastes. La lactoferrine elle aussi a permis la croissance d'hybridomes (YMADA et al., 1990b), Un hydrolysé de lactalbumine a permis la croissance de cellules BHK en réacteur (GURHAN et al., 1990) et la  $\beta$ -lactoglobuline a été employée avec succès par MATI et al. (1991) pour cultiver plusieurs souches d'hybridomes.

Ces produits de substitution n'ont pas une composition parfaitement définie mais le prix de revient du milieu de culture est diminué de façon tout à fait substantielle.

### **1 - 3 - 3 - 2 Substitution partielle du sérum par des composés définis**

Le milieu de base est additionné d'une faible quantité de sérum et est enrichi en composés mitogéniques et en facteurs de croissance. Ces milieux sont de plus en plus utilisés. De nombreuses firmes les commercialisent mais leur prix est égal, voire supérieur à celui du sérum de veau.

### Protéines de transport et peptides

albumine (BSA, HSA, ovalbumine)  
 lipoprotéines (HDL, LDL)  
 transferrine (humaine, bovine)  
 glycyllhistidyllysine (GHL, facteur de croissance hépatique)

### Lipides, stéroïdes, acides gras et précurseurs transporteur :

Phospholipides : phosphatidyl éthanolamine,	
phosphatidylcholine	HDL
cholestérol	LDL
a.oléique, linoléique, linoléinique	albumine
éthanolamine, phosphoéthanolamine	

### Facteurs de croissance et hormones

PDGF, EGF, FGFb, IL2, IL6  
 insuline, IGF1  
 hydrocortisone, dexaméthasone, testostérone, progestérone,  
 triiodothyronine, somatostatine, prostaglandines

### Facteurs d'attachement

fibronectine, fétuine, laminine, fibrinogène, facteur d'étalement sérique

### Inhibiteurs des protéases

inhibiteur de la trypsine du soja (SBTI)  
 inhibiteur de la trypsine du pancréas sécrétoire (PSTI)  
 α1 antitrypsine  
 aprotinine

### Enrichissement du milieu de base

vitamines ( αtocophérol, biotine)  
 sels minéraux ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $SeO_3^{--}$ , oligoéléments)  
 antioxydants (a.ascorbique, glutathion, βmercaptoéthanol, αthioglycérol, etc)

**Tableau 8** : Suppléments utilisés dans les milieux sans sérum (JÄGER, 1990)

Milieu	Concentration en protéines	Source	Prix (\$/L)
Marcor's Pro-Free LC-115	-	Accurate Chemical &Scient. Corp. USA	15
PFHM-11	-	Gibco Laboratories USA	42
ASF 103	> 1mg/L	Ajinomoto Japon	
ABC	-	Cell Enterprises USA	36
SFM-101	20mg/L	Kamiya Biomedical Co. USA	65
HL-1	<29mg/L	Ventrex Laboratories USA	46
WRC 935	56mg/L	W.R.Grace & Co.USA	35
Imocell	1g/L	IBF Biotechnics	47
Medi-Cult SR3	-	GEA.Biotech. Danemark	
PFHM-2	-	Gibco Laboratories USA	42
HB 101-102-104	780mg/L	Hana Biologics USA	34
Substitut Nutridoma		Boehringer Mannheim	
-SP	<40mg/L	USA - FRG	19
-HU	<40mg/L		19
-NS	<150mg/L		19

Tableau 9 : Quelques milieux complets et substituts de sérum commercialisés (SHACTER,1989).

### 1 - 3 - 3 - 3 Substitution totale du sérum

Le sérum est complètement supprimé. Il est remplacé par un mélange de composés présents à des concentrations variables comme la transferrine, l'albumine, le  $\beta$  mercaptoéthanol, l'insuline, l'éthanolamine, le sélénium associés à des hormones, des acides gras, des lipoprotéines. Ils ont été mis au point pour la culture de différents types cellulaires: hybridomes, lymphocytes, fibroblastes (TAGER, 1990) (Tableaux 8 et 9).

Ces milieux sont largement utilisés dans les réacteurs agités, qui comme signalé dans le chapitre 1-3-2-3, sont de gros consommateurs de milieu. Pourtant ils présentent quelques désavantages dont l'un est de taille :

- Leur prix de revient est là aussi souvent plus important que celui d'un milieu supplémenté en sérum (Tableau 10).

Facteurs	Concentrations	Prix estimés pour 1 L de milieu (\$U.S.)
milieu IMDM 50% + Ham F12 50%		0.5
NaHCO <sub>3</sub>	3,6mg/mL	0.017
Pyruvate de sodium	2mmol/L	0.05
Glutamine	3mmol/L	0.065
Ethanolamine	20 $\mu$ mol/L	0,14.10 <sup>-3</sup>
Acides aminés		0.035
Sérum albumine humaine	830mg/L	1.7
Transferrine humaine	4.2mg/L	0.4
Insuline bovine	10mg/L	0.75

**Tableau 10** : Prix de revient des facteurs de croissance dans les milieux de culture selon JAGER, 1990)

De plus - ils sont souvent longs à préparer.

- Ils ne peuvent pas être utilisés pour certaines lignées plus délicates.
- Les densités cellulaires atteintes sont souvent un peu plus faibles que celles obtenues avec un sérum.

## **1 - 4 LES ANTICORPS MONOCLONAUX**

### **1 - 4 - 1 Notions de base sur le système immunitaire**

Les anticorps ou immunoglobulines ( Ig ) , glycoprotéines produites par les lymphocytes B, sont responsables de l'immunité spécifique à médiation humorale. Les anticorps reconnaissent spécifiquement les antigènes étrangers et participent à leur élimination.

Le développement d'une réponse immunitaire, aboutissant à la production d'anticorps et de lymphocytes T cytotoxiques agissant directement sur la cellule cible visée, met en jeu toute une série d'interactions cellulaires: les unes, directes grâce à des structures membranaires exprimées sur les cellules qui interagissent, les autres, indirectes par l'intermédiaire de médiateurs solubles sécrétés par les cellules lymphoïdes ou les cellules présentant l'antigène qui initient la réponse immunitaire (Figure 14).

L'antigène est présenté aux cellules lymphoïdes par des cellules spécialisées, essentiellement les cellules de la lignée monocytaire, associé aux antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) exprimé par ces cellules. Cet antigène est reconnu par des lymphocytes T auxiliaires possédant un récepteur pour l'antigène et un récepteur CD4 reconnaissant spécifiquement les molécules HLA de classe II. L'interaction du lymphocyte T CD4+ et de la cellule présentant l'antigène, qui sécrète des médiateurs solubles comme l'interleukine 1 (IL1), entraîne l'activation du lymphocyte CD4+. Cette dernière aboutit à la production et la sécrétion de plusieurs lymphokines, notamment IL2, IL4, IL5, et IL6 qui agissent comme des facteurs de croissance sur les lymphocytes T, subissant une prolifération clonale, et permettent l'activation et la différenciation des cellules effectrices : lymphocytes T cytotoxiques, cellules productrices d'anticorps, cellules T "mémoire" et cellules NK.

Le lymphocyte T cytotoxique CD8+ possédant un récepteur pour l'antigène ne peut le reconnaître qu'en association avec un antigène de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité.

Les anticorps sont produits par les plasmocytes dérivés des lymphocytes B. Chaque lymphocyte B est programmé pour ne fabriquer qu'un seul anticorps qu'il expose à sa surface et qui peut agir à la façon d'un

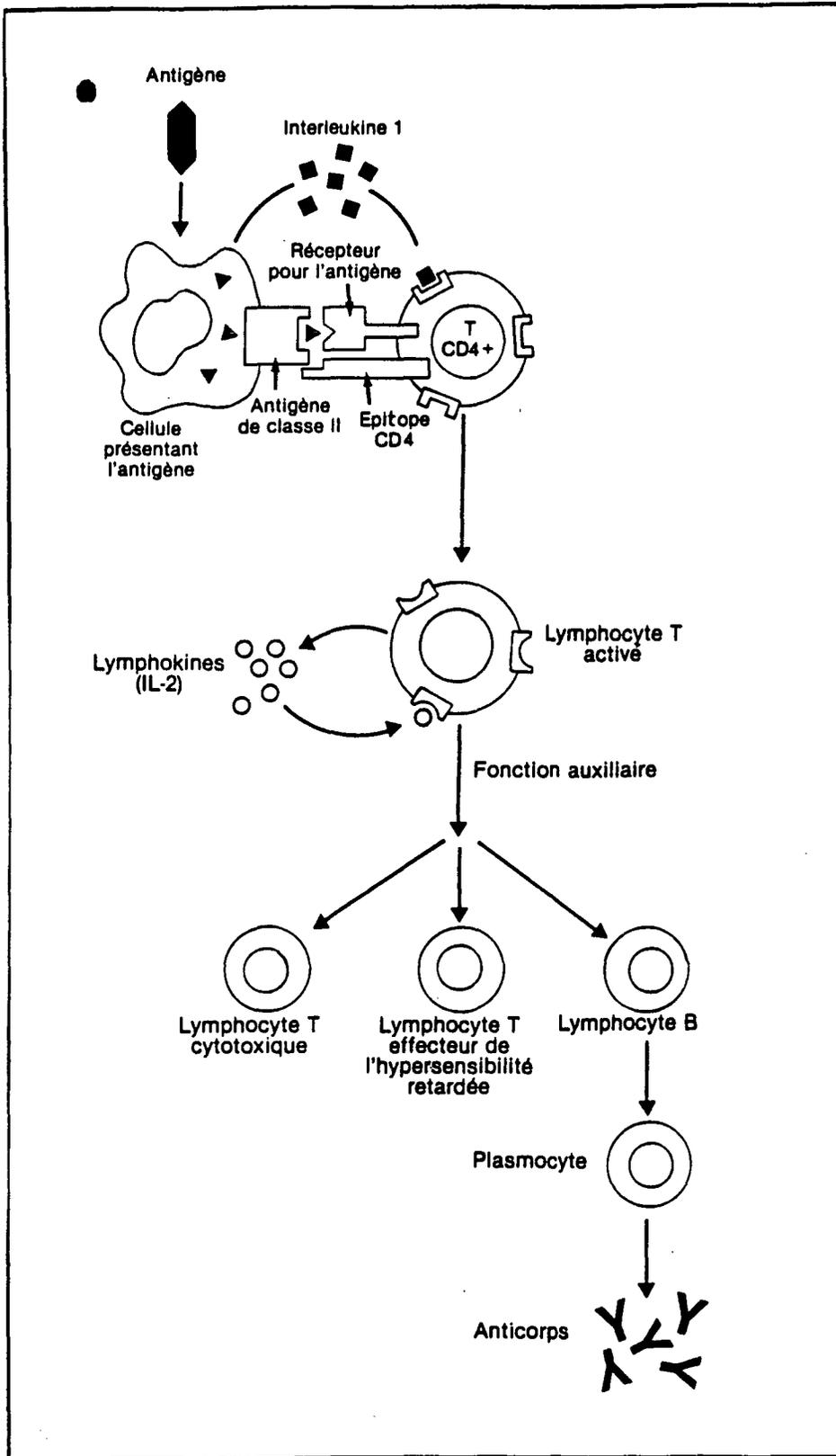


Figure 14 : Activation du système immunitaire selon BOITARD (1990)

récepteur pour l'antigène. La fixation et la reconnaissance de l'antigène activent ce lymphocyte B, ce qui entraîne : une prolifération clonale des cellules B et leur différenciation d'une part vers des cellules "mémoire" et d'autre part vers des cellules productrices d'anticorps, IgM (lors de la réponse primaire) et IgG, IgA et IgE sécrétés par commutation de classe après l'action des lymphokines secrétées par les lymphocytes T auxiliaires CD4+.

L'activation de la réponse immunitaire est soumise au contrôle des lymphocytes T suppresseurs, dont la cible principale est le lymphocyte T CD4+. La mise en jeu des mécanismes immunologiques effecteurs dépend ainsi de la balance entre les lymphocytes T auxiliaires et lymphocytes T suppresseurs qui possèdent un récepteur spécifique de l'antigène ou un récepteur spécifique des déterminants idiotypiques portés par les anticorps dirigés contre l'antigène.

## **1 - 4 - 2 Notions de base sur les anticorps**

### **1 - 4 - 2 - 1 Structure**

Les anticorps sont des protéines très diverses à la fois par leurs fonctions et par leur spécificité pour l'antigène. On peut néanmoins leur décrire une structure générale commune. Les immunoglobulines (Ig) comprennent deux régions distinctes, respectivement porteuses de deux fonctions qui les caractérisent :

- la fonction de reconnaissance exprimée par une région variable d'une molécule d'Ig à l'autre, qui semble pouvoir distinguer un nombre apparemment illimité d'antigènes différents.

- la fonction effectrice exprimée par une région constante, indépendante de la fonction de reconnaissance, qui est relativement peu diversifiée (fixation du complément, transport placentaire, opsonisation, adhésion aux macrophages). Les chaînes glycaniques sont fixées principalement sur cette région.

Cette dualité fonctionnelle des Ig repose sur une dualité structurale. C'est à partir des IgG, représentant plus de 75 % des Ig du sérum, qu'ont été obtenus les éléments biochimiques permettant d'élaborer le modèle structural des Ig de toutes les classes.

Les Ig sont constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques deux à deux et unies par des ponts disulfures. Elles ont une forme d'Y avec une région charnière située à la partie moyenne de la chaîne lourde, où se trouvent les ponts disulfures reliant les chaînes lourdes (Figure 15). Les expériences de dégradation montrent que les Ig sont formées de deux fragments compacts portant l'activité anticorps (Fab), liés à un troisième fragment (Fc) par des ponts peptidiques. L'analyse des séquences d'acides aminés révèle que les chaînes légères varient légèrement en longueur : 211 à 217 acides aminés (poids moléculaire d'environ 25 000 Da), et que les chaînes lourdes sont deux fois plus longues que les chaînes légères : 450 acides aminés pour les chaînes  $\kappa$  et  $\lambda$ , 550 environ pour les chaînes  $\mu$  (poids moléculaire compris entre 55 000 et 75 000 Da).

Les différentes chaînes présentent des séquences répétitives ou "domaines" de 110 acides aminés environ, comportant un pont disulfure et formant une boucle d'environ 60 acides aminés. Les chaînes légères contiennent deux domaines :  $V_L$  et  $C_L$  (V pour variable, C pour constant), les chaînes lourdes 4 ou 5 :  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ . Dans les domaines  $V_H$  et  $V_L$  existent trois régions hypervariables qui participent à la formation des sites anticorps.

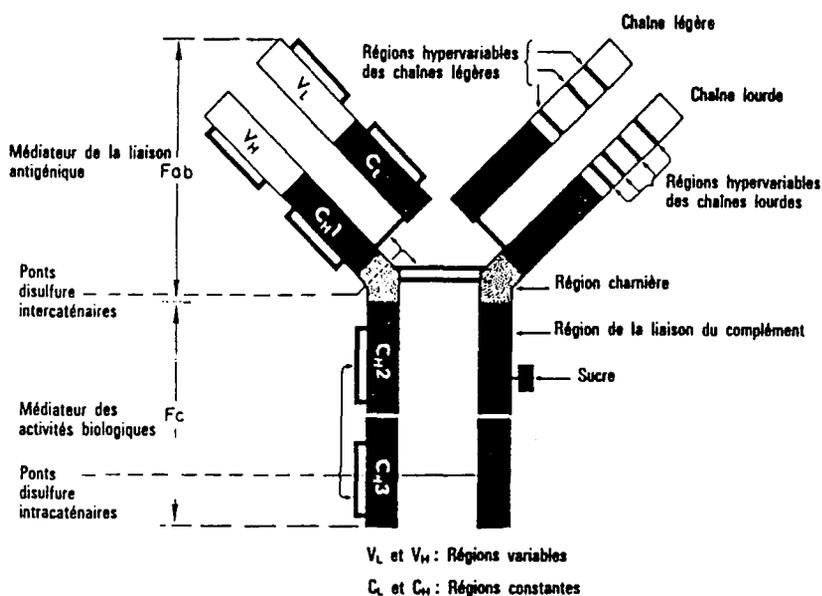


Figure 15 : structure de la molécule d'IgG d'après Wasserman et Capra (1977).

## 1 - 4 - 2 - 2 Variabilité

### *1 - 4 - 2 - 2 - 1 Variabilité isotypique*

Les isotypes définissent la classe et la sous classe des Ig. Ils sont identiques d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce.

Les immunoglobulines sont classées en fonction de la structure de la partie constante de leur chaîne lourde. On dénombre chez l'homme 5 classes d'immunoglobulines IgG comprenant 4 sous-classes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 , IgA comprenant 2 sous-classes IgA1, IgA2, IgM, IgD, IgE. Toutes les régions constantes des chaînes lourdes sont co exprimées dans un sérum de sujet normal. Ce sont des variants isotypiques. Quant aux régions constantes des chaînes légères, elles existent sous deux formes isotypiques Kappa et Lambda associées aux isotypes des chaînes lourdes. Chaque molécule ne contient qu'un seul type de chaîne légère, quelle que soit la classe de la chaîne lourde.

### *1 - 4 - 2 - 2 - 2 Variabilité allotypique*

Les allotypes traduisent des différences dans la structure primaire des Ig des individus d'une même espèce. Les caractères allotypiques sont situés dans les régions constantes des chaînes lourdes et légères : il s'agit généralement d'une substitution d'un résidu d'acide aminé par un autre. Les allotypes sont des polymorphismes génétiques qui suivent un déterminisme mendélien et sont détectables sérologiquement. 4 systèmes alléliques d'allotypes, exprimés de façon codominante, sont connus dans l'espèce humaine : allotypes des chaînes légères Kappa (3), allotype G<sub>M</sub> des chaînes lourdes (une vingtaine), facteur A2m (1) et A2m (2) s'exprimant sur les chaînes lourdes des IgA2 et facteur IgF présent sur les IgG1.

### *1 - 4 - 2 - 2 - 3 Variabilité idiotypique*

Les idiotypes sont des déterminants antigéniques associés au site anticorps, particulier à chaque molécule d'Ig qui les porte. Ils sont localisés dans la région variable et particulièrement dans la région hypervariable pour les idiotypes liés aux sites de combinaison avec l'antigène.

On peut induire la production d'anticorps anti-idiotypes.

#### 1 - 4 - 2 - 3 Fonctions

Les différentes classes d'Ig assurent des fonctions différentes.

##### *1 - 4 - 2 - 3 - 1 Les immunoglobulines G*

Elles sont produites lors de la réponse immunitaire secondaire et peuvent traverser le placenta.

Elles diffusent dans les espaces extravasculaires de l'organisme où elles neutralisent les toxines bactériennes et fixent les microorganismes favorisant ainsi leur phagocytose après activation du complément.

##### *1 - 4 - 2 - 3 - 2 Les immunoglobulines A*

La forme monomérique domine dans le sérum.

Dans les sécrétions séro-muqueuses (salive, larmes, fluide nasal, sueur, colostrum, sécrétions pulmonaires, génito-urinaires et gastro-intestinales), elles se présentent sous forme de dimère d'IgA unis par une petite molécule : la chaîne J, à une protéine synthétisée dans les cellules épithéliales locales : la pièce sécrétoire qui les protégerait des enzymes protéolytiques.

Les IgA inhibent l'adhérence de microorganismes à la surface des cellules des muqueuses.

##### *1 - 4 - 2 - 3 - 3 Les immunoglobulines M*

Appelées macroglobulines en raison de leur poids moléculaire élevé, ce sont des polymères de cinq sous-unités térapeptidiques, reliées par des ponts disulfures.

Excellents agents agglutinants et activateurs du complément, elles fixent les antigènes à épitopes multiples. Elles apparaissent très tôt au cours de la réponse à une infection, sont présentes dans la circulation et donc jouent un rôle de premier plan dans les bactériémies. Elles sont responsables de la réponse immunitaire primaire.

#### *1 - 4 - 2 - 3 - 4 Les immunoglobulines D*

Elles sont présentes en très faible quantité, sensibles aux dégradations protéolytiques, elles ont une faible demi-vie plasmatique.

Les IgD sont avec les IgM, les Ig prédominantes sur la surface des lymphocytes B. A ce titre, les IgD pourraient avoir un rôle dans la différenciation de ces cellules.

Il semblerait que IgD et IgM soient des récepteurs membranaires d'antigènes interagissant mutuellement pour contrôler l'activation ou la suppression des lymphocytes.

#### *1 - 4 - 2 - 3 - 5 Les immunoglobulines E*

Le fragment Fc des IgE a une très grande affinité pour les récepteurs présents à la surface des mastocytes et des polynucléaires basophiles. La fixation de l'antigène ou allergène à deux molécules voisines d'IgE aboutit à une dégranulation de ces cellules avec libération de nombreux médiateurs et amines vasoactives comme l'histamine (réaction d'hypersensibilité immédiate).

Présentes dans le sérum à faibles concentrations, elles protègent les muqueuses externes en déclenchant une réaction inflammatoire aigüe.

### 1 - 4 - 3 Rappels sur les anticorps monoclonaux (ACM)

Après injection d'un antigène, même purifié, à un animal, l'antisérum qui en résulte est, en réalité, composé de nombreuses immunoglobulines de type  $\gamma$ , de spécificité antigénique et de propriétés biologiques différentes. Ce phénomène est accru lors de l'utilisation d'antigènes impurs et mal définis (Figure 16).

De plus, il convient de souligner qu'il est pratiquement impossible d'obtenir des antisérums identiques lorsque l'Ag est injecté 2 fois au même animal en raison de l'hétérogénéité et du caractère imprévisible de la réponse humorale.

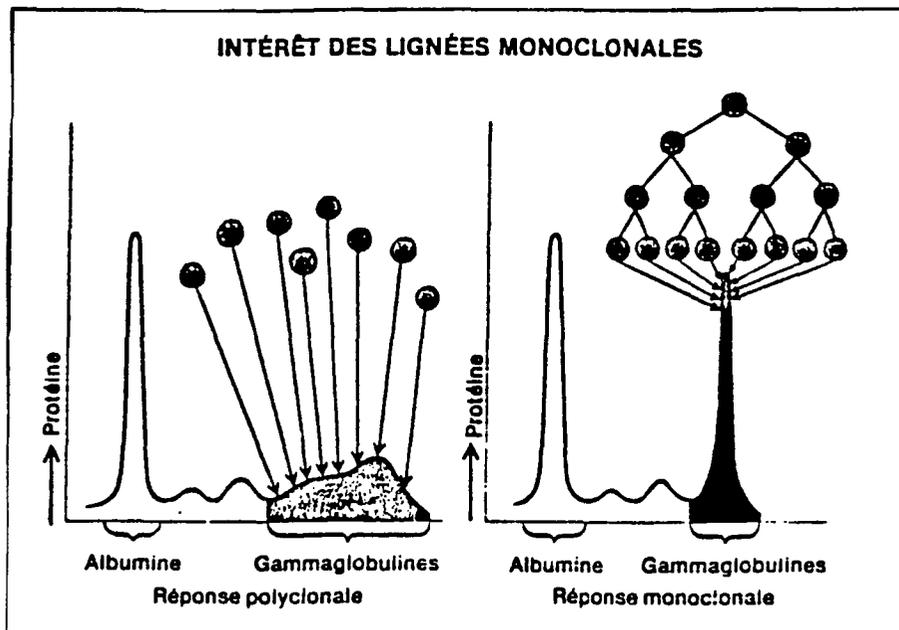


Figure 16 : Schéma de la distribution des gammaglobulines dans un spectre d'électrophorèse (Scharff, 1982).

Nombre de ces problèmes ont pu être résolus par l'apparition des anticorps monoclonaux spécifiques d'un déterminant antigénique unique et parfaitement reproductibles. Ils sont, en effet, issus d'un même clone cellulaire, cellules toutes issues de la même cellule mère et toutes jumelles.

#### 1 - 4 - 4 Le marché des anticorps monoclonaux

Le marché mondial des produits à base d'anticorps monoclonaux est en évolution constante. Alors qu'il était de 720 millions de francs en 1985 il avait été estimé à 10.6 milliards de francs pour 1990 (Tableau 11 et 13).

PRODUIT	1985	1990
Réactif de laboratoire	400	5 000
Réactif à usage grand public	200	1 000
Diagnostics in vivo	-	1 000
Sérothérapie	-	1 600
Traitement du cancer Systèmes vecteurs de médicaments	-	1 000
Purification industrielle	60	700
Applications en agriculture, horticulture	30	150
Diagnostics vétérinaires	30	120
<b>TOTAL</b>	<b>720</b>	<b>10 570</b>

Tableau 11 : Evolution de la vente mondiale de produits à base d'anticorps monoclonaux (en millions de francs) d'après Clarck 1985.

Ces anticorps monoclonaux sont, actuellement pour la plupart d'entre eux, produits, *in vitro*, dans des bioréacteurs de grand volume. Le marché annuel mondial de ces bioréacteurs est en augmentation d'année en année : puisqu'il était inférieur à 100 millions de Dollars en 1989, il devrait dépasser 200 millions de Dollars en l'an 2000 (Tableau 12).

	1989	1994	1999
	(S millions, 1989 dollars)		
Anticorps monoclonaux	92	141	219
Vaccins à usage humain	37	59	68
Lymphokines	21	60	145
Hormones à usage humain	53	174	527
Produits d'origine protéïque	56	130	280
Vaccins à usage vétérinaire	42	67	91
Hormones à usage vétérinaire	20	40	80
Développement et recherche	0	0	0
Autres produits	16	60	206
<b>TOTAL</b>	<b>336</b>	<b>732</b>	<b>1 617</b>

Tableau 12 : Evolution du Marché annuel mondial des bioréacteurs de production, exprimé par classes de produits (TGM, 1989).

Firmes	Etats	Utilisation
Diagnostic <i>in vitro</i> CEA / ORIS	France	Immunoessais enzymatiques de l'antigène carcinoembryonnaire, de l'alphafoetoprotéine et de la bêta-HCG
Centocor	USA	Diagnostic des cancers du foie, du sein et du côlon, diagnostic de l'épate B utilisant 3 AcM
Chugai	Japon	Diagnostic du cancer de la prostate
Couder	USA	Typage cellulaire HLA D/DR
Pasteur Diagnostics	France	Dosage des IgE totales et spécifiques (licence accordée à Pharmacia), de la rénine, de TSH. Diagnostic différentiel de l'herpes I et II, identification du CMV, du virus respiratoire syncytial
Gen. Diagnostic Corp.	USA	Dosage des drogues entraînant une toxicomanie (pour Hoffmann La Roche)
Genzyme Corp.	USA	Immunoessai enzymatique de la rubéole
Terumo Med. Corp.	Japon	Dosage de la digoxine
Immunotech	France	Dosage de l'histamine pour le diagnostic des allergies. Dosage de la TSH et des IgE
Clonatec / BioMérieux	France	Dosage de la prolactine, de la ferritine et de l'Ag CE
Clonatec / Biotrol	France	Diagnostic des maladies sexuellement transmissibles (chlamydiae, herpes type I et III)
BioMérieux	France	Diagnostic différentiel de l'herpes. Dosage de la prolactine. Kits de dosage de LH, FSH, TSH. Kits pour la sérologie de la toxoplasmose
Diagnostics grand public		
Boots Celtech	G-B	Test d'ovulation
Monoclonal Antibodies	USA	Test d'ovulation
Unipath	G-B	Test d'ovulation
Ortho Pharmaceutical	USA	Différents tests grand public
Clonatec / OHF	France	Test d'ovulation et de grossesse. Dosage des IgE spécifiques
Diagnostics <i>in vivo</i>		
Sorin Biomedica	Italie	Immunoscintigraphie des mélanomes
Technicare	USA	Imagerie de l'antigène carcinoembryonnaire
CEA / ORIS	France	Radio-imagerie
IRE	Belgique	Radio-imagerie
Hybritech	USA	AcM marqués à l'indium pour l'imagerie des cancers du sein
Thérapeutique anticancéreuse		
Boehringer Mannheim	Allemagne	Cancers lymphatiques et dermiques
Sanofi	France	Epuration de moelle osseuse
Immunotech	France	Epuration de moelle osseuse
Famitalia Carlo Erba	Italie	Ciblage de l'adriamycine
Hybritech	USA	Cancers du foie
Eli Lilly	USA	Systèmes de ciblage de médicaments
Yamanouchi	Japon	Facteur de nécrose des tumeurs
Takeda Chemical	Japon	Ciblage des tumeurs de la vessie
Purification industrielle		
Celtech	G-B	Purification de l'interféron. Purification de l'interleukine 2
Wellcome Biotechnology	G-B	Chromatographie d'affinité avec des AcM
Hoffmann la Roche	Suisse	Purification de l'interféron
Immunotech	France	Purification du facteur VIII (sera accordé sous licence en 1986)
Agriculture / Horticulture		
Agri-Diagnostic	USA	Diagnostic des maladies du gazon et des agrumes
Agricultural and Food Research Council	G-B	Diagnostic des maladies virales de la pomme de terre
Diagnostics vétérinaires		
Animax	USA	Diagnostics vétérinaires
Boots Celtech	G-B	Test d'ovulation des bovins
Molecular Genetics	USA	Diagnostic de la diarrhée néonatale du veau
Senetek	G-B	Tests de gestation et d'ovulation chez les chiens et les chats
Symbiotics	USA	Diagnostic de la filariose des chiens
Neogen	USA	Diagnostic de la mastite bovine
FFA Mérieux	France	Diagnostic de la diarrhée néonatale du veau
Clonatec	France	Tests de gestation du bétail. Test de gestation des bovidés sur bandelettes réactives

Tableau 13 : Les nouveaux produits à base d'anticorps monoclonaux commercialisés en 1985 ( CLARCK, 1987)

## 1 - 4 - 5 Leurs applications

L'investissement initial est important puisqu'il faut environ 4 mois pour obtenir un hybridome stable mais à long terme ces anticorps monoclonaux "faits sur mesure" ont ouvert une nouvelle ère dans des domaines très divers. Leur spécificité très étroite, leur affinité restant identique et la possibilité de leur obtention en quantité illimitée permet la standardisation des tests, diagnostics et traitements.

### 1 - 4 - 5 - 1 Dans le domaine diagnostique et fondamental

Leur utilisation peut se faire dans des spécialités aussi variées que la purification d'antigènes précieux, la radiologie, la détermination de groupes sanguins, le typage, le diagnostic de nombreuses infections.

#### *1 - 4 - 5 - 1 - 1 Purification d'antigènes précieux*

La réaction antigène-anticorps étant réversible, pour purifier un antigène il suffit de le faire passer sur une colonne de chromatographie où un support a été couplé à l'anticorps monoclonal complémentaire. Il y aura formation d'un complexe qui sera ensuite dissocié à l'aide soit d'une solution saline concentrée, soit d'une solution acide, soit par la guanidine. Cette manipulation sera d'autant plus facile que l'anticorps aura une haute spécificité vis-à-vis de l'antigène et que sa constante d'affinité sera faible.

#### *1 - 4 - 5 - 1 - 2 Imagerie médicale*

Si la scintigraphie permet par le truchement d'isotopes radioactifs marqués, d'avoir des images intéressantes pour le diagnostic de tumeurs diverses, l'utilisation d'Ac marqué par un isotope radio-actif permet, par une fixation spécifique aux niveau des cellules tumorales (par l'intermédiaire de leur Ag de surface), une détection plus fine (MACH, 1986).

En effet, on peut dès à présent mettre en évidence "*in vivo*", grâce à un anticorps monoclonal radiomarqué à l'iode 125 et dirigé contre l'antigène

l'ovaire de diamètre égal ou supérieur à 0,5 cm. Ces dépistages précoces permettent un traitement rapide.

Il est possible que dans l'avenir, on puisse déterminer l'origine tissulaire d'un néoplasme de localisation inconnue par la détection des antigènes produits au niveau des métastases.

L'avantage de l'utilisation des anticorps réside dans le fait que dans le domaine de l'imagerie, l'injection n'est pas répétée et que la quantité utilisée est faible. De ce fait, il est donc possible d'employer des anticorps monoclonaux d'origine animale.

#### *1 - 4 - 5 - 1 - 3 Biologie*

Les travaux de Biochimie de Yallow et Berson (1973) sont à l'origine du développement des techniques d'immunoanalyses (radioimmunologie, immunoenzymologie, immunofluorescence,...).

Les antisérums indispensables dans ces techniques de dosage ont été rapidement remplacés par des anticorps monoclonaux entraînant une extension de ces méthodes de la biochimie à la pharmacologie, à la toxicologie, à l'immunologie, à l'immunohématologie et à l'identification des produits solubles issus directement ou indirectement d'un agent infectieux.

L'évaluation de plus de 60 molécules (hormones, marqueurs du cancer, facteurs de croissance) dans les liquides biologiques souligne l'importance du marché des anticorps monoclonaux en tant que réactifs de laboratoire. Le changement dû aux anticorps monoclonaux conduit à une amélioration de la spécificité, de la limite de détection (sensibilité) et à une plus grande rapidité de réalisation.

Ainsi les antisérums obtenus contre l'hormone lutéinisante (LH) pouvaient aussi reconnaître l'hormone gon adotrope chorionique (HCG) en raison de la présence d'une chaîne polypeptidique commune (sous-unité) et de ce fait majorer artificiellement les valeurs. Ce problème n'a pu être résolu que par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre la sous-unité B spécifique de chacune de ces hormones polypeptidiques.

En ce qui concerne le dosage des hormones de nature stéroïde (ex : le 17 B oestradiol) la spécificité des anticorps monoclonaux a permis de supprimer les étapes préalables d'extraction et de chromatographie des échantillons biologiques et donc de diminuer le temps nécessaire à ces analyses.

De plus la redéfinition des grossesses à risque de trisomie 21 (ou syndrome de Down) pourrait être faite à partir de signes d'appel biologiques (détermination des concentrations d'HCG, d' FP, d'oestriol) en complément de l'âge maternel, l'échographie et les antécédents familiaux. Ceci pourrait être appliqué alors au dépistage de routine de manière systématique chez toute femme enceinte.

Enfin, l'immobilisation de ces anticorps sur des fibres optiques est en plein essor.

#### *1 - 4 - 5 - 1 - 4 Pharmacologie, Toxicologie*

Pour la plupart des substances médicamenteuses, la différence entre dose efficace et dose toxique est faible. Afin de réduire les effets secondaires, des méthodes immunochimiques ont été proposées pour la quantification des molécules les plus utilisées (digoxine, digitaline).

Actuellement, la distribution de nouvelles molécules s'accompagne de la mise à disposition des techniques d'évaluation dans les liquides biologiques des concentrations de ces substances (érythropoïétine, ciclosporine A). Ces mêmes techniques permettent aussi d'identifier ou de quantifier les produits utilisés dans un but de "dopage" (érythropoïétine, androgènes) ou qui peuvent être classées dans la rubrique "drogue".

Dans le cas d'une intoxication par la digitaline, l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre cet alcaloïde, par la formation d'un complexe Ag/Ac, permettrait d'éliminer rapidement cette substance de la circulation sanguine.

#### *1 - 4 - 5 - 1 - 5 Immunologie*

En immunologie les anticorps monoclonaux sont devenus entre autre indispensables pour :

- l'analyse structurale des antigènes,

- le typage des antigènes HLA du complexe majeur d'histocompatibilité,
- l'identification des marqueurs de membrane lymphocytaire,
- la thérapie immunosuppressive.

#### \* Typage HLA

L'identification des antigènes HLA (complexe majeur d'histocompatibilité) est réalisée de manière systématique avant toute transplantation d'organe, afin de déterminer la compatibilité tissulaire entre donneur et receveur, et dans le diagnostic de certaines maladies.

Ainsi en pratique médicale courante, la recherche de l'antigène HLA B<sub>27</sub> est effectuée devant toute suspicion de spondylarthrite ankylosante puisque l'efficacité diagnostique de cet examen approche 90 %.

La recherche de cet antigène se fait sur une suspension lymphocytaire totale par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux anti-HLA B<sub>27</sub>. Cependant en raison de nombreuses réactions croisées avec d'autres antigènes HLA B<sub>13</sub>, HLA B<sub>40</sub>, HLA Bw<sub>22</sub> et HLA Bw<sub>47</sub>, il convient d'utiliser plusieurs anticorps anti-B<sub>27</sub> dirigés contre des épitopes différents.

#### \* Les marqueurs de membrane lymphocytaire

Les marqueurs de membrane cellulaire sont des molécules de la surface des cellules dont la distribution est restreinte soit à une ou à quelques lignées, soit à différents stades de différenciation au sein de cette lignée.

L'utilisation des divers anticorps monoclonaux, produits actuellement associée à la technique de cytométrie de flux est présentée dans le tableau 14.

La caractérisation de ces molécules, par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux, a permis d'étudier les étapes de différenciation des lymphocytes T.

De plus, l'évaluation des populations lymphocytaires en clinique comprend :

- la numération des lymphocytes T totaux,
- la détermination du rapport lymphocytes CD<sub>4+</sub> (Helper) / CD<sub>8+</sub> (cytotoxiques).

**TABLEAU 14**  
Principaux anticorps utilisés pour l'identification des cellules hématopoïétiques

CLASSES DE DIFFÉRENCIATION	ANTICORPS	RÉACTIVITÉ CELLULAIRE	STRUCTURE MEMBRANAIRE RECONNUE
CD1	T6, Leu 6, IOT6, OKT6	thy, cel. dend. ss pop. B	gp 49
CD2	T11, Leu 5b, IOT11, OKT11	ly. T	récepteur pour les globules rouges de mouton, récepteur pour le LFA3
CD3	T3, Leu 4, IOT3, OKT3	ly. T	complexe CD3
CD4	T4, Leu 3a, IOT4, OKT4	ss pop. T (auxiliaire)	récepteur pour les antigènes de classe II (SMH) et le VIH
CD5	T1, Leu 1, IOT1, OKT1	ly. T ; ss pop. B (LLC)	gp 67
CD7	Leu 9, IOT7, OKT16	ly. T	gp 40
CD8	T8, Leu 2a, IOT8, OKT8	ss pop. T (suppresseur-cytotoxique)	récepteur pour les antigènes de classe I (SMH), hétérodimère gp 32
CD9	IOB2	ss pop. B (pré B), monocytes, plaquettes	p 24
CD10	J5, CALLA, IOB5, OKB cALLa	préc. lymph., ly. B des centres germinatifs, cell. granuleuses	endopeptidase neutre, cALLa, gp 100
CD11b	MO1, Leu 15, IOM1, OKM1	monocytes, cell. granuleuses, cell. NK	récepteur du C3 bi (CR3), gp 155/95
CD11c	Leu M5, IOM11	monocytes, cell. granuleuses, cell. NK, ss pop. B	gp 150/95
CD13	My7, OKM13	monocytes, cell. granuleuses	aminopeptidase N, gp 150
CD14	MO2, My4, Leu M3, IOM2, OKM14	monocytes, cell. de Langerhans de l'épiderme, (cell. granuleuses)	gp 55
CD15	Leu M1, ION1, OKM15	cell. granuleuses (monocytes)	haptène X (3-fucosyl-N-acétyllactosamine)
CD16	BW 209/2, HUNK2, VEP13, ION16	cell. NK, cell. granuleuses macrophages	récepteur III pour le Fc. IgC
CD19	B4, Leu 12, IOB4, OK panB	ly. B (et précurseurs)	gp 95
CD20	B1, Leu 16, IOB20	ly. B (et précurseurs)	p 37/32
CD21	B2, CR2, IOB1a, OKB7	ss pop. B	récepteur pour l'EBV et le C3d (CR2), p 140
CD25	Tac. IOT14	lymphocytes activés, T, B, monocytes	récepteur pour l'interleukine 2 (chaîne $\beta$ )
CD29	IOT29	large	chaîne $\beta$ VLA, chaîne $\beta$ 1 de l'intégrine, glycoprotéine plaquettaire GP IIa
CD33	My9, Leu M9	cell. granuleuses	gp 67
CD34	HPCA1, IOM34	précurseurs (myéloïdes et lymphoïdes)	gp 105-120
CD36	OKM5, IOP36	préc. érythro., mono., méga.	gp 90, récepteur de la trombospondine
CD38	T6, IOB6	précurseurs lymphoïdes, cellules T activées, plasmocytes	p 45
CD41	anti gp IIb/IIIa, OK PLT, J15, IOP41	plaquettes	complexe plaquettaire GP IIb/IIIa et GP IIb
CD42b	AN 51, IOP42	plaquettes	GP Ib, gp 135/25
CD45R	IOL2, Leu 18	ss pop. ly. T, B, monocytes cell. granuleuses	T200 (restreint)
CD56	NKH1, Leu 19, IOT56	cell. NK, ly. activés	gp 220/135, NKH1
CD57	Leu 7, IOT10	cell. NK, ly. T, ss pop B, cerveau	gp 110, HNK1

thy : thymocytes  
cel. dend. : cellules dendritiques  
cALLa : common ALL antigen  
ss pop. : sous-population

gp : glycoprotéine  
ly T : lymphocytes T  
ly B : lymphocytes B  
préc. : précurseurs

LFA3 : leucocyte function antigen 3  
SMH : système majeur d'histocompatibilité  
VIH : virus d'immunodéficience humaine  
EBV : Epstein-Barr virus  
NK : natural killer

Enfin, par un marquage spécifique avec d'autres anticorps monoclonaux, il est possible de typer des proliférations malignes des cellules du système immunitaire.

Dans l'avenir, on peut imaginer, après obtention d'anticorps spécifiques dirigés contre diverses cellules malignes, des thérapeutiques spécifiques adaptées à chaque patient.

#### \* Immuno-hématologie

Les anticorps monoclonaux peuvent servir à la détermination des groupes sanguins (BARNSTABLE, 1978). Des anticorps monoclonaux anti-A, anti-B, anti-AB sont utilisés maintenant en routine de même qu'il existe des anticorps monoclonaux anti-Rhésus D utilisés pour la détection et la prévention de l'allo immunisation foetomaternelle.

#### 1 - 4 - 5 - 1 - 6 Identification des agents infectieux

Les anticorps monoclonaux permettent d'identifier des agents pathogènes qu'ils soient parasitaires (*Schistosomes*), bactériens (*Clostridium Tétani* et *botulinum*, infections à *Streptococcus A*) et enfin et surtout viraux. C'est grâce à eux que l'identification du récepteur du virus de l'hépatite virale (HBS) a été rendue possible.

L'utilisation des anticorps monoclonaux a permis aussi de différencier des sous-classes de virus qui apparaissent identiques avec les antisérums conventionnels.

En ce qui concerne le virus de la grippe, sa carte antigénique a été établie à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Quant au virus de la rage, longtemps considéré comme unique, les anticorps monoclonaux montrent son instabilité. La possibilité de distinguer divers sérotypes devrait permettre d'améliorer la vaccination et de mieux expliquer et endiguer l'épidémiologie.

## - Le virus du SIDA

Le premier cas mondial de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) fut décrit en 1981 et l'agent pathogène responsable de ce syndrome, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) fut isolé entre 1982 et 1984.

Bien que les tests biologiques de dépistage, diagnostique et de surveillance des infections par les virus VIH1 et VIH2 reposent essentiellement sur des réactions "immunologiques" il nous a semblé intéressant d'envisager cette pathologie dans un paragraphe spécial.

En effet, en juillet 1990, l'organisation mondiale de la santé estimait que le nombre de personnes infectées était compris entre 8 à 10 millions, ce qui laisse présager un chiffre de 15 à 20 millions pour l'an 2000.

Depuis l'application, en 1983, des méthodes permettant de mettre spécifiquement en évidence les anticorps anti-VIH, l'évolution technologique n'a cessé d'entraîner une amélioration de ces tests de dépistage et de diagnostic vers le développement de techniques dans le but de détecter directement les anticorps viraux, et d'évaluer d'autres paramètres biologiques dans le cadre de la surveillance (numération des populations lymphocytaires T-CD4 et T-CD8, détermination du taux de la  $\beta$ 2 microglobuline).

### Test de dépistage

Lors des tests de dépistage de routine, la recherche d'anticorps spécifiques, qu'ils soient dirigés contre les protéines du core (P24, P28), contre les glycoprotéines de l'enveloppe (GP41, Gp 120, Gp 160), contre la polymérase P34 ou P51 ou encore contre la protéine NEF, par méthode immunoenzymatique, l'utilisation d'anticorps anti-immunoglobulines humaines (anti-IgM ou anti-IgG) n'intervient que dans la phase de révélation des complexes Ag / Ac formés.

### Détection du virus

Il est désormais possible d'effectuer aussi la recherche de l'antigénémie virale. Son intérêt est double :

- l'apparition des antigènes viraux précède celle des anticorps. Elle se produit 3 à 5 semaines après la contamination et disparaît dans les semaines suivant la formation des anticorps spécifiques.

La réapparition de l'antigène P24 lors de l'évolution de l'infection serait un facteur de mauvais pronostic.

La recherche de l'Ag P24 dans les liquides biologiques (sang, LCR) se fait par immunoenzymologie ou par immunofluorescence grâce à des anticorps monoclonaux. Par ailleurs, le génome viral peut être mis en évidence par l'intermédiaire de sondes nucléiques qui comprennent des acides nucléiques modifiés chimiquement. L'addition d'un second anticorps dirigé contre le premier, permet de révéler les complexes formés.

- Autres examens

Enfin l'évaluation de la concentration sanguine de B2 microglobuline et l'évolution de l'immunodéficience détectée par la détermination du rapport nombre de lymphocytes T CD4+ / nombre de lymphocytes T CD8+ constituent un autre domaine d'utilisation des anticorps monoclonaux dans la pathologie associée au virus HIV.

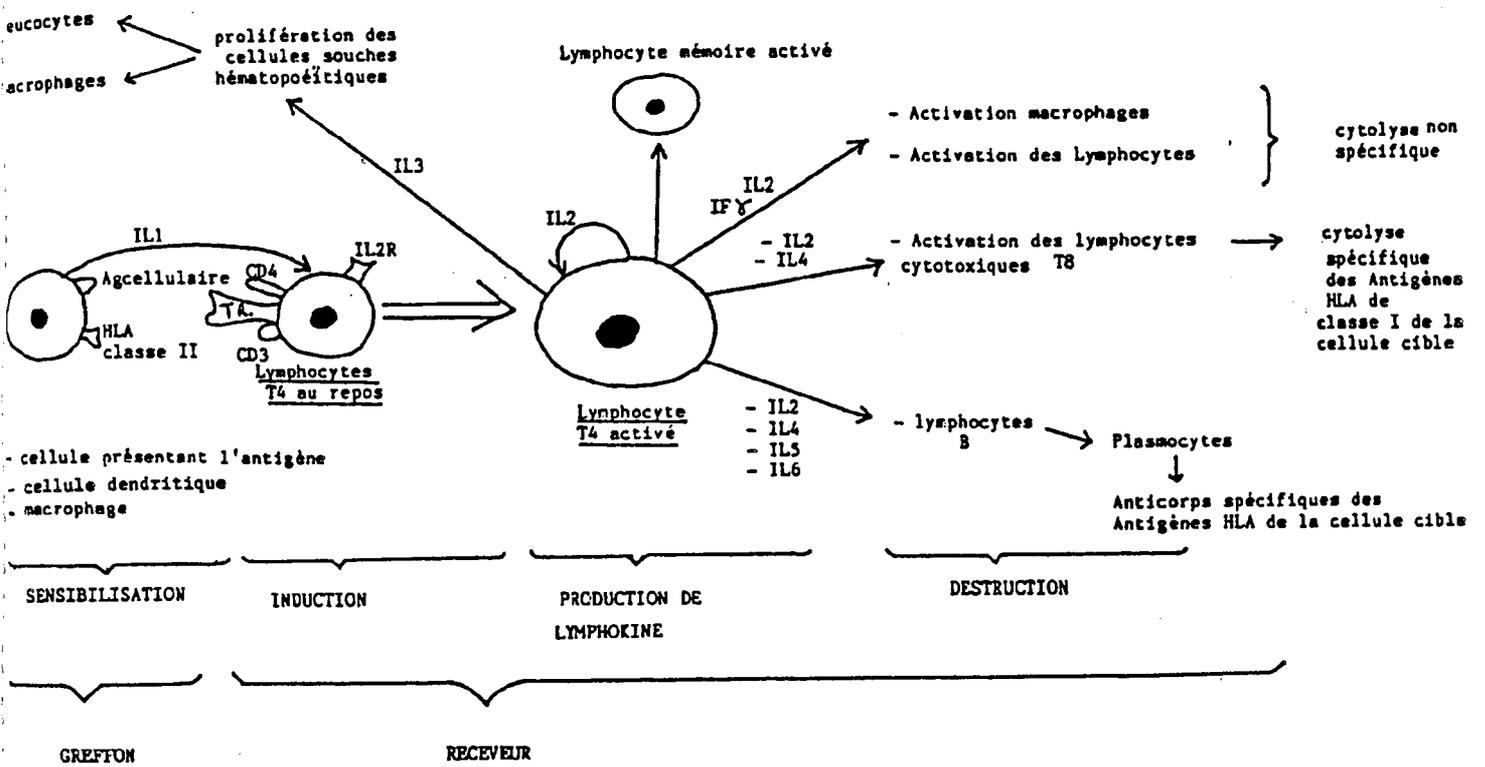
1 - 4 - 5 - 2 Dans le domaine thérapeutique

Dans ce domaine, la quantité d'anticorps nécessaire étant beaucoup plus importante et les injections devant être répétées, seuls des anticorps d'origine humaine peuvent être envisagés.

1 - 4 - 5 - 2 - 1 Immunothérapie

- Traitement immunosuppresseur

Les anticorps monoclonaux sont avec les sérums anti-lymphocytaires, la ciclosporine A et le FK 506, des méthodes spécifiques de traitement immunosuppresseur (Figure 17). Les progrès en immunosuppression portent sur la recherche d'une spécificité de plus en plus grande de la cible afin de diminuer, voire supprimer la réaction allo-immune ou auto-immune sans agir sur l'ensemble du système immunologique. Depuis l'introduction en 1981 des anticorps anti-lymphocytes T, leur application en clinique s'étend désormais à toutes les transplantations d'organe et à l'auto-immunité. De nombreux anticorps monoclonaux réactifs contre un grand nombre d'antigènes de surface cellulaires, ont été isolés (Tableau 14). Deux sont utilisés en routine : des anticorps anti-lymphocytes T dirigés contre le complexe moléculaire CD3 / récepteur T pour l'antigène, ou OK3 et ceux dirigés contre les récepteurs de l'interleukine 2, utilisés à titre prophylactique dans les semaines précédant la greffe. Dans ce cas, on traite "*in vitro*" la moëlle du donneur par un anticorps monoclonal anti-lymphocytes T



INTERACTIONS CELLULAIRES  
LORS DU REJET d'ALLOGREFFE

Figure 17 : Mécanismes du rejet d'allogreffe et règles du traitement immunosuppresseur F. Michel in "Guide Pratique de la transplantation rénale et pancréatique" G. Benoit Assoc. Franç. Urol., 1991 - p 227.

en présence de complément afin d'éliminer tous les lymphocytes T du greffon.

. Il existe aussi maintenant des anticorps anti-lymphocytes T qui reconnaissent les molécules d'adhésion.

Leur capacité immunosuppressive dépend en fait de l'importance fonctionnelle de la molécule-cible. Or les cytokines et les molécules d'adhésion représentent des substances impliquées non seulement dans les phénomènes immunologiques, mais aussi dans l'extention et la dissémination des cancers laissant deviner le développement ultérieur du marché des anticorps monoclonaux.

. Pour palier les effets secondaires de ces anticorps de première génération (xénosensibilisation, surimmunosuppression et activation cellulaire avec libération de cytokines), des anticorps dits de deuxième génération sont en préparation et leur production se fait en partie dans des secteurs différents des hybridomes.

- soit leur construction génétique est réalisée dans des plasmides qui sont ensuite exprimés dans des cellules de myélome de rat.

- soit la sécrétion de fragments Fv (ou de construction chimérique avec conservation des propriétés de reconnaissance antigénique) se fait par des bactéries.

. Les études qui se poursuivent sur l'obtention d'anticorps ou de fragments actifs d'anticorps obtenus par manipulation génétique ont deux buts :

- l'obtention d'un rendement en anticorps actifs plus élevé que celui des techniques courantes d'amplification.

- la production de fragments actifs de poids moléculaire le plus bas possible pour réduire l'antigénicité et permettre l'élimination rénale.

#### *1 - 4 - 5 - 2 - 2 Cancérologie*

Puisqu'il existe des antigènes dits "associés aux tumeurs", il est possible de produire des anticorps capables de les reconnaître et de les détruire. Ces anticorps monoclonaux "spécifiques" de certains cancers peuvent être utilisés dans un but thérapeutique pour aboutir à la destruction, "*in vivo*", des cellules cancéreuses.

La lyse des cellules tumorales peut se faire de plusieurs façons :

- directement par des anticorps anti-tumoraux "nus" agissant sur la cellule cible.

Dans les "purges médullaires", la moëlle comportant des cellules malignes peut être traitée par les anticorps monoclonaux : après prélèvement médullaire, on irradie complètement l'individu, puis on traite "*in vitro*" la moëlle à l'aide des anticorps monoclonaux qui vont reconnaître et détruire, grâce à leur haute spécificité, uniquement les cellules malignes. La moëlle contenant uniquement des cellules normales sera alors réinjectée au patient.

Par ailleurs, la cible peut être représentée par une substance considérée comme facteur de croissance du cancer. Dans ce cas, ce sont des anticorps spécifiques tels que les anticorps anti-interleukine 6 (IL6) qui neutralisent cette cytokine.

- sous l'action d'un radio-isotope (iode 131, yttrium 90) qui, couplé à l'anticorps monoclonal, est véhiculé jusqu'à la tumeur. L'anticorps monoclonal reconnaissant les déterminants antigéniques à la surface de la cellule tumorale de façon spécifique, on aura ainsi une action directe et spécifique de l'isotope radioactif.

- sous l'action d'un médicament. L'anticorps monoclonal se fixe sur la cellule tumorale et permet une action directe de la substance sur celle-ci. Les immunodrogues sont directement véhiculées vers la cible ; leur action est plus sélective et efficace à plus faible dose (chimiothérapie locale).

Ceci minimise les effets secondaires des chimiothérapies habituelles.

- sous l'action d'une substance cytotoxique comme la toxine diphtérique ou la ricine.

Ces immunotoxines associent la grande spécificité de l'anticorps monoclonal et celle de la toxine elle-même. Elles sont 100 à 1000 fois plus efficaces que les autres substances anti-tumorales. La fixation sur l'anticorps monoclonal de la substance cytotoxique permet de concentrer son effet dans un environnement immédiat. Cependant, cette méthode thérapeutique n'en est encore qu'à ses débuts.

La fixation de ces diverses molécules sur l'anticorps monoclonal s'effectue par des réactions covalentes au niveau des groupements

glucidiques de la partie constante de l'anticorps ou sur des groupements SH après rupture des ponts disulfures. On évite de modifier la partie NH<sub>2</sub> variable qui sert à la fixation de l'anticorps sur l'antigène.

### *1 - 4 - 5 - 2 - 3 Thérapeutique anti-HIV*

La seule thérapie actuelle anti-HIV d'utilisation médicale courante concerne les substances inhibant la transcriptase-reverse dont le chef de file est la zidovudine (AZT R).

Différentes cibles potentielles ont été envisagées mais leur efficacité doit être prouvée. L'importance de l'enjeu justifiait donc d'analyser la place de l'immunothérapie de ces stratégies.

#### *. Les anticorps neutralisants*

L'intérêt de tels anticorps réside dans le fait qu'ils représentent un des moyens naturels de défense de l'organisme contre les virus.

Dans un premier temps les anticorps monoclonaux obtenus bloquaient la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire, mais après fixation du virus sur son récepteur CD4. De ce fait, d'autres anticorps monoclonaux inhibant cette étape de fixation et pouvant, par conséquence, agir en coopération avec les précédents ont été envisagés. Les résultats cliniques préliminaires observés sont en faveur d'un effet bénéfique mais modéré. Cette thérapeutique a été aussi préconisée dans le cas de contamination accidentelle (personnel soignant, laboratoire). Mais comme toute administration d'anticorps, les inconvénients sont représentés par la nécessité d'injections IV répétées, l'efficacité limitée et les problèmes d'immunisation secondaire avec formation d'anticorps.

#### *. Les molécules CD4 solubles fixées*

Dépourvues de la région transmembranaire de fixation cellulaire, ces molécules qui deviennent des leurres, bloquent les molécules gP 120 à la surface du virus. Afin d'accroître leur demi-vie plasmatique (quelques minutes) certains domaines de la molécule CD4 ont été associés à des régions Fc d'immunoglobulines pour former des "immunoadhésines". Celles-ci présentent une efficacité "in vivo" mais leur activité est faible même à des concentrations élevées.

### . Les immunotoxines

Elles associent une toxine (de la ricine ou du bacille diphtérique) à une immunoglobuline.

De tels médicaments encore hypothétiques agiraient de la même manière que les lymphocytes T tueurs : après reconnaissance par l'anticorps monoclonal à la surface cellulaire de la glycoprotéine de l'enveloppe du virus, la toxine détruirait les cellules en cours de synthèse virale et diminuerait ou inhiberait la production virale.

Les anticorps monoclonaux constituent donc des médicaments inhibiteurs de l'infection virale par HIV1 et HIV2. Ils représentent avec la thérapie génique les principales méthodes d'approche thérapeutique en cours d'élaboration.

Comme nous venons de le voir, le champ d'applications des anticorps monoclonaux est immense.

De nombreux paramètres concernant les modalités d'administration, les mécanismes d'action *in vivo* doivent encore être précisés pour accroître le potentiel thérapeutique des anticorps monoclonaux. En ce qui concerne les anticorps développés à partir d'hybridomes de souris ou de rats, ils sont peu utilisables chez l'homme car ils peuvent entraîner des phénomènes allergiques, de rejets ou de formation chez le patient d'anticorps anti-souris (ou rat) neutralisant les anticorps injectés. Toutes les approches thérapeutiques nécessitent donc la mise au point de nouveaux et nombreux anticorps monoclonaux. Toutefois, il existe actuellement des anticorps monoclonaux dits "humanisés" ou "mixtes" produits par génie génétique qui possèdent la partie variable d'un anticorps de souris liée à une double chaîne constante humaine.

En outre, il convient de ne pas négliger le fait que les anticorps monoclonaux, même s'ils sont d'origine humaine, sont produits à partir de cellules malignes. Il est donc difficile d'affirmer qu'ils ne risquent pas d'être contaminés par des particules virales. Malgré le nombre restreint de résultats thérapeutiques présentés à ce jour, le domaine d'utilisation des anticorps monoclonaux en cancérologie est en plein développement.

## 1 - 5 OBJECTIF PERSONNEL : OBTENTION D'ANTICORPS MONO-CLONAUX

### 1 - 5 - 1 Obtention d'anticorps monoclonaux anti-hPL

Notre laboratoire était engagé depuis plusieurs années dans l'étude des actions physiologiques de l'hPL et en particulier de son activité sur la croissance cellulaire. Nous avons produit des anticorps monoclonaux anti-hormone placentaire lactogène.

Dans un premier temps, l'hPL a été extraite à partir de placentas frais puis nous avons procédé à l'immunisation de souris. Les lymphocytes de souris ont été fusionnés pour obtenir des hybridomes. Leur culture en masse a été effectuée :

- d'une part en bioréacteur en présence de SVF ou de LS pour obtenir des anticorps monoclonaux "*in vitro*",
- d'autre part, ils ont été injectés à des souris afin d'obtenir des anticorps monoclonaux "*in vivo*".

#### 1 - 5 - 1 - 1 L'hormone lactogène placentaire

##### 1 - 5 - 1 - 1 - 1 Généralités

L'hormone lactogène placentaire (human placental lactogen : hPL) ou hormone chorionique somatomammotrophique (HCS) a été isolée pour la première fois en 1961 du placenta humain par ITO et HIGASKI (1961).

Sa structure polypeptidique est très proche de celle de l'hormone de croissance hypophysaire (hGH).

Synthétisée dans le tissu syncytio-trophoblastique, elle comporte 191 acides aminés et son poids moléculaire est de 21600 Da (NIALL et al., 1971).

##### 1 - 5 - 1 - 1 - 2 Rôle

Son rôle physiologique n'est pas totalement défini. Elle aurait des propriétés :

- lutéotrophique : en intervenant comme cofacteur de l'HCG,
- mammotrophique et lactogénique,
- somatotrophique.

L'hPL agirait aussi au niveau :

- du métabolisme protéique en augmentant la rétention azotée,
- du métabolisme glucidique en augmentant la résistance périphérique cellulaire à l'action de l'insuline et en stimulant les cellules de Langerhans, ce qui entraînerait une hyperinsulinémie. Elle serait impliquée dans l'effet "diabétogène" de la grossesse.

### 1 - 5 - 1 - 1 - 3 Intérêt du dosage

Du fait de sa demi-vie qui est d'environ 20 à 30 minutes, son dosage dans de sérum reflète quasi instantanément sa production, laquelle est en relation directe avec l'importance de la masse placentaire.

La concentration sérique d'hPL augmente lors de la grossesse jusqu'à un plateau vers la 34ème semaine, puis diminue à la fin pour disparaître rapidement après l'accouchement (Tableau 15).

Les valeurs usuelles sériques sont :

semaines d'aménorrhée gravidique	mg/l	semaines d'aménorrhée gravidique	mg/l
11 — 12	0,30 à 1,20	26 — 27	3,10 à 5,30
12 — 13	0,50 à 1,50	27 — 28	3,30 à 5,50
13 — 14	0,60 à 1,70	28 — 29	3,70 à 5,60
14 — 15	0,80 à 2,00	29 — 30	3,70 à 6,40
15 — 16	0,80 à 2,30	30 — 31	4,00 à 6,60
16 — 17	1,30 à 2,60	31 — 32	4,30 à 6,80
17 — 18	1,40 à 2,80	32 — 33	4,50 à 7,20
18 — 19	1,40 à 3,00	33 — 34	4,70 à 7,60
19 — 20	1,80 à 3,40	34 — 35	5,00 à 7,80
20 — 21	2,10 à 3,70	35 — 36	5,30 à 8,00
21 — 22	2,20 à 3,90	36 — 37	5,50 à 8,40
22 — 23	2,40 à 4,20	37 — 38	5,60 à 8,40
23 — 24	2,50 à 4,50	38 — 39	5,60 à 8,60
24 — 25	2,70 à 4,70	39 — 40	5,00 à 9,00
25 — 26	2,90 à 5,00	40 — 41	4,60 à 9,60

Tableau 15 : Valeurs usuelle sériques selon le guide des analyses spécialisées Cerba.

L'évolution de cette hormone présente un intérêt tout particulier en pathologie obstétricale.

- Lors de grossesses multiples, son taux s'élève surtout à partir du 3ème trimestre.

Les valeurs d'hPL sont diminuées dans les cas de :

- môle hydatiforme (dans ce cas, le taux d'hPL est d'autant plus bas que le taux d'HCG est élevé)
- menace d'avortement
- souffrance foetale ou hypertrophie foetoplacentaire.

Lorsqu'il existe une hypertension, les taux d'hPL sont inversement proportionnels à l'intensité de l'hypertension.

Dans le diabète, le taux d'hPL augmente, en cas de diabète instable ou mal équilibré mais diminue lorsqu'il existe un retentissement placentaire. Par contre, aucune variation n'est observée lorsque le diabète est stable ou équilibré.

Le dosage de l'hPL présente un intérêt moindre dans les cas :

- d'alloimmunisation foetoplacentaire,
- d'insertion basse du placenta,
- de terme dépassé.

Dans le liquide amniotique les taux d'hPL sont nettement plus faibles (0,4 à 0,5 µg/ml). La progression des concentrations n'est pas régulière au cours de la grossesse, mais il existe aussi une augmentation des valeurs en cas de grossesses gémellaire ou multiple.

### **1 - 5 - 2 Obtention d'anticorps monoclonaux anti-beta lactoglobuline**

Notre laboratoire étudie le rôle de facteur de croissance de la  $\beta$  lactoglobuline. Il était donc intéressant de disposer d'anticorps monoclonaux contre la  $\beta$ -lactoglobuline.

Cette molécule est composée d'une chaîne polypeptidique de 162 acides aminés. Son poids moléculaire est de 18400. Elle possède deux ponts disulfures et un groupement sulfhydryl libre.

### 1 - 5 - 3 Obtention d'anticorps monoclonaux anti $\alpha$ 1 antitrypsine

#### 1 - 5 - 3 - 1 Généralités

L' $\alpha$  1 antitrypsine est une enzyme impliquée dans la protéolyse du tissu conjonctif et plus particulièrement dans celle du poumon. Cette  $\alpha$  1 globuline est synthétisée dans le foie, à une concentration plasmatique comprise entre 1.5 et 3 g/l. Un déficit de cette enzyme peut induire des maladies pulmonaires et en particulier l'emphysème.

Son rôle principal est une activité antiélastase et plus particulièrement une antiélastase des neutrophiles.

Le poids moléculaire de cette glycoprotéine de 52000 peut être un peu différent selon les variants. Ce polymorphisme résulte du déplacement d'un acide aminé. Ces différents variants (M, Z, S et plus particulièrement F, X, L) peuvent être identifiés par électrophorèse sur gel d'amidon en milieu acide ou par électrofocusing.

L' $\alpha$  1 AT augmente au cours :

- des infections bactériennes
- de la grossesse
- des tumeurs malignes
- des brûlures étendues

#### 1 - 5 - 3 - 2 Purification

La purification de l' $\alpha$  1 antitrypsine humaine est préparée à partir de la fraction IV-I de Cohn extraite du plasma.

Mise en suspension dans du tampon tris HCl 0,1 M, pH 8,5 et agitée une nuit à 25°C, elle est traitée au sulfate d'ammonium à 50 % puis centrifugée après une nuit de repos.

Le surnageant contenant l' $\alpha$  1 antitrypsine est alors ultrafiltré puis purifié.

L' $\alpha$  1 antitrypsine ainsi préparée peut être utilisée comme réactif de laboratoire.



## **2 - MATERIEL ET METHODES**

### **2 - 1 LA CULTURE CELLULAIRE**

#### **2 - 1 - 1 La chambre de culture et son matériel**

La culture "*in vitro*" des cellules s'effectue dans un secteur du laboratoire spécialement aménagé. Après un sas d'entrée, protégé par des rayons Ultra-Violet, la chambre de culture, proprement dite, dont les murs sont recouverts d'une peinture antiseptique, est climatisée, et équipée de hottes à flux laminaire horizontal, de classe 100 (Gelaire).

Les cellules sont placées dans des incubateurs cytoperm (HERAUS) stérilisables, réglés en température, taux de CO<sub>2</sub> et d'humidité.

Les observations et les photographies des cellules se font à l'aide d'un microscope Diaphot (NIKON).

Le matériel utilisé est le plus souvent à usage unique (flacons de culture, microplaques, pipettes, etc...) stérilisé aux rayons  $\gamma$ . S'il s'agit de matériel en verre (flacons-spinners ou bioréacteur) il est autoclavé à 120°C pendant 20 à 30 min selon son volume. Si, pour des raisons de coût, on réutilise un matériel plastique, il est restérilisé à l'oxyde d'éthylène et subit une désorption de 3 semaines.

De nombreuses précautions supplémentaires sont prises (blouses spéciales, tapis de sol, huisseries colmatées, désinfection régulière) afin de minimiser les risques de contaminations, fléau de la culture cellulaire. En effet, les conditions de culture des cellules (milieu riche, température, humidité) sont idéales au développement de contaminants bactériens, fongiques ou mycoplasmaïques.

De nombreux laboratoires essaient de se protéger de ces contaminations en ajoutant des antibiotiques et des antifongiques à leurs milieux de culture. Nous avons cessé leur utilisation, car elle n'est pas totalement efficace et surtout, elle risque de masquer la contamination la plus pernicieuse : celles des mycoplasmes.

## 2 - 1 - 2 La détection des mycoplasmes

La mise en évidence de la présence de mycoplasmes dans les cellules étant délicate, un ensemble de trois techniques a été mis au point par l'Institut Pasteur. Celles-ci sont réalisées sur des cellules cultivées sans antibiotiques.

### 2 - 1 - 2 - 1 La culture directe

Elle s'effectue en boîtes de Petri de 6 cm de diamètre contenant 5 ml de milieu préparé de la façon suivante :

#### *2 - 1 - 2 - 1 - 1 Préparation du milieu de base BD liquide:*

- DIFCO PPLO broth (0554-01-9 Difco)	2.1 g
- tryptone (0123-01 Difco)	1 g
- yeast extract (0127-01 Difco)	0.5 g
- H <sub>2</sub> O	QSP 100 ml

Retirer 22 ml de cette solution

Ajouter 1 g de Bacto Agar Difco (0140-01) aux 78 ml restants

Agiter pour dissoudre l'agar

Autoclaver 20 min à 120°C

Avant refroidissement ajouter :

- 20 ml de sérum de cheval non inactivé
- 1 ml d'ampicilline à 66 mg/ml
- 1.6 ml de glucose à 30 %

Couler 5 ml dans des boîtes de petri de 6 cm.

Ces boîtes se conservent 15 jours à 4°C.

#### *2 - 1 - 2 - 1 - 2 Mode opératoire*

Un grosse goutte de surnageant de culture des cellules à confluence est déposée sans l'étaler sur la surface de la gélose. Dès que la goutte est sèche, les boîtes sont parafilmées et incubées à l'envers dans une étuve à 37°C. La présence de mycoplasmes est visualisée par l'apparition de colonies typiques en "oeuf sur le plat". (Figure 18 et 19).

Si l'observation après trois jours d'incubation est négative, les boîtes sont réincubées 3 jours supplémentaires et lues de nouveau.

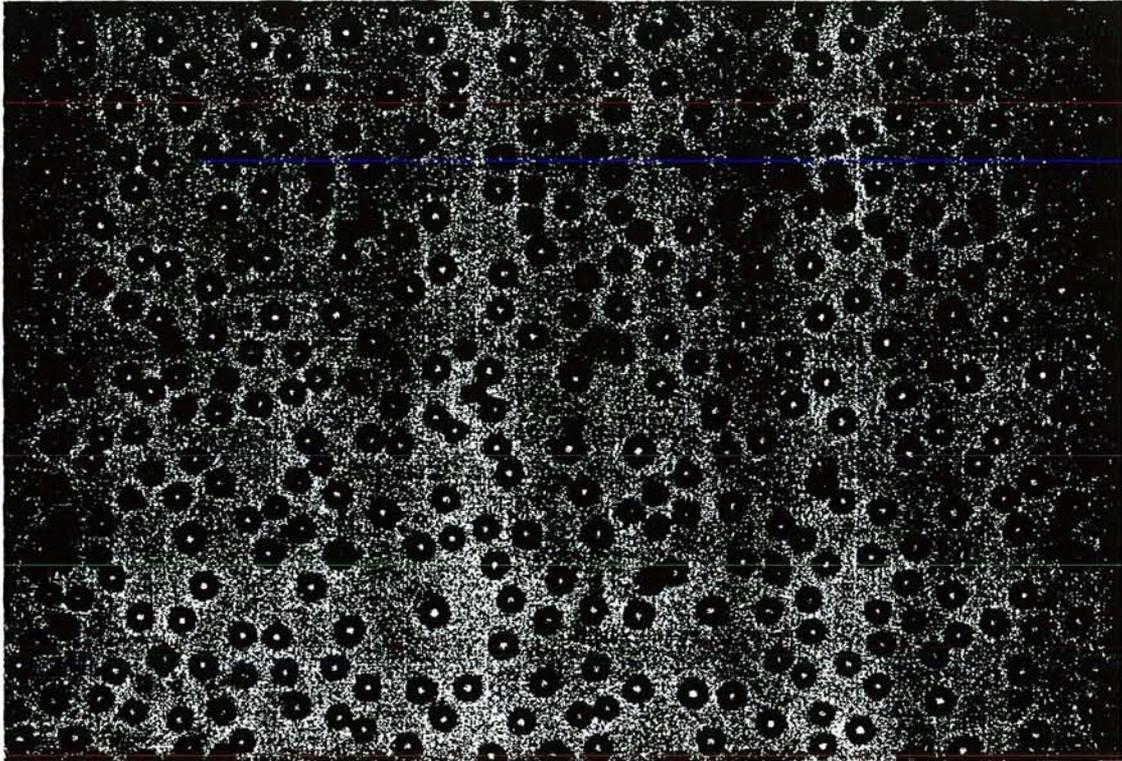


Figure 18 : Colonies de mycoplasmes en "oeuf sur le plat" observées après 10 jours de culture sur gélose sélective ( grossissement \* 100)

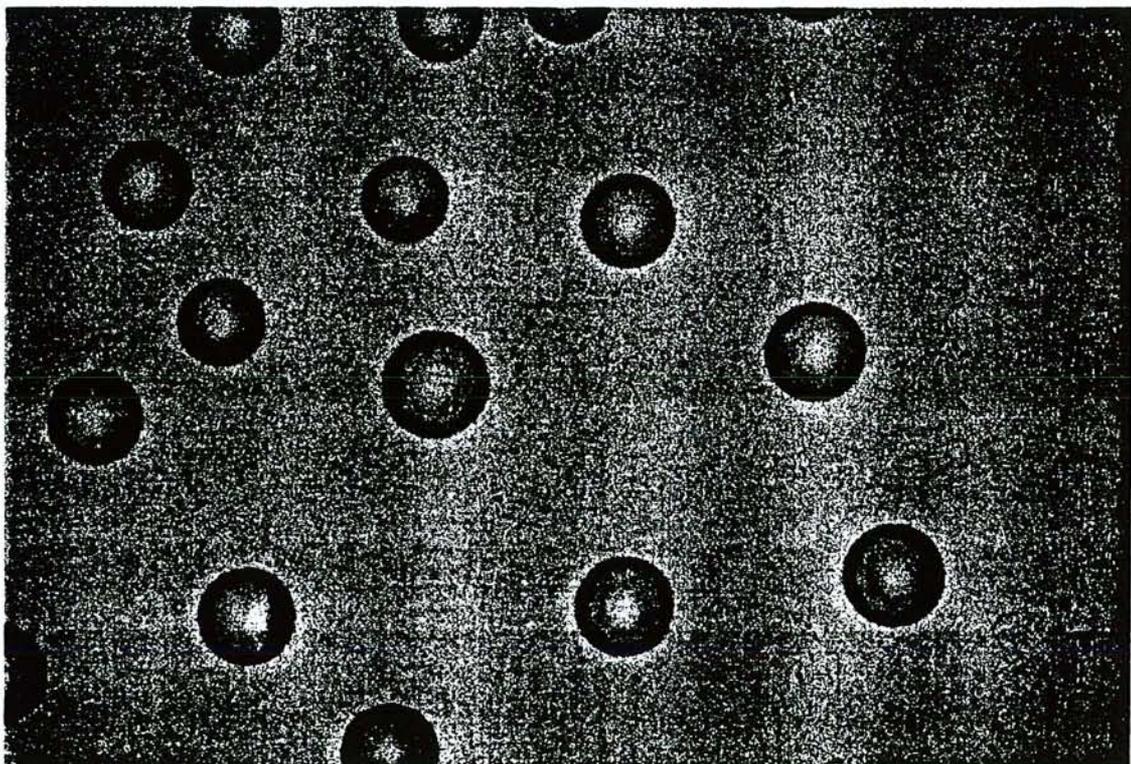


Figure 19 : Colonies de mycoplasmes en "oeuf sur le plat" observées après 10 jours de culture sur gélose sélective ( grossissement \* 400)

## 2 - 1 - 2 - 2 La technique enzymatique à l'adénosine phosphorylase

Les mycoplasmes possèdent une adénosine phosphorylase qui catalyse la réaction



La présence de l'enzyme et donc des mycoplasmes présents dans le milieu de culture est révélée grâce à un substrat radioactif.

### 2 - 1 - 2 - 2 - 1 Préparation des réactifs

#### \* Tampon Tris-EDTA :

Dissoudre 0,60 g de Tris dans 2 ml d'eau

Dissoudre 0,37 g d'EDTA 0,2 M dans 2 ml d'eau

Ajuster le pH à 7,4

Compléter à 100 ml

#### \* Solution de substrat :

-TrisEDTA	100 $\mu$ l
-BSA 0,5 %	100 $\mu$ l
-Ribose 1 P 5 mM ( Sigma R 9381 )	100 $\mu$ l
- [ <sup>14</sup> C] Adénine 50 $\mu$ Ci/ml (Amersham)	100 $\mu$ l
-H <sub>2</sub> O	600 $\mu$ l

Répartir en tubes Eppendorf contenant 15  $\mu$ l. Le substrat marqué se conserve 6 mois à -20°C.

#### \* Solution du substrat froid :

-Adénine (Sigma A 8626 )	0,5 mg
-Adénosine (Sigma A 7636)	1 mg
-Hypoxanthine (Sigma H 9677)	0,5 mg
-QSP 1 ml	
-Inosine (Sigma I 4125)	1 mg

Répartir en aliquots de 100  $\mu$ l dans des tubes Eppendorf. Le substrat non marqué se conserve 1 an à 4°C.

### 2 - 1 - 2 - 2 - 2 Mode opératoire :

5  $\mu$ l de surnageant de culture sont ajoutés au tube Eppendorf contenant 15  $\mu$ l de la solution de substrat marqué. Le mélange est homogénéisé par une centrifugation de quelques secondes puis incubé 3 jours à 37°C.

5  $\mu$ l de substrat non marqué sont alors ajoutés et après une nouvelle centrifugation de quelques secondes, 2  $\mu$ l sont déposés sur papier cellulose (Avicel Schelcher et Schull, CERA LABO). La séparation des produits de la réaction se fait par chromatographie ascendante de 15 minutes en utilisant de l'eau distillée comme solvant de migration.

Après séchage, les deux bandes correspondant à l'adénine et à l'adénosine sont repérées à l'aide d'une lampe UV à 254 nm, puis découpées et déposées dans des plots de comptage.

2 ml de liquide scintillant (Instafluor Packard) sont ajoutés et la radioactivité est alors comptée à l'aide d'un compteur B (Packard).

1 unité (arbitraire) d'activité enzymatique est égale à 1 % de  $^{14}\text{C}$  adénine transformée en adénosine en 3 jours à 37°C par 5  $\mu$ l d'échantillon (soit environ 1 nmole d'adénine transformée en adénosine par ml).

Si le rapport

$\frac{^{14}\text{C Adénine} \times 100}{^{14}\text{C Adénosine}}$  est inférieur ou égal à 10 %, le test est considéré comme négatif.

### 2 - 1 - 2 - 3 La technique de DAPI ( 4-6 diamine 2 phénylindol dihydrochlorure )

Cette technique permet la mise en évidence des mycoplasmes par la fluorescence de l'ADN qu'ils contiennent.

L'observation sur un microscope à fluorescence révèle la présence de mycoplasmes à la surface des cellules (Figure 20) ou disséminés autour des cellules (Figure 21).

### *2 - 1 - 2 - 3 - 1 Préparation des réactifs :*

- le réactif de Carnoy se prépare extemporanément en mélangeant :
  - 6V éthanol absolu
  - 3V chloroforme
  - 1V acide acétique glacial
  
- le DAPI (Boehringer) est dilué au 1/100 avant emploi dans du PBS
- le tampon de montage est un mélange volume à volume de véronal (solution 0,2 M de diméthylmalonurée) et de glycérol.

### *2 - 1 - 2 - 3 - 1 Mise en culture*

Quand les cellules à tester sont non adhérentes (hybridomes, myélomes) une coculture avec des cellules 3T6 est réalisée dans des tubes de Leighton stériles contenant une lamelle dégraissée à l'alcool.

2 tubes sontensemencés chacun avec :

- 0,2 ml d'une suspension de cellules 3T6 à confluence (grattées au préalable )
  - 2 ml de milieu RPMI +1% de glutamine 2mM + 10 % de SVF
  - 0,2 ml de surnageant contenant les cellules à tester.
- puis sont incubés 3 jours à 37°C

### *2 - 1 - 2 - 3 -2 Technique de révélation de la fluorescence :*

- Les tubes de Leighton sont vidés de leur contenu,
  - lavés avec 2 ml d'eau physiologique,
  - fixés 10 min par 2ml de réactif de Carnoy.
- Après élimination du fixateur
- ils sont séchés 1 h à 37°C ou 2 à 3 h à température ambiante,
  - rincés une fois au PBS,
  - colorés 15 à 20 min au DAPI,
  - rincés deux fois au PBS,
  - la lamelle est récupérée puis séchée.

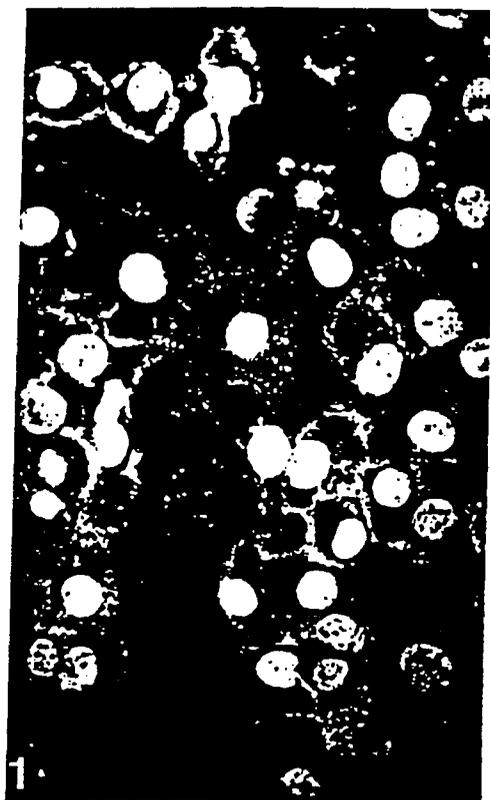


Figure 20 : Cellules contaminées par un mycoplasme formant des amas près de la membrane cytoplasmique des cellules, après coloration au DAPI  
Grossissement \*360.



Figure 21 : Cellules contaminées par un mycoplasme formant des granulations éparses, après coloration au DAPI  
Grossissement \* 360

- Il faut alors repérer le côté où sont fixées les cellules et le mettre sur la lame où l'on a déposé une goutte de tampon de montage
- La lecture s'effectue alors au microscope à fluorescence

Si la première observation après 3 jours est négative, la même manipulation sera effectuée après 6 jours de culture.

#### 2 - 1 - 2 - 4 L' Interprétation

Si les tests décrits sont tous les trois négatifs, il n'y a pas de mycoplasmes dans la culture testée. S'ils sont tous les trois positifs, l'interprétation est sans problème : la culture est contaminée. Par contre, il arrive que l'un des trois tests soit discordant. Dans ce cas on le recommence.

La méthode enzymatique est la moins contestable. Le DAPI est souvent facile à interpréter, quant à la culture simple, les colonies en oeuf sur le plat ne sont pas toujours aussi nettes que sur les photos présentées (Figures 18 et 19).

## 2 - 1 - 3 Les milieux de culture

### 2 - 1 - 3 - 1 Les milieux de base

Pour toutes les cultures de routine, nous utilisons le RPMI 1640 (Rooswelt Park Medical Institute SEROMED 121-10 (Tableau 16 ) riche en vitamines, acides aminés, sels minéraux nécessaires à la croissance cellulaire "*in vitro*".

Ce milieu nous est fourni sous forme de poudre qui doit être dissoute dans 10 l d'eau pyrodistillée et complétée par 2 g/l de bicarbonate de sodium (SIGMA).

Ainsi reconstitué, son pH est ajusté à 7,3 par barbotage de CO<sub>2</sub>. Il est ensuite filtré sur filtre Millipack 100 (Millipore) à l'aide d'une pompe péristaltique puis réparti en flacons stériles de 500 ml et stocké à 4°C. 5 ml de glutamine 2 mM sont ajoutés à chaque flacon au moment de l'emploi.

Lors de la fusion et durant un mois environ, nous utilisons du milieu DMEM (GIBCO 041-01965)(Tableau 17) et pour les lavages précédents la fusion, du milieu MEM Gibco 041-01095, plus pauvre en glucose (1g / l au lieu de 4,5 g / l) en vitamines et en acides aminés.

### 2 - 1 - 3 - 2 Les compléments de milieu

Pour assurer la croissance cellulaire "*in vitro*", il est toujours nécessaire d'ajouter au milieu de base des protéines, des facteurs de croissance, des molécules mitogènes de petit poids moléculaire, etc. C'est souvent le sérum de veau foetal qui apporte ces compléments au milieu de base mais nous avons, dans notre laboratoire utilisé également du sérum de cheval et du lactosérum pour remplacer ce sérum de veau foetal, très onéreux.

#### 2 - 1 - 3 - 2 - 1 Le sérum de veau foetal (SVF)

Nous utilisons, en particulier lors des fusions et pendant toute la période de sélection des hybrides, du sérum de veau foetal (Jacques Boy) conservé à -20°C en flacons stériles de 500 ml. Au moment de l'emploi, il est décongelé et porté pendant 30 minutes à 56°C afin de détruire des inhibiteurs de croissance.

RPMI 1640 MEDIUM  
MILIEU RPMI 1640

COMPOSITION DU MILIEU : Quantités en mg/L.

Sels

Bicarbonate de sodium, NaHCO <sub>3</sub>	2000
Chlorure de potassium, KCl	400
Chlorure de sodium, NaCl	5000
Phosphate disodique, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1512
Nitrate de calcium, Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	100
Sulfate de magnésium, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	100

Aminoacides

. L-Arginine	200
. L-Asparagine	50
. L-Aspartique acide	20
. L-Cystine	50
. L-Glutamine	300
. L-Glutamique acide	20
. Glycine / Glycocolle	10
. L-Histidine	15
. L-Hydroxyproline	20
. L-Isoleucine	50
. L-Leucine	50
. L-Lysine HCl	40
. L-Méthionine	15
. L-Phénylalanine	15
. L-Proline	20
. L-Sérine	30
. L-Thréonine	20
. L-Tryptophane	5
. L-Tyrosine	20
. L-Valine	20

Vitamines

. Acide folique	1
. Acide para-aminobenzoïque	1
. Biotine	0,2
. Choline chlorure	3
. I-Inositol	35
. Nicotinamide	1
. D-Pantothénate de calcium	0,25
. Pyridoxine HCl	1
. Riboflavine	0,2
. Thiamine HCl	1
. Vitamine B12	0,005

Autres composants

. D-Glucose	2000
. Glutathion	1
. Rouge de Phénol *	5

\* Les milieux liquides 1X contiennent 10 mg/L de Rouge de Phénol

Références : MOORE G.E. et al., J. Am. Med. Assoc., 199 519 (1957)

## MILIEUX DE CULTURE SYNTHETIQUES

Composant	041-01965	041-01095
	1X Liquide mg/L	1X Liquide mg/L
<b>SALÉS INORGANIQUES :</b>		
Cl <sub>2</sub>	200.00	200.00
(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.10	
I	400.00	400.00
SO <sub>4</sub> (anhyd.)	--	
SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200.00	200.00
Cl	6400.00	6800.00
HCO <sub>3</sub>	3700.00	2200.00
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	125.00	140.00
<b>MINÉRAUX COMPOSANTS :</b>		
Glucose	4500.00	1000.00
Agar de Phénol	15.00	10.00
PES	-	-
Fluorure de Sodium	-	-
Inosine	-	-
Xanthine	-	-
Adénine	-	-
<b>ACIDES AMINÉS :</b>		
Alanine	-	-
Asparagine	-	-
Arginine · HCl	84.00	126.00
Acide L-Aspartique	-	-
Cystine	48.00	24.00
Cystine 2HCl	-	-
Acide L-Glutamique	-	-
Glutamine	584.00	292.00
Proline	30.00	-
Histidine HCl H <sub>2</sub> O	42.00	42.00
Isoleucine	105.00	52.00
Leucine	105.00	52.00
Lysine HCl	146.00	72.50
Méthionine	30.00	15.00
Phénylalanine	66.00	32.00

L-Proline	-	-
L-Sérine	42.00	-
L-Thréonine	95.00	48.00
L-Tryptophane	16.00	10.00
L-Tyrosine	72.00	36.00
L-Tyrosine (sel disodique)	-	-
L-Valine	94.00	46.00
<b>VITAMINES :</b>		
Pantothénate de Calcium D	4.00	1.00
Chlorure de Choline	4.00	1.00
Acide Folique	4.00	1.00
DL-Inositol	7.20	2.00
Nicotinamide	4.00	1.00
Pyridoxal HCl	4.00	1.00
Riboflavine	0.40	0.10
Thiamine HCl	4.00	1.00

Milieu d'Eagle Modifié par Dulbecco 041-01965 (DMEM)

Milieu Essentiel Minimum 041-01095 (MEM)

Tableau 17 : Compositions des milieux de base DMEM et MEM.

Une fois par an environ, plusieurs lots de SVF de différents fournisseurs sont testés. Nous choisissons le lot qui nous donne le meilleur rapport qualité-prix et le réservons pour l'année. Ce sont les clonages qui donnent les meilleurs renseignements sur la qualité d'un sérum. Nous effectuons donc un clonage avec chaque lot et celui qui permet d'obtenir le pourcentage le plus élevé de clones sur une plaque de 96 puits, est considéré comme le meilleur.

#### *2 - 1 - 3 - 2 - 2 Le sérum de cheval*

Lorsque les hybridomes sont stabilisés, ils sont adaptés au sérum de cheval qui est utilisé soit à 10 % comme le sérum de veau, soit à 1 % en complément du lactosérum.

Le sérum de cheval est préparé à partir de sang récupéré en récolte ouverte aux abattoirs, sans anticoagulant. Il est décanté puis centrifugé 25 min à 2800 g. Le surnageant est récupéré, filtré 2 fois à 0,22 um sur filtres Millipack en série puis congelé à -20°C en aliquots de 100 ml.

Au moment de l'emploi il est décongelé et chauffé à 56°C 30 min de la même façon que le SVF.

#### *2 - 1 - 3 - 2 - 3 Le lactosérum*

Le lactosérum est fourni par la Société Est Lait (Vigneulles les Hattonchâtel). Il provient de lait de grand mélange ayant servi à la fabrication de fromages à pâte molle et croûte fleurie. C'est un lactosérum doux qui lorsqu'il nous arrive a été écrémé et préfiltré à 10 um.

Dans notre laboratoire il subit une succession de traitements.

\* Une préfiltration : Elle est réalisée sur 4 cartouches de 10 pouces Millipore :

- CP 19 (1,2 à 0,8 um)
- CP 06 (0,8 à 0,45 um)
- CP 03 (0,45 à 0,2 um)
- CWSS.

Les trois premières cartouches de type Polysep sont des combinaisons en série d'un préfiltre en profondeur, en microfibres de verre borosilicaté et d'une membrane filtrante allant de  $1,2 \mu$  à  $0,2 \mu$ .

La quatrième est une cartouche Milligard TP filtrante à  $0,2 \mu$ .

Elles sont placées dans des carters inox équipés de manomètres qui permettent de filtrer sans difficulté, 60 litres de lactosérum en une heure, sans atteindre les pressions critiques (c'est la première cartouche qui colmate le plus rapidement: la pression monte jusqu'à 2,8 bars). Le lactosérum placé dans une bonbonne sous pression est envoyé dans les carters grâce à de l'air (Figure 22).

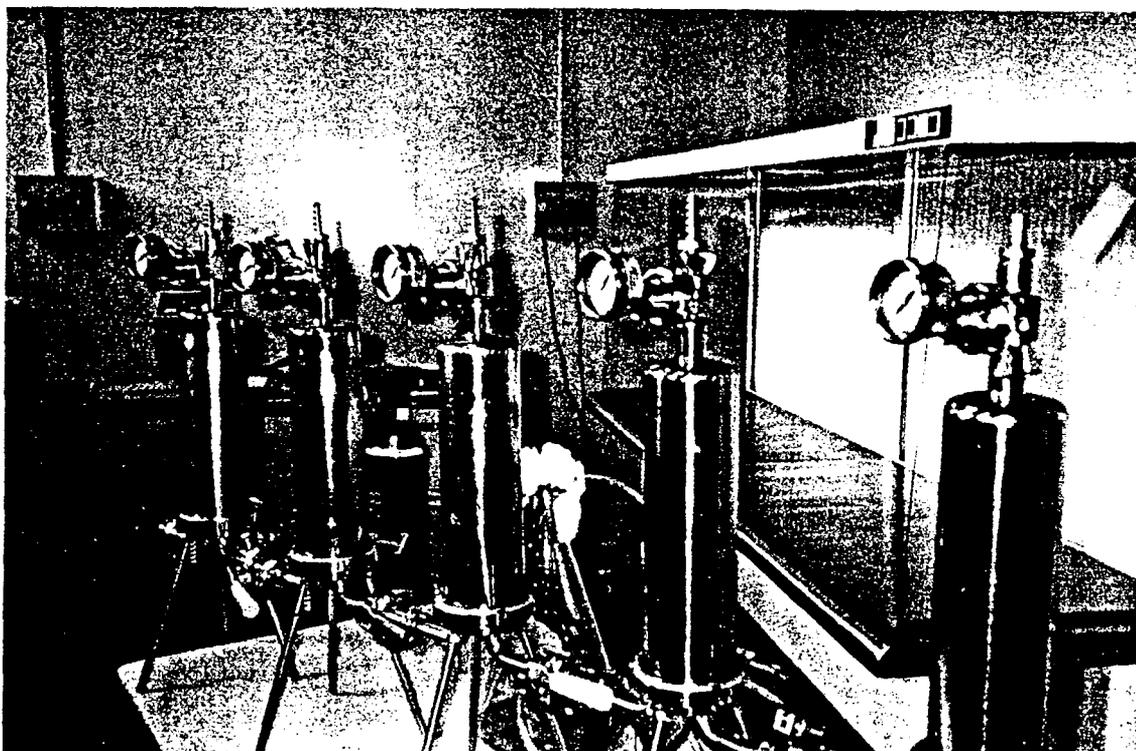


Figure 22 : Montage en série de 5 carters de filtration

\* L'ultrafiltration : Elle s'effectue tangentiellement sur deux cassettes Pellicon en polysulfone à seuil de coupure 10 000 Da.

L'avantage de ce procédé par rapport à une filtration conventionnelle frontale est considérable. En effet, on échappe au phénomène de concentration de polarisation qui réduit le débit et le volume traité. Là, le liquide balaie tangentiellement la surface de la membrane. Cet effet de balayage limite le temps de contact du produit avec la membrane et augmente la qualité du produit récupéré (Figures 23 et 24).

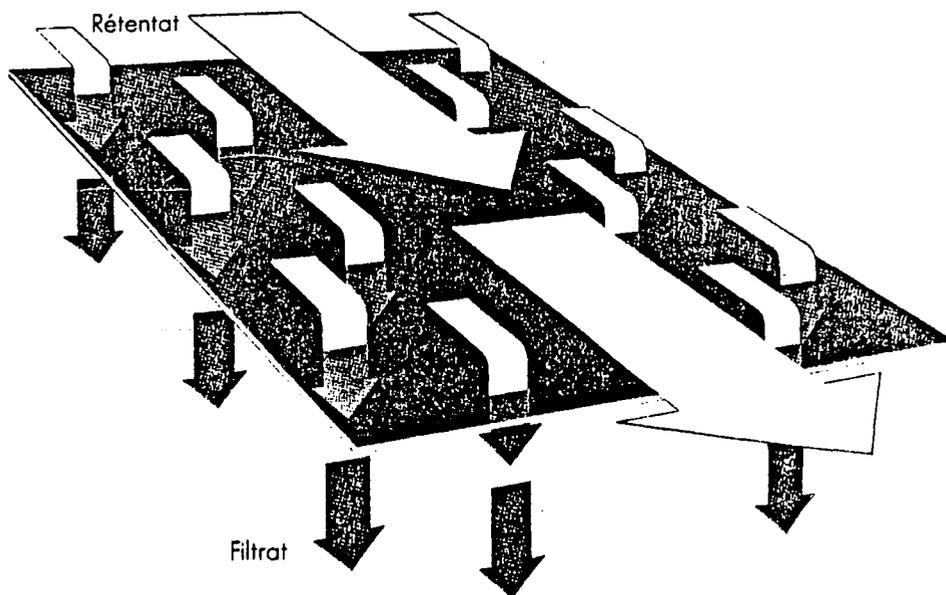


Figure 23 : Représentation schématique du flux tangential sur une membrane (PELLICON).

L'utilisation d'une pompe "moineau" réglée sur 15, donne un débit de filtrat de 880 ml/min et de rétentat de 6,5 l/min avec une pression d'entrée de 3,5 bars et de sortie de rétentat de 2,5 bars (Figure 25).

En moins d'une heure, 20 litres de lactosérum concentré sont obtenus. Les protéines sont alors dosées sur les lactosérums de départ et après concentration (Figure 26).

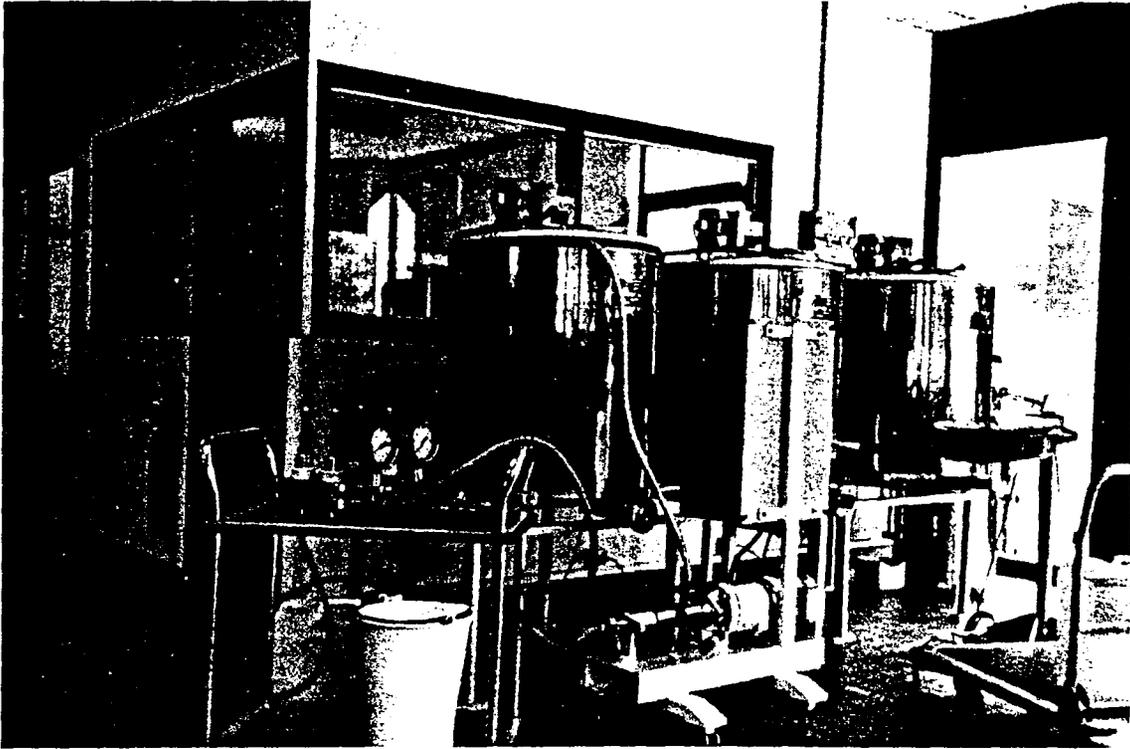


Figure 26 : Le lactosérum est stocké dans une cuve Inox de 200 l. A la sortie de la cartouche de filtration tangentielle, le filtrat est éliminé, alors que le rétentat retourne dans le tank et ce jusqu'à élimination des 2/3 du volume initial.

\* La thermisation : Elle s'effectue au bain-marie à 60°C pendant 1 heure puis le lactosérum est ramené à son volume initial (60l) avec de l'eau distillée milli Q.

\*La deuxième filtration tangentielle : Après rinçage des cassettes d'ultrafiltration (100 l d'eau distillée et 25 litres d'eau Milli Q), une nouvelle filtration tangentielle est réalisée. Elle permet de ramener le taux final en protéines du lactosérum à 20 g/l.

\* La filtration stérilisante : La séquence de filtres est un peu différente de la précédente puisqu'il s'agit à ce stade de réaliser une filtration stérilisante :

- CP 19
- CWSS
- CVGL Durapore 0,22  $\mu\text{m}$
- CVVL Durapore 0,1  $\mu\text{m}$ .

Dans ce cas, les deux dernières cartouches inox contenant les filtres sont autoclavées avant emploi. Les éléments filtrants sont hydrophiles, constitués d'une membrane plissée en fluorure de polyvinylidène.

\* Le flaconnage : Le lactosérum est, à ce stade, stérile mais une nouvelle filtration est encore réalisée sous hotte à flux laminaire sur 1 ou 2 filtres millipak (en série) avant de le conditionner en flacons stériles de 500 ml qui sont stockés à -20°C jusqu'à leur emploi. Ils seront alors décongelés puis chauffés 30 min à 56°C comme les sérums. Ce produit est commercialisé sous le nom de **Lactocell** par la Société Bio-France Réactifs Développement.

### 2 - 1 - 3 - 3 Les contrôles des compléments de milieu

Les substituts de sérum préparés dans notre laboratoire, c'est-à-dire le sérum de cheval et le lactosérum doivent subir une série de tests en plus de la recherche de mycoplasmes décrite au paragraphe 2-1-2. Nous effectuons :

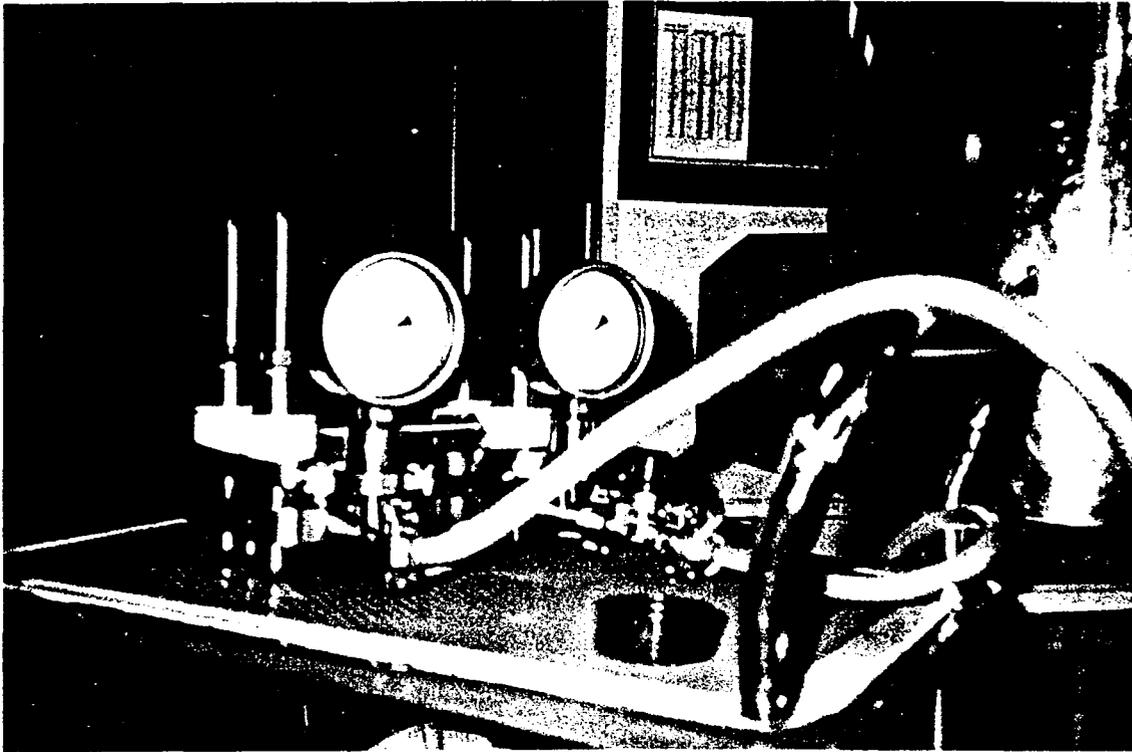


Figure 24 : Appareil de filtration Pellicon.

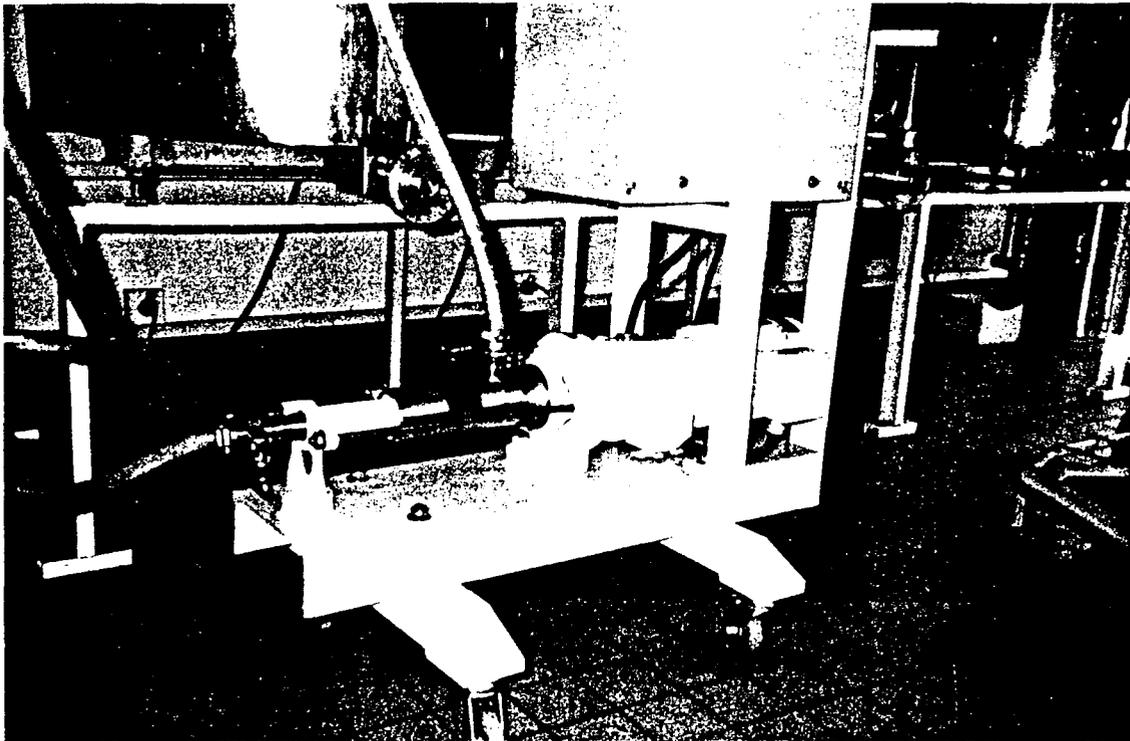


Figure 25 . Pompe moineau.

## 2 - 1 - 3 - 3 - 1 La recherche de pyrogènes

Bien que le fabricant annonce que les cassettes PMNL 10 000 assurent une dépyrogénéation du liquide traité, il est préférable de s'assurer de l'absence de substances pyrogènes par un test LIMULUS.

Nous utilisons pour ce faire, un kit L.A.L. (IBF Biotechnics, Villeneuve la Garenne). Ce test L.A.L. (Lysat d'Améboocytes de Limule) permet la détection "in vitro" des endotoxines présentes dans une solution aqueuse. Les protéines du lysat d'améboocytes coagulent en présence des lipopolysaccharides des bactéries Gram- (endotoxines du produit à tester).

### \* Mode opératoire :

#### 1 - Préparation d'une solution de soude apyrogène :

- employer une verrerie apyrogène (autoclavée deux heures à 210°C).
- Dissoudre stérilement les pastilles de soude dans de l'eau apyrogène.
- Autoclaver l'ensemble une heure à 120°C.
- Ajuster le pH des échantillons entre 6,5 et 7,5..

#### 2 - Dosage des pyrogènes :

- Prendre 2 ampoules de 5 ml d'eau apyrogène, les transvaser dans un tube de 15 ml stérile
- Solubiliser le contenu de 2 flacons de L.A.L. dans 1 ml d'eau apyrogène et les conserver dans la glace durant toute la manipulation
- Solubiliser l'endotoxine standard par 2 ml d'eau apyrogène (injectés à travers le bouchon de caoutchouc passé à l'alcool).
- Agiter 10 min au vortex
- Pour la gamme étalon préparer 7 dilutions successives au 1/10 d'endotoxine dans des tubes spéciaux apyrogènes. Agiter 30 secondes après chaque dilution puis 1 min avant utilisation.

- La gamme du test est réalisée dans des tubes apyrogènes de la façon suivante :

- 0,1 ml des dilutions d'endotoxine préparées précédemment ( dans le tube témoin, la dilution d'endotoxine est remplacée par 0,1 ml d'eau apyrogène)
- 0,1 ml de L.A.L.

- Pour les essais on dépose :

- 0,1 ml de L.A.L.
- 0,1 ml d'échantillon dont le pH est compris entre 6,75 et 7,5

Chaque échantillon est testé en six exemplaires.

- Pour les contrôles d'inhibition :

Dans les tubes contenant 1 et 1,012 ng / ml d'endotoxine, on ajoute 0,1 ml de l'échantillon à tester.

- Reprendre 0,1 ml du mélange
- Ajouter 0,1 ml de LAL
- Incuber tous les tubes 1h au bain- marie à 37°C
- Lire la présence ou l'absence d'un gel solide au fond du tube ( par retournement une seule fois du tube).

### *2 - 1 - 3 - 3 - 2 Recherche de virus animaux*

Ces analyses sont effectuées au Laboratoire National de Pathologie Bovine de Lyon où entérovirus, parvovirus, rotavirus, rétrovirus, adénovirus, coronavirus sont recherchés ainsi que les virus parainfluenza, de la diarrhée bovine et de la rhinotrachéite bovine.

### *2 - 1 - 3 - 3 - 3 Contrôles de stérilité selon les normes de la Pharmacopée Française de 1985*

Ils sont effectués sur un bouillon nutritif et sur une Gélose, répétés 3 à 5 fois par test selon la technique suivante :

### \* Milieu de culture

- Bouillon au thioglycolate et résazurine (Bio Mérieux 5.113.1)  
Dissoudre 2,95 g dans 100 ml d'eau distillée.  
Autoclaver 20 min à 120°C.  
Répartir stérilement en tubes à essai de 7 ml.
  
- Gélose trypticase soja (Bio Mérieux réf. 5.146.1)  
Dissoudre 4 g dans 100 ml d'eau distillée.  
Autoclaver 20 min à 120°C.  
Couler stérilement en boîtes de Pétri (10 ml/boîte).

### \* Mode opératoire

- Ensemencer 500 µl de milieu à tester dans 3 boîtes et 500 µl dans 3 tubes.
- Etaler au rateau sur les boîtes
- Agiter les tubes.
- Scotcher les boîtes, boucher les tubes.
- Incuber :
  - les boîtes à 37°C.
  - les tubes à 30°C.
- Lire après 3 semaines d'incubation.

Prévoir pour chaque test 3 boîtes et 3 tubes témoins.

#### *2 - 1 - 3 - 3 - 4 Autres contrôles de stérilité*

Le test de stérilité de la Pharmacopée demandant trois semaines pour être interprété, il est plus rapide de mettre le produit à tester en présence de milieu de base dans l'incubateur de la chambre de culture dans un flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Celui-ci étant très riche, s'il y a contamination bactérienne ou fongique, elle est décelable à partir de 48 heures. Ce test supplémentaire nous est très utile lorsqu'il y a nécessité d'utiliser rapidement le substitut de sérum.

### 2 - 1 - 3 - 3 - 5 Tests de croissance cellulaire

Il faut s'assurer au préalable que chaque lot de sérum de cheval ou de lactosérum permet la croissance des hybridomes. Pour cela, 2 techniques sont utilisées :

- soit le passage direct des cellules du milieu témoin à 10 % de SVF au milieu à tester (c'est-à-dire à 10 % de sérum de cheval ou 9 % de LS + 1 % de sérum de cheval).

- soit un passage progressif appelée "adaptation". Dans ce cas, les cellules sont traitées selon les données du tableau 18.

Temps de culture (jours)	SVF %	Substitut à tester
J0	10	0
J1	7,5	2,5
J3	5	5
J5	2,5	7,5
J7	1	9
J9	0	10

Tableau 18 : Adaptation à un substitut des cellules cultivées en SVF.

Quand les cellules sont parfaitement adaptées à leur nouveau milieu de culture, il convient de faire des études comparatives en prenant pour référence le milieu à 10 % de SVF. Celles-ci s'effectuent en flacons "spinners" selon une technique dite de récolte-recharge (Figure 27).

Au jour J<sub>0</sub>, pour chaque substitut à tester et pour le témoin, 1 flacon (Wheaton Millerville N.J., USA) contenant 150 ml de milieu estensemencé à

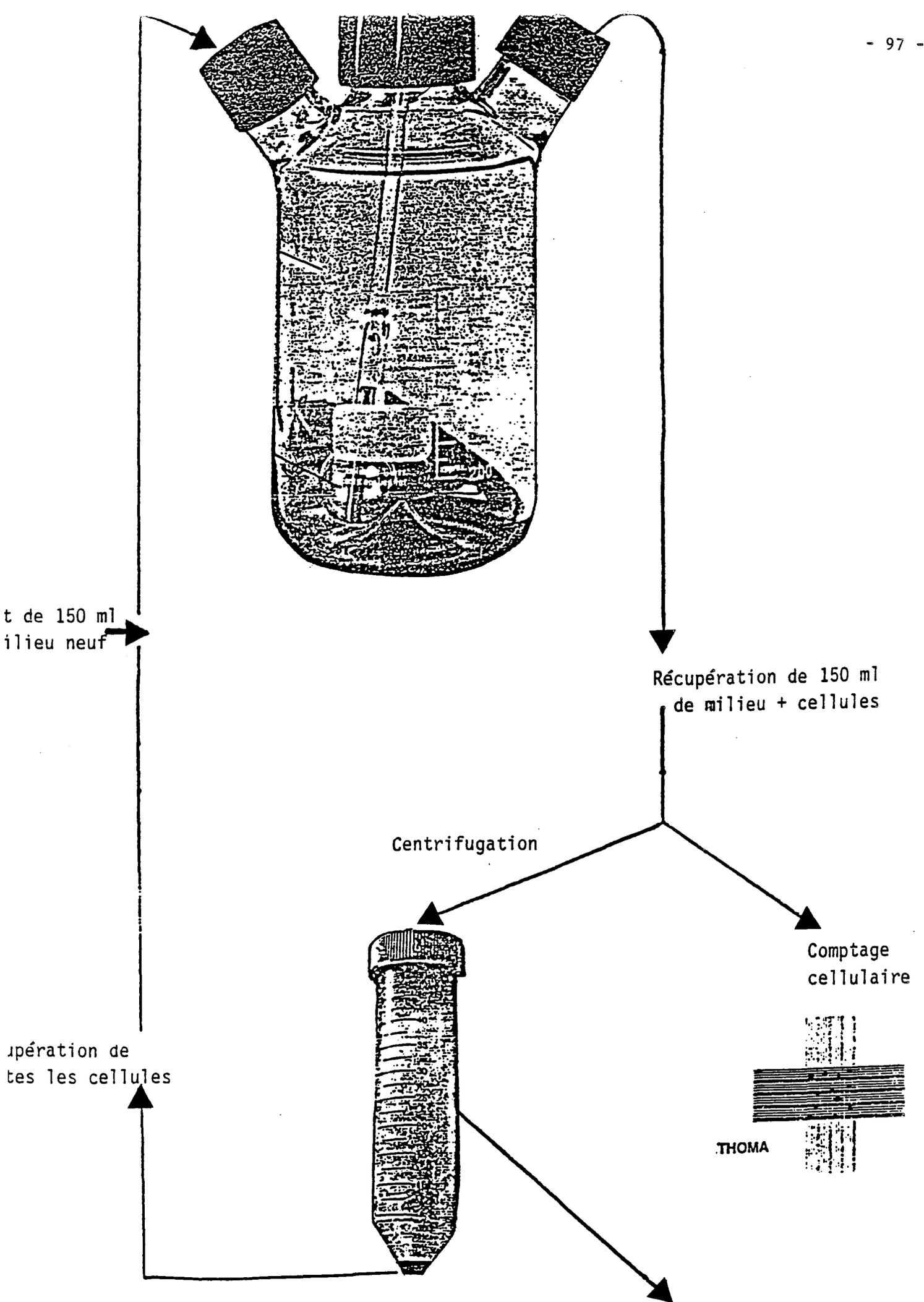


Figure 27 : Schéma de la technique dite de "récolte-recharge" en flacon spinner

20.10<sup>4</sup> cellules/ml puis placé dans l'étuve à 37°C sur agitateur magnétique (NCS 1045 - Techné OSI) à 50 rpm. Chaque jour, la suspension cellulaire est prélevée en totalité, les cellules sont comptées, leur viabilité étant estimée grâce à une coloration au Bleu Trypan. Après 5 min de centrifugation à 800 g, le culot est resuspendu dans 5 ml de milieu et réintroduit dans le flacon contenant le volume initial de milieu frais.

Cette manipulation est poursuivie généralement pendant 7 jours, car au-delà, la viabilité des cellules chute rapidement au dessous de 80%.

Des courbes comparatives sont établies en ce qui concerne les taux de croissance, la viabilité et les taux de sécrétion d'anticorps. Le substitut est considéré comme valable si ces paramètres sont égaux ou supérieurs à ceux obtenus avec du sérum de veau foetal à 10%.

Lors de ces études, les comptages cellulaires s'effectuent sur cellule de THOMA. Un aliquot de la suspension cellulaire est déposé entre la cellule et la lamelle. Les cellules sont dénombrées sur toute la partie quadrillée de la cellule. L'incertitude du comptage étant relativement importante, il est conseillé d'effectuer au moins trois comptages et d'en faire la moyenne. Le nombre de cellules est alors multiplié par 10<sup>4</sup> pour obtenir la concentration par millilitre de suspension. La distinction cellules vivantes/cellules mortes est réalisée grâce au bleu trypan, colorant qui ne pénètre dans la cellule que lorsque sa membrane est perméable c'est à dire quand la cellule est morte ou en cours de dégradation. Les cellules colorées sont donc considérées comme mortes.

## **2 - 2 LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMMUNISATION**

### **2 - 2 - 1 Le choix des animaux**

Pour toutes les immunisations, "*in vivo*" ou "*in vitro*", nous utilisons des souris élevées par nos soins. Chaque année, nous commandons cinq couples de souris: 5 mâles Balb/C blanches et 5 femelles C 57 noires à la Société C.R.Janvier à Rennes. Nous les croisons et effectuons nos manipulations sur la génération F1. Afin de ne pas avoir de problèmes de

consanguinité et de toujours pouvoir leur donner un âge précis, chaque souris est repérée par le nom de son père et de sa mère et sa date de naissance. L'avantage de croiser une souris blanche et une noire est de pouvoir être sûr de travailler uniquement sur la première génération où toutes les souris sont grises.

## **2 - 2 - 2 Le choix de l'antigène**

### **2 - 2 - 2 - 1 L' 1 antitrypsine**

L' 1 antitrypsine que nous avons utilisée lors de nos immunisations et pour les tests ELISA qui ont suivi la fusion a été préparée dans notre laboratoire à partir de placentas humains selon la technique décrite au paragraphe 1 - 5 - 3.

### **2 - 2 - 2 - 2 L'hPL préparé au laboratoire**

La préparation de l'hPL se fait à partir de placentas prélevés lors de césariennes effectuées à la Maternité Centrale. Ils sont lavés avec une solution NaCl 0,15 M, puis refroidis à 4°C, découpés en petits fragments, congelés dans l'azote liquide et lyophilisés.

Après lyophilisation, les fragments sont réduits en poudre fine par un broyeur à galets. La poudre de placenta est alors remise en solution dans de l'eau distillée et l'extraction de l'hPL effectuée selon la technique mise au point par BELLEVILLE (1972).

Trois formes d'hPL sont récupérées selon cette technique. Elles sont appelées formes lente, rapide et intermédiaire selon leur vitesse de migration (BELLEVILLE, 1976).

Nos premiers essais d'immunisation ont été réalisés avec les formes lente et rapide d'hPL (la bande intermédiaire étant en fait un mélange de bande lente et de bande rapide).

### 2 - 2 - 2 - 3 L'hPL commercial

La fabrication précédemment décrite, longue et dépendante des accouchements par césarienne, nous a amené à poursuivre nos travaux avec de l'hPL du commerce. L'hPL ayant servi aux immunisations qui ont permis d'obtenir des anticorps monoclonaux anti-hPL, a été fourni par la société Bioproducts, 3 rue Didelot à Nanterre (Tableau 19).

  
**bioproducts**  
D.S. updated 15.09.88

i020 - hPL, Iodination grade  
human Placental Lactogen  
+++++

Batch 017

Origin : human placenta

Molecular weight : 22,000

Supply : 1 mg lyophilized, essentially salt free in  
NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> - 0.05 M - pH 8.0

Immunological potency : RIA : 1 x IRP Int. St. of Placental Lactogen 73/545  
MRC (1 mIU/mg) or equivalent

Contaminations : > 98 % pure by SDS page  
hCG undetectable.

Storage : stable when stored at - 20°C

Reference : Endocrinology, 1965, 76, 369

Immunoenzymatic dosages :

Hepatitis B surface antigen (Abbott Kit AUSZYME II) : negative  
HTLV III antibody (Abbott Kit HTLV III EIA) : negative

Tableau 19 : Caractéristiques de l'hPL commercialisé par la Société Bioproducts.

### 2 - 2 - 2 - 4 La beta lactoglobuline

Nous avons utilisé pour les immunisations une beta lactoglobuline bovine Sigma L6879.

## 2 - 2 - 3 L'immunisation

### 2 - 2 - 3 - 1 L'immunisation "in vivo"

Lors de la première immunisation, les souris (3 femelles F1) sont âgées de 7 semaines.

La deuxième et la troisième s'effectuent à 4 semaines d'intervalle. A chaque fois les souris reçoivent 35 µg d'antigène en solution dans 125 µl de PBS additionné d'un volume égal d'adjuvant complet de Freund.

Après une bonne homogénéisation du mélange (au moins 2 minutes) sur un agitateur Vortex, le mélange a été injecté immédiatement par voie intrapéritonéale.

Trois mois après, une injection de rappel de 250 µg a été réalisée, toujours par voie intrapéritonéale. La souris a été sacrifiée 3 jours après le rappel.

Si l'on veut effectuer cette injection de rappel plus rapidement, il est nécessaire de surveiller l'évolution du taux d'anticorps par des dosages sanguins sur chaque animal. Ces prélèvements sont réalisés sur la souris endormie, à l'aide d'une pipette Pasteur rôdée, au coin interne de la cavité oculaire de la souris. L'animal ayant le taux d'anticorps le plus élevé est sélectionné et surveillé régulièrement jusqu'à ce que son taux d'anticorps chute. C'est alors le moment idéal pour faire l'injection de rappel.

### 2 - 2 - 3 - 2 L'immunisation "in vitro"

Nous avons essayé de nombreux protocoles d'immunisation "in vitro" publiés dans la littérature. Celui qui nous a donné les meilleurs résultats a été celui de BORREBAECK(1986).

#### 2 - 2 - 3 - 2 - 1 Le milieu de base

Le milieu utilisé pour l'immunisation est un milieu DMEM (Flow 12.33.2.54) avec bicarbonate et sans glutamine auquel sont ajoutés, pour 500 ml de milieu :

- 25 mg de streptomycine
- 20 000 UI de pénicilline
- 5mM de glutamine
- 5 ml de solution d'acides aminés non essentiels(réf 16.810.49)
- 50 µM de β mercaptoéthanol

Ce milieu est appelé S DMEM (DMEM supplémenté).

### 2 - 2 - 3 - 2 - 2 Préparation du "milieu thymocytes"

10 souris femelles (5 Balb / C et 5 C 57) âgées de 6 semaines exactement sont sacrifiées afin de récupérer leur thymus qui sont rassemblés dans du S DMEM complétement par 10% de sérum de lapin (Calbiochem 56 64 75).

Les thymocytes sont alors extraits des thymus par pression au travers d'un filtre métallique stérile de 50 mesh et collectés dans une boîte de Pétri contenant 5 ml de S DMEM+2% de sérum de lapin. Après homogénéisation à la pipette, les cellules sont comptées à l'hémacytomètre puis amenées à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  cellules / ml dans ce même milieu auquel sont ajoutés  $16 \mu\text{M}$  de thymidine et  $100 \mu\text{M}$  d'hypoxanthine.

Elles sont alors cultivées dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> contenant 50 ml de suspension cellulaire, à 37°C dans un incubateur, régulé à 8% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité.

Après 48h, le milieu est centrifugé à 800 g pendant 10 minutes. Le surnageant est filtré à  $0,22 \mu\text{m}$  et congelé à -80°C en tubes de 15ml. Le milieu thymocytes (TCM) peut se conserver 1 an. 10 thymus nous ont permis de préparer 500 ml de milieu à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  cellules/ml.

### 2 - 2 - 3 - 2 - 3 Récupération des splénocytes

Une souris Balb/C femelle de 9 semaines est tuée afin de récupérer ses splénocytes. Pour ce faire, la rate est prélevée, placée dans une boîte de Pétri contenant 5 ml de milieu S DMEM(Flow).

Plusieurs techniques peuvent alors être utilisées pour la récupération des cellules:

- Soit on place la rate dans un potter contenant 0,5 ml de milieu et on la broie pour en extraire les cellules.

Cette technique bien qu'efficace est très traumatisante pour les cellules qui, dans le cas d'une immunisation "*in vitro*" doivent être en parfait état pour pouvoir supporter ensuite une culture de 5 jours en boîte.

- Soit on injecte à l'aide d'une seringue 5 ml de milieu à l'intérieur de la rate qui gonfle puis laisse sortir son contenu.

Cette technique, qui comporte le risque d'éclatement de la rate, est peu utilisée bien qu'elle permette de récupérer des splénocytes en bon état.

- Soit à l'aide de 2 pinces plates, on vide par pressions successives la rate de son contenu la plus complètement possible. Cette méthode nous semblant la plus simple a été adoptée pour toutes nos manipulations.

Après quelques instants nécessaires au dépôt des plus grosses particules, la suspension de lymphocytes est aspirée à l'aide d'une pipette appuyée perpendiculairement sur le fond de la boîte.

La suspension est alors diluée dans 20ml de milieu et centrifugée à 800g, 5 minutes.

Le surnageant est éliminé et la même opération est renouvelée 1 ou 2 fois pour éliminer le maximum de particules de gros volume.

Enfin, le culot est repris dans 5ml de S DMEM additionné de 10% de sérum de lapin.

#### *2 - 2 - 3 - 2 - 4 Le milieu d'immunisation*

Il se prépare ainsi:

- 15 ml de surnageant de thymocytes (TCM)
- 300 ul d'antigène dissous dans 10 ml de S DMEM et filtré
- 5ml de suspension de lymphocytes

Le mélange est incubé pendant 5 jours à 37°C, 8% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité

#### *2 - 2 - 3 - 2 - 5 Le milieu d'immunisation "enrichi"*

BOSS ( 1986) et ERICH et al.( 1989) ont observé un meilleur rendement d'immunisation en utilisant un milieu enrichi par un glycopeptide qui joue le rôle d'adjuvant : le N acétylmuramyl- L-alanyl D. isoglutamine (MDP Calbiochem 110-125). Nous avons testé ce milieu dont la composition est la suivante :

### 2 - 2 - 3 - 3 L'immunisation mixte

Nous avons également, procédé à des immunisations mixtes selon le principe de BORREBAECK (1989) c'est-à-dire une immunisation classique "*in vivo*" suivie d'une immunisation "*in vitro*".

Sur une souris Balb / C de 4mois 100  $\mu$ l d'antigène sont injectés par voie intrapéritonéale selon la technique décrite au paragraphe 2-2-2-4.

17 jours plus tard, les lymphocytes (environ  $10^8$ ) déjà stimulés sont récupérés et mis en contact pendant 5 jours dans le mélange suivant :

- 15 ml de S DMEM
- 0.5 ml de sérum de lapin
- 15 ml de milieu TCM
- 600 $\mu$ l de MDP
- 300  $\mu$ l d'antigène

## 2 - 3 LA FUSION CELLULAIRE

### 2 - 3 - 1 La culture des cellules de myélomes

Pour toutes les fusions nous avons utilisé la même souche de myélome qui nous a été confiée par le Professeur Bazin ( Université Catholique de Louvain Bruxelles). Cette souche appelée PIAO est une lignée de myélome de souris non sécrétant.

Le succès d'une fusion et son rendement sont étroitement liés à la bonne viabilité et à la croissance exponentielle de la culture du myélome parental (LEBACQ- VERHEYDEN et al. 1983).

Dix jours avant la fusion, la souche de myélome est mise en culture dans du RPMI + 10% SVF dans une boîte de 25 cm<sup>2</sup> à une concentration de 5. 10<sup>4</sup> cellules / ml.

Chaque jour, les cellules sont comptées à l'hémacytomètre (moyenne de trois comptages) , le culot de centrifugation est remis en suspension dans du milieu neuf à la concentration cellulaire de départ.

Après trois passages en boîte, les cellules sont placées en flacon spinner contenant de 150 à 250 ml de milieu et leur temps de doublement est calculé selon la formule :

$$T = 1 / r \text{ ( en heures)}$$

Où T est le temps de génération ou de doublement

r est le taux de croissance

Si on part de l'hypothèse que les cellules sont en phase exponentielle, on peut dire que

$$x_t = 2^n \cdot x_0$$

x<sub>t</sub> étant le nombre de cellules au temps t

n le nombre de générations

x<sub>0</sub> le nombre de cellules au temps 0

et 2 puisqu'il s'agit d'un doublement

$$n = r.t = \text{taux de croissance} \times \text{temps de l'expérience}$$

$$\text{---> } x_t = 2^{rt} x_0$$

$$\text{---> } r = 3,322 / t (\log x_t - \log x_0)$$

**Le temps de doublement T en heures est égal à 1/r**

Pour la souche de myélome, quand le temps de doublement est compris entre 14 et 16h pendant 3 à 4 jours, il est alors possible de fusionner.

## 2 - 3 - 2 Les différents modes de fusion

### 2 - 3 - 2 - 1 La fusion au PEG

Quelque soit la technique d'immunisation "*in vivo*" ou "*in vitro*", nous avons adopté une seule technique de fusion utilisant comme agent fusionnant le polyéthylène glycol.

### 3 - 2 - 2 - 1 - 1 Préparation des macrophages

Pour assurer aux cellules fusionnées les meilleures conditions de croissance, il est fortement conseillé de les mettre en présence de cellules nourricières ( feeder cells ). Nous utilisons des macrophages péritonéaux.

Les macrophages sont une source supplémentaire de facteurs de croissance. De plus, il semblerait qu'ils diminuent la toxicité du plastique des flacons de culture et qu'ils soient capables d'éliminer en partie les cellules mortes.

Ils sont obtenus à partir d'une souris tuée par dislocation cervicale. Après dégagement de la peau de l'abdomen, 5 ml de MEM froid et sans sérum, sont injectés dans la cavité péritonéale en veillant à ne pas perforer l'intestin, ce qui serait source de contamination.

Après massage de l'abdomen, 3 à 4 ml de milieu sont récupérés et transférés dans un tube stérile afin de centrifuger la suspension à 800 g pendant 5 minutes.

Le surnageant est éliminé et le culot, après comptage des cellules nucléées à l'hémacytomètre, est dilué jusqu'à une concentration de  $5 \cdot 10^4$  cellules / ml et distribué à raison de 100  $\mu$ l par puits dans des plaques de 96 puits (COSTAR). Cette manipulation est généralement réalisée la veille de la fusion.

#### *2 - 3 - 2 - 1 - 2 Préparation du PEG*

Placer dans un flacon de 100 ml autoclavable

- 5 g de PEG 4000 (9727 Merck)
- 7 ml de PBS
- 1 ml de DMSO (2950 Merck)

Chauffer jusqu'à dissolution complète au Bain-Marie à 50°C

Autoclaver 15 min à 120°C ou filtrer à 0,22  $\mu$ m

Stocker à 37°C 2 mois maximum.

#### *2 - 3 - 2 - 1 - 3 Préparation du milieu de fusion*

Le milieu de fusion appelé DMEM C (conditionné) est composé comme suit :

à 500 ml de DMEM (Gibco 041-1965) sont ajoutés

- 10% de SVF
- 2% de HAT
- 2mM de glutamine
- 5 ml d'acides aminés non essentiels 100 x (043-1140 Gibco)
- 5 ml de pyruvate 100 mM (043-1360 H Gibco)
- 100  $\mu$ g de streptomycine / ml
- 100 UI de pénicilline / ml

#### 2 - 3 - 2 - 1 - 4 La fusion

D'une part la rate de la souris est prélevée et les splénocytes sont récupérés comme décrit au paragraphe 2-2-2-5-3. Ils sont comptés à l'aide d'une cellule de Thoma.

Une rate de souris contient environ  $10^8$  lymphocytes, mais seul un dénombrement exact permet ensuite d'établir un rapport précis entre lymphocytes et myélomes, rapport qu'il est nécessaire de respecter pour assurer un bon rendement de fusion.

D'autre part la suspension de myélomes est elle aussi comptée et en fonction de sa concentration, un certain volume est prélevé de façon à se trouver dans un rapport de 1 cellule de myélome pour 5 lymphocytes.

Chaque suspension cellulaire est lavée trois fois par du milieu MEM et centrifugée à 800 g pendant 5 minutes.

Les culots sont repris par 12,5 ml de ce même milieu chauffé au préalable à 37°C, puis sont mélangés. Après une nouvelle centrifugation, les 25 ml de surnageant sont éliminés et le culot contenant le mélange myélomes- lymphocytes est séché par retournement sur un papier absorbant.

Il est ensuite décollé à l'aide d'une pipette pasteur à pointe rodée et soudée et 1 ml de PEG à 37°C lui est ajouté goutte à goutte en agitant doucement le tube durant 90 secondes très précisément. Il y a alors formation d'aggrégats que l'on dissocie par ajout de 2 ml de milieu MEM en 90 secondes, puis de 20 ml en 4 minutes. Une nouvelle centrifugation est encore réalisée, toujours dans les mêmes conditions. Le surnageant est éliminé.

A ce moment, les cellules qui ont commencé à fusionner, sont resuspendues délicatement dans 10 ml de milieu MEM C+ 2% de HAT puis rediluées dans la quantité nécessaire de ce même milieu pour se trouver à une concentration finale de  $2 \cdot 10^6$  cellules par puits.

La suspension est alors distribuée grâce à une pipette multicanaux à raison de 100 ul par puits dans les plaques contenant déjà 100 ul de suspension de macrophages distribuée la veille.

A cette étape, il est possible d'observer au microscope les cellules fusionnées ou en cours de fusion (Figures 28 et 29).

Les plaques de 96 puits sont placées les unes à côté des autres dans l'incubateur réglé à 8 % de CO<sub>2</sub>, pendant 3 jours. Il est alors préférable de ne pas les toucher et de ne pas ouvrir l'étuve. Au troisième jour, le maximum de milieu (environ 150 ul) est remplacé en prenant garde de ne pas toucher les cellules qui se sont déposées au fond des puits, puis les plaques sont replacées à l'étuve pour 2 jours encore.

Le milieu de culture est alors supplémenté en HAT pendant une quinzaine de jours puis en HT jusqu'au 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> clonage.

#### 2 - 3 - 2 - 2 L'électrofusion

Les essais d'électrofusion ont été réalisés avec un électropulseur à simples impulsions ( R2820 Apelex ) relié à une cuve de type cuve de spectrophomètre qui tient lieu de chambre de fusion.

Les splénocytes sont récupérés de la même façon que lors de la fusion au PEG puis lavés dans 10 ml d'une solution de NH<sub>4</sub>Cl qui va détruire les globules rouges.

Les lymphocytes sont alors comptés et mélangés à une suspension de cellules de myélome dans un rapport de 1 cellule de myélome pour 5 lymphocytes. Le mélange est lavé 2 fois dans un tampon contenant

- 0,213 g / l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,068 g / l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 93,1 g / l de saccharose

puis repris dans 6 ml de ce même tampon et répartis dans les cuves de fusion à raison de 300ul par cuve.

Une rate de souris contenant environ 1x10<sup>8</sup> lymphocytes, est mise en contact avec 2x10<sup>7</sup> cellules de myélomes. On estime, dans ces conditions, à 6x10<sup>6</sup> le nombre de cellules dans chaque cuve.

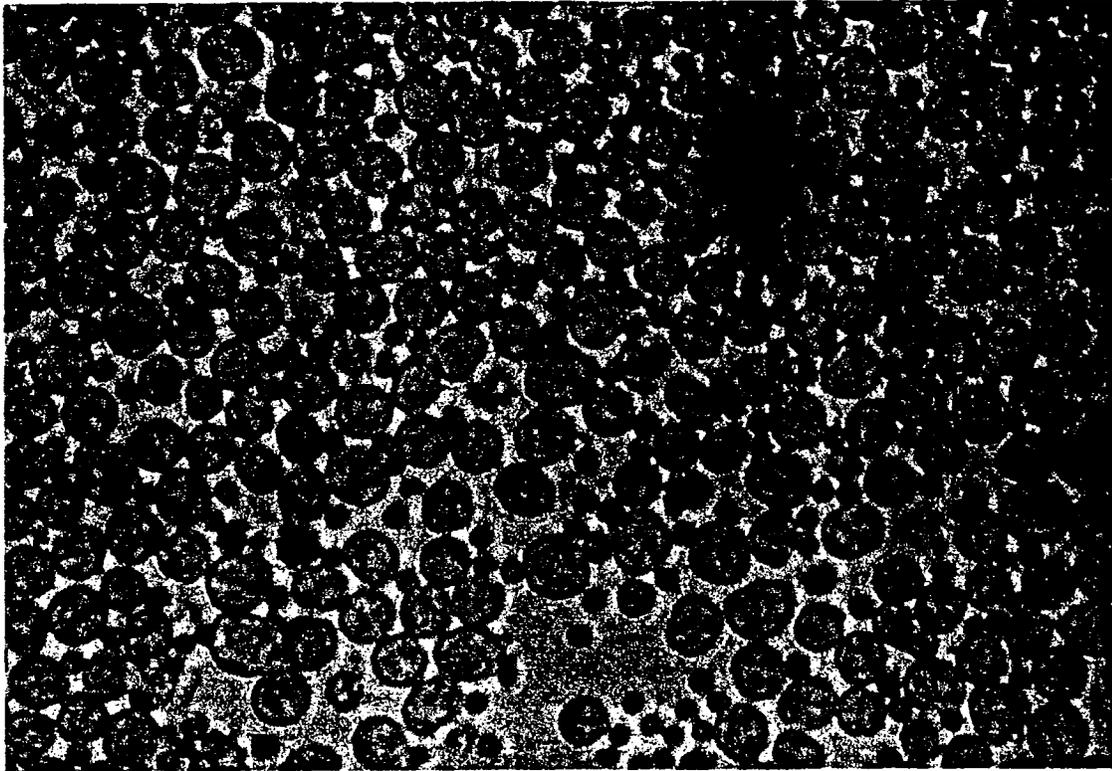


Figure 28: cellules de myélomes et lymphocytes en fusion ( grossissement \* 200)

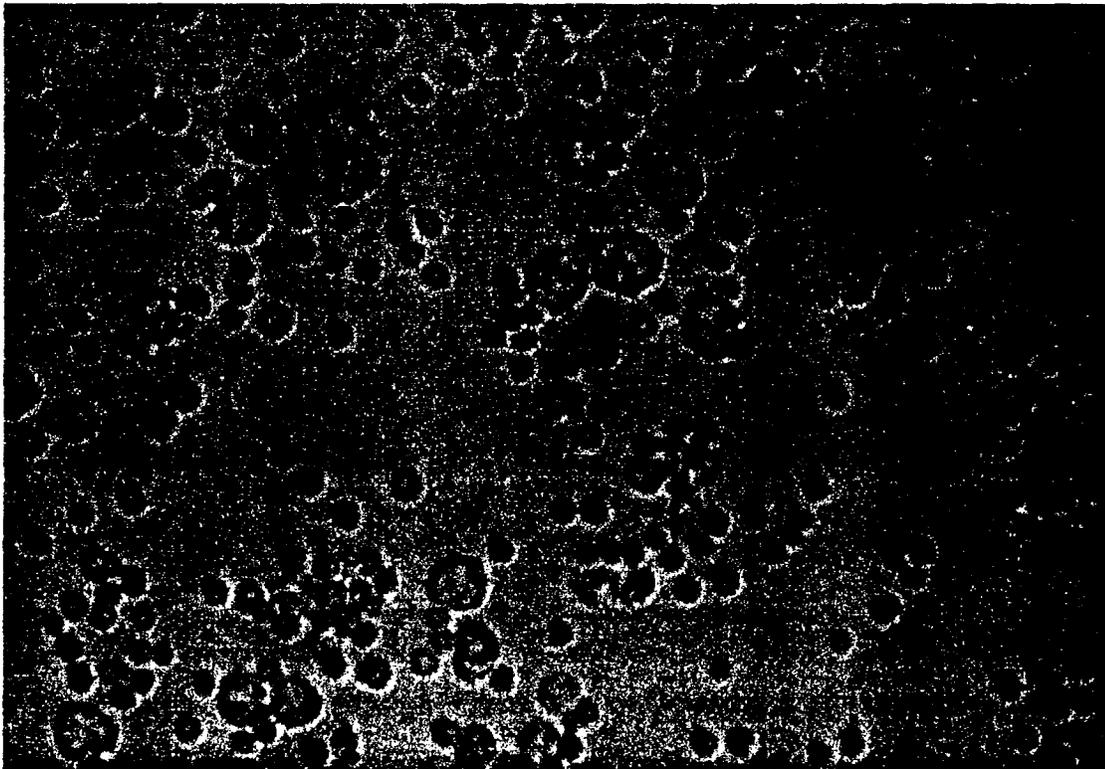


Figure29:cellules de myélomes et lymphocytes en fusion ( grossissement \* 400)

Plusieurs essais ont été réalisés en faisant varier différents paramètres c'est à dire :

3,4 ou 5 impulsions de 3,5 ou 4 KV / cm espacées de 1, 5, 9 secondes.

Immédiatement après ces impulsions, 1 ml de milieu de post fusion est ajouté délicatement pour ne pas dissocier les cellules en fusion

La composition de ce milieu est la suivante:

- 1,065 g / l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

- 0,340 g / l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- 7,715 g / l de  $\text{NaCl}$

- 0,596 g / l de  $\text{KCl}$

Les cuves sont alors placées à 37°C pendant 30 minutes puis leur contenu est récupéré, centrifugé 5 minutes à 800g. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules fusionnées est repris dans 2 ml de milieu RPMI + 10% de SVF et 1% de HAT et déposé dans des plaques de 24 puits contenant  $3 \times 10^4$  cellules de macrophages dans 1 ml de milieu.

La concentration finale dans les puits est donc de  $3 \times 10^6$  cellules fusionnées.

Les plaques sont alors replacées à l'étuve à 37°C, 95% d'humidité et 8% de  $\text{CO}_2$ .

## 2 - 4 LA SELECTION DES HYBRIDOMES

Au cinquième jour de la fusion une première lecture au microscope est effectuée avant le premier changement de milieu. Cette lecture est fondamentale car elle permet de repérer les puits où les cellules ont poussé. De plus, il est encore possible de distinguer les différents clones en formation (Figure 30).

Au septième jour ou huitième jour, une dernière observation au microscope permet de sélectionner les puits contenant des cellules ayant poussé rapidement (clones de grande taille). Les surnageants de ces puits vont être testés par une méthode ELISA au dixième jour.

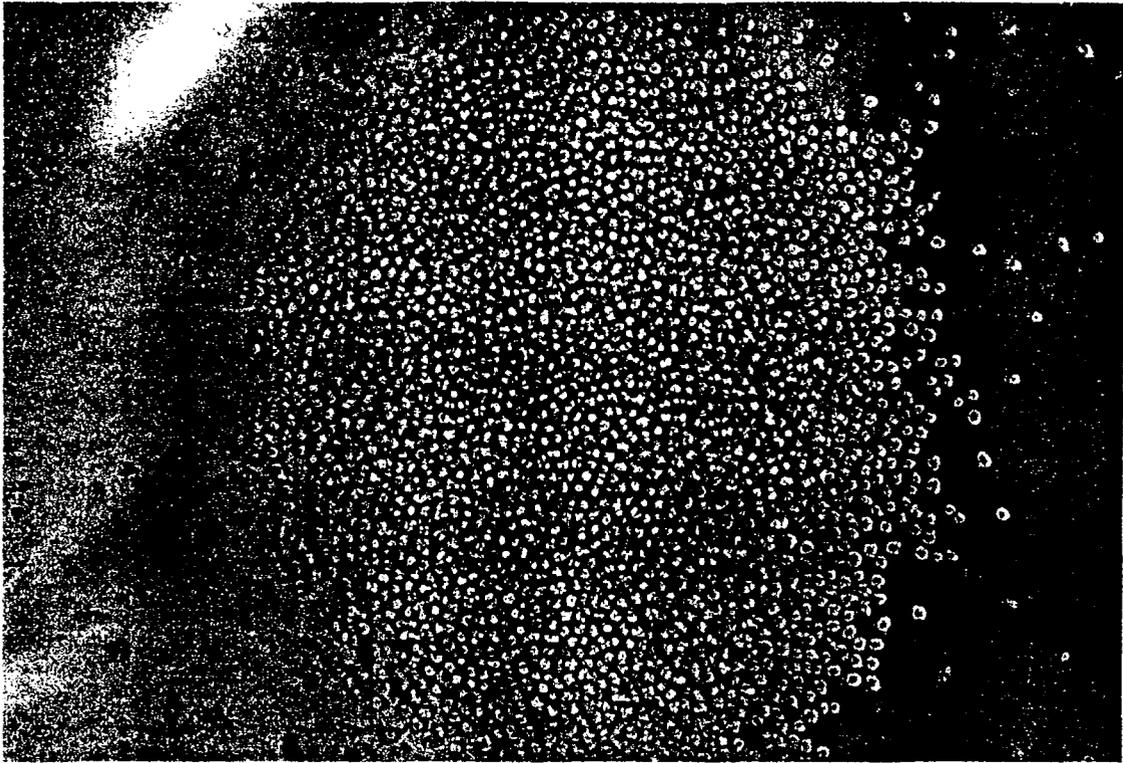


Figure 30 : Clone observé au microscope (grossissement x 200) 8 jours après la fusion.

#### 2 - 4 - 1 Le test ELISA

##### 2 - 4 - 1 - 1 Les réactifs

* PBS	NaCl	8 g
	KCl	0,200 g
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	1,440 g
	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 11 H <sub>2</sub> O	0,200 g
	H <sub>2</sub> O	QSP 1 l

\* Immunsérum de chèvre anti-IgG de souris réf. 4140 Tago

\* Immunsérum de chèvre anti-IgG de souris marqué à la peroxydase réf. 6440 Tago

\* BSA (Sigma) en solution à 2 % dans du PBS

\* Tampon phosphate pH 6 0,1 M

\* Tampon carbonate pH 9,6 0,1 M

\* Substrat servant à révéler l'activité peroxydasique :

TMB (3, 5, 3', 5 Tetra méthylbenzidine) réf. 8622 Merk à préparer extemporanément à raison de 10 mg dans 10 ml de DMSO.

## 2 - 4 - 1 - 2 Mode opératoire

- Fixation de l'antigène sur les microplaques :

\*Dilution de l'immunsérum de chèvre à raison de 20  $\mu$ l dans 100  $\mu$ l de tampon carbonate pH 9,6 et répartition dans les plaques à raison de 100  $\mu$ l par puits.

\*Incubation une nuit à 4°C.

\*Rinçage des plaques par du PBS (3 lavages).

- Saturation des sites non spécifiques :

\*Répartition de 100  $\mu$ l par puits d'une solution de BSA à 2 % dans du PBS.

\*Incubation une nuit à 4°C.

\*Elimination de la BSA par retournement des plaques.

- Réaction Antigène-Anticorps :

\*Dépôt de 100  $\mu$ l de surnageant par puits.

\*Incubation 2 h à 37°C.

\*Lavage 5 fois au PBS Tween (à 1%).

\*Ajout de 100  $\mu$ l de l'immunsérum marqué à la peroxydase (dilué à 1/1000 dans du PBS Tween).

\*Incubation 1 h à 37°C.

\*Lavage 5 fois au PBS Tween puis 1 fois avec le tampon phosphate pH 6.

\*Essorage de la plaque par retournement sur papier absorbant.

- Révélation du complexe Antigène-Anticorps :

\*Dilution de la solution TMB dans le DMSO à raison de 100 ul dans 10 ml de tampon pH 6 + 4 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 110 volumes.

\*Répartition de cette solution à raison de 100 ul par puits.

\*Après 10 min d'attente, blocage de la réaction par 25 ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 9N.

\*Lecture des densités optiques sur un lecteur de microplaques (à 450 nm pour le TMB).

### 2 - 4 - 1 - 3 Remarques

Juste après la fusion et pendant les cinq clonages qui suivront, on se place en système ELISA spécifique, c'est à dire que les puits sont "coatés" avec l'antigène utilisé pour l'immunisation. Ceci permet de s'assurer qu'on a bien des anticorps monoclonaux spécifiques. Après 4 à 5 clonages, les autres mesures de sécrétion utiliseront un système aspécifique, c'est à dire que les puits seront "coatés" avec des Ig anti immunoglobulines de souris ( Figure 31).

## 2 - 4 - 2 Le clonage

### 2 - 4 - 2 - 1 Principe

D'une façon générale, le clonage permet de sélectionner des cellules à l'intérieur d'une population cellulaire hétérogène. Le critère de sélection peut être :

- soit la rapidité de croissance
- soit la sécrétion d'une protéine particulière.

Dans notre cas, il s'agit de sélectionner les cellules en fonction de leur sécrétion d'immunoglobuline afin d'obtenir un anticorps monoclonal.

Nous utilisons une méthode de dilution limite où les cellules sont déposées dans des plaques de 96 puits à raison d'une cellule par puits.

## 2 - 4 - 2 - 2 Protocole de la méthode de dilution limite

Le jour du clonage, les cellules sont comptées (3 comptages) à la cellule de Thoma. A partir de ce dénombrement ( $\times 10^4/\text{ml}$ ) des dilutions successives sont réalisées afin de distribuer dans la plaque de 96 puits.

Théoriquement : 100 cellules dans les 8 puits de la 1ère rangée verticale  
10 cellules dans les 8 puits de la 2ème rangée verticale  
1 cellule dans les 80 puits restants.

Les deux premières rangées servent à la sauvegarde des cellules en cas d'erreur de manipulation ou de difficulté de reprise des cellules. C'est dans les 80 puits que se fera la recherche des puits ne comportant qu'un seul clone. Il est généralement estimé qu'un clonage est réussi lorsque 60 à 70 % des puits comportent un clone et un seul.

## 2 - 4 - 2 - 3 Clonage après fusion

Lors de ces clonages, il faut favoriser au maximum la pousse cellulaire. Ils sont effectués en présence de 3 à 5  $10^3$  cellules de macrophages déposés dans chaque puits (100 $\mu\text{l}$ ) la veille de la manipulation.

Le résultat du premier ELISA suivant la fusion permet de sélectionner les 10 puits correspondant aux cellules les plus sécrétantes.

10 jours après le premier clonage, 10 plaques correspondant chacune à un puits sélectionné à partir du test ELISA, sont observées au microscope et tous les puits ne présentant qu'un seul clone sont retestés par un nouvel ELISA

A nouveau, les 10 clones les plus sécrétants, sont choisis pour être recloneés.

Après 5 tests ELISA et 4 clonages, le clone ayant gardé au cours du temps ( toutes ces manipulations s'effectuent sur 6 à 8 semaines) la meilleure sécrétion est choisi pour la fabrication en masse de l'anticorps monoclonal. Toutefois, il est prudent, lors de chaque sélection, de congeler 2 ou 3 clones ayant des sécrétions intéressantes car on n'est jamais à l'abri d'une contamination ou d'une perte de sécrétion.

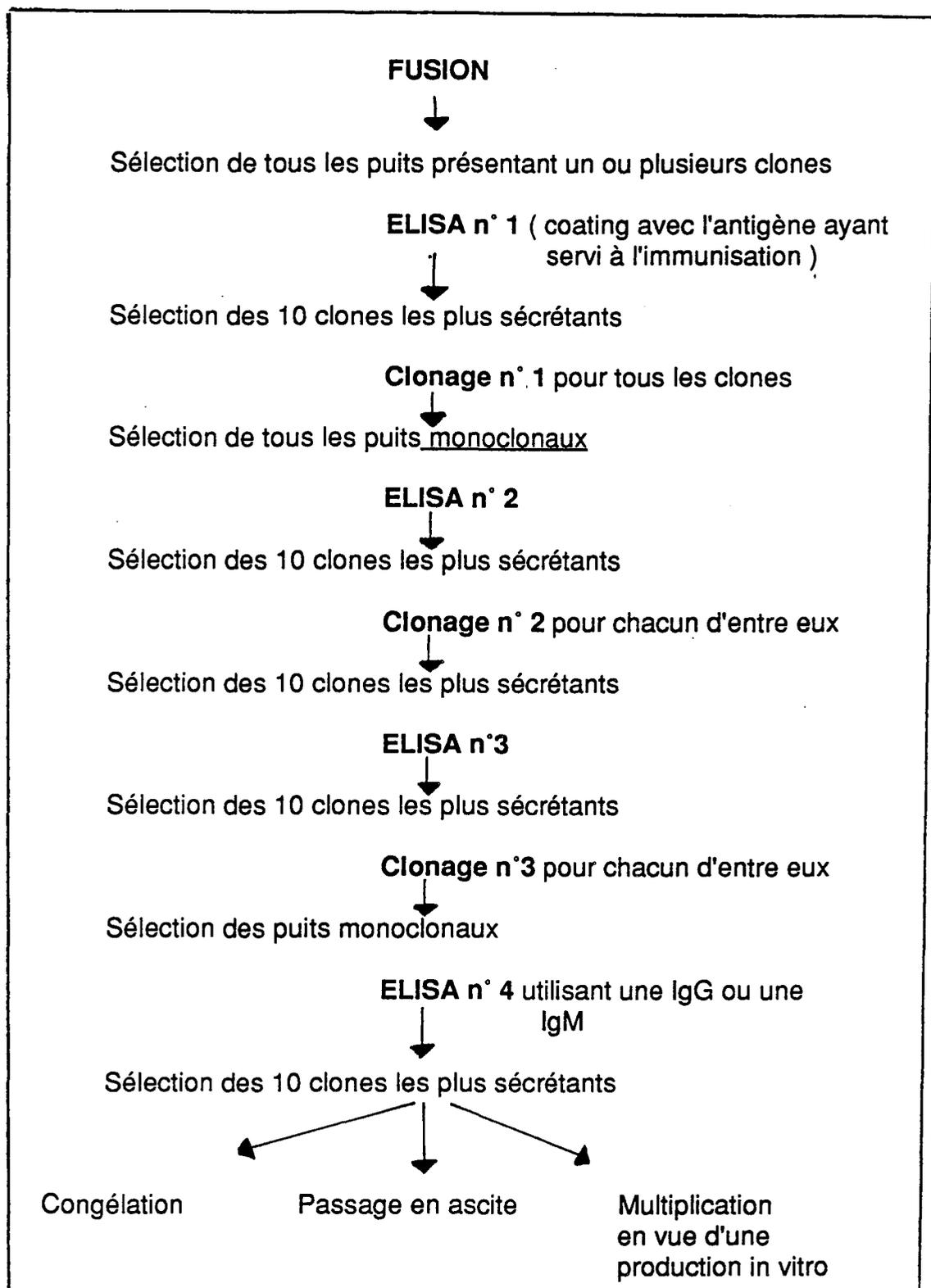


Figure 3 1 : Schéma des différentes étapes de sélection des clones.

## 2 - 5 La sauvegarde des hybridomes

### 2 - 5 - 1 La congélation

Cette étape est difficile à supporter pour les cellules. Elles y subissent en effet :

- un choc thermique,
- une déshydratation qui entraîne une augmentation de leur concentration saline,
- une chute du taux de protéines externes qui jouent le rôle d'agent protecteur,
- une variation de pH,
- et surtout un phénomène de surfusion au moment de l'apparition des premiers cristaux.

Il faut donc diminuer au maximum ce temps de surfusion en augmentant la vitesse du refroidissement à ce moment précis. Pour obtenir une bonne congélation, il est conseillé de descendre la température de :

\* 1° C / min de + 4°C à - 45°C,

\* 2, 5° C / min jusqu'à - 75° C,

puis de laisser les cellules à cette température quelques heures et de les transférer dans l'azote liquide à - 196°C. (Ceci n'est réalisable qu'avec des systèmes de congélation programmables.)

En pratique, les cellules sont centrifugées, le culot est repris dans du milieu de culture supplémenté en SVF de telle sorte que l'on ait  $5 \cdot 10^5$  cellules / ml, ce qui est considéré comme la concentration optimale. On ajoute alors un mélange DMSO - SVF ( 1V / 4V) goutte à goutte en agitant le tube dans la glace pilée.

La suspension est alors répartie dans des cryotubes de 1 ml qui seront déposés soit :

\* dans une boîte spéciale appelée cryofreeze (POLYLABO - réf. 22470) contenant de l'alcool isopropylique. Celle-ci sera ensuite placée quelques heures à - 80° C (selon le fournisseur, l'alcool permettrait la descente graduelle de 1° C / min). Les tubes seront alors transférés dans un container d'azote liquide à - 196°C.

\* dans un appareil de congélation (Nicoool 416) comportant une programmation électronique de la température étalonnée au préalable pour chaque type cellulaire. Cet appareil relié à une bonbonne d'azote liquide permet la descente en température jusqu'à - 196° C.

Les cryotubes seront ensuite transférés dans leur container (BT - CFPO).

### **2 - 5 - 2 La décongélation**

La décongélation doit être réalisée très rapidement à cause de la toxicité à température ambiante du cryoprotecteur qu'est le DMSO. Pour cela, les cryotubes sont sortis de l'azote liquide et immédiatement plongés dans un bain-marie à + 37° C jusqu'à complète décongélation.

Les cellules sont diluées dans 20 ml de RPMI complété et centrifugées 5 min à 800 g.

Le surnageant est alors éliminé et le culot est resuspendu dans les 20 ml de milieu contenant la suspension de macrophages qui augmente le rendement de la reprise des cellules. Les hybridomes sont répartis à une densité d'environ  $5 \cdot 10^4$  cellules/ml dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup>.

Les flacons de culture sont placés debout dans l'étuve pendant 2 jours. Lorsque les cellules sont à confluence dans le fond du flacon, 10 ml de milieu sont éliminés et le flacon peut alors être couché dans l'étuve jusqu'au repiquage dans de nouveaux flacons.

Le fait de resuspendre les cellules dans 20 ml de milieu permet une plus grande dilution du DMSO toxique. Le maintien de la boîte debout facilite la reprise de la croissance car les cellules sont moins dispersées.

## 2 - 5 - 3 Le passage en ascite

### 2 - 5 - 3 - 1 Protocole

Le passage en ascite peut être pour un clone la possibilité de le sauvegarder ou même de le débarrasser d'une contamination bactérienne ; c'est aussi le moyen de produire des anticorps monoclonaux *"in vivo"*. Il est réalisé sur des souris Balb / C ou hybride F1 Balb / C - C 57.

La souris reçoit, au moment de l'injection de cellules ou mieux 8 à 10 jours avant, 0,5 ml de Pristane (2, 6, 10, 14, Tétraméthyl pentadécane) en intrapéritonéal.  $1 \cdot 10^7$  cellules environ sont injectées dans la cavité péritonéale. 1 à 5 semaines plus tard, la tumeur ascitique se développe, l'abdomen de la souris grossit.

Pour extraire le liquide d'ascite on introduit dans la cavité péritonéale une aiguille 16 G sur environ 1 cm. Le liquide qui s'écoule est récupéré dans un tube. Un massage de l'abdomen facilite l'écoulement.

Ce prélèvement est généralement effectué 3 fois avant que la souris soit sacrifiée.

### 2 - 5 - 3 - 2 La congélation des liquides d'Ascite

Les liquides d'ascite étant prélevés en plusieurs fois, il est conseillé de les stocker avant leur utilisation en ayant pris soin auparavant de les préserver d'une dégradation de l'anticorps par des enzymes et de la prolifération bactérienne. Pour ce faire, nous utilisons la technique MANOUVIER et al. (1989).

#### 2 - 5 - 3 - 2 - 1 Réactifs

\* L'inhibiteur d'enzymes utilisé est du Phénylméthylsulfonylfluoride (P M S F) MERCK ref 7349 en solution à raison de 0,40 mg / ml dans de l'éthanol

\* l'agent bactériostatique est du Thimérosal (éthylmercurithiosalicylate de sodium, SIGMA T 5125) en solution à 0,1 % dans l'eau.

### 2 - 5 - 3 - 2 - 2 - Protocole

. Ajouter par millilitre d'ascite 30 µl de thrombine (Roche) à 100 unités par millilitre.

. Placer quelques instants au bain-marie à + 37° C, le temps de la formation d'un coagulum.

- . Attendre 30 min à température ambiante
- . Centrifuger 10 min à 25 000 g
- . Récupérer le surnageant et lui ajouter :
  - 20 µl de PMSF
  - 10 µl de thimérosal par millilitre d'ascite.
- . Congeler à - 20° C ou à - 80° C.

## 2 - 6 - LA MULTIPLICATION DES HYBRIDOMES "IN VITRO"

### 2 - 6 -1 La culture en spinner

Lorsque 2 à 3 flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> sont à confluence, il est possible de passer les cellules dans un système agité où elles poussent plus facilement puisqu'elles se trouvent en contact permanent avec le milieu.

Deux types de cultures peuvent être réalisés :

- \* Le système dit de récolte recharge décrit dans le § 2-1-3-3-5
- \* Le système dit en "batch" où la culture est réalisée sur 5 à 6 jours.

Au jour J0 le spinner contenant 150 ml de milieu estensemencé à une concentration de 5.10<sup>4</sup> cellules/ml.

Chaque jour un comptage des cellules est effectué à l'hémacytomètre et un échantillon de 10 ml est prélevé pour y réaliser (après centrifugation) l'analyse de différents paramètres. Le culot cellulaire de l'échantillon est suspendu dans 10 ml de milieu neuf et replacé dans le flacon.

La pousse cellulaire est moins rapide que lors d'une culture en récolte - recharge car le milieu s'épuise assez vite et les éléments toxiques s'accumulent. Mais la consommation de milieu est nettement réduite et les

anticorps sont accumulés dans un volume restreint ce qui facilite leur purification ultérieure.

Le choix de l'une ou l'autre technique dépend du but que l'on s'est fixé.

## 2 - 6 - 2 La culture en bioréacteur

La capacité des spinners étant limitée à 250 ou 300 ml maximum, pour une production plus importante, il est nécessaire d'adopter un système plus sophistiqué appelé bioréacteur ou cytoculteur (figure 32 ).

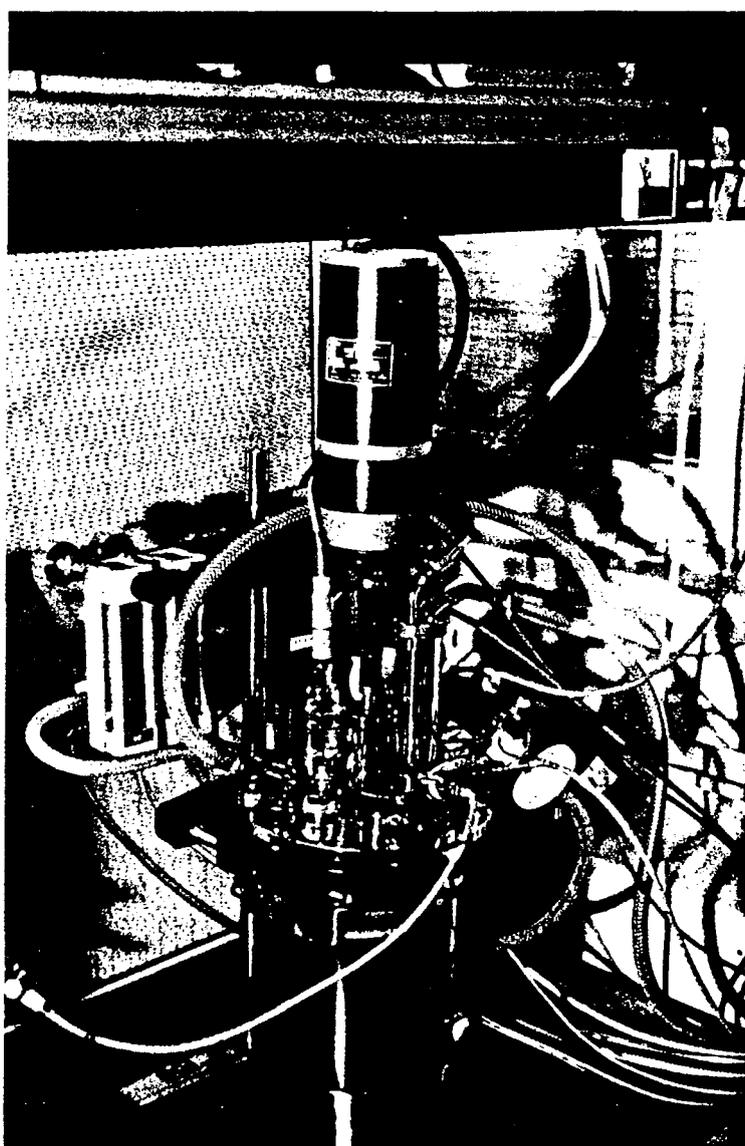


Figure 32 : Cytoculteur CETRIC

## 2 - 6 - 2 - 1 Description du système

Le bioréacteur mis au point dans notre laboratoire est placé sous une hotte à flux laminaire horizontal. Il est en fait composé de deux éléments :

. le cytotacteur proprement dit constitué d'une cuve de verre de 2 litres de volume utile, maintenue à + 37°C, reliée à un système de régulation ; le milieu de culture ( 1,2 l) y est agité en permanence à 60 tours/min et régulé au niveau du pH, du taux d'oxygène, de CO<sub>2</sub> et de la température.

. le réacteur est constitué d'un cylindre de verre contenant une mousse de polyéther entouré d'une jaquette où circule en permanence de l'eau thermostatée à + 37° C. Les cellules sontensemencées dans la mousse.

Les circulations du milieu se font au moyen de pompes péristaltiques.

. Une pompe double permet le renouvellement du milieu : arrivée continue de milieu neuf et prélèvement du même volume de milieu usé ;

. une autre pompe alimente les cellules du réacteur de bas en haut avec du milieu régulé qui repart ensuite dans le cytotacteur.(Figure 33)

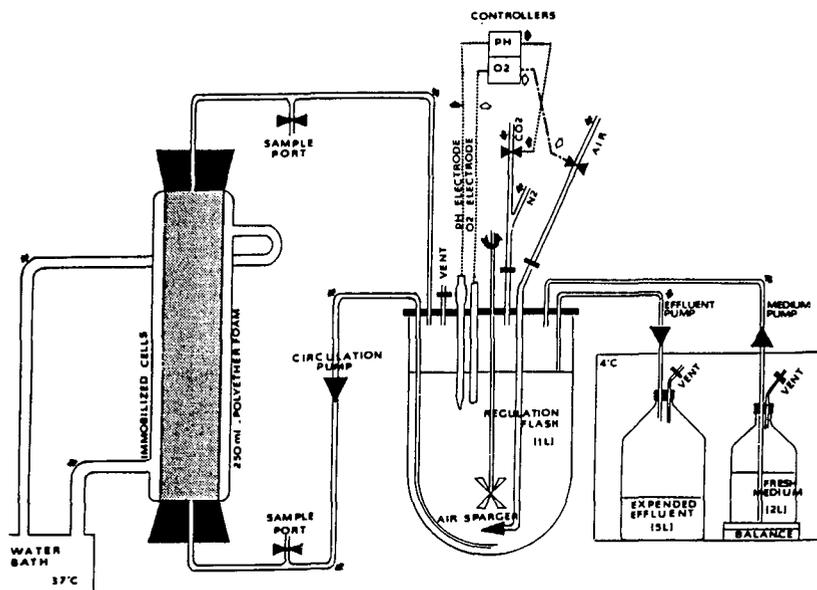


Figure 33: Schéma de montage du système.

## 2 - 6 - 2 - 2 Les régulations dans le cytoculteur

Un système électronique de mesure et de contrôle (SGI - Toulouse) assure les régulations suivantes : (Figure 34 )

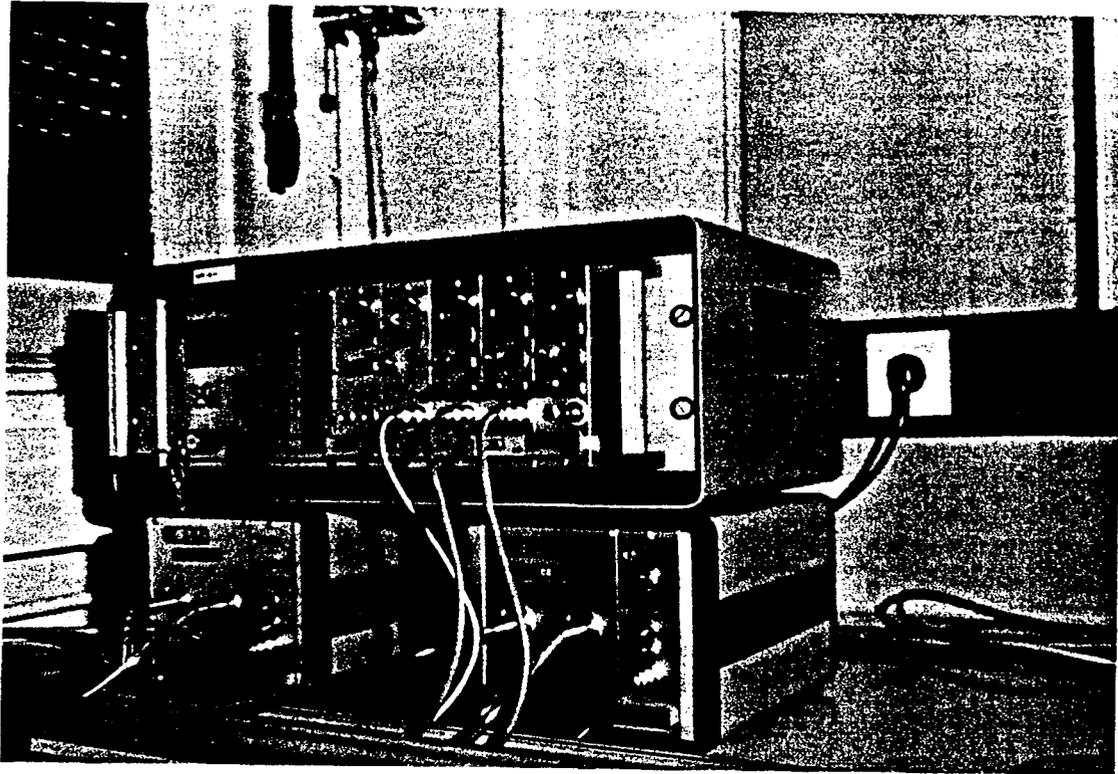


FIGURE 34 : Système de régulation des différents paramètres

- maintien de la température à + 37° C par l'intermédiaire d'un courant d'air chaud envoyé dans la jaquette et d'une "aiguille" d'eau froide plongeant dans le milieu.

- maintien du pH à 7,3 par l'intermédiaire d'un mélange N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> stérilisé par filtration à 0,22µm avant son arrivée à la surface du milieu.

- maintien d'une concentration en oxygène dissous à 60 % de saturation en air du milieu grâce à une bouteille d'air médical stérilisé par filtration qui barbote dans le milieu.

Chacun de ces trois paramètres est contrôlé en permanence par une sonde ; le débit de renouvellement du milieu est réglé manuellement en fonction de la concentration du glucose dosé chaque jour que l'on ne laisse pas descendre en dessous de 1 g/l.

La circulation du milieu dans l'éponge est de 500 ml/heure ; le réacteur ayant un volume de 250 ml, le milieu est renouvelé complètement deux fois par heure.

## 2 - 6 - 2 - 3 Démarrage d'une culture

### *2 - 6 - 2 - 3 - 1 Montage du système*

Le cylindre de mousse de polyether est bouilli trois fois dans de l'eau distillée pour éliminer les sels minéraux, les traces de catalyseur utilisé pour la polymérisation de la mousse ainsi que tous les composés pouvant être toxiques pour les cellules.

Il est ensuite placé dans son réceptacle de verre et autoclavé 20 min en vapeur humide sous une pression de 1 bar. Les deux extrémités sont fermées par des manchons en papier aluminium.

Le cytotuteur est lui aussi autoclavé dans les mêmes conditions après l'avoir rempli d'un litre d'eau et y avoir fait plonger les sondes à O<sub>2</sub> et à pH préalablement étalonnées. Les orifices non connectés sont obturés comme précédemment.

Les tuyaux reliant les divers éléments du montage sont en Norprène usage alimentaire (MASTERFLEX 6402-13 ou 14). Les connections se font à l'aide de raccords "Luer" inox et de robinets trois voies. Le tout est autoclavé.

Le montage définitif s'effectue sous hotte à flux laminaire en prenant le maximum de précautions.

L'eau est alors vidée et remplacée par du milieu de culture. Le système fonctionne 24 heures pendant lesquelles les différents réglages sont affinés.

Toutes ces manipulations sont effectuées avec des mesures de stérilité draconiennes car la moindre erreur peut provoquer une contamination qui entraîne une perte de milieu conséquente et un travail de démontage, de nettoyage, de remontage fastidieux.

### 2 - 6 - 2 - 3 - 2 L'ensemencement

7,5 10<sup>7</sup> cellules, maintenues en phase exponentielle de croissance dans un spinner, sont resuspendues dans 10 ml de milieu et injectées à l'aide d'une seringue par le robinet trois voies placé au bas de l'éponge.

La circulation du milieu est :

- . maintenue une demi-heure pour permettre aux cellules de se "nichier" dans tout le volume de l'éponge,
- . arrêtée pendant une demi heure afin qu'elles s'y positionnent,
- . rétablie jusqu'à la fin de l'expérience à raison de 500 ml / heure.

### 2 - 6 - 2 - 4 Le suivi de la culture

Il se fait par l'intermédiaire de différents dosages effectués sur un prélèvement quotidien : 12 ml environ sont prélevés chaque jour à heure fixe, centrifugés, fractionnés en fonction des analyses. Certaines de celles-ci sont effectuées le jour même (glucose, LDH, PAL). Les autres le sont à la fin de l'expérience sur l'ensemble des milieux conservés à -20°C.

\* Le taux de glucose qui permet la régulation du débit de renouvellement du milieu dans le cytoculteur est réalisé par une méthode enzymatique automatique utilisant le kit Merck 14 1041 à la glucose-oxydase (appareil WAKO).

\* La LDH utilisée comme marqueur de la mort cellulaire est dosée par une méthode optimisée S.F.B.C grâce à un kit Biotrol A0300 - 9.

\* La phosphatase alcaline, considérée comme un des marqueurs de la croissance cellulaire, est dosée sur analyseur WAKO par une méthode colorimétrique (kit Boehringer 415294).

Les dosages des autres constituants se font en fin d'expérience sur les surnageants qui ont été congelés.

\* Les ions ammonium sont dosés par la méthode colorimétrique de Berthelot après déprotéinisation.

\* Le pyruvate est dosé par une méthode cinétique enzymatique ( kit Boehringer 124.982).

\* Le lactate lui aussi est dosé sur WAKO à l'aide de Kit BioMérieux ref. 611.92.

\* La  $\beta$  glucuronidase est déterminée par un dosage photométrique manuel selon la méthode de Glaser et Sly (1973).

\* Les acides aminés sont quantifiés après passage sur résines échangeuses d'ions, grâce à un analyseur Beckman 7000.

Tous ces dosages sont réalisés pour le suivi d'un bioréacteur à cellules fixées ou pour les études comparatives des différents substituts de sérum que nous effectuons en flacons spinner.

\* Les taux d'anticorps monoclonaux présents dans le surnageant de culture, sont déterminés par une technique ELISA décrite au paragraphe 2 - 4 - 1 - 2.

Après lecture des densités optiques sur un lecteur automatique de plaques (Molecular Devices), elles sont converties en concentration d'anticorps grâce à l'établissement d'une courbe étalon  $D.O. = f(\log(Ac))$ .

La courbe 35 a été réalisée avec un anticorps monoclonal purifié MARK-3 Allotype Kappa 1 A réf. 2888 (laboratoire BAZIN) par dilutions successives de la solution primaire à 1 mg/ml.

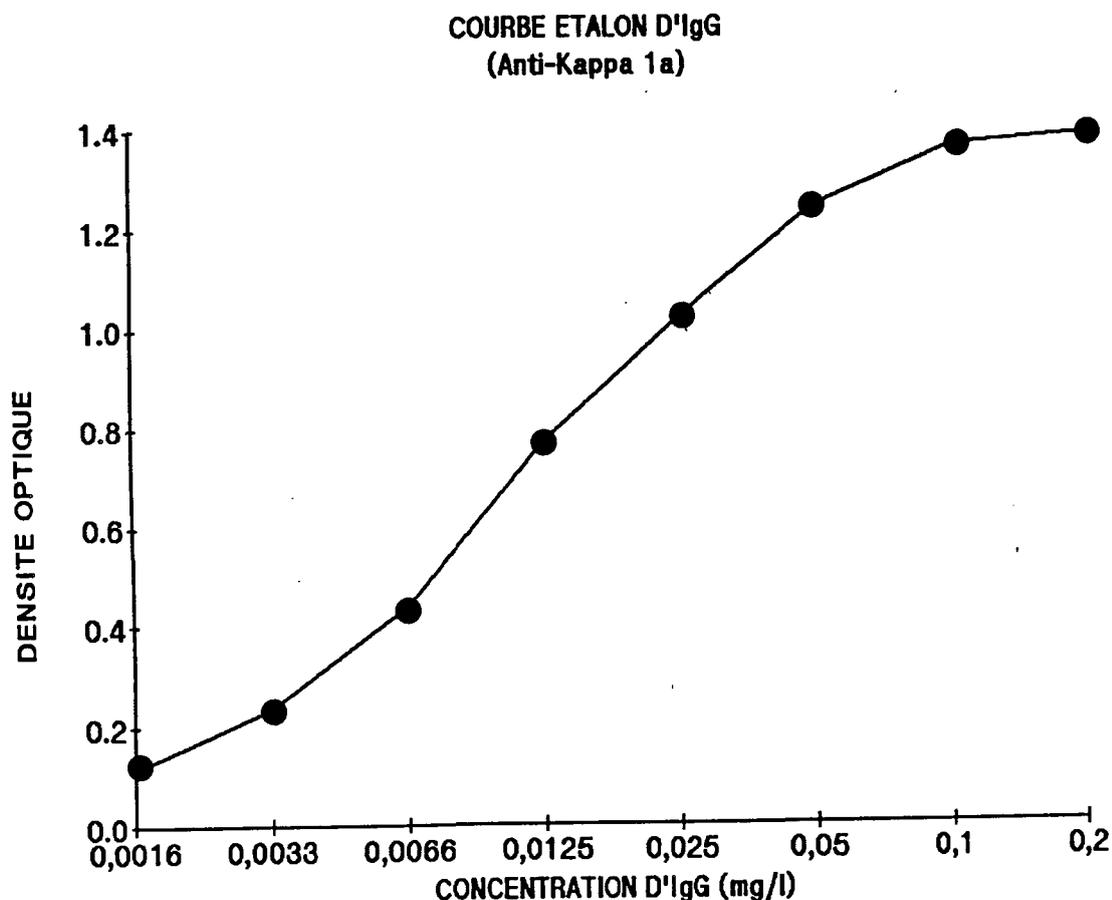


Figure 35 : Courbe étalon permettant la quantification des anticorps monoclonaux présents dans les surnageants de culture.

#### 2 - 6 - 2 - 5 Le comptage des cellules

Lorsque l'on décide d'arrêter la culture, généralement un comptage des cellules à l'intérieur de l'éponge est réalisé soit par :

- extraction simple des cellules,
- éclatement de ces cellules et récupération de leur noyau avant numération

Pour l'extraction simple des cellules, il suffit de faire passer, après vidange de l'éponge, du milieu de culture ou du PBS à grande vitesse de haut en bas dans l'éponge : une bonne partie des cellules se décrochent.

Ensuite, l'éponge est mise à tremper dans du PBS et pressée dans au moins trois bains successifs. Les différents milieux de récupération des cellules sont "poolés" et les comptages sont réalisés. La valeur trouvée est toutefois donnée par défaut par rapport au nombre réel des cellules.

L'autre technique consiste à faire éclater les cellules par une solution d'acide citrique 0,1M. Pour cela, après récupération des 250 ml de milieu contenus dans l'éponge (par vidange en ouvrant le robinet), on fait circuler 2 l d'acide citrique pendant 1 heure en circuit fermé puis 1/2 heure à grande vitesse robinet ouvert. L'éponge est ensuite passée dans 3 bains de PBS, pressée à chaque passage et les noyaux (colorés par une solution de cristal violet à 0,2 % dans l'acide citrique 0,1 M) sont comptés.

#### 2 - 6 - 2 - 6 La répartition des cellules à l'intérieur de la mousse

Afin de connaître la répartition des cellules dans le réacteur en fin de culture, une solution de liquide de Bouin est passée à l'intérieur de la mousse pendant 1/2 heure, puis celle-ci est déshydratée par des passages successifs de solutions à degré alcoolique croissant de 50 à 100°.

La mousse contenant toutes les cellules est alors sortie délicatement de son logement pour être incluse dans de la paraffine. Cette manipulation est réalisée par le Laboratoire d'Anatomie Pathologie de l'Hôpital de Brabois du Prof. FLOQUET que nous remercions. Des coupes sont ensuite effectuées sur la mousse incluse, colorées et fixées sur une lame de verre.

L'observation au microscope permet de distinguer les noyaux cellulaires colorés en bleu par l'hématoxyline de Harris et les cytoplasmes colorés en rose par l'éosine (Figure 36).



Figure 36 : Répartition des cellules à l'intérieur de l'éponge

## **2 - 7 LA PURIFICATION DES ANTICORPS**

### **2 - 7 - 1 Purification des liquides d'ascite**

La purification des liquides d'ascite a été effectuée par chromatographie d'affinité sur colonne de Lo-MK - 2 immobilisé. (Rat anti chaîne légère Kappa de souris) au laboratoire du Professeur H. BAZIN (immunologie expérimentale de l'Université catholique de Louvain à Bruxelles).

### **2 - 7 - 2 Purification des surnageants de culture**

Les surnageants ont été purifiés au même endroit selon la même technique après avoir été concentrés trois fois par ultrafiltration sur membrane à seuil de coupure 10 000 Da.



### **3 - RESULTATS - DISCUSSION**

#### **3 - 1 FABRICATION DE DIFFERENTES SOUCHES D'HYBRIDOMES**

Nous avons établi 3 souches stabilisées d'hybridomes sécrétant respectivement les anticorps monoclonaux suivants :

- anti  $\alpha$ 1 antitrypsine humaine ( $\alpha$ 1AT)
- anti  $\beta$  lactoglobuline bovine (B lac)
- anti Hormone lactogène placentaire humaine.

La souche anti  $\alpha$ 1 antitrypsine a été détruite quelques mois après sa stabilisation à cause d'une contamination mycoplasmique qui nous a obligé à éliminer toutes nos cellules stockées en azote liquide. Nous n'avons donc pas pu exploiter cet hybridome.

La souche anti B lactoglobuline a permis à un chercheur de notre laboratoire (Madame F. MATI) de travailler sur les récepteurs de cette protéine et d'en étudier les épitopes.

La souche anti-hormone lactogène placentaire a été utilisée par un chercheur (Monsieur H. MAAZOUZI) pour mesurer l'activité facteur de croissance de cette protéine et d'en étudier les épitopes et le mécanisme d'action.

Nous travaillons toujours sur ces lignées pour effectuer des études du métabolisme cellulaire ainsi que des essais de détoxification du milieu de culture (diminution du taux d'ammoniaque) en bioréacteur, en vue d'optimiser la production d'AcMc.

##### **3 - 1 - 1 Fabrication d'hybridomes anti $\alpha$ 1 antitrypsine**

6 souris femelles Balb C ont été immunisées à 3 semaines d'intervalle par 250 ug d' $\alpha$ 1 antitrypsine en présence d'adjuvant complet de Freund (ACF).

- 2 mois après la dernière injection, le taux d'anticorps des différentes souris a été contrôlé après prélèvement sanguin. 3 nouveaux rappels de 300

µg sont alors réalisés sur la souris la mieux immunisée en présence d'adjuvant incomplet (IFA).

- Le lendemain du 3ème rappel, la fusion des lymphocytes de la rate a été réalisée avec des cellules de myélomes dans un rapport d'une cellule de myélome pour 10 lymphocytes. Les cellules ont été distribuées à raison de  $2,8 \cdot 10^5$  cellules par puits dans 10 plaques de 96 puits en présence de macrophages.

- Après 9 jours, 18 % des puits présentaient un ou plusieurs clones.

- Au premier test ELISA, 40 % de ces puits testés donnaient une D.O. supérieure à 0,3.

- Les cellules des 16 puits les plus positifs ont été clonées.

- A l'observation microscopique, 430 puits issus de ces clonages présentaient un ou deux clones (28 %). Après le test ELISA n° 2, 275 d'entre eux (64 %) avaient une D.O. > 0,200.

- Les 8 puits les plus sécrétants ont été alors sélectionnés et 8 nouveaux clonages ont été réalisés. Après lecture de ces clonages et repérage des puits présentant cette fois un seul clone, le test ELISA n°3 donnait 72,5 % de puits ayant une D.O > 0,2.

- Les 5 puits les plus sécrétants ont été sélectionnés et 5 nouveaux clonages nous ont alors permis d'obtenir 75 puits monoclonaux dont les D.O. étaient comprises entre 1,5 et 2.

Parallèlement à chaque clonage, les cellules ont été sauvegardées par congélation et après le 3ème et le 4ème test ELISA, des injections de cellules à des souris ont été effectuées afin d'obtenir des liquides d'ascite.

Les différentes étapes de cette manipulation sont résumées dans le tableau 20 (Toutes les D.O. exprimées, le sont toujours déduction faite, du témoin négatif).

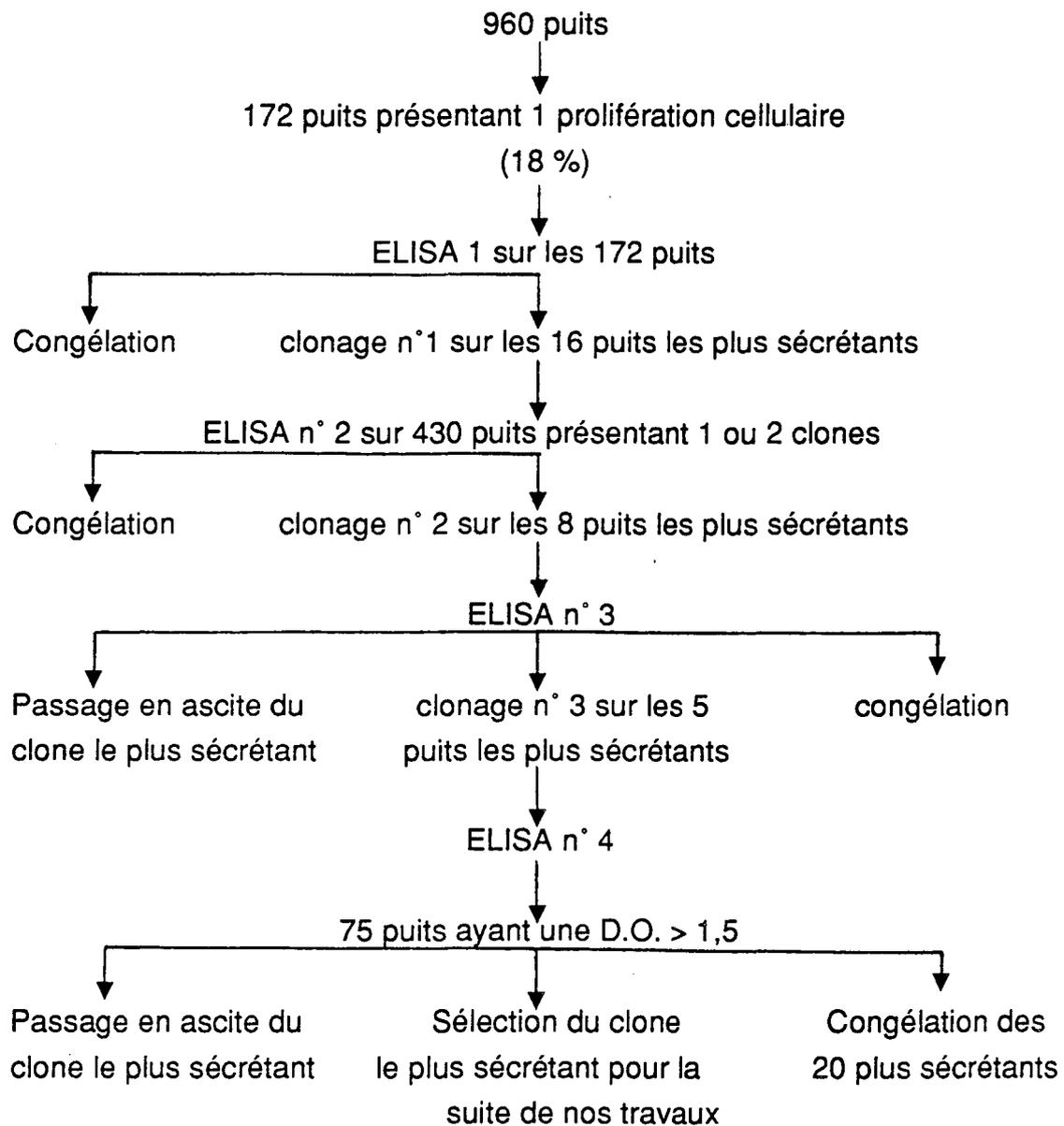


Tableau 20 : Résumé des différentes étapes de la fabrication d'hybridomes anti $\alpha$ 1 antitrypsine.

Lors de cette première fusion nous n'avons pas, comme dans toutes celles qui suivent, un suivi précis des sécrétions car notre numérotation était renouvelée lors de chaque clonage. Il ne nous a donc pas été possible de suivre l'évolution individuelle de chaque clone mais nous avons tout de même pu constater une augmentation graduelle des D.O. qui sont passées de 0,2 à 2.

### 3 - 1 - 2 Fabrication d'hybridomes anti $\beta$ lactoglobuline

La souche d'hybridomes anti  $\beta$  lactoglobuline que nous utilisons couramment dans notre laboratoire a été obtenue par fusion au PEG après immunisation "*in vivo*".

#### 3 - 1 - 2 - 1 Fusion après immunisation "*in vivo*"

##### 3 - 1 - 2 - 1 - 1 Protocole

- 5 souris femelles F1 de 8 semaines ont été immunisées. Elles ont reçu chacune 3 injections, à 3 semaines d'intervalle de 125  $\mu$ g de  $\beta$  lactoglobuline additionnée de 125  $\mu$ l d'adjuvant complet de Freund.

- 2 mois après la première injection la souris qui avait le taux d'anticorps le plus élevé a été restimulée par 250  $\mu$ g de  $\beta$  lactoglobuline mélangé à 125  $\mu$ l d'adjuvant incomplet de Freund.

- 2 jours avant la fusion, les cellules de myélome PIAO ont été cultivées en DMEM + 10 % SVF en flacon spinner et leur temps de doublement a été estimé à 18 h.

- la fusion, en présence de macrophages, a été effectuée avec  $1,2 \cdot 10^8$  lymphocytes et  $3 \cdot 10^7$  cellules de myélomes. Les cellules fusionnées ont été réparties dans 7 plaques de 96 puits à raison de  $4,6 \cdot 10^5$  cellules par puits en présence de milieu DMEM.

- 5 jours après la fusion, 58 % des puits présentaient un ou plusieurs clones. A 7 jours, ce pourcentage était passé à 80 %.

- Un premier test ELISA nous a permis de déterminer que 10,4 % des surnageants des puits avaient une densité optique supérieure à 0,2. Les cellules des 8 puits les plus sécrétants (DO de 0,38 à 0,65) ont été clonées.

- Après 10 jours d'incubation, 55 % des puits présentaient un ou plusieurs clones et 15 % d'entre eux n'en présentaient qu'un seul. Le test ELISA n° 2 qui a suivi, nous a donné 71 % de puits dont le surnageant avait une D.O. supérieure à 0,2.

- Les cellules des 8 puits les plus sécrétants (D.O. de 0,58 à 1,88) ont été à nouveau clonées et certaines d'entre elles ont été congelées (clone 2-4).

- Après 10 jours, 62 puits à un seul clone sont repérés (à ce stade seuls les puits à un seul clone sont pris en compte). 98 % d'entre eux donnaient des D.O. > 0,3 (ELISA n° 3)

Les cellules de l'un d'entre eux (clone 2-6-2) ont alors été multipliées et injectées à des souris en vue d'une production d'ascite.

Les 10 plus sécrétants (D.O. > 1,5 à 1,9) ont alors subi un 3ème clonage.

Un 4ème test ELISA, sur 84 puits ne présentant qu'un seul clone a révélé que la D.O. de 81 d'entre eux était supérieure à 1. Les 12 plus sécrétants (D.O. > 1,6) ont été multipliés et congelés. Le plus sécrétant d'entre eux a été multiplié et utilisé par F. MATI (thèse de Doctorat, 1992).

Ces différentes étapes sont résumées dans les tableaux 21 et 22.

Nous pouvons remarquer :

- Qu'à l'exception du 5-7-10-3, les 6 hybridomes les plus sécrétants sont issus du puits qui présentait la plus forte sécrétion dès le départ (D.O. = 0,921).

- Le puits n° 2 (D.O. = 0,683) nous a permis d'obtenir 4 hybridomes stables.

- Les puits n° 3 et 4 dont les D.O. étaient peu différentes de celles du puits n° 2 (D.O. = 0,649 et 0,646) ont perdu leur sécrétion dès le premier clonage.

- Le n° 5 s'est maintenu jusqu'à la fin des clonages. Il est donc assez périlleux de ne sélectionner que 2 ou 3 clones lors de chaque test ELISA.

La multiplication du nombre de clonages rend donc ce travail très lourd et il est prudent de prévoir 3 mois entre le jour de la fusion et le moment où l'on obtient un hybridome que l'on peut supposer stable, c'est-à-dire qui ne va pas perdre sa capacité de sécrétion. De plus, on ne sait pas encore si les clones obtenus sont des hybridomes différents, soit par le patrimoine

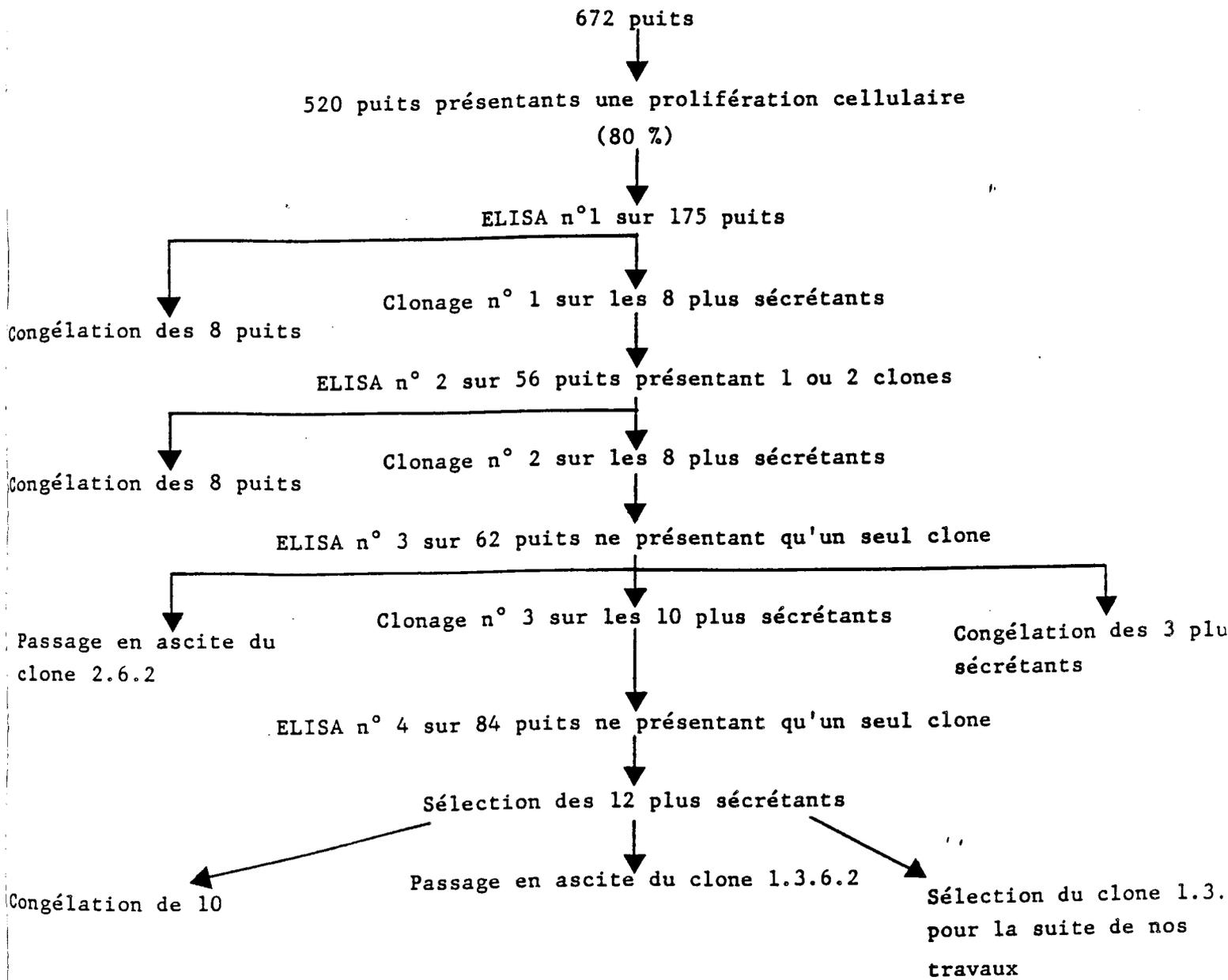


Tableau 21 : Résumé des différentes étapes de la fabrication d'hybridomes anti- $\beta$  lactoglobuline après immunisation "in vivo".

ELISA 1	D0	ELISA 2	D0	ELISA 3	D0	ELISA 4	D0		
1	0,921	→ 1.1	: 1,88	→ 1.1.3	: 1,73	→ 1.1.3.5	: 1,81		
		→ 1.2	: 1,82	→ 1.2.8	: 1,65	→ 1.2.8.4	: 1,83		
						→ 1.2.8.10	: 1,75		
		→ 1.3	: 1,82	→ 1.3.6	: 1,68	→ 1.3.6.1	: 1,88		
				→ 1.3.7	: 1,65	→ 1.3.6.2	: 1,87		
						→ 1.3.7.9	: 1,75		
		→ 1.4	: 1,73	→ 1.4.5	: 1,72	→ 1.4.5.6	: 1,80		
		2	0,683	→ 2.6	: 0,89	→ 2.6.1	: 1,89	→ 2.6.1.12	: 1,46
						→ 2.6.2	: 1,82	→ 2.6.2.11	: 1,61
						→ 2.6.4	: 1,72	→ 2.6.4.8	: 1,77
				→ 2.6.9	: 1,62	→ 2.6.9.7	: 1,78		
3	0,649								
4	0,646	→ 4.5	: 1,18						
5	0,643	→ 5.7	: 0,82	→ 5.7.10	: 1,50	→ 5.7.10.3	: 1,84		
6	0,523								
7	0,485	→ 7.8	: 0,57						
8	0,384								

Tableau 22 : Evolution des sécrétions (exprimées en D0) au cours des différents clonages d'hybridomes anti-β lactoglobuline.

génétiq ue, soit par leur anticorps sécrété, car aucune analyse génétique et/ou immunologique n'a été réalisée pour caractériser les différents anticorps produits.

A ce stade, il est à noter que les congélations effectuées aux différentes étapes de cette expérience, si elles sont sécurisantes, ne sont pas très utiles car les hybridomes nouvellement créés, si ils sont faciles à cultiver après décongélation, perdent souvent leur pouvoir de sécrétion.

Par contre, les liquides d'ascites obtenus avec ces mêmes jeunes hybridomes ont généralement des concentrations en anticorps importantes.

### *3 - 1 - 2 - 1 - 2 Incidence de la durée de l'immunisation et du milieu de fusion*

Cette fusion nous ayant donné de bons résultats, nous avons voulu étudier l'influence du temps écoulé entre les premières immunisations et l'injection de rappel. Nous avons donc travaillé sur le même lot de souris F1 femelles, mais en effectuant le rappel 7 mois après la première injection (au lieu de 2 mois).

De plus, nous voulions savoir si le milieu de base de la fusion influait sur son taux de réussite. Nous avons utilisé 2 souris et réalisé 2 fusions simultanées, l'une en milieu RPMI et l'autre en milieu DMEM que nous avons comparée avec la précédente réalisée 5 mois auparavant.

Nous avons pu établir le tableau comparatif n° 23 :

	% de puits présentant une pousse cellulaire	% de puits dont le surnageant possède une DO > 0,2
Fusion n° 1 Rappel après 2 mois en DMEM	80	11
Fusion n° 2 Rappel après 7 mois en DMEM	76	13
Fusion n° 3 Rappel après 7 mois en RPMI	72	16

Tableau 23 : Comparaison des rendements de fusion en fonction du temps d'immunisation et du milieu de culture.

Ces résultats font apparaître que dans le même milieu (DMEM) une différence de cinq mois entre les 2 rappels n'apporte pas de changement notable au niveau du rendement de fusion tant au point de vue des puits présentant une pousse cellulaire (76 % - 80 %), qu'au point de vue des puits dits "positifs" c'est-à-dire dont le surnageant présente une D.O. > 0,2 (13 % - 11 %).

Une souris bien immunisée le reste longtemps et une simple injection de rappel permet d'obtenir une bonne réponse. Ces différences sont d'ailleurs d'autant moins significatives que chaque souris réagit légèrement différemment à une même dose d'antigène. Il est vrai que dans cette expérience, nous n'avons pas comparé les taux d'Ac présents avant le rappel. Ces souris ayant déjà subi un prélèvement sanguin lors du choix de l'animal à sacrifier pour la première fusion.

Nous avons donc effectué nos autres expériences avec une injection de rappel environ 2 mois après la première immunisation.

Quant au milieu de fusion, les résultats étant là aussi comparables (72 % contre 80 % pour la croissance et 16 % contre 11 % pour la sécrétion), nous avons choisi de continuer nos fusions avec le milieu DMEM.

### 3 - 1 - 2 - 2 Fusion après immunisation "*in vitro*"

Notre souhait étant de réaliser des fusions après immunisations "*in vitro*", plus rapides et moins coûteuses en antigène, nous avons essayé tout d'abord de déterminer la concentration optimale en antigène.

#### 3 - 1 - 2 - 2 - 1 - Etude de la relation concentration en antigène/nombre de puits sécrétants

Cette première étape, fondamentale pour la suite de nos travaux, a été réalisée sur 3 souris femelles F1 (BalbC/C57) âgées de 8 semaines.

Il fallait effectuer simultanément les 6 immunisations et les 6 fusions dans des conditions parfaitement similaires en faisant varier uniquement la quantité d'antigène.

Nous avons voulu couvrir en une fois un champ assez large et avons choisi les concentrations suivantes : 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 20 et 50 ug/ml.

Après avoir sacrifié 3 souris, nous avons récupéré et poolé les lymphocytes de leur rate et avons obtenu  $3,6 \cdot 10^8$  cellules que nous avons réparties dans 6 flacons ( $6 \cdot 10^7$  cellules par flacon).

Nous avons ajouté dans chaque flacon :

- 15 ml de "milieu thymocytes"
- 15 ml de SDMEM
- 0,5 ml de sérum de lapin
- et l'antigène à différentes concentrations.

Après 5 jours d'immunisation dans l'étuve à 8 % de CO<sub>2</sub> et à 37°C , les lymphocytes ont été comptés et fusionnés avec les cellules de myélomes. Après 5 jours de culture "*in vitro*" le taux de viabilité des lymphocytes était seulement d'environ 50 %.

Les cellules fusionnées ont été réparties en plaque de 96 puits, en présence de macrophages, à une densité d'environ  $2.10^5$  cellules par puits.

Après 7 jours d'incubation, les puits présentant une pousse cellulaire ont été repérés et le test ELISA effectué au 10ème jour. Les résultats de ces différentes fusions sont rassemblés dans le tableau 24 :

Concentration en Ag en $\mu\text{g/ml}$	Puits présentant une pousse cellulaire en %	% age puits sécrétants / puits testés	D.O. du puits le plus sécrétant
0,01	38,5	4,4	0,25
0,1	41,7	15	0,27
1	31,2	70	0,31
10	37,3	80,5	0,30
20	38,4	0	0
50	19,8	0	0

Tableau 24 : Pourcentage de réussite d'une fusion en fonction de la dose d'antigène utilisé pour l'immunisation "*in vitro*".

Il est donc à noter que, mis à part la concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  qui semble diminuer le rendement de fusion, de 0,01 et 20  $\mu\text{g/ml}$  d'antigène le pourcentage de puits contenant des clones est tout à fait comparable.

Par contre, il semble clair que la concentration optimale pour obtenir un maximum de puits sécrétants soit comprise entre 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$  pour cet antigène. Nous utiliserons donc pour la suite de nos travaux la concentration de 8  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$  lactoglobuline.

Cette étude n'a pas été poursuivie au-delà puisque nous avons déjà stabilisé une souche d'hybridome anti B lactoglobuline. Par contre, le clone ayant une D.O. à 0,315 a été multiplié et les cellules injectées à une souris. Après 6 jours, un liquide d'ascite s'est développé mais s'est révélé négatif lors du test ELISA. Il est probable que les cellules n'étaient pas suffisamment "stabilisées" et qu'elles ont perdu rapidement leur pouvoir de sécrétion.

### 3 - 1 - 2 - 2 - 2 Première fusion après immunisation "in vitro"

Notre première fusion après immunisation "in vitro " a été réalisée sur une souris femelle F1 de 10 semaines.

Les cellules de la rate ont été placées dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup> en présence de 15 ml de milieu thymocyte, 10 ml de milieu SDMEM, 2,5 % de sérum de lapin et 200 ug de B lactoglobuline filtrée (8 ug/ml).

Après 5 jours d'incubation à 37°C, 8 % de CO<sub>2</sub>, les lymphocytes ont été dénombrés :  $5 \cdot 10^7$  (une rate contenant au moins  $1 \cdot 10^8$  lymphocytes, on constate une perte de 50 % après 5 jours de culture "in vitro ")

Ils ont été fusionnés avec  $2,5 \cdot 10^7$  cellules de myélomes (dont le temps de doublement était de 16,6 h) et répartis dans 5 plaques à raison de  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puits et placés à 37°C, 8 % de CO<sub>2</sub>.

Après 6 jours de culture, 30 % des puits présentaient une pousse cellulaire (au lieu de 80 % après immunisation "in vivo "). Ils ont été testés par un test ELISA.

Les étapes suivantes sont les mêmes que lors de la fusion après immunisation "in vivo " :

- 6 clonages ont été effectués sur les 6 puits ayant une sécrétion > 0,2 D.O.

- Après le 2ème test ELISA, 6 nouveaux clonages ont été réalisés sur les 6 puits présentant une D.O. > 0,1.

- Au 3ème clonage, tous les puits avaient perdu leur sécrétion.

Les tableaux 25 A et 25 B relatent le suivi du travail et l'évolution des sécrétions. Le principe de la dénomination des clones reste le même que précédemment.

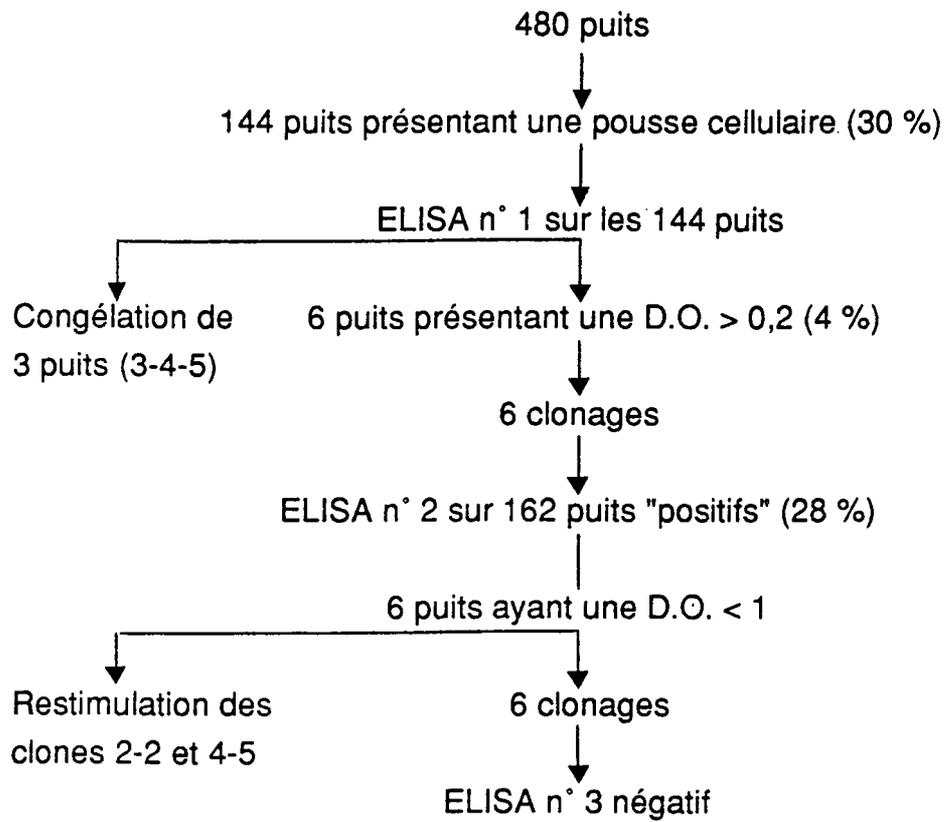


Tableau 25 A : Résumé du suivi de la fusion après immunisation "*in vitro*".

ELISA n° 1 D.O.		ELISA n° 2 D.O.		ELISA n° 3 D.O.
1	0,91			
2	0,55	→ 2.1 : 0,24		0
		→ 2.2 : 0,21		0
		→ 2.4 : 0,14		0
3	0,50 .			
4	0,22 .	→ 4.3 : 0,15		
		→ 4.5 : 0,14		0
		→ 4.6 : 0,11		0
5	0,20 .			
6	0,19			

Tableau 25 B : Evolution des sécrétions au cours des différents clonages lors de la fusion après immunisation "*in vitro*".

La comparaison de 2 fusions, l'une après immunisation en "*in vivo*" et l'autre "*in vitro*" est assez intéressante.

- Le pourcentage de puits présentant une pousse cellulaire passe de 80 % à 30 %.

- De plus 4 % seulement de ces clones (2 et 3) sont sécrétants (contre 10 à 16 %).

- Après le premier clonage, seuls 2 puits permettent de retrouver des cellules sécrétant encore. Et si cela se comprend pour les clones 5 et 6 qui avaient dès le départ des sécrétions très faibles, il est plus surprenant que le

clone n° 1, qui avait une sécrétion nettement supérieure aux autres, soit devenu négatif aussi rapidement.

Ayant perdu toute sécrétion après l'ELISA 3, nous avons tenté de redécongeler les puits 3, 4 et 5. Mais, encore une fois, après 3 semaines de congélation, nous n'avons pu que constater la perte de sécrétion.

#### *3 - 1 - 2 - 2 - 3 Essai de restimulation des clones*

Devant la chute rapide des sécrétions lors de l'ELISA 2, en plus des 6 clonages, nous avons tenté de réaliser une restimulation de la sécrétion sur les clones 2-2 et 4-5. Pour cela, après les avoir fait proliférer, ils ont été aliquotés chacun dans 3 puits contenant 1,5 ml de milieu TCM et mis en présence 1 ou 10 ug de B lactoglobuline diluée dans 0,5 ml de milieu SDMEM pendant 5 jours.

Cet essai est resté sans résultat. Les sécrétions ne sont pas réapparues.

#### *3 - 1 - 2 - 2 - 2 - 4 Essai de diminution du temps d'incubation des lymphocytes*

Le mauvais état des lymphocytes après 5 jours de culture "*in vitro*" est sans doute l'élément déterminant le petit nombre de clones positifs lors du premier ELISA mais il n'explique sans doute pas le fait que les rares clones sécrétants deviennent négatifs après le deuxième clonage.

Nous avons essayé de réduire ce temps d'incubation de 3 à 5 jours. Les lymphocytes sont, en effet, restés en meilleur état, mais nous n'avons obtenus aucun clone sécrétant.

#### *3 - 1 - 2 - 2 - 5 Essai d'augmentation de la dose d'antigène*

Les sécrétions lors de la première fusion étant restées relativement faibles, nous avons tenté, tout en restant dans la fourchette optimale déterminée au paragraphe 3-1-2-2-1, d'augmenter la dose d'antigène. Nous sommes donc passé, pour l'immunisation, de 8 à 12 ug/ml de B lactoglobuline.

- 307 puits où il y avait pousse cellulaire (80 %)
- 61 puits présentant 1 sécrétion supérieure à 0,3 de D.O. (20 %)
- Les 8 puits les plus sécrétants ont été clonés :

1 : 2,38	5 : 1,05
2 : 1,98	6 : 0,98
3 : 1,48	7 : 0,93
4 : 1,29	8 : 0,74

- Mais n'ont donné aucune réponse lors de l'ELISA suivant.

Les sécrétions étaient lors de cette expérience très nettement supérieures à celles de la précédente puisqu'elles allaient jusqu'à 2,3 mais un seul clonage a suffi pour qu'elles disparaissent toutes. Nous n'avons trouvé aucune explication à ce phénomène.

Comme l'on fait de nombreux auteurs, nous avons pensé ajouter un glycopeptide pour essayer de stabiliser la sécrétion.

### *3 - 1 - 2 - 2 - 6 Fusion après ajout de MDP*

Cette expérience a été réalisée sur une souris Balb C femelle âgée de trois mois.

Le milieu d'immunisation avait la composition suivante :

- B lactoglobuline 300 ug (10 ug/ml)
- MDP 600 ul (20 ul/ml)
- TMC 15 ml
- SDMEM 15 ml
- Sérum de lapin 0,5 ml
- Lymphocytes  $3,4 \cdot 10^8$

Les lymphocytes lors des fusions précédentes étant très altérés (ou morts à 50 %), nous avons supposés qu'en présence de MDP, stimulant la réponse immunitaire, il était possible de les cultiver seulement 3 jours.

Nous avons, pour cette raison et au vu du nombre important de lymphocytes de cette rate, augmenté légèrement la concentration de l'antigène (10 µg au lieu de 8).

Après 3 jours de culture, nous n'avions plus que  $6,4 \cdot 10^7$  lymphocytes qui ont été fusionnés avec des cellules de myélomes dont le temps de doublement était de 13 heures.

Les cellules fusionnées ont été réparties dans 7 plaques à raison de  $2 \cdot 10^5$  cellules par puits.

La succession d'ELISA et de clonages, toujours la même est résumée dans le tableau 26 :

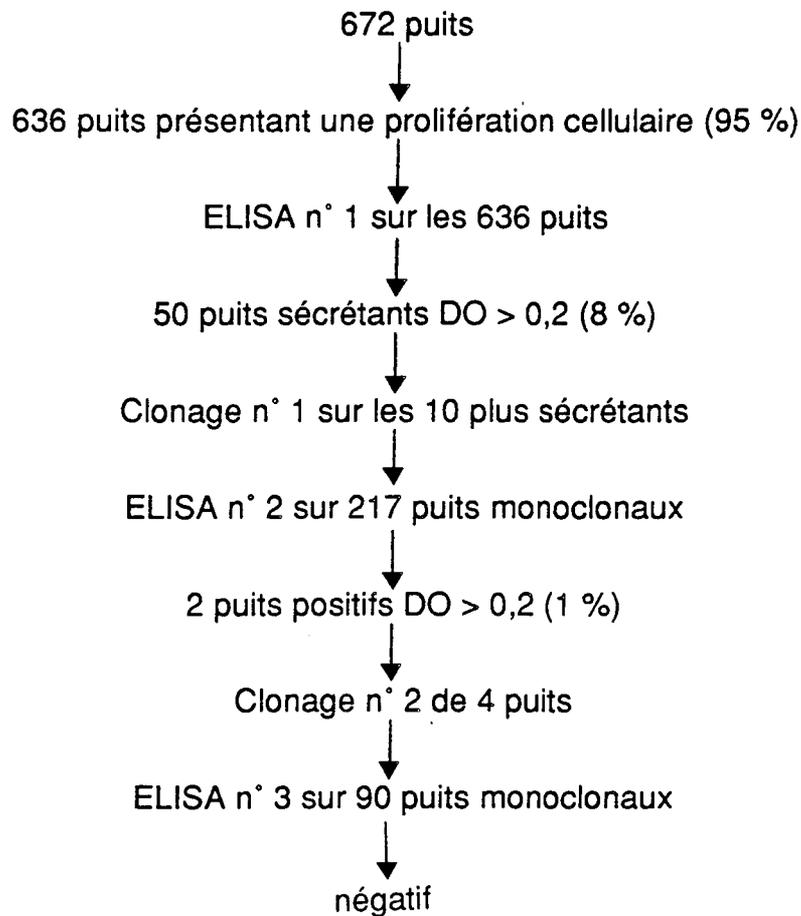


Tableau 26 : Résumé des différentes étapes de l'expérience.

L'évolution des sécrétions peut être résumée ainsi :

ELISA n° 1 D.O.	ELISA n° 2 D.O.		ELISA n° 3 D.O.
1 : 0,767			
2 : 0,726	2.3	: 0,148	0
3 : 0,695	3.4	: 0,143	0
4 : 0,665	4.1	: 0,929	0
5 : 0,647			
6 : 0,584			
7 : 0,515			
8 : 0,514			
9 : 0,510	9,2	: 0,199	0
10 : 0,507			

Tableau 27 : Evolution des sécrétions au cours des 3 tests ELISA suivant la fusion après immunisation "*in vitro*" en présence de MDP.

La présence de MDP ne semble pas améliorer en quoi que ce soit la stabilisation de la sécrétion de ces jeunes hybridomes et nous avons alors voulu tenté ce qu'on pourrait appeler une immunisation mixte ; c'est-à-dire, d'abord une immunisation "*in vivo*" suivie d'une immunisation "*in vitro*".

### 3 - 1 - 2 - 3 Fusion après immunisation mixte

Cette immunisation "*in vivo*" a été réalisée sur une souris Balb C femelle âgée de 12 semaines, avec 200 µg de β lactoglobuline injectés en présence de CFA en intrapéritonéal.

Après 10 jours, les lymphocytes de la rate ont été récupérés selon le protocole habituel et l'immunisation "*in vitro*" a été réalisée dans le milieu suivant :

- 15 ml de milieu TCM
- 15 ml de milieu SDMEM
- 0,5 ml de sérum de lapin
- 400 µl de MDP (13 µl/ml)
- 300 µg de B lactoglobuline (10 µg/ml)
- $1,4 \cdot 10^8$  lymphocytes

Après 3 jours d'incubation à 37°C avec 8 % de CO<sub>2</sub> la fusion a été réalisée avec 3,5.10<sup>7</sup> cellules de myélomes dont le temps de doublement était de 15 h.

Nous avons diminué ici le rapport lymphocytes/myélomes afin de diminuer les risques de fusion myélome-myélome.

Les cellules fusionnées ont été réparties dans 5 plaques à raison de 2,8.10<sup>5</sup> / puits.

70 % des puits ont présenté une pousse cellulaire.

14 % d'entre eux avaient une D.O. > 0,2.

Les 10 plus sécrétants (D.O. de 0,93 ---> 0,29) ont été clonés. L'ELISA qui a suivi n'a plus montré de sécrétions.

Ce "compromis" "*in vivo* - *in vitro*" n'a donc pas, lui non plus, résolu nos problèmes et nous nous sommes à nouveau tournés vers l'immunisation "*in vivo*" pour fabriquer une nouvelle souche cellulaire nécessaire aux travaux de notre laboratoire.

### **3 - 1 - 3 Fabrication d'hybridomes anti-hormone placentaire lactogène**

Nous avons, dans ce cas, travaillé avec 6 souris femelles F1 de 8 semaines auxquelles nous avons injecté, toujours en intrapéritonéale, 3 fois 35 µg d'hPL + ACF, puis 6 mois après 250 µg d'hPL + IFA à celle qui présentait le taux d'anticorps le plus important.

1,3.10<sup>8</sup> lymphocytes ont été fusionnés avec 4.10<sup>7</sup> cellules de myélomes dont le temps de doublement était de 15 h. Les cellules ont été réparties à raison de 3,2-10<sup>5</sup> cellules fusionnées par puits.

Nous avons obtenu 60 % de puits présentant des clones. 156 d'entre eux ont été testés.

La démarche de sélection est résumée dans le tableau 28 :

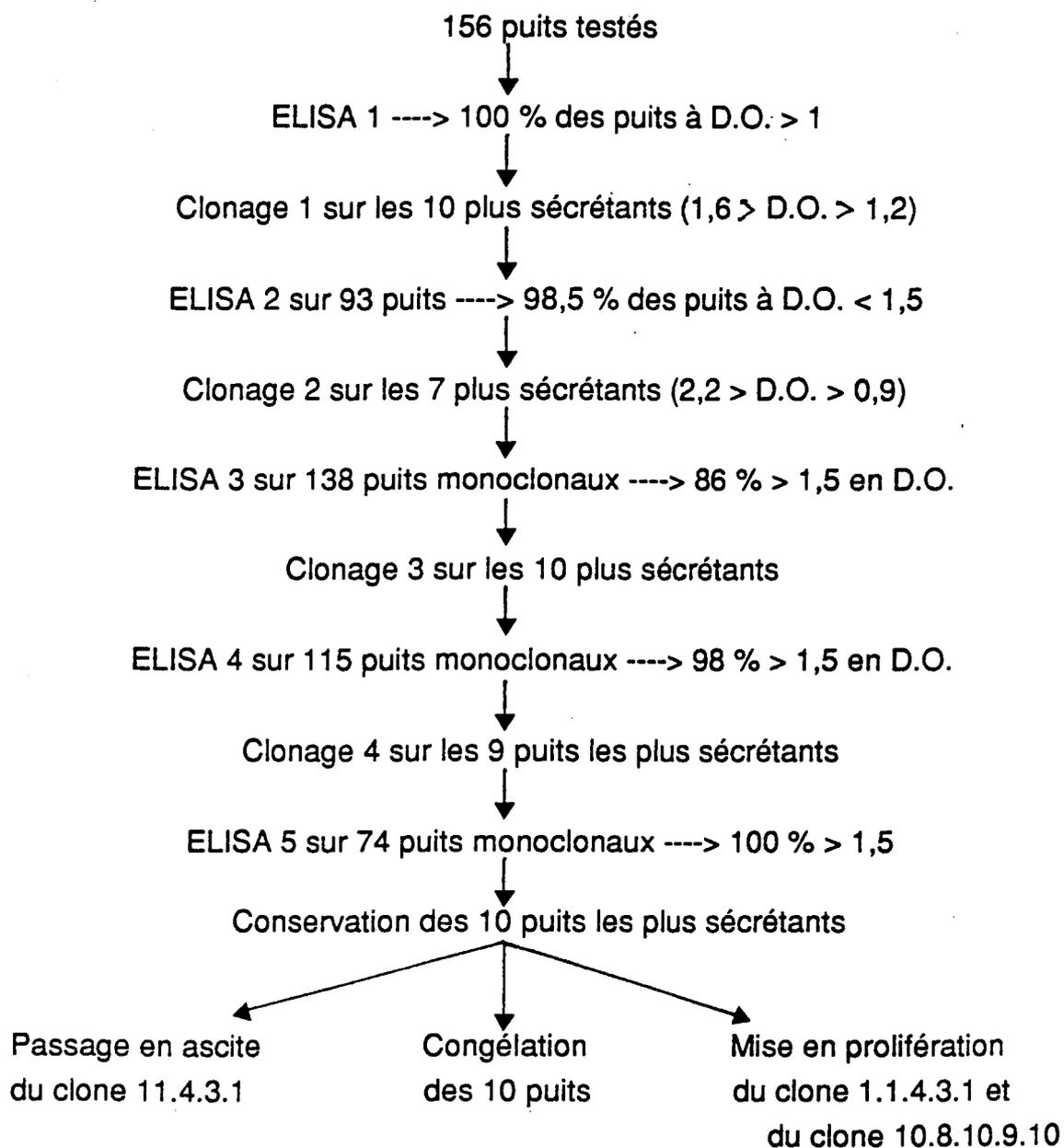


Tableau 28 : Résumé des différentes étapes de la création des hybridomes anti-hPL.

Cette fusion nous a donné d'excellents résultats : les densités optiques ont été très élevées dès le départ de la manipulation et le sont restées jusqu'au 5ème ELISA (Tableau 29).

Après le 3ème ELISA, on peut remarquer que tous les clones sont issus soit du clone n°1 (le plus sécrétant), soit du clone n° 10 (le moins sécrétant). Donc, là aussi, nous avons la preuve qu'il est difficile de sélectionner à priori les 3 ou 4 clones les plus sécrétants afin d'alléger les séries d'ELISA et de clonages.

ELISA n° 1		ELISA n° 2		ELISA n° 3		ELISA n° 4		ELISA n° 5	
	D.O.		D.O.		D.O.		D.O.		D.O.
1	: 1,601	→ 1.1	: 2,22 *	→ 1.1.4	: 1,75	→ 1.1.4.1	: 1,73	→ 1.1.4.1.7	: 1,
						→ 1.1.4.2	: 1,67	→ 1.1.4.1.9	: 1,
						→ 1.1.4.3	: 1,63	→ les 6 plus sécrétants	
		→ 1.2	: 2,20	→ 1.1.6	: 1,74			→ de 1.1.4.3.1 à 1.1.4.3.	
				→ 1.2.3	: 1,77	→ 1.2.3.5	: 1,30	→ 1.2.3.7.10 : 1.	
						→ 1.2.3.7	: 1,25		
		→ 1.3	: 2,16 *	→ 1.2.9	: 1,68				
				→ 1.3.1	: 1,79	→ 1.3.1.8	: 1,23		
		→ 1.4	: 2,11	→ 1.3.7	: 1,71	→ 1.3.7.4	: 1,34		
		→ 1.9	: 1,83	Essai de clonage sans macrophages - Echec					
				→ 1.9.5	: 1,75				
				→ 1.9.8	: 1,70	→ 1.9.8.6	: 1,26		
2	: 1,49								
3	: 1,42								
4	: 1,41								
5	: 1,40								
6	: 1,32								
7	: 1,31								
8	: 1,28	→ 8.10	: 0,90 *						
9	: 1,26								
10	: 1,19	→ 10.5	: 2,06 *	plaque contaminée					
		→ 10.6	: 2,03 *	→ 10.6.2	: 1,78				
		→ 10.7	: 2,03 *	aucun clone					
		→ 10.8	: 2,02 *	→ 10.8.10	: 1,53	→ 10.8.10.9	: 1,20	→ 10.8.9.10	: 1

Tableau 29 : Suivi des D.O. au cours des différents tests ELISA lors de la création d'anticorps monoclonaux anti-hPL après immunisation *in vivo*

Le suivi des sécrétions au cours du temps fait ressortir que le clone 1.1.4.3.1 est toujours resté très élevé en D.O. et on peut penser que la régularité dans la sécrétion est une preuve de la stabilité future des hybridomes.

Nous travaillons toujours avec cette souche d'hybridomes qui est en effet facile à cultiver et bien sécrétante.

	Concentration en antigène lors de l'immunisation	Nombre de cellules par puits lors de la fusion	%age de puits présentant une pousse cellulaire en %	Pourcentage de puits ayant un surnageant dont la D.O. est supérieure à 0,2				
				ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5
ATT	3 x 250 µg + 3 rappels de 300 µg	1,2.10 <sup>5</sup>	18	40	64	72,5	15,6 > 1,5	
hPL in vivo	3 x 35 µg + 250 µg après 3 mois	3,2.10 <sup>5</sup>	60	100 > 1	98,5 > 1,5	100 > 1,5	88 > 1,5	100 > 1
β n° 1	3 x 125 µg + rappel 250 µg après 2 mois	4,6.10 <sup>5</sup>	80	10,4	71	98 10 clones > 1,5	96,4 > 1	
β n° 2	3 x 125 µg + rappel 250 µg après 7 mois	2,7.10 <sup>5</sup>	76	12,5	EXPERIENCE ARRETEE			
β en RPMI	3 x 125 µg + rappel 250 µg après 7 mois	2,7.10 <sup>5</sup>	90	16	EXPERIENCE ARRETEE			
β in vitro n° 1	8 µg/ml	1,5.10 <sup>5</sup>	29	4	3,7	0		
β in vitro n° 2	12 µg/ml	1,3.10 <sup>5</sup>	80	20	0			
β in vitro MDP	10 µg/ml	2.10 <sup>5</sup>	70	80	1	0		
β in vitro n vivo + n vitro	10 µg/ml	2,8.10 <sup>5</sup>	96,8	14	0			

Tableau 30 : Récapitulatif des différentes fusions réalisées.

### 3 - 1 - 4 Synthèse des résultats des différentes fusions et discussion

Le tableau n°30 résume toutes les fusions que nous avons réalisées. Ce bilan nous permet de faire un certain nombre de constatations et d'émettre quelques suggestions qui devraient nous permettre d'optimiser les techniques, surtout en ce qui concerne l'immunisation "*in vitro*".

#### "*In vivo*"

- Le fait de faire subir à une souris trois injections de rappel semble ne rien apporter ni au rendement de fusion, ni au nombre de puits positifs, ni à leur sécrétion, encore qu'il soit assez difficile de comparer nos trois immunisations puisqu'elles ont été faites avec des antigènes différents.

- Quant aux diverses expériences réalisées avec la beta lactoglobuline, mis à part le fait que de toute évidence, on obtienne de bien meilleurs résultats en "*in vivo*" qu'en "*in vitro*", il semble que le milieu de fusion n'intervienne pas de façon fondamentale.

#### "*In vitro*"

Si l'on compare les deux fusions après immunisation *in vitro*, il semblerait qu'en passant de 8 à 12 µg / ml, on obtienne 5 fois plus de puits sécrétants. On peut s'interroger alors sur le fait que cette sécrétion disparaisse dès le premier clonage.

L'immunisation a-t-elle été trop peu importante et donc le nombre de cellules immunisées trop faible?

Les clones ont-ils perdu leur sécrétion très rapidement par réarrangements chromosomiques?

Pour essayer de résoudre ce problème, plusieurs solutions peuvent être envisagées:

## 1 - Optimisation de l'immunisation

\* Puisque l'augmentation de la concentration en antigène mis au contact des lymphocytes n'améliore pas la stabilité de la sécrétion, peut-être faudrait-il étudier le temps de contact des lymphocytes avec l'antigène. Il est vrai que la réduction de 5 à 3 jours que nous avons tentée ne nous a pas permis d'obtenir des clones sécrétants. Pourtant Boerner et al. ( 1991) ont montré que les meilleurs rendements étaient obtenus avec une mise en contact comprise entre 2 et 5 jours. Il faudrait donc renouveler cette expérience afin d'obtenir des clones sécrétants et étudier ensuite leur stabilité au cours du temps.

\* L'addition d'adjuvant au cours de l'immunisation afin de stimuler la réaction immunologique est souvent citée dans la littérature. Dans notre cas, la présence de MDP avec une dose d'antigène intermédiaire ( 10ug ) a permis une augmentation spectaculaire du nombre de puits sécrétants lors du premier ELISA ( 80%), taux jamais atteint après une immunisation "*in vitro*". Mais là aussi les sécrétions ont rapidement chuté puisqu'il ne reste que 1% de puits positifs lors du second ELISA et plus aucun au suivant.

Ceci est sans doute dû au fait qu'après une immunisation de 5 jours on obtienne presque exclusivement des isotypes IgM ( Boer et al. 1989 ) beaucoup moins stables que les IgG. Il faudrait pouvoir prolonger jusqu'à 8 jours la stimulation, tout en gardant une bonne viabilité des lymphocytes, pour obtenir des IgG (Takanaski et al. 1987 ).

Beaucoup d'autres adjuvants ont été testés semble-t-il avec succès : L'ester méthyl leucyl leucine ( Borrebaeck 1989 ), le sulfate de dextran ( Schelling 1986), le milieu conditionné en thymocytes que nous avons d'ailleurs utilisé.

\* L'addition de cytokines est sans aucun doute une expérience à réaliser. En effet, Blank et al. ( 1991) ont obtenu quatre souches différentes d'hybridomes stables à la suite d'une immunisation *in vitro* en présence d'interleukine 2. Cette interleukine favorise *in situ* la formation de lymphocytes en lymphoblastes. Nous pouvons donc supposer qu'en l'utilisant *in vitro*, l'immunisation serait meilleure. Il serait intéressant de les utiliser lors de nos futures expériences.

Danielsson (1987) a lui aussi étudié l'effet de différentes cytokines et a démontré que le s PWMT et l'IL2 augmentaient le nombre de clones sécrétants stables mais qu'il n'en était rien pour l'IL1 et le BCDF qui, eux, restent sans effet.

\* L'immunisation intrasplénique qui semble, d'après Maeno(1988), donner d'excellents résultats avec des doses d'antigène de l'ordre de 100 ng, pourrait être elle aussi envisagée.

\* La restimulation *in vitro* des cellules de la rate immunisées *in vitro* n'a pas donné de résultats encourageants au cours de notre expérimentation. Pourtant, Erich (1989) a montré que cette technique, en présence de MDP avait permis d'obtenir 17 hybridomes producteurs d'IgG spécifiques au lieu de 6. C'est peut-être le fait que nous n'ayons pas ajouté ce dipeptide qui nous a conduits à l'échec.

## 2/ Stabilisation des sécrétions.

Pour obtenir une plus grande stabilité des clones sécrétants, plusieurs stratégies peuvent être envisagées:

\* Le passage rapide des clones positifs en ascite après le premier clonage permettrait peut être l'évolution des immunoglobulines d'isotype IgM à l'isotype IgG plus stable. Bien sûr se pose le problème de la présentation de l'antigène à une cellule lymphoblastoïde dont on ne connaît rien des récepteurs de surface.

\* Jalfré (1981) quant à lui conseille plutôt une multiplication des cellules issues d'un même clone après le premier clonage afin de favoriser l'obtention d'un génotype stable. Bien sûr il reste nécessaire de les recloner par la suite mais ce procédé permet d'éliminer rapidement les cellules qui de toute façon perdraient leur sécrétion au cours du temps.

Quoi qu'il en soit, l'étape la plus critique semble être le clonage.

\* La stabilisation des sécrétions dépend en effet de la séparation rapide des clones sécrétants des non sécrétants. Il est important comme le suggère Leitzke et al. (1985) d'essayer de distinguer les clones provenant d'une seule cellule de ceux issus de plusieurs par un examen microscopique survenant le plus tôt possible. Underwood et al. (1988) ont démontré que les changements de spécificité d'un anticorps anti-influenza étaient dus à la présence de populations cellulaires mixtes mal sélectionnées par cette technique suivie de clonages. Cette sélection par dilution limite est peut-être à remettre en cause, encore que ces mêmes auteurs pensent que l'utilisation d'un milieu semi-solide ne garantisse pas non plus la "monoclonalité".

\* Dans ces conditions extrêmes de culture , les facteurs paracrines sécrétés étant très faibles et donc peu efficaces sur la croissance ( Ozturk et al. 1990 ), il est préférable d'ajouter des macrophages comme cellules nourricières. Leur utilisation systématique lors de nos clonages nous a permis de stimuler la croissance des hybridomes, mais en revanche, nous nous sommes ainsi trouvés dans ce que Saszewski ( 1984) appelle la pire des situations : la proportion de puits présentant des clones est importante mais rares sont ceux qui sécrètent l'anticorps recherché. Il pense que dans ces conditions, la probabilité d'obtenir des clones producteurs du "bon" anticorps diminue d'au moins moitié par rapport au seul fait du hasard.

En tenant compte de ces différentes suggestions nous pouvons essayer d'établir un protocole "optimisé" qui consisterait à :

- sélectionner au microscope les puits supposés monoclonaux (dès le quatrième ou le cinquième jour) et ayant un titre élevé en anticorps (déterminé par ELISA).
- cloner par dilution limite, en présence de macrophages, une dizaine de clones.
- multiplier les cellules les plus sécrétantes à l'issue de ce clonage.
- sélectionner à nouveau les populations cellulaires dont la production en immunoglobulines spécifiques est élevée.
- congeler une partie de cette population.
- réinjecter à des souris une autre partie puis recloner les ascites obtenues.

- cloner directement la dernière partie vraisemblablement encore hétérogène afin d'obtenir des hybridomes monoclonaux dont la sécrétion est importante et stable dans le temps.

Ce protocole, multipliant les chances de maintien des sécrétions, ne garantit pourtant pas le résultat. La clef de la réussite passe indéniablement par la multiplication du nombre des fusions.

### 3/ Qualité des immunoglobulines

Naguère, les paramètres de sélection des clones étaient presque uniquement fonction du titre en immunoglobulines qu'ils sécrétaient. De plus en plus, les progrès de la technologie permettent d'étudier également la qualité de ces anticorps. En effet, leur utilisation ultérieure dépend de cette qualité.

Des études d'affinité et de spécificité des interactions antigène-anticorps ainsi que l'approche de leur toxicité doivent être systématiquement envisagées. De même, l'activité de ces immunoglobulines dans des conditions biologiques, surtout si elles sont destinées à la thérapeutique, est un passage obligatoire. Une meilleure connaissance de leur structure, particulièrement en ce qui concerne la glycosilation, donnera sans doute de nouveaux critères de sélection.

### 3 - 2 PRODUCTIONS D'ANTICORPS MONOCLONAUX "IN VIVO"

Les trois souches d'hybridomes établies au laboratoire ont été injectées à des souris de 8 à 10 semaines en vue de leur production "in vivo".

$10^7$  cellules sont injectées dans le péritoine d'une souris qui avait reçu une injection de 500  $\mu$ l de pristane 8 à 10 jours auparavant.

La récupération des liquides d'ascite est effectuée lorsque l'abdomen de l'animal a plus que doublé de volume. En règle générale, 3 ponctions sont réalisées aux jours J<sub>7</sub>, J<sub>11</sub> et J<sub>15</sub> ; à ce stade l'animal est sacrifié. Les 3 ponctions permettent de prélever 10 à 12 ml de liquide d'ascite environ.

#### 3 - 2 - 1 Production d'anticorps monoclonaux anti $\alpha$ 1 antitrypsine

Les cellules du clone le plus sécrétant (D.O. = 1,9) ont été injectées à une souris.

Après récupération des liquides d'ascite, le test ELISA (non spécifique réalisé après coating en IgG anti-souris) a donné les D.O. suivantes :

Dilutions	P	1/10	1/100	1/1000	1/10 000
D.O.	> 2	> 2	> 2	> 2	1,77

N'ayant pas poursuivi les dilutions au-delà du 10 000ème, nous n'avons pas pu établir une quantification exacte de la sécrétion d'IgG. En effet, la D.O. de 1,77 était supérieure au dernier point de gamme de notre courbe étalon présentée au paragraphe 2-6-2-4.

Le même clone ayant été congelé 2 mois à -80°C en présence de lactosérum, (Derouiche, 1990) décongelé puis injecté à une souris, nous a permis de confirmer cette première approximation. En effet la dilution au 1/100000 correspond à une production de 1,1 g/l

Dilution	1/100	1/1000	1/10 000	1/100 000
D.O.	2,347	2,210	2,621	0,704

Toutefois, il faut être très prudent en ce qui concerne ce résultat. En effet, il est certain que cette quantification ne fait pas la distinction entre les immunoglobulines spécifiques anti  $\alpha$  1 antitrypsine et celles du sérum de la souris, qui bien qu'étant relativement jeune, possède toutefois un taux d'anticorps élevé. D'après Bazin (1990) 5 à 70 % du total des immunoglobulines dosées dans un liquide d'ascite proviendraient de l'hôte.

### 3 - 2 - 2 Production d'anticorps monoclonaux anti B lactoglobuline

Les cellules du clone ayant une D.O. de 0,686 ont été injectées à une souris, 12 ml de liquide d'ascite ont été ponctionnés.

Le test ELISA réalisé après coating en B lactoglobuline nous a donné :

Dilution	Pur	1/10	1/100	1/1000	1/10 000	1/10 <sup>5</sup>	1/10 <sup>6</sup>	1/10 <sup>7</sup>
D.O.	1,659	1,256	1,357	0,864	0,537	0,173	0,057	0,010

La quantification, qui cette fois est spécifique, fait apparaître une concentration de 86 mg/l d'Ig anti- $\beta$  lactoglobuline.

Il n'est toutefois pas possible de comparer ce taux de production d'anticorps à celui de l'ascite précédente puisque cette fois le test ELISA a été réalisé après un coating en  $\beta$  lactoglobuline pour ne quantifier, que les Ig produites par l'hybridome lui-même.

### **3 - 2 - 3 Production d'anticorps monoclonaux anti-hPL**

Les cellules du clone 1.1.4.3.1 (ayant une D.O. de 1,907) ont été injectées à une souris. 15 ml de liquide d'ascite ont été récupérés et purifiés dans le laboratoire du Professeur BAZIN par chromatographie d'affinité à l'aide d'immunoglobulines de rat anti-chaîne Kappa de souris.

Le liquide d'ascite avait une concentration de 6 g/l d'immunoglobulines totales. Là non plus, il n'est pas possible de faire la distinction entre les immunoglobulines de la souris et celles de l'hybridome qui lui a été injecté.

### **3 - 2 - 4 Discussion**

Si l'on compare les taux d'anticorps obtenus avec nos 3 souches d'hybridomes (qui varient de 0,9 à 6 g / l) à ceux obtenus, par Reuveny (1986), ( 10g / l) nous nous trouvons dans une fourchette un peu basse.

L'utilisation d'adjuvant incomplet de Freund (IFA) souvent préconisée (Mueller et al., 1986) plutôt que de pristane, pourrait peut-être augmenter la concentration d'anticorps à partir de nos ascites. En effet, Manouvrier et al., (1990) ont réalisé une étude comparative des différents types d'adjuvants qui a montré qu'un mélange volume à volume d'IFA et de pristane (PIFA) pouvait donner jusqu'à deux fois plus d'anticorps. De plus, le temps écoulé entre la stimulation par l'adjuvant et l'injection intrapéritonéale des hybridomes semble lui aussi jouer un rôle important. Dans notre cas nous avons sans doute trop attendu (10 jours) puisque Kints et al. (1989) conseillent une injection simultanée des cellules et de l'IFA ou du PIFA pour obtenir un taux maximal d'immunoglobulines.

### **3 - 3 PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX "IN VITRO"**

#### **3 - 3 - 1 Production d'anticorps en flacons spinners avec de différents milieux de culture**

La production d'anticorps monoclonaux "*in vivo*" imposant la gestion lourde d'une animalerie et le sacrifice de nombreux animaux, la plupart des laboratoires se tournent maintenant vers la production "*in vitro*".

Dans ce cas, les concentrations en anticorps étant moins importantes, le but des "cultivateurs" de cellules est donc d'optimiser les techniques de culture "*in vitro*" afin de s'approcher le plus possible des conditions rencontrées par les cellules "*in vivo*".

Dans cet esprit, nous avons établi sur plusieurs souches d'hybridomes (Mark3 , A49, F34, TSH), des comparaisons de croissance, de viabilité cellulaire, et de productions d'anticorps en fonction de différents substituts de milieu de culture (Legrand, 1990).

Nous avons prolongé ce travail sur les hybridomes anti-hPL en comparant 3 compléments de milieu : 10 % de sérum de veau foetal et le lactosérum à 9 % supplémenté soit par 1 % de sérum de veau foetal, soit par 1 % de sérum de cheval.

Nous avons travaillé selon le protocole décrit au paragraphe 2-1-3-3-6 : Les hybridomes ont été cultivés en flacons spinners en système récolte-recharge. L'ensemencement de départ était de  $2.10^5$  cell/ml et la culture a été menée durant 7 jours.

Chaque jour un échantillon du surnageant a été conservé afin de réaliser différents dosages qui nous ont permis d'établir les courbes comparatives qui suivent. Nous désignons par :

- SVF le milieu supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal,
- LS + SVF le milieu supplémenté par 9 % de lactosérum + 1 % de sérum de veau foetal,
- LS + SCH le milieu supplémenté par 9 % de lactosérum + 1 % de sérum de cheval.

##### **3 - 3 - 1 - 1 Croissance**

La figure 37A fait apparaître pour les 3 milieux des profils de croissance comparables avec un maximum de cellules au Jour J<sub>4</sub>.

La densité cellulaire maximale obtenue est d'environ  $4.10^6$  cell/ml avec toutefois un nombre de cellules resté plus faible en LS + SCH.

### Hybridome anti hPL

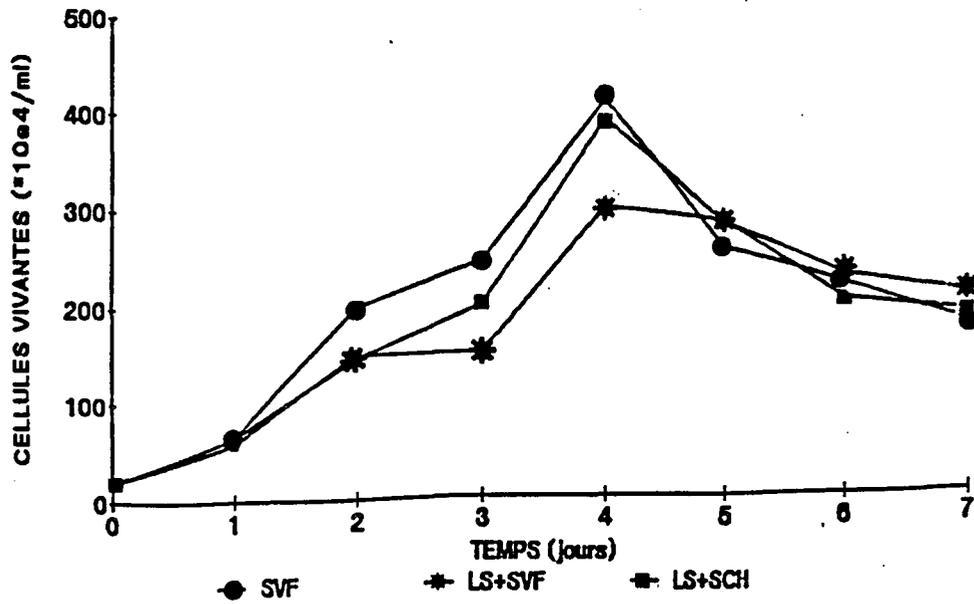


Figure 37 A : Prolifération cellulaire d'une souche anti-hPL en mode récolte-recharge en présence de différents compléments de milieu de culture :

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

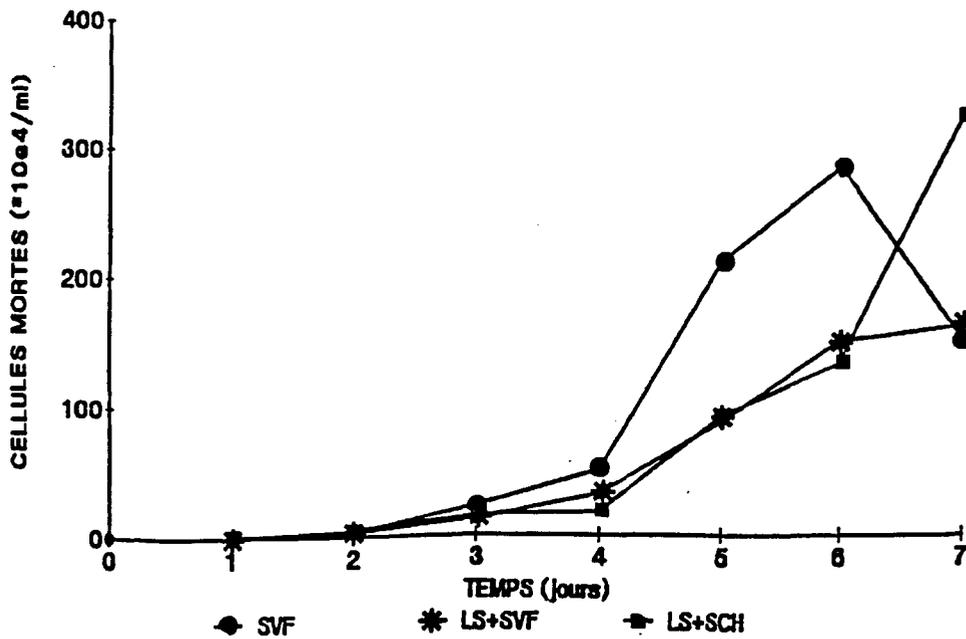


Figure 37 B : Mortalité cellulaire d'une souche anti-hPL en mode récolte-recharge en présence de différents compléments de milieu de culture :

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

Le nombre de cellules mortes durant les 3 premiers jours de la culture ( $J_0$  à  $J_3$ ) est comparable dans les 3 milieux alors qu'à partir de  $J_4$  le taux de mortalité dans le milieu SVF devient jusqu'à 3 fois plus important que dans les milieux contenant du lactosérum (Figure 37B). Ce phénomène s'est vérifié avec toutes les souches d'hybridomes utilisées. Il semblerait que le lactosérum retarde l'apparition des cellules mortes.

### 3 - 3 - 1 - 2 Sécrétion d' Anticorps Monoclonaux

Le but d'une culture d'hybridomes est d'obtenir le maximum d'anticorps avec le minimum de milieu, afin de diminuer le coût de production.

Pour comparer la capacité des différents milieux de culture à stimuler la sécrétion d'anticorps monoclonaux, nous avons ramené les taux d'IgG produites à  $10^4$  cellules en 24 h . C'est ce que nous appellerons la production spécifique. Les figures 37 C et 37 C' montrent que les cellules cultivées en LS (+ SVF ou + SCH) sécrètent plus que celles cultivées en SVF.

Si on considère les sécrétions ramenées au nombre de cellules vivantes, elles sont environ deux fois plus élevées en LS + SVF et presque trois fois plus élevées en LS + SCH qu'en SVF.

Même si les différences n'ont pas toujours été aussi évidentes au cours des différentes expériences réalisées au laboratoire, le lactosérum présente toujours l'avantage d'obtenir des concentrations supérieures en anticorps monoclonaux.

### 3 - 3 - 1 - 3 Approche comparative du métabolisme

Une première approche concernant le métabolisme cellulaire a été effectuée dans notre laboratoire sur plusieurs souches cellulaires par C. LEGRAND (1990).

Nous avons prolongé ce travail sur la souche hPL.

Toutes les courbes présentées reflétant le métabolisme cellulaire dans les différents milieux sont elles aussi exprimées en production ou en consommation spécifique, c'est-à-dire ramenées à  $10^4$  cellules et cumulées sur 24 h. Chaque valeur est calculée de la façon suivante :

Figure 37 C

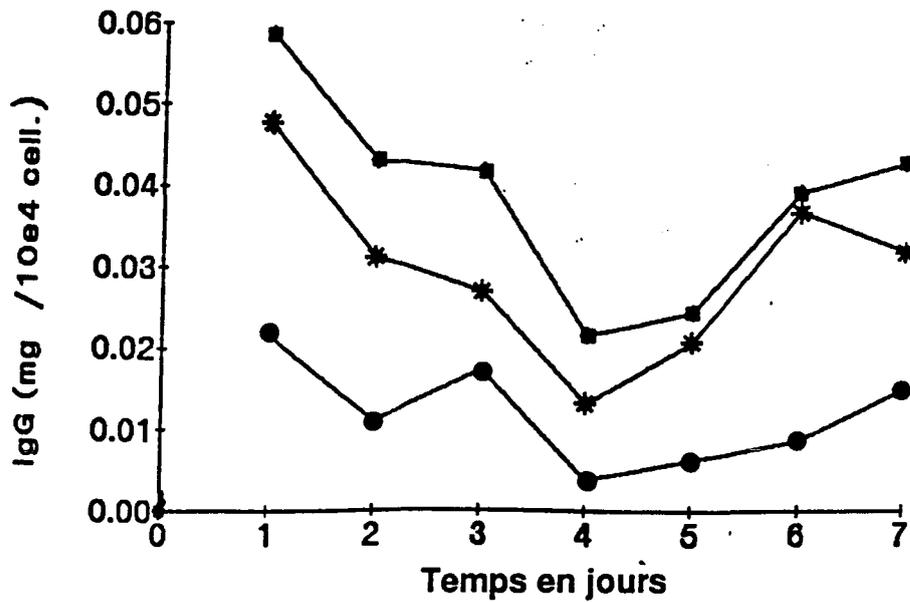


Figure 37 C : Sécrétion d'anticorps (en mg) ramenées à 10<sup>4</sup> cellules vivantes dans une culture de la souche anti-hPL en mode récolte-recharge en présence de différents milieux de culture :

- RPMI + 9 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

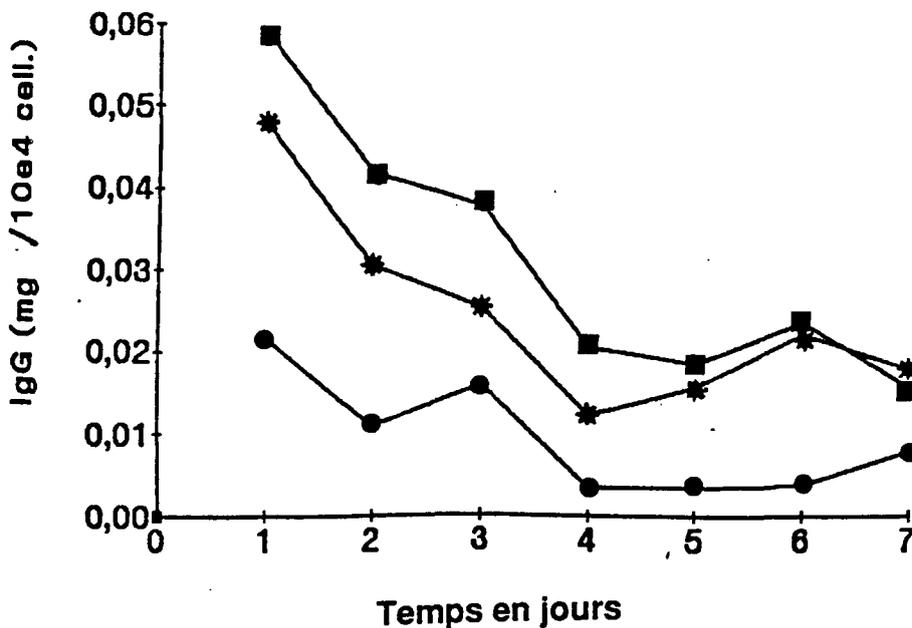


Figure 37 C'

Figure 37 C' : Sécrétions d'anticorps (en mg) rapportées à 10<sup>4</sup> cellules totales (vivantes et mortes) dans une culture de la souche anti-hPL en mode récolte-recharge en présence de différents milieux de culture :

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

Pour les éléments nutritifs consommés :

(valeur à  $J_0$  - Valeur à  $J_x$ )

----- x  $10^4$

nombre de cellules

Pour les métabolites produits :

(valeur à  $J_x$  - valeur à  $J_0$ )

----- x  $10^4$

nombre de cellules

Il est à noter que les interprétations ne peuvent être généralement faites que sur la période exponentielle de croissance. A partir du jour J5, toutes les courbes se lissent à cause de la déficience en éléments nutritifs, qui malgré le renouvellement quotidien, sont consommés très rapidement par les cellules arrivées à une densité d'environ  $3.10^6$  cell / ml.

### *3 - 3 - 1 - 3 - 1 Consommations de glucose et de glutamine*

Ces deux composés sont les principaux éléments énergétiques de la cellule.

On remarque que :

- quel que soit le milieu, le glucose présent (environ 11 mM ) est consommé totalement en 24 h au 4ème jour dès qu'on atteint une concentration cellulaire de  $3.10^6$  cell/ml (Tableau 31).

Jours	Consommation journalière du glucose en mM		
	SVF	LS + SVF	LS + SCh
0	0	0	0
1	3,83	3,94	4,22
2	10,5	9,06	7,00
3	11,06	10,61	9,17
4	11,11	10,72	10,94
5	11,11	10,28	11,00
6	11,11	10,72	11,00

Tableau 31 : Consommations journalières de glucose dans les 3 milieux au cours d'une culture en récolte-recharge de la souche anti hPL

- A l'exception du point J2 pour le milieu LS + SCH, la consommation spécifique de glucose est globalement équivalente quel que soit le milieu (Figure 37D).

Quant à la glutamine la quantité à l'origine dans les milieux de culture est différente : les milieux LS en contiennent environ 2 mmoles/l alors que le milieu SVF en contient environ 4 mmoles/l.

Or, lors du premier jour de la culture, son taux de consommation spécifique est environ 4 fois plus important en LS, pour devenir équivalent par la suite (Figure 37 G).

De plus, on remarque que dans les 3 milieux, la glutamine n'est jamais complètement consommée en 24 h (il en reste chaque jour environ 1/4 dans les milieux LS et la moitié dans le milieu SVF) (Tableau 32).

Il semble donc que dans cette expérience, cet acide aminé ne soit pas un facteur limitant de la croissance.

Consommation journalière de glutamine en mM			
Jours	SVF	LS + SVF	LS + SCH
0	0	0	0
1	0,384	1,538	1,185
2	1,716	1,850	1,255
3	2,030	1,880	1,342
4	1,776	1,683	0,975
5	1,489	1,436	1,087
6	1,852	1,576	0,899
7	1,819	1,470	1,052

Tableau 32 : Consommation journalière de glutamine dans les 3 milieux au cours d'une culture en récolte-recharge de la souche anti hPL

*3 - 3 - 1 - 3 - 2 Production de lactate*

A l'exception du point J2 pour le milieu LS + SCH, la cinétique de production spécifique de lactate est similaire dans les 2 milieux complémentés avec du LS et reste nettement supérieure à celle observée dans le milieu SVF, alors que la consommation de glucose est équivalente dans les 3 milieux (Figure 37 E). D'ailleurs si on établit lors de la phase exponentielle (J<sub>3</sub>) de croissance, le rapport :

$$Y = \frac{\text{Lactate produit}}{\text{Glucose consommé}}$$

Milieux	Lactate produit en mM	Glucose consommé en mM	Y établi au J3 de la culture
SVF	16.04	11.05	1.45
LS + SVF	21.08	10.61	1.98
LS + SCH	18.56	9.17	2.02

on remarque que dans le cas du milieu SVF, le rapport est d'environ 1,45 (72 % du maximum de production théorique) alors que dans les 2 milieux LS il avoisine 2,00 (98 % du maximum de production théorique de lactate à partir du glucose).

### *3 - 3 - 1 - 3 - 3 Production de pyruvate*

Ce métabolite est produit à des taux très faibles (entre 0,4 et 0,6 mM) et se situe au carrefour de nombreuses voies métaboliques. L'interprétation de ses variations est donc délicate. Nous pouvons toutefois observer une production spécifique supérieure dans le milieu LS + SCH (Figure 37 I). Mais compte-tenu du seuil de détection du dosage et de son coefficient de variation, il serait prudent de confirmer cette observation sur plusieurs expériences.

### *3 - 3 - 1 - 3 - 4 Productions d'acide glutamique et d'ammoniaque*

Pour les 3 milieux nous observons de très faibles différences en fin de culture, alors qu'en phase exponentielle de croissance, l'acide glutamique est produit en plus grande quantité dans les milieux LS. Ceci correspond aux différences observées dans la consommation de glutamine (Figure 37 H) .

De la même façon, la production spécifique d' $\text{NH}_3$  est similaire dans les 3 milieux à partir de  $\text{J}_4$ , alors qu'en début de culture les cellules cultivées en présence de LS produisent plus d' $\text{NH}_3$ .

Hybridome anti-hPL

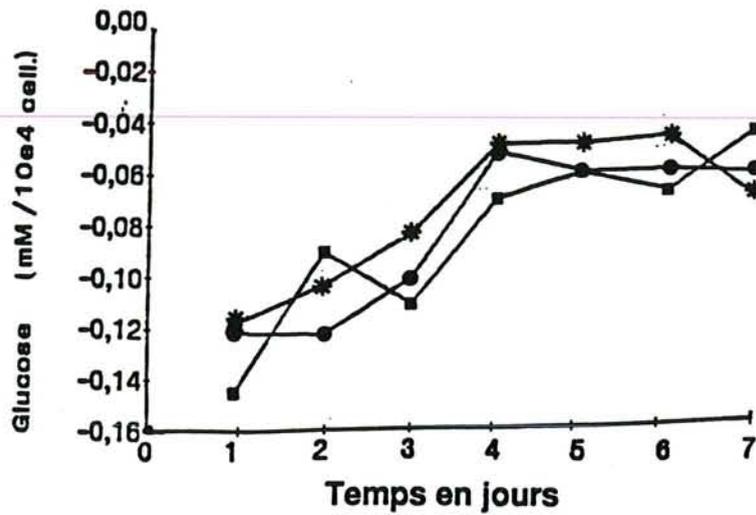


Figure 37 D

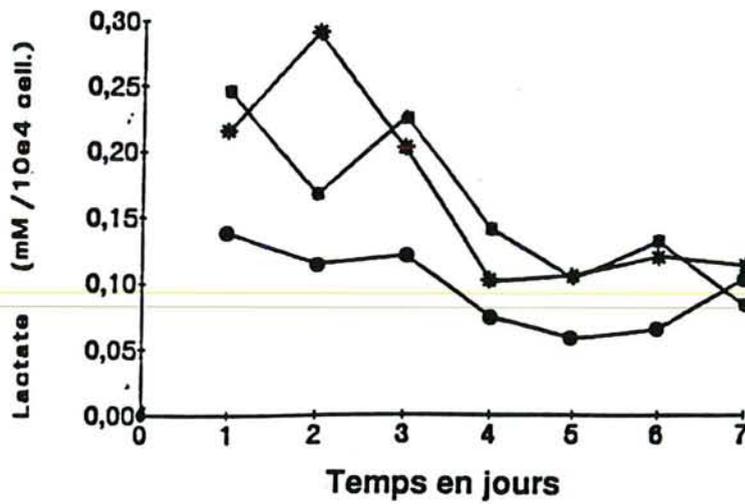


Figure 37 E

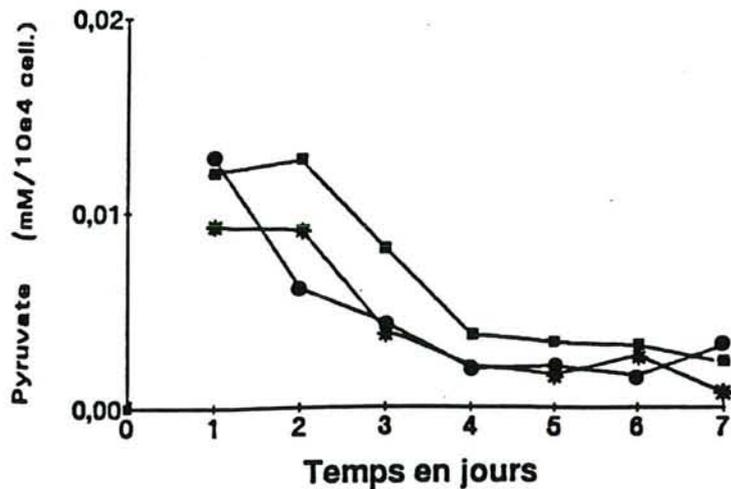


Figure 37 F

Figures 37 D, E, F : Variations spécifiques des glucose, lactate et pyruvate au cours d'une culture de la souche anti-hPL en mode récolte-recharge dans différents milieux :

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

### Hybridome anti-hPL

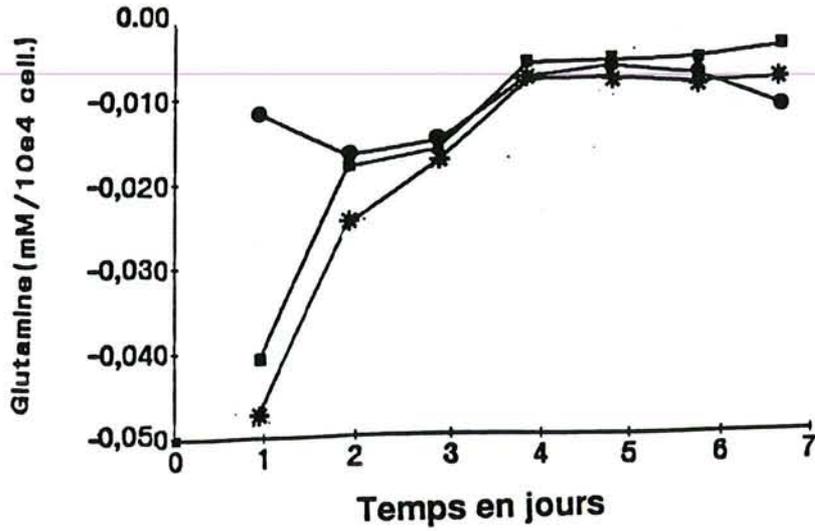


Figure 37 G

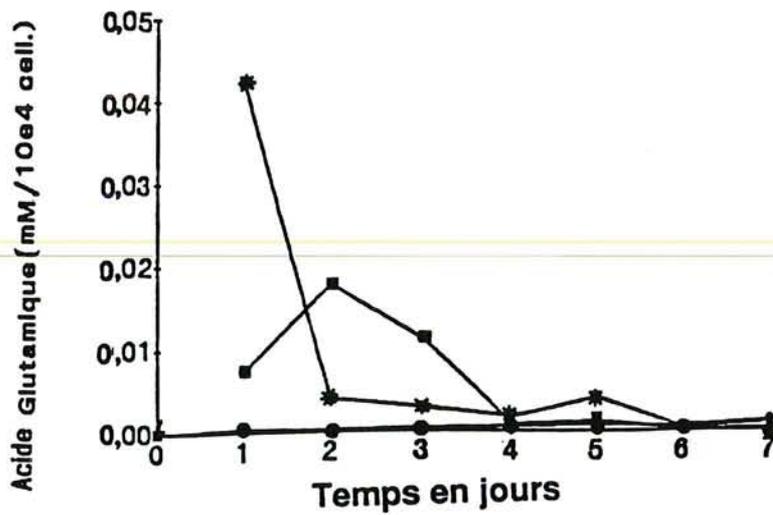


Figure 37 H

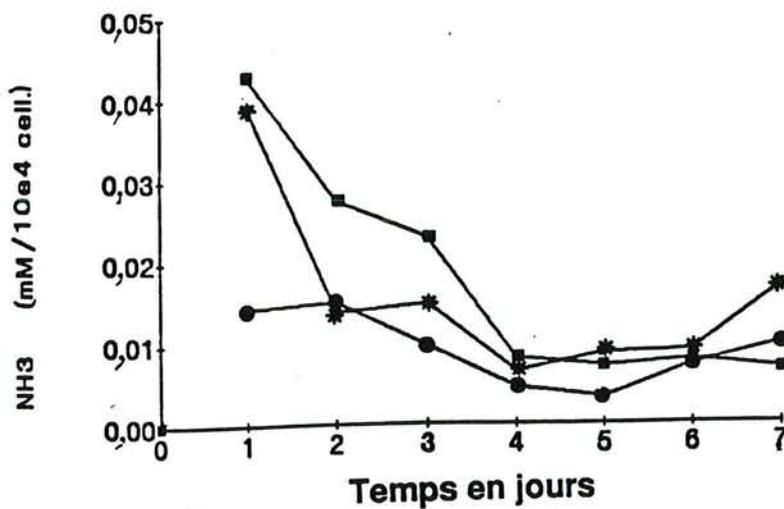


Figure 37 I

Figures 37 G, H, I : Variations des glutamine, glutamate, ammoniacque au cours d'une culture de la souche anti-hPL en mode récolte-recharge dans différents milieux :

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

De plus, si on établit à J<sub>3</sub> le rapport :

$$Y = \frac{\text{NH}_3 \text{ produit}}{\text{GLN consommée}}$$

on met en évidence une différence importante dans les 3 milieux.

Milieux	Gln cons en mM	NH <sub>3</sub> prod en mM	Y à J3
SVF	2.03	1.28	0,63
LS + SVF	1.89	1.55	0,82
LS + SCH	1.34	1.88	1,44

Il est intéressant de souligner que même si les quantités d'NH<sub>3</sub> produit sont supérieures en milieu lactosérum (Figure 37 I), les taux de croissance et de production d'anticorps monoclonaux n'en sont pas affectés (Figure 37 H).

Ceci est d'ailleurs à rapprocher de la constatation faite par Hu et al. (1976) qui pensent que la concentration en ions NH<sub>4</sub> ne serait toxique pour les hybridomes et ne causerait une réduction de la production d'anticorps qu'au-delà de 6 mM.

### 3 - 3 - 1 - 3 - 5 Métabolisme des acides aminés

Nous présenterons ici seulement les résultats des acides aminés dont les concentrations ont varié au cours de l'expérience.

Leurs concentrations avant ensemencement dans les différents milieux utilisés pour les cultures sont quelque peu différents :

Concentration en acides aminés dans les différents milieux (en $\mu$ moles)	RPMI + 10% SVF	RPMI + 9 % LS + 1 % SVF	RPMI + 9 % LS + 1 % SCH
Alanine	111	17	8
Glycine	187	113	348
Leucine	409	336	97
Isoleucine	399	368	109
Sérine	304	263	249
Valine	226	160	143

Tableau 33 : Concentrations en acides aminés des milieux de culture avant ensemencement.

C'est surtout l'alanine qui présente des profils très différents en LS et en SVF (figure 37J) et des concentrations de départ qui varient de 10 à 100  $\mu$ M (Tableau 33).

On remarque d'ailleurs que c'est dans les milieux qui en contiennent 10 fois moins que sa production est au moins 2 fois plus importante, surtout lors de la phase exponentielle de croissance.

Lors de notre étude comparative, les taux de glycine et de proline augmentent au cours du temps de façon supérieure dans les milieux LS (Figures 37K et 37L).

La sérine (Figure 37M) est plutôt consommée dans le milieu SVF, alors qu'elle est plutôt produite dans les milieux LS.

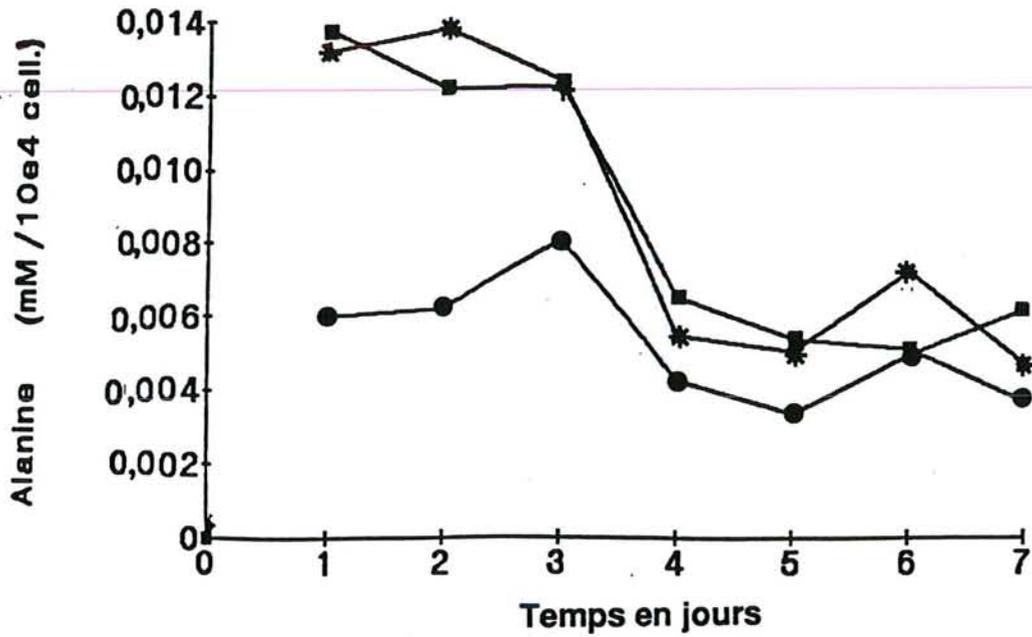


Figure 37 J

Production spécifique de glycine

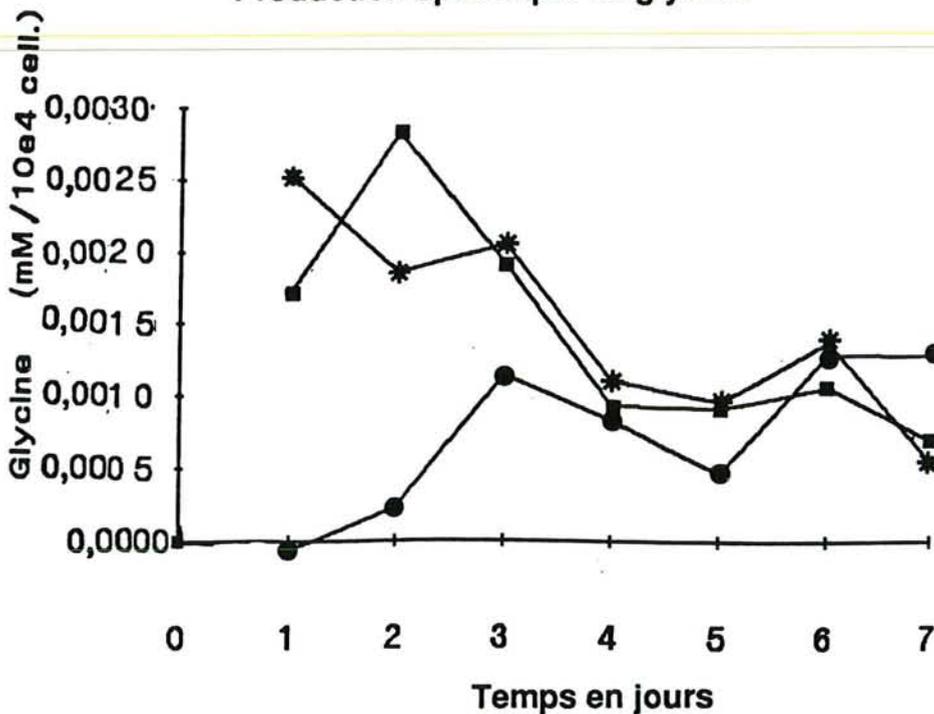


Figure 37 K

Figure 37 J, K : Variations de l'alanine et de la glycine au cours d'une culture de la souche anti-hPL en mode récolte-recharge dans différents milieux :

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

### Hybridome anti-hPL Production spécifique de proline

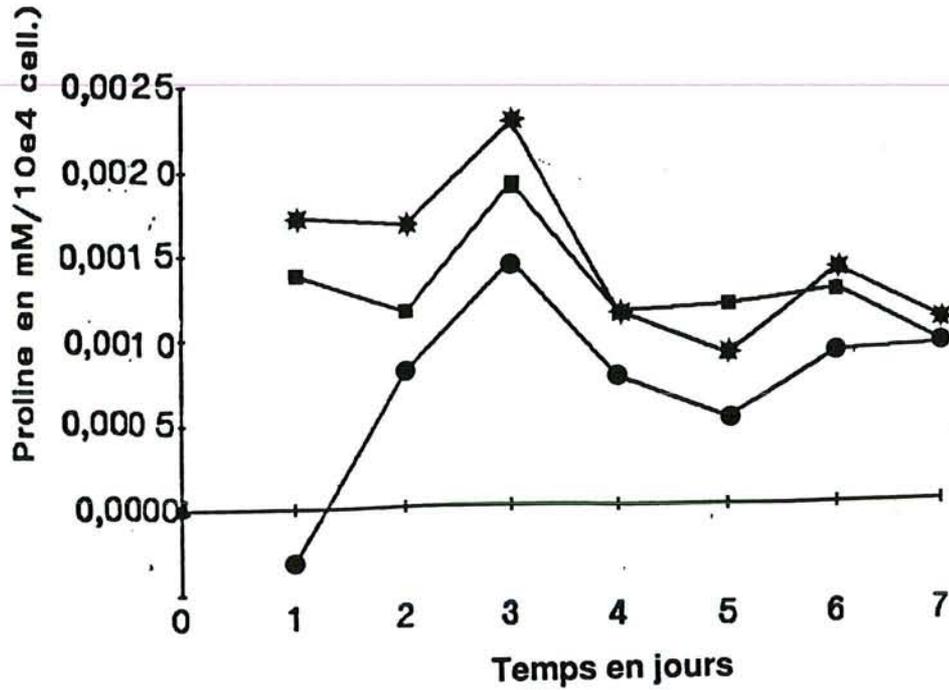


Figure 37 L

### Variation spécifique de la Sérine

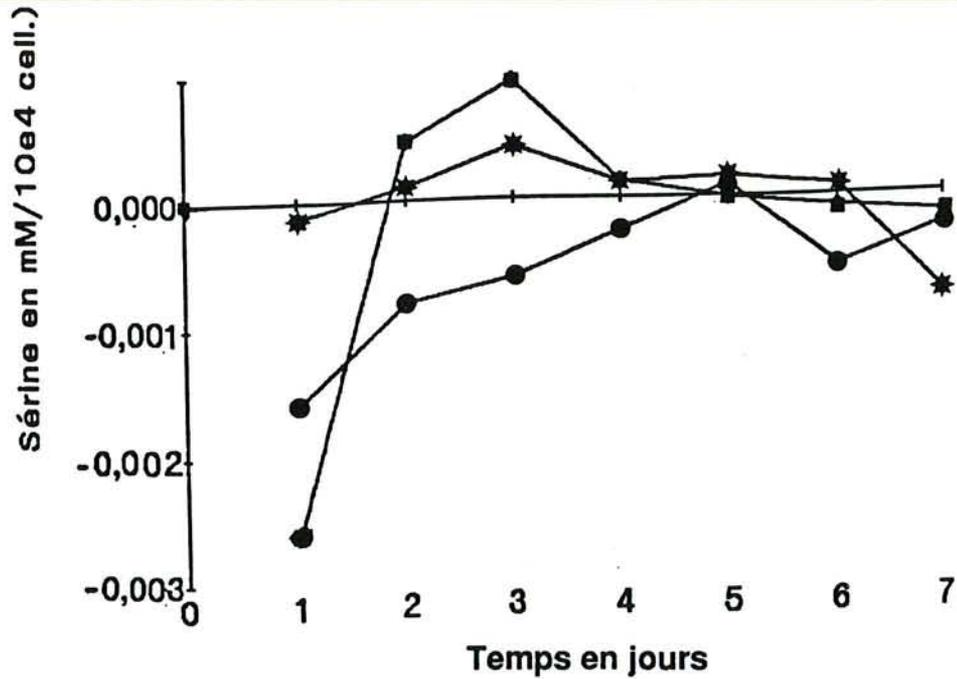


Figure 37 M

Figures 37 L et M : Variations de la proline et de la sérine au cours d'une culture de la souche anti-hPL en mode récolte-recharge dans différents milieux :

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

### Hybridome anti-hPL Consommation spécifique de Valine

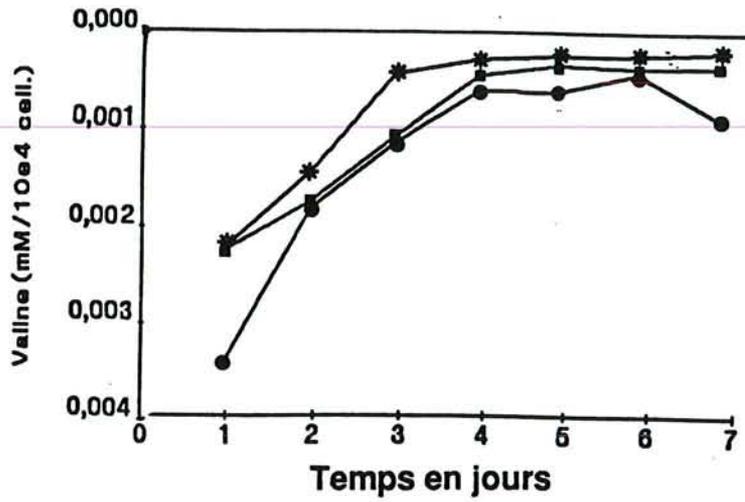


Figure 37 P

### Consommation spécifique de Leucine

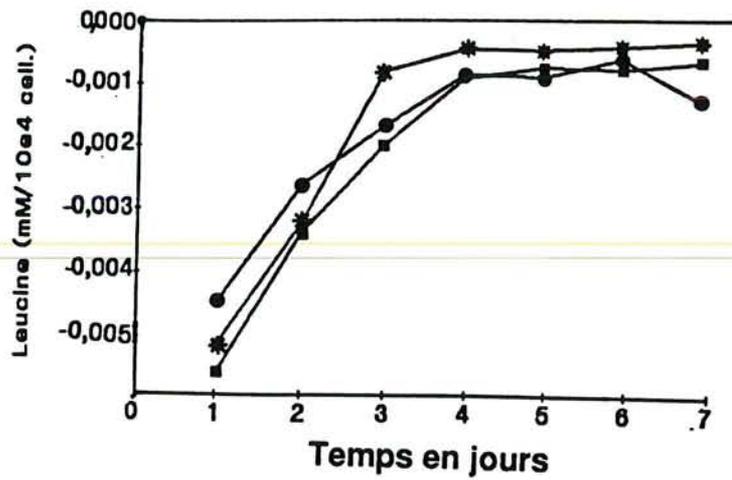


Figure 37 N

### Consommation spécifique d'Isoleucine

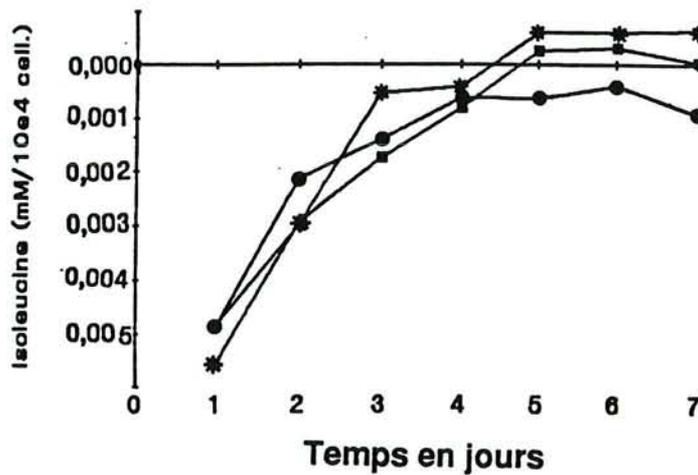


Figure 37 O

Figure 37 P, N, O : Consommations spécifiques de valine, leucine et isoleucine au cours d'une culture de la souche anti-hPL en mode récolte-recharge dans différents milieux.

- RPMI + 10 % SVF
- \* RPMI + 9 % LS + 1 % SVF
- RPMI + 9 % LS + 1 % SCH

Quant aux acides aminés branchés : leucine, isoleucine et valine quel que soit leur concentration de départ, ils évoluent de la même façon durant toute l'expérience. Pour chacun des trois milieux, leurs variations sont identiques mais restent toutefois délicates à interpréter (Figures 37N, 37O et 37P). Toutefois, en fin de culture (les 4 derniers jours), on peut observer une consommation spécifique légèrement supérieure dans le milieu SVF.

Les observations qui viennent d'être énoncées ont déjà été faites lors des précédentes études comparatives SVF - LS et ce quel que soit la souche d'hybridome et quel que soit l'origine du lot de lactosérum.

Un chercheur de notre laboratoire, C. Legrand décrit les mêmes phénomènes sur 4 souches d'hybridomes avec du lactosérum d'une autre origine (Lactosérum en poudre de la Société ASMAR).

Nous avons également confirmé ces observations avec le même lot de lactosérum liquide EST LAIT sur une autre souche d'hybridomes : les Mark 3 en SVF, LS + SVF et LS + SCH (I. Parmentelot, 1991).

### 3 - 3 - 1 - 4 Discussion

#### 3 - 3 - 1 - 4 - 1 *Croissance et sécrétion dans différents milieux*

\* Le LS à 9 % qu'il soit complétement par 1 % de SVF ou de SCH induit une croissance équivalente dans les cultures d'hybridomes. De plus, il semblerait qu'il ait un effet protecteur sur les cellules puisque nous avons observé des taux de cellules mortes inférieurs à ceux obtenus avec le SVF. Ces remarques sont concordantes avec les résultats obtenus lors de la cryopréservation des cellules à - 80°C en présence de LS.

En effet, nous avons montré (Derouiche et al., 1990) qu'un certain nombre d'acides gras connus pour jouer un rôle dans la conservation de l'intégrité de la membrane plasmique sont présents à des concentrations plus importantes dans le LS. Ils pourraient donc assurer une meilleure préservation de la membrane des hybridomes.

D'autre part Otzurk et al. (1990) ont observé l'effet protecteur de certains facteurs de croissance dans les cultures cellulaires. Leur présence dans des fractions de lait, humaines ou bovines, (Shing et al., 1984 ;

Campbell et al., 1989) pourrait expliquer également le nombre moins important de cellules mortes observé dans les derniers jours des cultures en présence de lactosérum.

Ceci peut présenter un avantage certain pour la production d'anticorps qui est d'ailleurs supérieure en LS. En effet, Reuveny et al. (1986) ont montré qu'il était préférable de prolonger la viabilité des cellules plutôt que d'optimiser leur croissance et donc d'augmenter la densité cellulaire pour améliorer la production d'anticorps.

### *3 - 3 - 1 - 4 - 2 Métabolisme*

C'est en tenant compte des principales voies métaboliques résumées dans le schéma 1, que nous discuterons les différentes observations qui viennent d'être faites.

\* Quoi qu'il en soit, la phase de déclin des cultures débute au jour J<sub>5</sub> pour les 3 milieux, ce qui coïncide avec la consommation totale du glucose en 24 h. Celui-ci peut donc être considéré comme un facteur limitant la croissance. Il serait peut-être intéressant d'augmenter l'apport de glucose à ce moment de la culture comme l'ont décrit Reuveny et al. (1986).

Toutefois, il faut savoir que l'absence ou la diminution de glucose n'est pas le seul facteur responsable de la mort cellulaire qui est aussi provoquée par l'accumulation d'inhibiteurs tels que le lactate et l'ammoniaque (Glaken et al., 1986).

Dans notre expérience nous constatons que le glucose est converti majoritairement en lactate (> 70 %) ce qui corrobore les observations de Lauks et al. (1987).

\* En fait, seulement 5 % du glucose entrerait dans le cycle de Krebs dans ces conditions de culture (Zielke et al., 1978). Les hybridomes seraient apparemment dépendants de la voie glycolytique puisque le rapport lactate/glucose est très élevé et la concentration de pyruvate très basse. Miller et al. (1989) ont suggéré que ce phénomène pouvait être attribué au besoin de réoxyder le N.A.D.H. dérivé de la glycolyse.

De plus, on sait que le lactate peut être produit à partir de la glutamine (Zielke et al., 1980). Ce dernier étant produit de façon plus importante dans les milieux LS (dans lesquels la glutamine est elle-même consommée de façon plus importante) laisse à penser que le lactate est non seulement produit à partir du glucose mais aussi à partir de la glutamine.

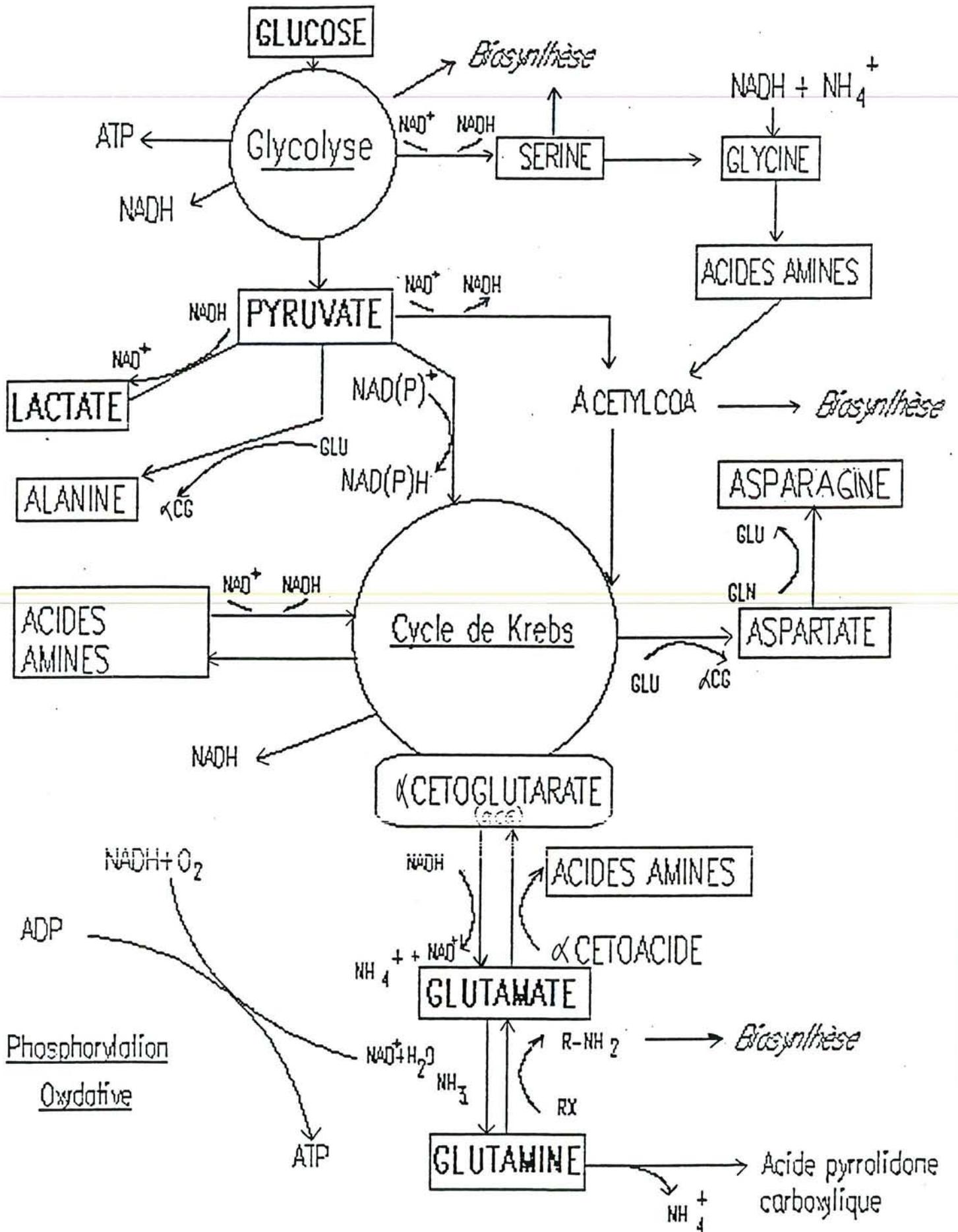


Schéma 1 : Principales voies du métabolisme des hybrides d'après Miller et al. (1989).

\* Après le glucose, c'est la glutamine qui est l'élément énergétique le plus abondant dans les milieux de culture. Elle est consommée à 75 % dans les milieux contenant du LS et à 50 % dans le milieu SVF.

Cette différence de consommation se retrouve d'ailleurs dans les productions plus importantes en milieu LS de glutamate et d'ammoniaque, les deux principaux produits de la glutaminolyse d'après Mac Kehan (1986).

Or, nous avons remarqué que dans les milieux LS (moins riches en protéines et donc moins tamponnés), le pH était toujours plus alcalin qu'en milieu SVF.

Ces deux observations pourraient peut-être expliquer la consommation plus importante en glutamine dans les milieux LS. En effet, Ozturk et al. (1990) ont montré qu'un pH alcalin ainsi qu'une forte concentration en ions phosphates contribueraient à cette forte consommation de glutamine.

Les cellules cultivées en LS produisent plus d' $\text{NH}_3$  que celles cultivées en SVF, ce qui pourrait présenter un inconvénient car l' $\text{NH}_3$  est souvent considéré comme un inhibiteur dans les cultures cellulaires. Glacken et al. (1986) ont expliqué son effet inhibiteur sur la croissance et la production d'AcMc par le fait qu'il peut induire la déplétion de certains intermédiaires du cycle de Krebs, en particulier celle de l'  $\alpha$ -cétoglutarate (  $\alpha$ -cétoglutarate  $\rightarrow$  glutamate). Cette déplétion bloquerait le cycle en entraînant une diminution de l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire et à la production d'AcMc dans le cas des hybridomes. De la même façon Butler et al. (1989) ont montré qu'une augmentation des productions d'alanine et de glycine pouvait induire une déplétion de phosphoénolpyruvate et de l'acétyl CoA qui interviennent dans le cycle de Krebs, et diminuent la croissance cellulaire.

Bien que dans les milieux LS le glutamate, l'alanine et la glycine soient produits de façon plus importante, le taux de production d'AcMc ne s'en trouve pas affecté. Ce qui ne semble pas confirmer l'hypothèse de Glacken et al. mais ceci pourrait venir du fait que les différences observées ne sont pas suffisamment importantes.

La production légèrement supérieure de NH<sub>3</sub> par les cellules cultivées en LS ne présente donc pas un handicap à l'utilisation de ce substitut de sérum. Les acides aminés branchés tels que valine, leucine, isoleucine sont consommés de façon équivalente dans les 3 milieux. Ils ne sont pas complètement utilisés en 24 h et ne semblent donc pas être des facteurs limitants de la croissance cellulaire. Toutefois, Griffiths (1970) a émis l'hypothèse que ces acides aminés deviendraient des facteurs limitants avant que leur consommation n'atteigne 100 %. Selon lui une concentration résiduelle dans le milieu serait nécessaire pour établir un équilibre entre les milieux intra et extracellulaires.

D'autres acides aminés, encore, réagissent différemment sans que nous puissions donner d'explications précises. C'est le cas de la sérine, qui est plutôt utilisée dans le milieu SVF et produite dans les milieux LS. Elle provient essentiellement du glucose pour donner, entre autre, des phospholipides.

NAD

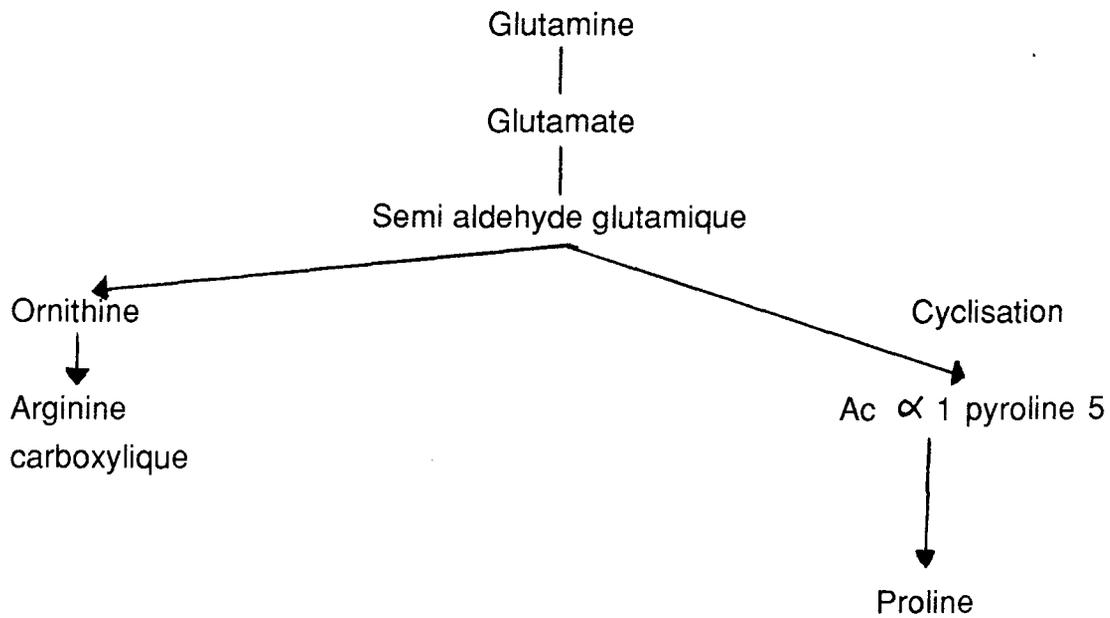
Glucose -----> 3 phosphoglycérate -----> Ac. 3P hydroxypyruvique ----->

phosphosérine -----> Sérine -----> Glycine  
<-----

Protéines / Phospholipides

Les milieux LS étant plus riches en phospholipides, la transformation de la sérine a sans doute tendance à se faire plutôt vers la glycine, puisqu'elle est plus produite dans les milieux LS.

Quant à la proline, sa production deux fois plus importante en LS qu'en SVF, peut s'expliquer par le fait qu'elle provient du glutamate et donc de la glutamine qui sont eux aussi soit plus produits, soit plus consommés dans les milieux LS.



Quant à la voie ornithine, arginine, elle semble peu utilisée puisque ces deux acides aminés ne varient pas au cours de la culture quel que soit le complément de milieu.

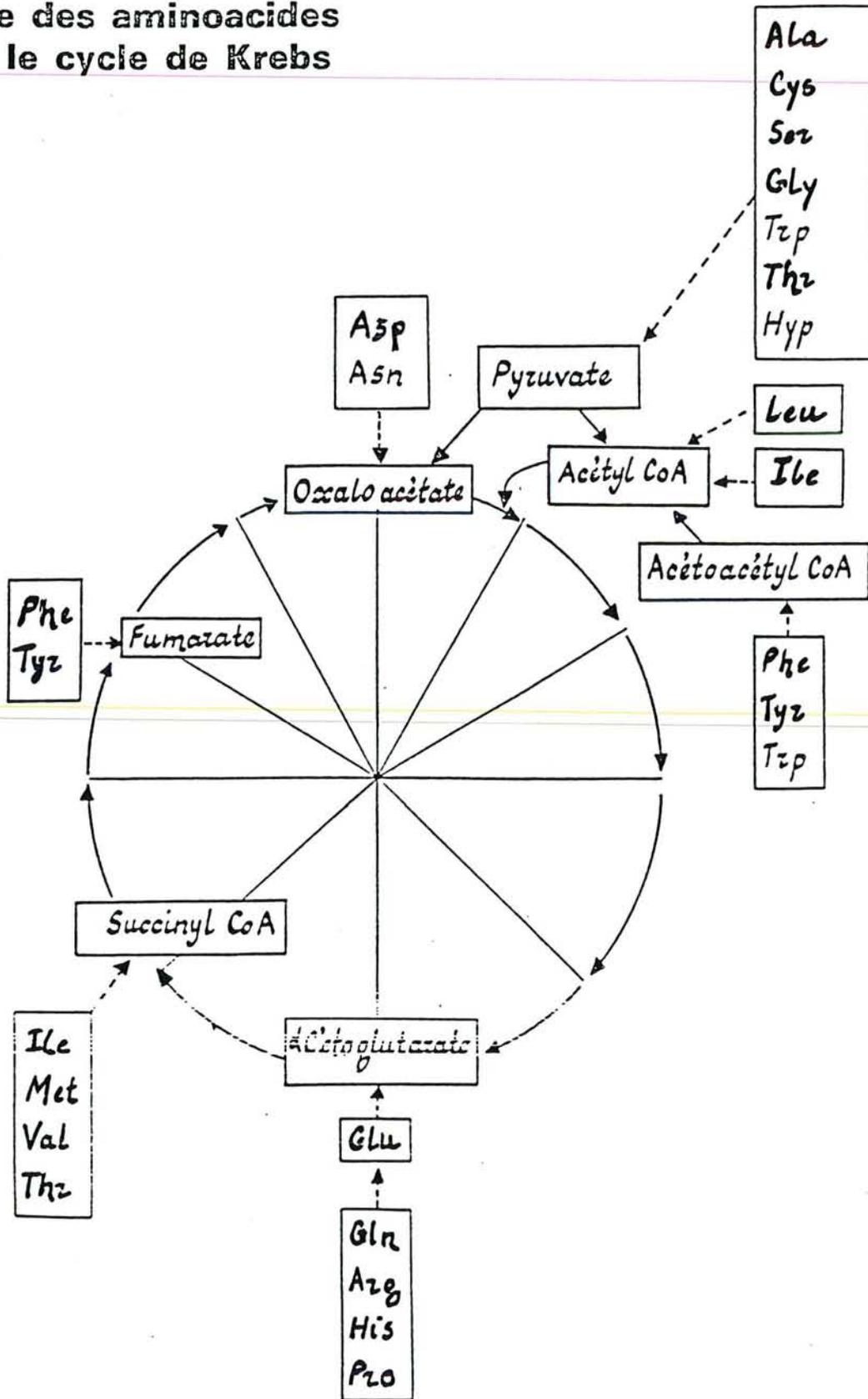
En résumé, la culture en LS entraîne quelques différences au niveau du métabolisme alors que les cinétiques de croissance et de production restent comparables à celles obtenues en présence de SVF, avec tout de même un léger avantage en ce qui concerne la production d'anticorps en milieu LS.

Cependant, il est difficile de tirer des conclusions péremptoires ; seules des expériences complémentaires avec des produits marqués pourraient nous indiquer les voies métaboliques empruntées dans un cas ou dans l'autre (Schéma 2).

De plus, il faut tenir compte du fait que nos calculs ne représentent qu'une estimation globale des variations des différentes métabolites qui ne tient pas compte des phénomènes de protéolyse.

Afin d'obtenir une approche plus précise, il serait peut-être intéressant de suivre les variations métaboliques de façon encore plus régulière par des dosages plus rapprochés et des marquages par des éléments radioactifs.

# Entrée des aminoacides dans le cycle de Krebs



N.B. La leucine conduit également et directement à l'acétoacétate.

Schéma 2 : Entrée des acides aminés dans le cycle Krebs d'après Miller et al. (1989).

### **3 - 3 - 2 Recherche de marqueurs biochimiques de l'état physiologique des hybridomes.**

---

Notre but étant de produire la plus grande quantité d'anticorps dans les meilleures conditions possible (en particulier de coût), nous sommes, après ces différentes expériences en spinner, passés à l'étape suivante : le bioréacteur à cellules piégées.

En effet, l'avantage de ce système est de permettre, lors d'une culture continue, la récupération du milieu utilisé sans entraîner l'élimination des cellules et ce sans avoir recours au système de spin-filters dont les inconvénients ont été décrits au chapitre 1 - 3 - 2 - 3.

Toutefois, le fait de ne pouvoir suivre l'évolution du nombre des cellules au cours d'une culture dans un tel système, nous a amené à rechercher au préalable des marqueurs de la prolifération et de l'état des cellules.

Aussi, différentes expériences ont été réalisées.

---

#### 3 - 3 - 2 - 1 Choix des marqueurs

Des composés connus comme étant des marqueurs du cancer et donc de la prolifération de cellules tumorales ont été dosés dans les surnageants de cultures : la  $\beta$  2 microglobuline, l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), l' $\alpha$  foetoprotéine, les acides sialiques liés aux lipides.

Diverses enzymes marqueurs des principaux compartiments cellulaires ont été étudiées. Ce sont la phosphatase alcaline (PAL), la glutamyl transférase ( $\gamma$  GT), la 5' nucléotidase comme enzymes membranaires. La lactate déshydrogénase (LDH), l'aspartate amino transférase (ASAT), la créatine phosphokinase comme enzymes cytosoliques. La B glucuronidase ( $\beta$ Glu) et la N acétyl glucosaminidase comme enzymes lysosomiales.

Afin de rechercher parmi tous ces composés, lesquels étaient susceptibles de nous donner des informations sur l'état des cultures d'hybridomes, nous avons réalisé une première expérience en "batch" en flacons statiques. Soixante dix flacons de 25 cm<sup>2</sup> ont été ensemencés au jour

O avec  $10 \cdot 10^4$  cellules Mark 3/ml (viabilité > 95 %) dans 9 ml de milieu RPMI 1640 + 10 % de SVF + 2 mM de glutamine. Chaque jour, 7 flacons ont été prélevés, les cellules comptées et les surnageants obtenus après centrifugation, conservés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'aux dosages.

A partir de cette expérience, aucune relation n'a pu être établie entre l'état physiologique des cellules et :

- l'ACE
- la  $\beta 2$  microglobuline
- l' foetoprotéine
- les acides sialiques liés aux lipides
- la  $\gamma$  GT
- la 5' nucléotidase
- la GOT
- la créatine phosphokinase
- et la N acétyl glucosaminidase.

En revanche, nous avons montré que les activités phosphatase alcaline et B glucuronidase correspondent à un nombre de cellules vivantes, et que celle de la lactate déshydrogénase est liée au nombre de cellules mortes (Bour, 1988).

Il semblerait que soit naturellement, soit sous l'effet des conditions de culture, les hybridomes relarguent dans le milieu une forte activité phosphatase alcaline.

Quant à la B glucuronidase, c'est une enzyme glycoprotéique que l'on trouve dans les microsomes et les lysosomes des cellules. Cette enzyme synthétisée dans le cytoplasme rejoint le lysosome grâce à une molécule signal : le mannose 6 phosphate. Cependant, on sait maintenant qu'une partie de cette enzyme est sécrétée.

Quant à la LDH, nos résultats semblent confirmer les remarques faites par Figueiredo et al (1986) qui proposait d'utiliser l'activité LDH libérée dans le milieu de conservation d'un organe à transplanter pour en juger l'état. D'ailleurs, de nombreux auteurs utilisent maintenant cette relation (Legrand, 1991).

### 3 - 3 - 2 - 2 Marqueurs de la viabilité cellulaire

---

Afin d'établir des corrélations précises entre le nombre de cellules vivantes et les marqueurs du métabolisme, nous avons réalisé une série de culture en "batch" de 24 heures en flacons spinners de 250 ml. Pour se faire, des hybridomes A 49 et Mark 3 ont été ensemencés dans 150 ml de milieu RPMI + 10 % SVF à 6 concentrations différentes :

10.10<sup>4</sup> cell / ml  
25.10<sup>4</sup> cell / ml  
50.10<sup>4</sup> cell / ml  
100.10<sup>4</sup> cell / ml  
150.10<sup>4</sup> cell / ml  
200.10<sup>4</sup> cell / ml

Le taux de viabilité des cellules ensemencées était toujours supérieur à 95 %.

---

Après 24 h de culture, les milieux ont été centrifugés et les surnageants ont été utilisés pour effectuer différents dosages.

Les manipulations ont été réalisées en une seule fois sur 6 spinners différents. Si une discordance quelconque apparaissait, 6 nouveaux spinners étaient réensemencés.

Les productions et consommations en 24 h ont été établies pour les glucose, lactate, pyruvate, ammoniacque,  $\beta$  glucuronidase, phosphatase alcaline et 20 acides aminés.

Les corrélations ont été ensuite établies entre la moyenne d'au moins 3 comptages des cellules vivantes dans le milieu et 9 composés dont les variations étaient suffisamment importantes pour pouvoir être exploitées.

Les diverses équations ainsi établies sur les deux souches sont résumées dans les tableaux 34 et 35 et présentées sur les figures 38 et 39.

Paramètres dosés	Equations des droites de régression établies pour la souche A 49	Coefficient de régression R
glucose	$Y = - 19,8x - 22,627$	0,978
lactate	$Y = 17x - 28,395$	0,975
NH <sub>3</sub>	$Y = 126,7x - 14,338$	0,934
PAL	$Y = 2,867x - 6,498$	0,915
βglu	$Y = 5,464x - 35,487$	0,914
glutamine	$Y = 0,079x - 38,789$	0,963
alanine	$Y = 0,221x - 16,358$	0,974
cystine	$Y = -0,73x - 37,188$	0,959
lysine	$Y = -1,068x - 35,753$	0,919

Tableau 34 : Récapitulatif des différentes équations établies sur la souche A 49.

Paramètres dosés	Equations des droites de régression établies pour la souche Mark 3	Coefficient de régression R
Glucose	$Y = - 26x - 24,7$	0,980
Lactate	$Y = 19,7x - 32,9$	0,979
NH <sub>3</sub>	$Y = 168,2x - 12,2$	0,927
PAL	$Y = 3,85x - 3,3$	0,970
βglu	$Y = 7,31x - 41,1$	0,926
Glutamine	$Y = - 0,11x - 46,5$	0,961
Alanine	$Y = 0,29x - 15,8$	0,969
Cystine	$Y = - 0,98x - 44,6$	0,959
Lysine	$Y = - 1,44x - 44$	0,926

Tableau 35 : Récapitulatif des différentes équations établies sur la souche Mark 3.

### 3 - 3 - 2 - 3 Marqueur de la mort cellulaire

Cette expérience ne nous permettait pas d'établir une corrélation entre la LDH et les cellules mortes : la culture ne durant que 24 h, même à une concentration de départ de  $2.10^6$  cellules / ml nous n'avions qu'environ  $10.10^4$  cellules mortes / ml.

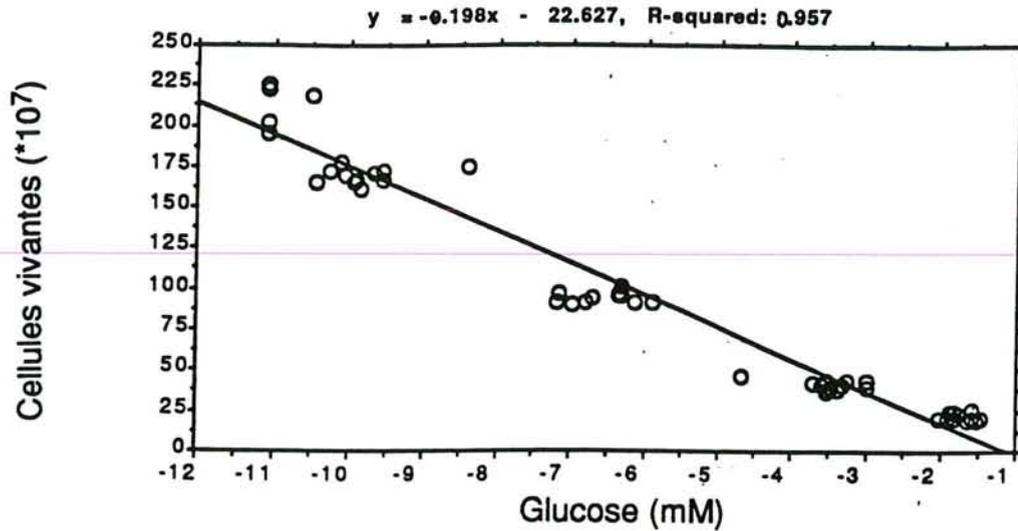


Figure 38 A

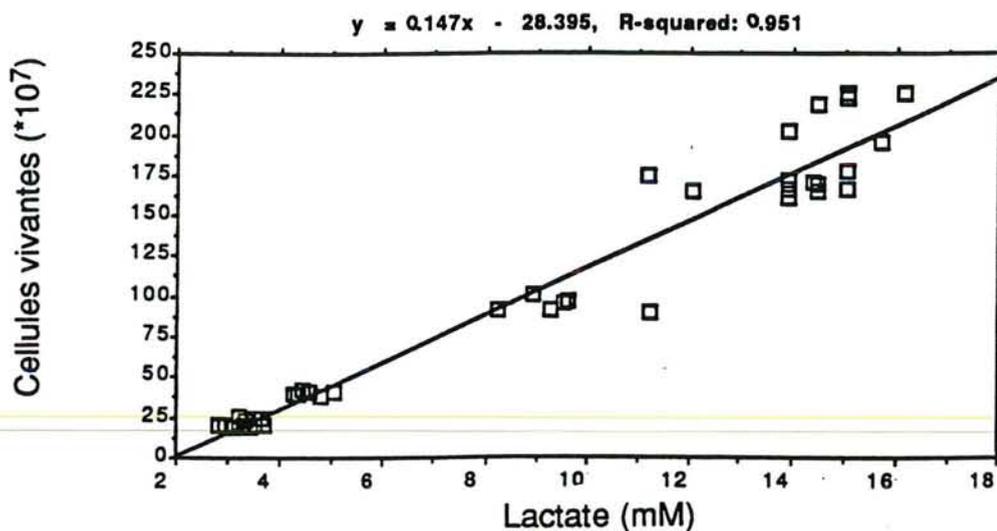


Figure 38 B

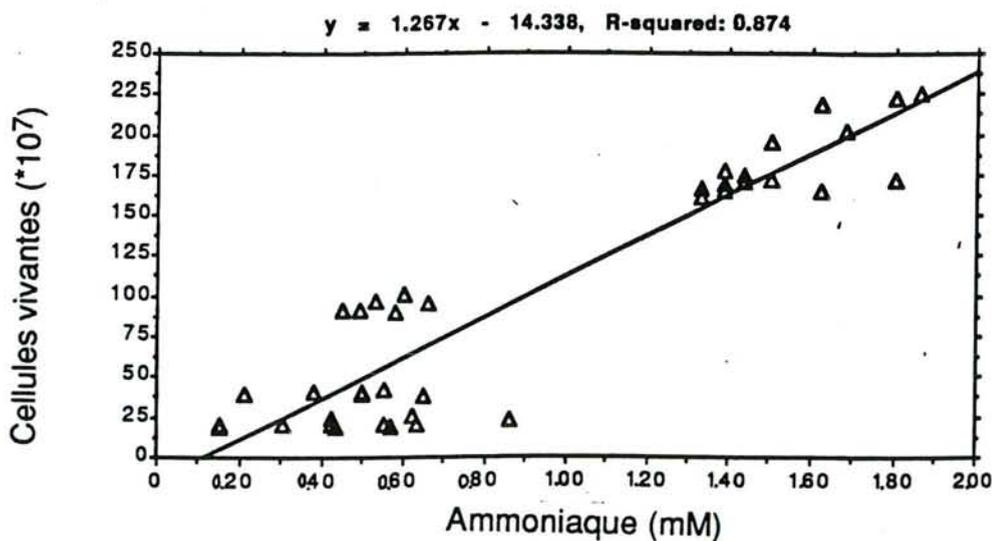


Figure 38 C

Figures 38 A, B, C : Corrélations entre le nombre de cellules vivantes et la concentration des différentes molécules dosées dans le surnageant de culture d'hybridomes A 49.

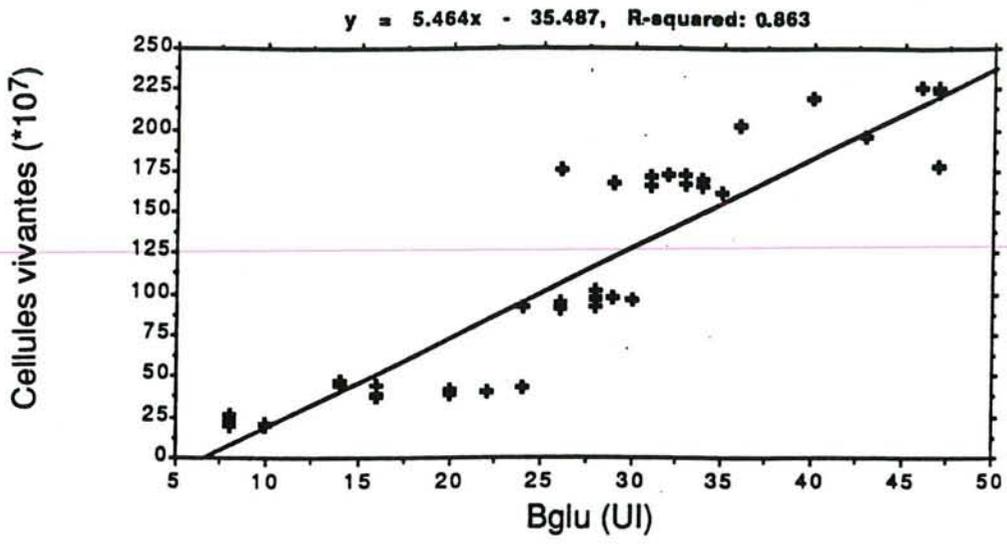


Figure 38 D

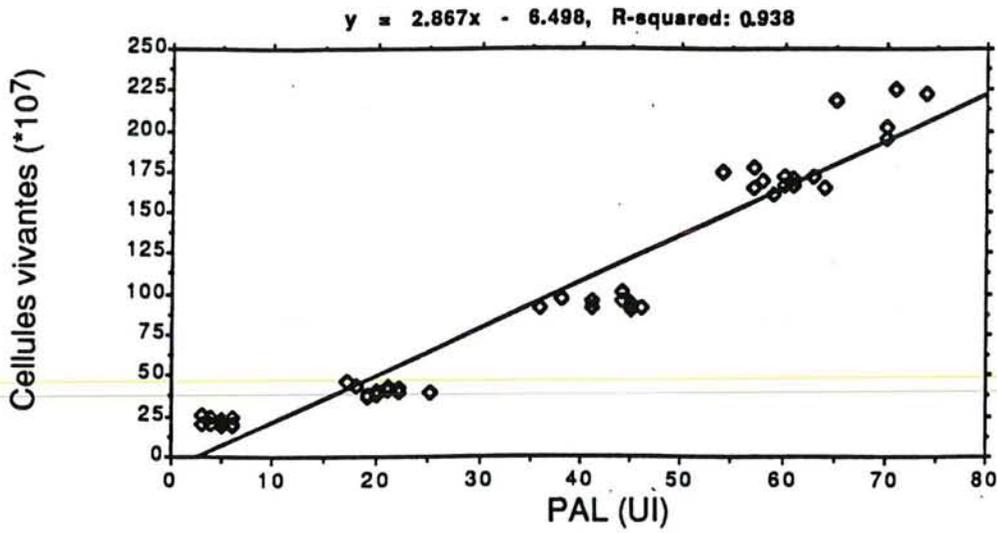


Figure 38 E

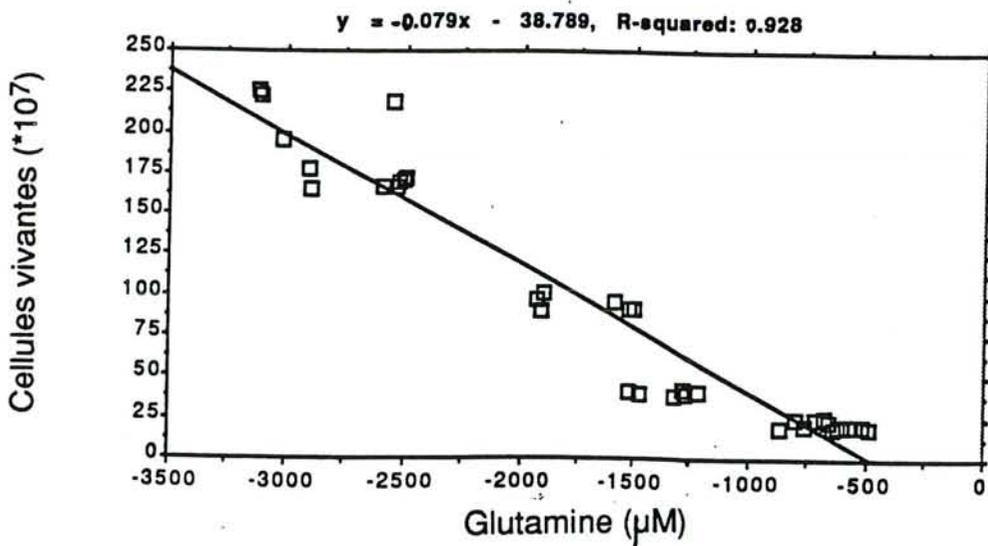


Figure 38 F

Figure 38 D, E, F : Corrélations entre le nombre de cellules vivantes et la concentration des différentes molécules dosées dans le surnageant de culture d'hybridomes A 49.

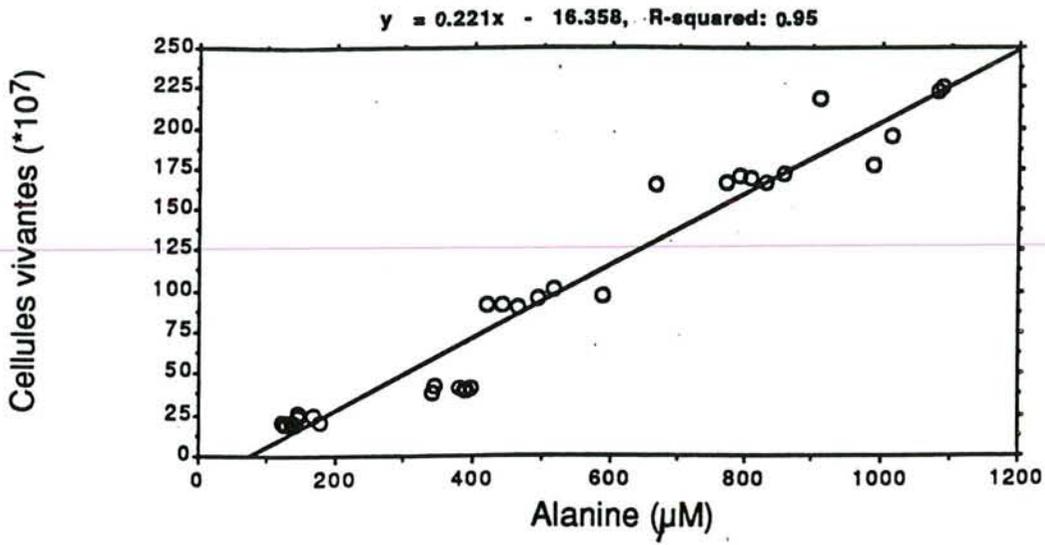


Figure 38 G

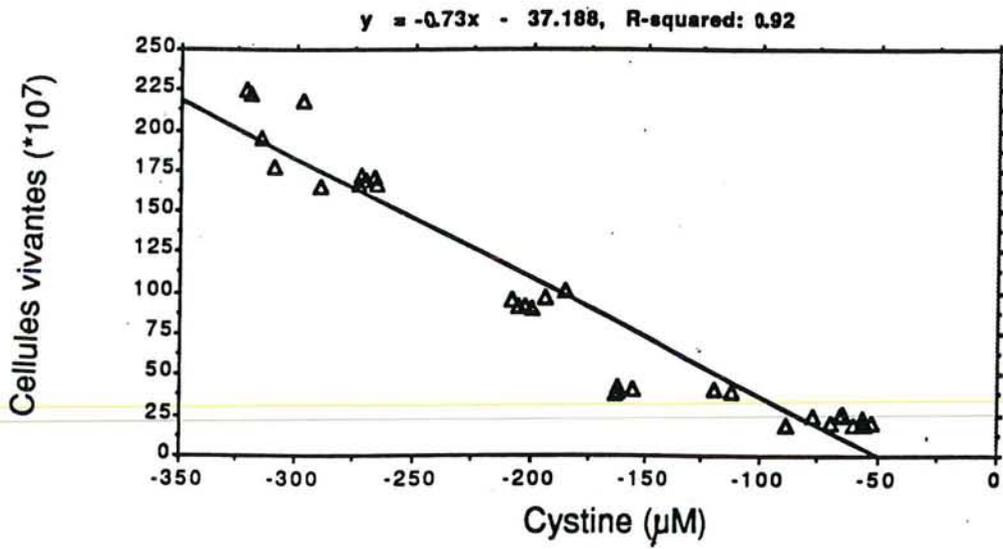


Figure 38 H

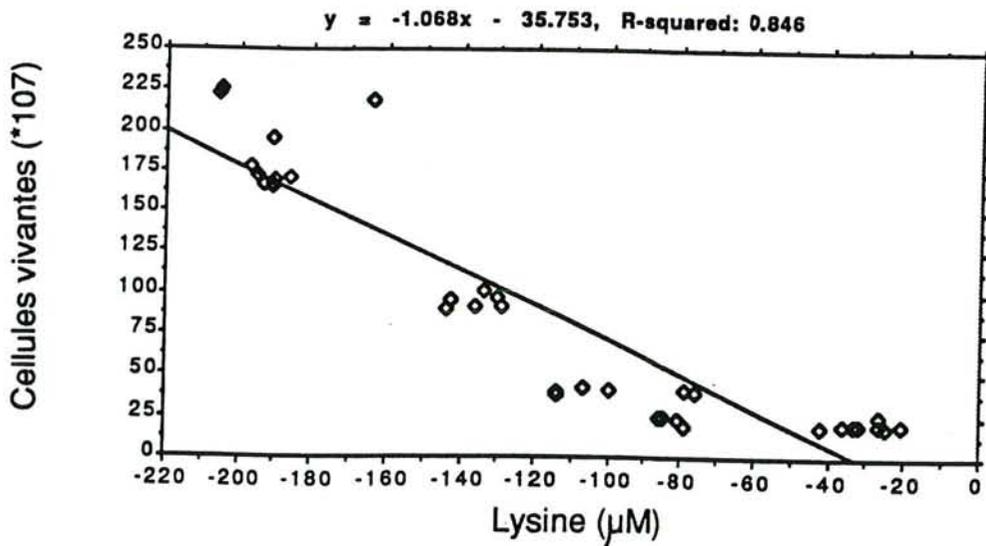


Figure 38 I

Figures 38 G, H, I : Corrélations entre le nombre de cellules vivantes et la concentration des différentes molécules dosées dans le surnageant de culture d'hybridomes A 49.

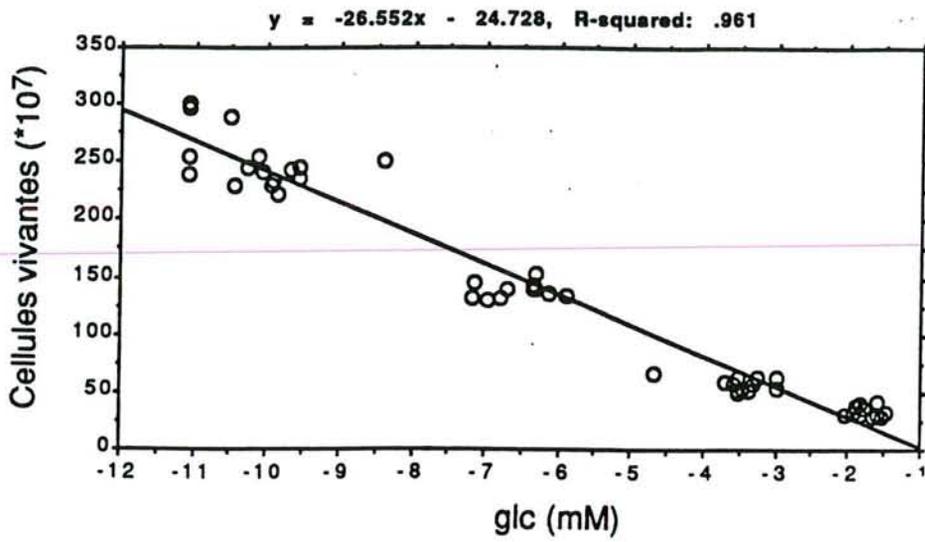


Figure 39 A

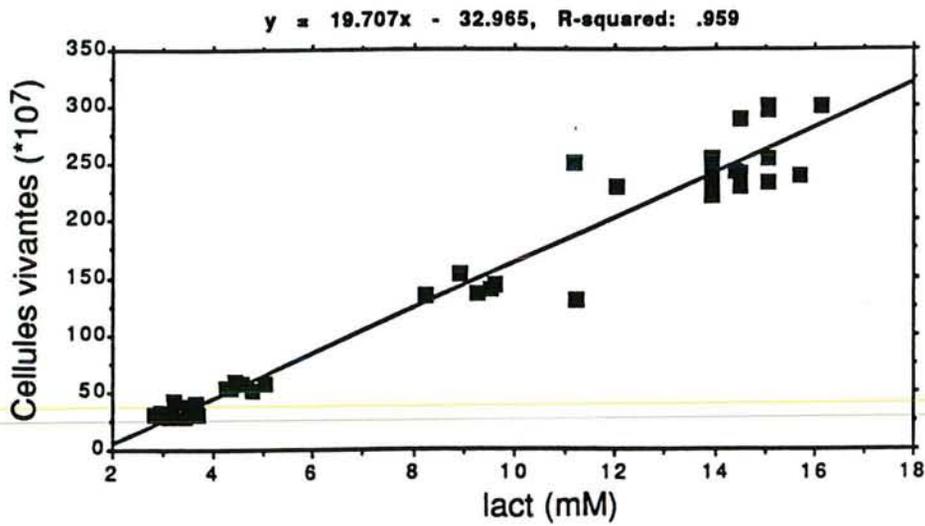


Figure 39 B

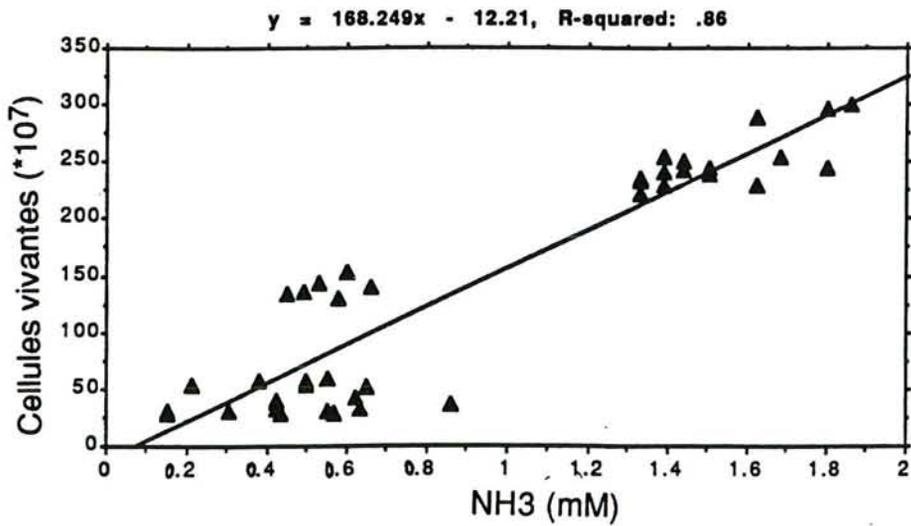


Figure 39 C

Figures 39 A, B, C : Corrélations entre le nombre de cellules vivantes et la concentration des différentes molécules dosées dans le surnageant de culture d'hybridomes Mark 3.

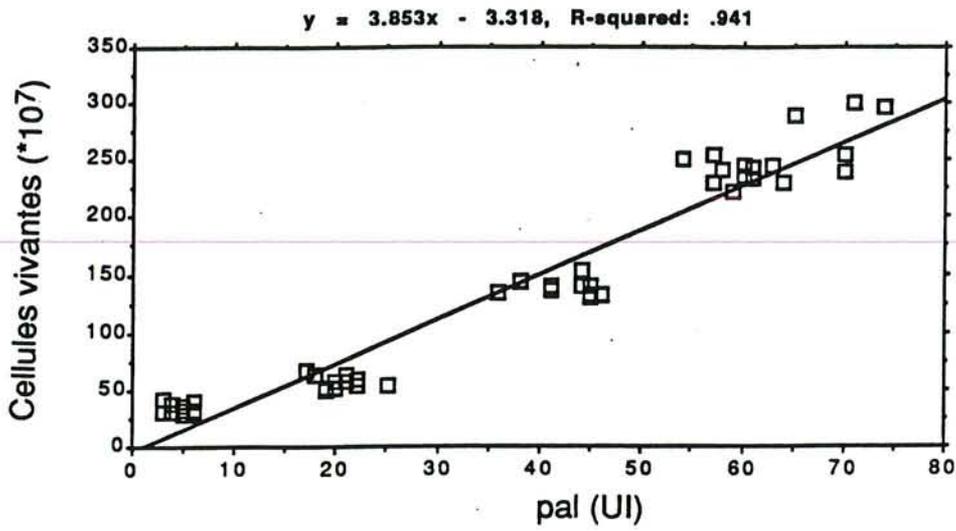


Figure 39 D

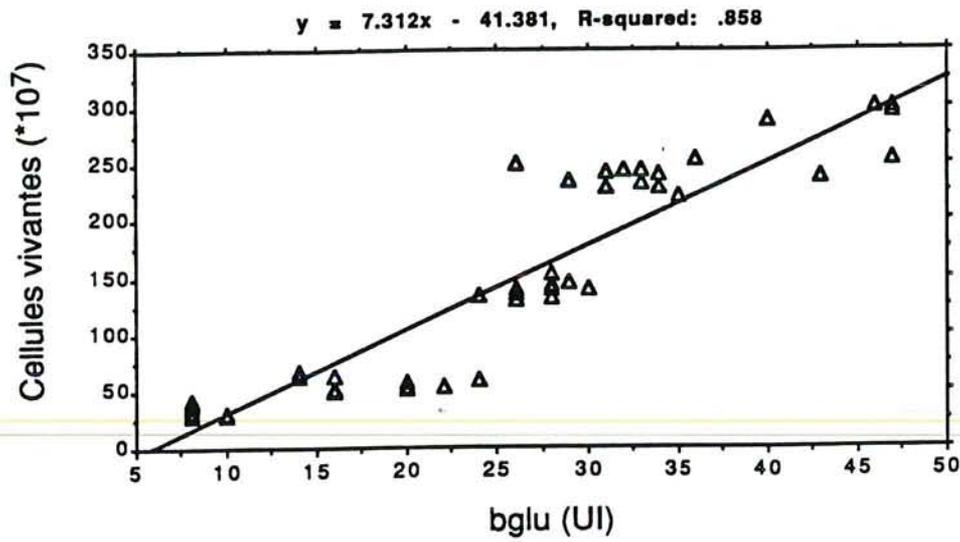


Figure 39 E

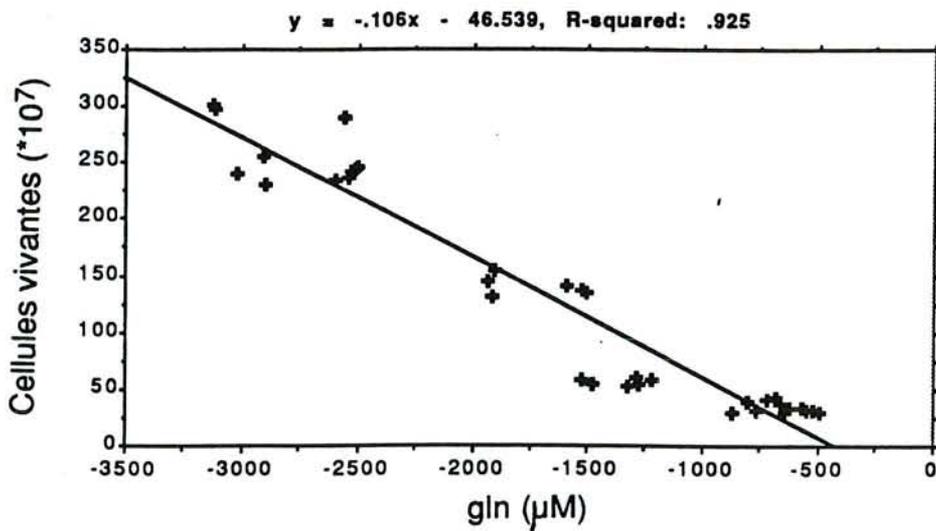


Figure 39 F

Figures 39 D, E, F : Corrélations entre le nombre de cellules vivantes et la concentration des différentes molécules dosées dans le sumageant de culture d'hybridomes Mark 3.

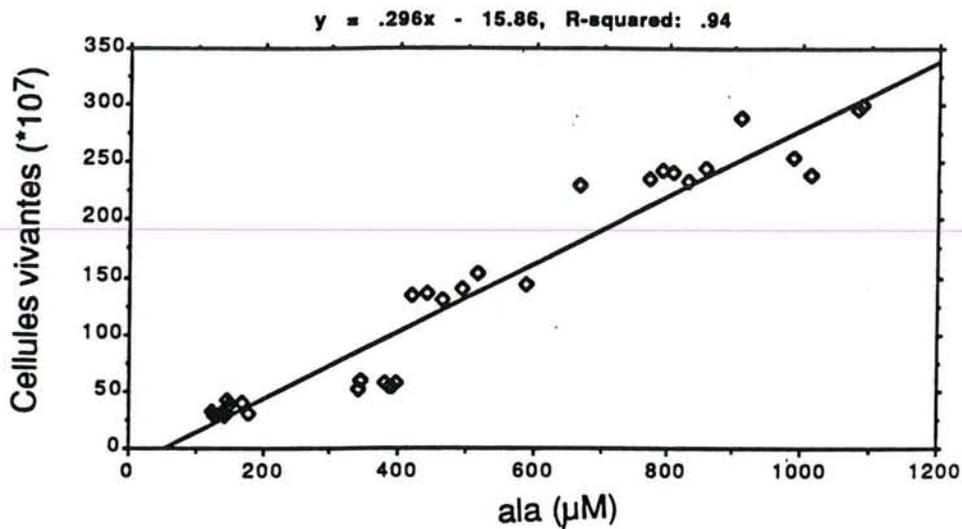


Figure 39 G

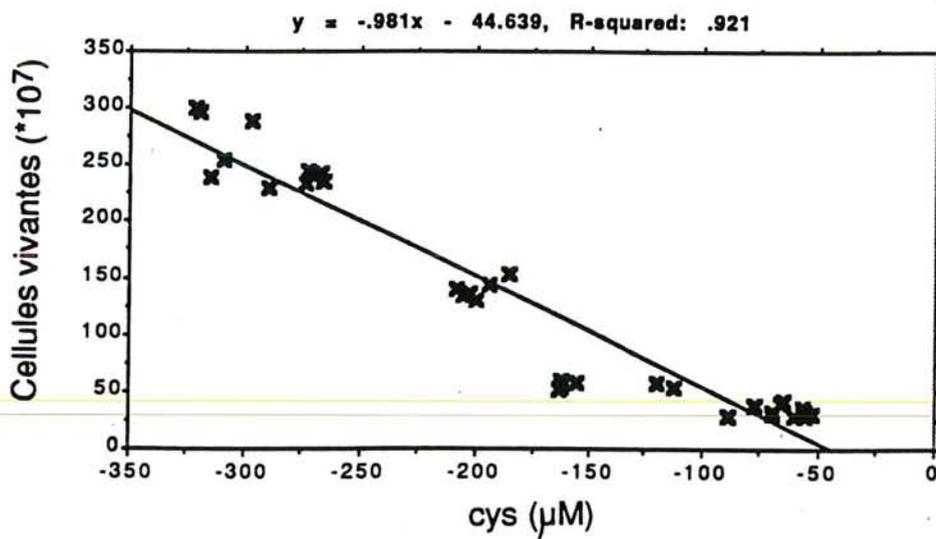


Figure 39 H

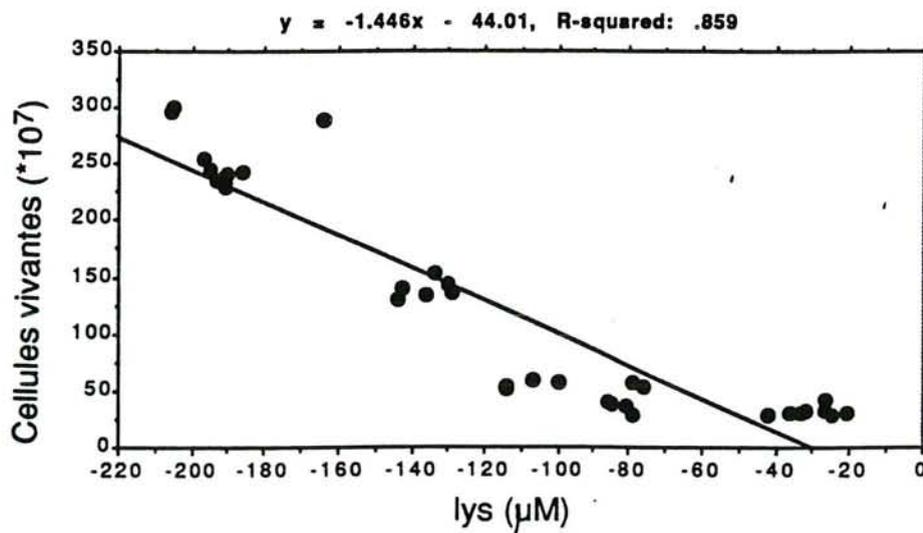


Figure 39 I

Figures 39 G, H, I : Corrélations entre le nombre de cellules vivantes et la concentration des différentes molécules dosées dans le surnageant de culture d'hybridomes Mark 3.

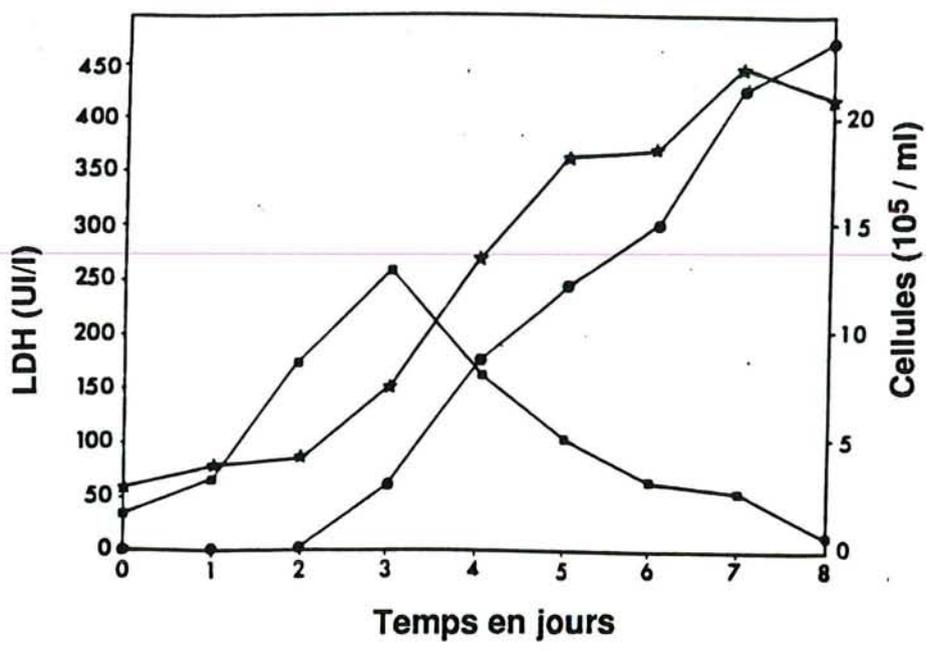


Figure 40

Figure 40 : Comparaison entre LDH et cellules mortes sur cellules Mark 3. Culture en flacons statiques sur 8 jours en batch, en RPMI + 10 % SVF.

- \* LDH
- Cellules mortes
- Cellules vivantes

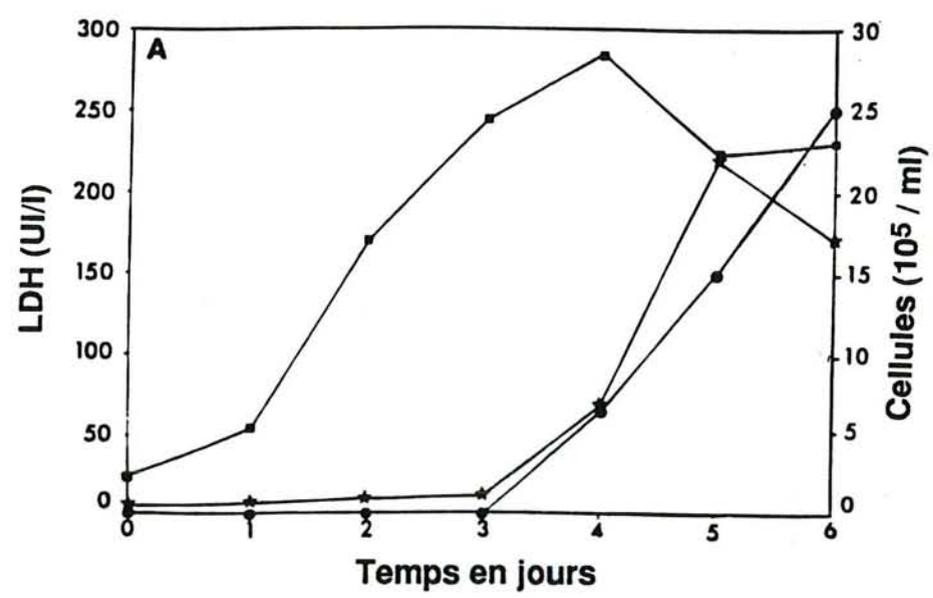


Figure 41

Figure 41 : Comparaison entre LDH et cellules mortes sur cellules Mark 3. Cultures de 6 jours en flacons spinners en récolte-recharge, en RPMI + 10 % SVF.

Nous avons donc réalisé, toujours sur cellules Mark 3, une culture de 8 jours en "batch" en flacons statiques de 25 cm<sup>2</sup>.

Au jour 0 de l'expérience, 21 flacons statiques ont étéensemencés avec  $10 \cdot 10^4$  cellules/ml (viabilité > 90 %) dans 10 ml de milieu de culture. Chaque jour, 3 flacons ont été prélevés et leurs cellules comptées. Après centrifugation à 800 g, 5 min, la LDH a été dosée sur les surnageants de culture. La figure 40 montre que l'activité de la LDH augmente parallèlement au nombre de cellules mortes (dénombrées par coloration au bleu trypan). Cette expérience a été vérifiée sur 4 autres souches d'hybridomes.

De plus, nous avons confirmé ces observations sur des cultures de 6 jours en flacons spinner en récolte-recharge, système dont le renouvellement de milieu s'approche plus d'un bioréacteur en perfusion (Figure 41).

Par la suite, nous avons utilisé la LDH comme marqueur de la mort cellulaire .

Ces différentes corrélations étant établies, nous avons cultivé nos cellules en système continu dans un réacteur.

### **3 - 3 - 3 Culture des hybridomes en bioréacteur**

#### **3 - 3 - 3 - 1 Essai d'évaluation de la croissance cellulaire en bioréacteur**

Nous avons ensuite essayé d'appliquer les corrélations établies pour évaluer la croissance cellulaire à l'intérieur d'un bioréacteur dont les cellules étaient inaccessibles.

Nous avons réalisé 6 bioréacteurs selon le protocole décrit au paragraphe 2-6-2. Ils ont tous étéensemencés à  $7,5 \cdot 10^7$  cellules pour 1,4 l de milieu (1,2 l dans le bol du réacteur et 0,2 l dans l'éponge) ce qui correspond à une concentration de  $5,35 \cdot 10^4$  cellules/ml. Ils ont été interrompus à des temps divers à savoir aux jours 3, 7, 10, 14, 14 et 21.

Les cellulesensemencées étaient des hybridomes Mark 3. Le milieu de culture était du RPMI enrichi par 10 % de SVF pour 5 d'entre eux : 3, 7, 10, 14 et 21 jours. Un 6ème a été réalisé avec seulement 5 % de SVF afin

d'étudier l'influence de la concentration en sérum sur le nombre de cellules et sur les sécrétions obtenues. Nous reparlerons de cette étude ultérieurement.

Des prélèvements sont effectués chaque jour à heure fixe et différents paramètres dosés.

La consommation journalière de milieu a été mesurée par pesée afin d'établir les productions et les consommations en fonction du volume de milieu renouvelé en 24 h.

A la fin de chaque expérience le nombre de cellules à l'intérieur de l'éponge, a été déterminé par comptage selon le protocole décrit au paragraphe 2-6-2-5 et comparé à celui obtenu en appliquant les corrélations établies lors de nos expériences en spinners et présentées dans le chapitre ci-dessus.

En fait, nous nous sommes rendu compte que ces 9 corrélations donnaient des résultats assez discordants avec les comptages effectués en fin de culture et nous n'avons pu comparer le nombre de cellules comptées (par défaut) qu'avec la moyenne des chiffres obtenus grâce aux formules établies pour le glucose et le lactate.

Temps de culture en jours	Conditions de culture	Cellules dénombrées par comptage	Cellules estimées par la moyenne des corrélations établies en glucose et lactate
3		$7.10^8$	$6,4.10^8$
7		$1,2.10^9$	$9,9.10^8$
10		$2,5.10^9$	$2,7.10^9$
14	10 % SVF	$2,7.10^9$	$3,4.10^9$
14	5 % SVF	$1,6.10^9$	$1,65.10^9$
21		$4,3.10^9$	$4,55.10^9$

Tableau 36 : Comparaison du nombre de cellules compté à la fin de la culture et estimé grâce aux corrélations établies en glucose et lactate.

Le fait que seules les corrélations établies en glucose et lactate puissent s'appliquer à nos différents bioréacteurs nous a surpris mais peut sans doute s'expliquer.

Nous sommes en bioréacteur dans un système différent de celui des spinners :

- Les cellules sont immobilisées dans un cas et agitées dans l'autre. Leur comportement est sans doute différent.

- De plus, le fait que les nutriments soient apportés en continu dans le réacteur et toutes les 24 h en spinner modifie vraisemblablement leur métabolisme.

Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par Reuveny (1986) qui a prouvé que les besoins nutritionnels de cellules étaient nettement inférieurs si celles-ci étaient cultivées en perfusion plutôt qu'en batch et ce plus particulièrement lors de leur phase stationnaire de croissance.

### 3 - 3 - 3 - 2 Etude comparative du SVF et du LS comme substituts de milieu de culture

Ayant montré en flacons spinners que le milieu LS pouvait remplacer le milieu SVF avec une prolifération cellulaire comparable et une sécrétion d'anticorps supérieure dans un système récolte-recharge, nous avons réalisé un bioréacteur où les hybridomes anti-hPL étaient cultivés en LS.

A J11, les cellules étaient entrées dans leur phase stationnaire de croissance puisque le renouvellement quotidien de milieu était de 1,250 l et la consommation de glucose stabilisée à 1,15 g/l depuis 3 jours.

A J12, nous avons donc remplacé le milieu contenant du SVF par un milieu contenant du LS à 9 % et du SVF à 1 %. 1,7 l de milieu étaient ainsi renouvelés.

Ce système ne permet jamais d'être complètement à 9 % LS + 1 % SVF mais un calcul nous a permis d'estimer le temps nécessaire pour se trouver à 99 % de nouveau milieu.

Nous avons calculé :

$$\frac{dVC_i}{dt} = DC_e - DC_i$$

V étant le volume de milieu dans le réacteur

C<sub>i</sub> étant la [C] de milieu à l'intérieur du bol

C<sub>e</sub> étant le [C] de milieu frais dans le bol

D étant le débit de la pompe

t étant le temps en jour

$$-V \frac{d(C_e - C_i)}{D(C_e - C_i)} = dt$$

C<sub>e</sub> étant une constante par rapport au temps. Sa dérivée par rapport au temps est nulle.

$$dt = \frac{-V d(-C_i)}{D(C_e - C_i)}$$

$$\log C_e - C_i = -t \frac{D}{V} + \log C_e$$

$$C_e - C_i = C_e e^{-\frac{Dt}{V}}$$

$$C_i = C_e - C_e e^{-\frac{Dt}{V}}$$

$$C_i = C_e (1 - e^{-\frac{Dt}{V}})$$

Donc au Jour J<sub>12</sub> la concentration en milieu LS + SVF est de 70 %

J<sub>13</sub> 91 %

J<sub>14</sub> 97 %

J<sub>15</sub> 99 %

Il est donc possible de raisonner à partir du J<sub>14</sub> ou J<sub>15</sub> pour établir les comparaisons entre les deux milieux.

### *3 - 3 - 3 - 2 - 1 Essai d'estimation de la pousse cellulaire*

Après avoir établi des corrélations sur les souches A49 et Mark 3, nous avons utilisé la souche anti-hPL fabriquée dans notre laboratoire pour poursuivre nos études de milieux de culture en bioréacteur.

Les expériences de corrélations décrites au chapitre 3-3-2-2 étant très lourdes (30 à 60 spinners pour chaque souche) et très coûteuses, nous avons tenté d'exploiter les résultats de ces expériences pour interpréter les cultures de la souche anti-hPL en bioréacteur.

Nous avons appliqué ces corrélations à J13, jour correspondant au maximum de glucose consommé et de lactate produit en SVF, et à J17, jour à partir duquel les cellules se trouvent totalement en milieu LS. Nous ne pouvions pas établir nos corrélations à J22 car ce jour correspond à l'arrêt de la culture, dû à un début de contamination bactérienne.

Le métabolisme des bactéries aurait sans aucun doute faussé nos interprétations.

Les différentes estimations du nombre total de cellules réparties dans l'éponge sont résumées dans le tableau suivant :

Equations établies en fonction de la souche	Nombre de cellules estimées			
	A49		Mark 3	
Glucose	nb de cell J13	nb de cell J19	nb de cell J13	nb de cell J19
$Y = - 19,8 x - 22,6$	$1,6 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$		
$Y = - 26,6 x - 24,7$			$1,8 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$
Lactate				
$Y = 17 x - 28,4$	$1,7 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$		
$Y = 19,7 x - 32,9$			$2,35 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$

Tableau 37 : Estimations en fonction des corrélations établies en A 49 et Mark 3 du nombre de cellules à l'intérieur de l'éponge au cours de la culture d'hybridomes anti-hPL en bioréacteur.

Il est impossible de comparer les chiffres obtenus à J13 et à J19 avec un comptage puisque nous n'avons accès aux cellules qu'à l'arrêt du bioréacteur. Cependant, on remarque qu'ils sont sous-estimés puisque le comptage à J22 nous donne  $9,2 \cdot 10^9$  cellules (comptage par défaut, les cellules n'étant pas récupérées à 100 %) et qu'entre J17 et J22 on observe une stabilisation de la culture (les taux de consommation de glucose et de production de lactate étant parfaitement stables).

Plusieurs hypothèses peuvent être alors émises :

1) Les valeurs obtenues en fonction des équations sur les 2 souches A49 et Mark 3 varient de façon assez importante (Tableau 37). Il est donc permis de penser que chaque souche d'hybridome a un métabolisme qui lui est propre et il est fort probable que celui de la souche hPL soit assez différent des 2 autres.

2) A J19 nous avons établi mathématiquement que les cellules se trouvaient à 100 % de milieu à base de lactosérum. Or nous avons observé précédemment que le métabolisme des cellules était très dépendant du milieu de culture (paragraphe 3-3-1-4). La production spécifique de lactate, par exemple, est supérieure en lactosérum, donc si on utilise les corrélations établies en SVF, pour une même quantité de lactate produit on aura un nombre de cellules inférieur en LS.

Il est donc clair que ce système de "surveillance" de la culture par méthode de corrélation sera à établir pour chaque souche d'hybridomes et pour chaque milieu de culture.

### *3 - 3 - 3 - 2 - 2 Etude de l'évolution de la consommation de glucose*

Nous pouvons tout d'abord faire quelques observations (Figure 42 A). Si l'on admet que la consommation du glucose est le reflet de l'évolution d'une culture on peut dire que :

- de J1 à J4 les cellules se trouvent en phase de latence. Elles essaient de s'adapter à leur nouveau mode de culture (immobilisation après l'agitation du spinner).

- de J4 à J10 les cellules sont en phase exponentielle de croissance.

- de J10 à J12 elles arrivent, malgré le renouvellement constant du milieu, à une phase stationnaire de croissance.

C'est d'ailleurs ce moment que nous avons choisi pour les passer à un autre milieu de culture.

- de J13 à J18 nous remarquons une diminution de la consommation de glucose.

Ce phénomène peut s'expliquer par les observations faites en spinner au paragraphe 3-3-1-3-1 à savoir une consommation spécifique moins importante en LS qu'en SVF.

De plus, l'adaptation des cellules à ce nouveau milieu a pu entraîner un ralentissement ou un arrêt momentané de la pousse cellulaire.

- à partir de J18 les cellules semblent atteindre un plateau tout comme en SVF au jours 10, 11 et 12. Notre souhait était de maintenir cette culture le plus longtemps possible dans cette phase de latence qui correspond souvent à un maximum de production d'anticorps mais une contamination nous a, hélas, obligé à arrêter là l'expérience à J<sub>22</sub>.

### *3 - 3 - 3 - 2 - 3 Etude de la production de lactate*

La figure 42 A fait apparaître dans les deux cas, une cinétique de production de lactate tout à fait proportionnelle à celle de la consommation de glucose. Toutefois, ces productions et consommations sont supérieures en milieu LS.

Ceci correspond bien aux observations faites en culture agitée (paragraphe 3-3-1-3-2). On remarque, en effet, qu'après une phase de latence de 4 jours, 90 % du glucose est transformé en lactate en milieu SVF, alors que 70 % seulement se trouve transformé en milieu LS.

Ces remarques expliquent l'impossibilité que nous avons eu d'établir une estimation exacte du nombre de cellules présentes dans l'éponge, dans un milieu LS, grâce aux corrélations établies en SVF.

C'est sans aucun doute aussi le mode de culture différent (cellules piégées ou agitées, perfusion ou récolte-recharge toutes les 24 h) qui influe sur le métabolisme cellulaire. En effet, le fait de se trouver en récolte-recharge avec un taux de glucose qui chute très rapidement quand les cellules sont très nombreuses, fait que les conditions de cultures sont fondamentalement changées.

De plus, nous avons au niveau du bioréacteur un apport d'oxygène régulé, lequel joue un rôle prépondérant dans le métabolisme énergétique et plus particulièrement dans la glycolyse.

#### *3 - 3 - 3 - 2 - 4 Etude de la consommation de glutamine*

Nous remarquons que tout comme en récolte-recharge la consommation de glutamine est deux fois plus importante lorsque les cellules se trouvent dans le milieu LS, puisqu'elle est inférieure à 1 mM en SVF et atteint pratiquement 2 mM en LS (Figure 42 B).

#### *3 - 3 - 3 - 2 - 5 Etude de la production d'ammoniaque (Figure 42 C)*

Après une production relativement stable en début de culture, la nette progression du taux d'ammoniaque à J13 correspond vraisemblablement au chargement de milieu : nous avons déjà observé lors des cultures en récolte-recharge que la production de  $\text{NH}_3$  était globalement supérieure en milieu LS (paragraphe 3-3-1-3-3). Les cellules consomment plus de Glutamine en LS et produisent plus d' $\text{NH}_3$ .

Quant à l'augmentation régulière de J20 à J22, elle pourrait s'expliquer par la contamination bactérienne qui s'accompagne généralement d'une importante libération d' $\text{NH}_3$ .

De plus, nous pouvons observer que le taux de  $\text{NH}_3$  dans les bioréacteurs à renouvellement continu reste relativement faible puisque toujours inférieur à 1 mM en milieu LS et inférieur à 0,5 mM en milieu SVF. Cette remarque est valable pour tous les bioréacteurs que nous avons réalisés.

Ce taux n'est vraisemblablement gênant ni pour la croissance cellulaire, ni pour la production d'immunoglobulines et il ne semble pas nécessaire de devoir détoxifier le milieu de culture dans un système à renouvellement continu.

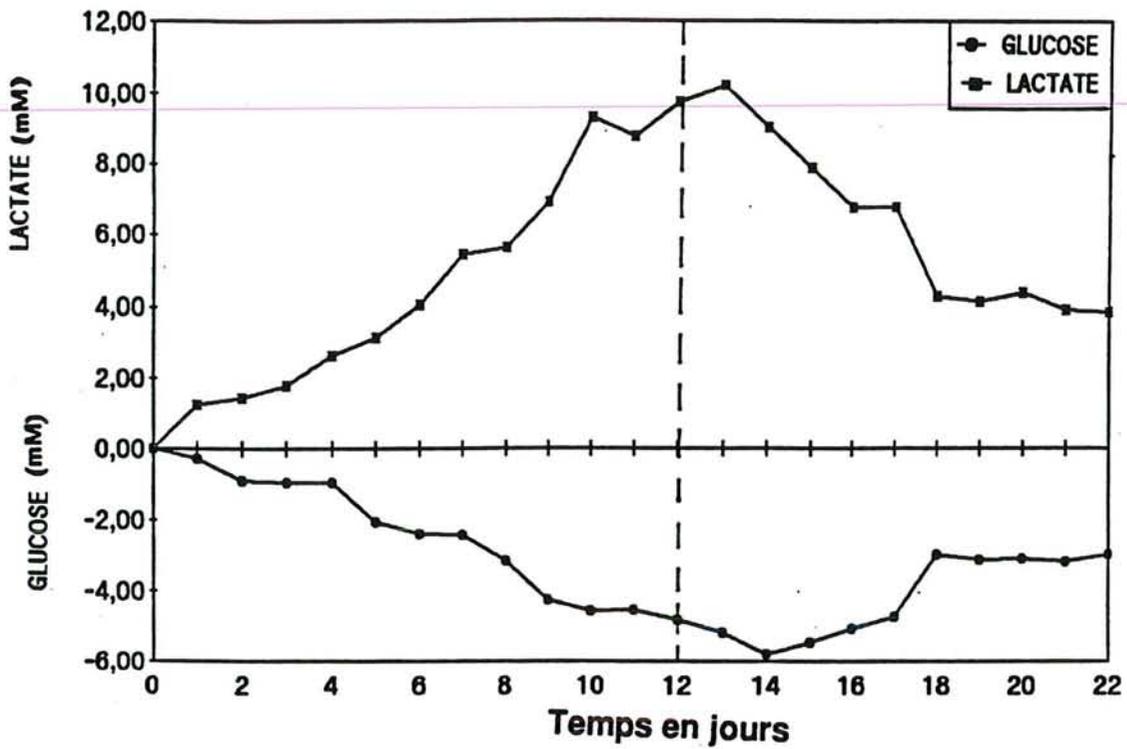


Figure 42 A

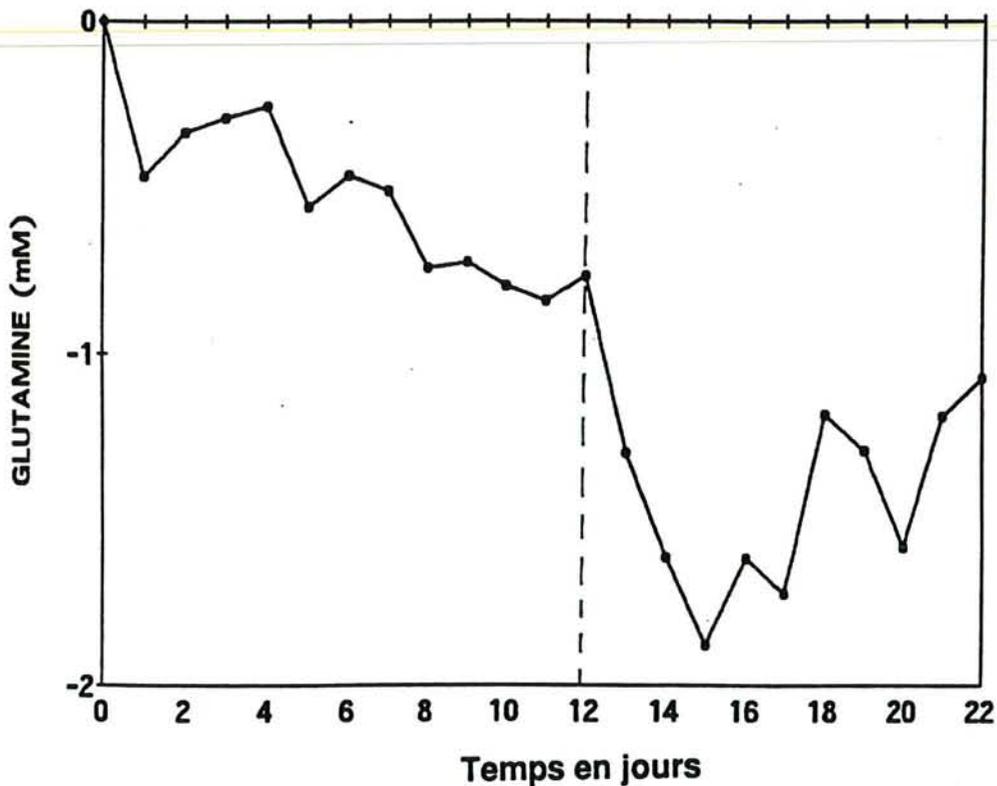


Figure 42 B

Figures 42 A et B : Variations des glucose, lactate, glutamine au cours d'une culture de la souche anti-hPL en bioréacteur avec renouvellement continu en SVF pendant 12 jours puis en LS jusqu'à la fin de la culture.

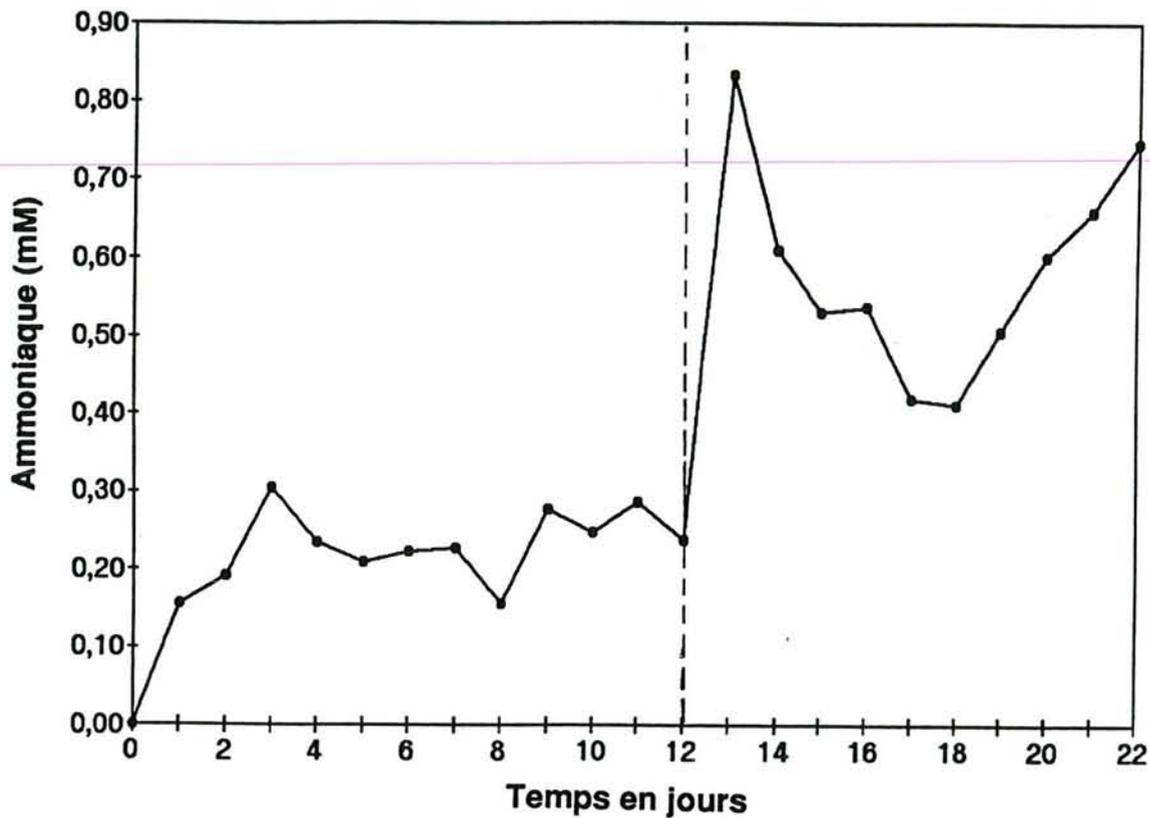


Figure 42 C

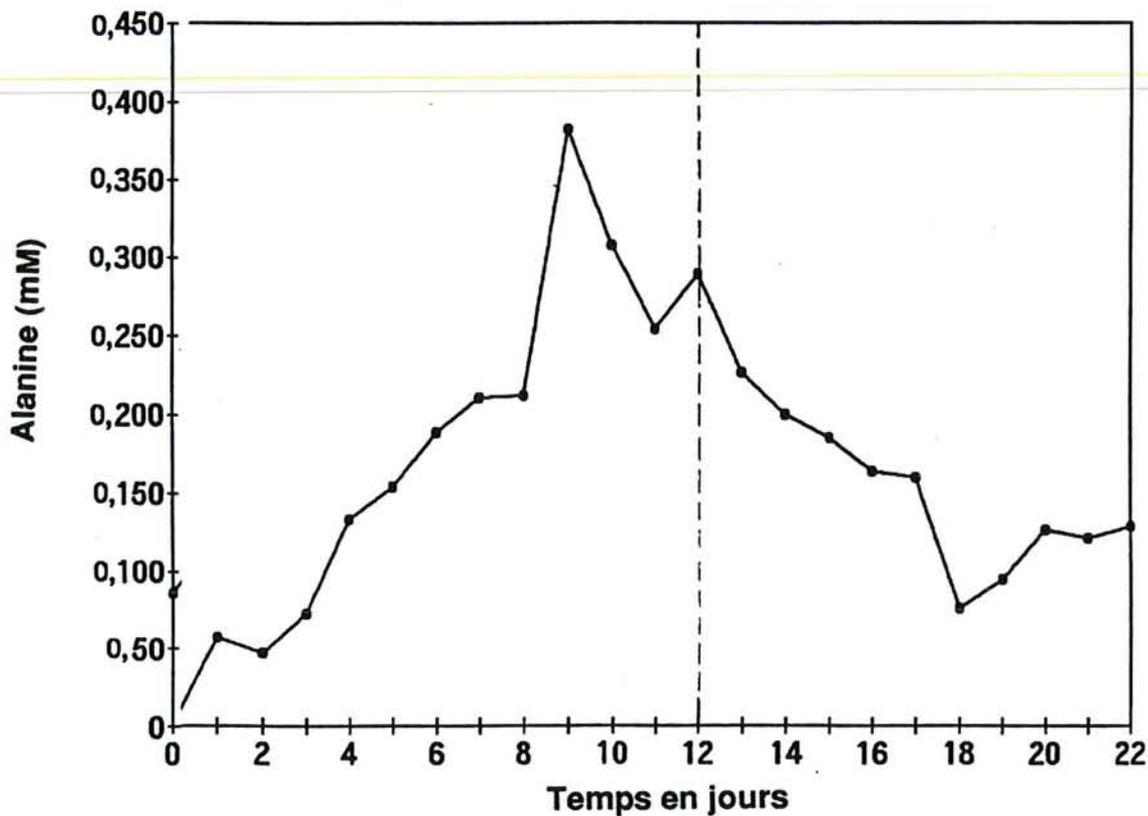


Figure 42 D

Figure 42 C et D : Variations de l'ammoniaque et de l'alanine au cours d'une culture de la souche anti-hPL en bioréacteur avec renouvellement continu en SVF pendant 12 jours puis en LS jusqu'à la fin de la culture.

### 3 - 3 - 3 - 2 - 6 Etude de la production d'alanine (Figure 42 D)

La cinétique de la production d'alanine suit tout à fait celle de la consommation de glucose. Il serait donc logique de penser que cet acide aminé pourrait être également utilisé comme marqueur du métabolisme actif des cellules et donc du nombre de cellules vivantes.

Nous avons donc appliqué les équations des corrélations établies :

1) Avec la souche Mark 3 :

-  $Y = 0,29 x - 15,84$  et avons obtenu une estimation de  $1,5 \cdot 10^9$  cellules

2) Avec la souche A49 :

-  $Y = 0,22 x - 16,35$  pour obtenir  $1,1 \cdot 10^9$  cellules

Nous remarquons que ces estimations sont relativement proches de celles établies en glucose et lactate.

Les corrélations obtenues avec l'alanine ne s'étant vérifiées que dans 2/3 de nos bioréacteurs, nous ne les avons pas présentées.

Comme de plus la technique de dosage de l'alanine, qui se fait concomitamment avec celui de tous les autres acides aminés, est plus lourde que celle du glucose ou du lactate, nous avons préféré utiliser seulement ces deux derniers comme contrôles continus de nos cultures.

### 3 - 3 - 3 - 2 - 7 Etude de l'évolution de la LDH (Figure 42 E)

La courbe du marqueur de la mort cellulaire présente un pic dès le premier jour de la culture. Ceci s'explique par la mort, lors de l'ensemencement, d'un nombre de cellules relativement important. En effet, ces cellules cultivées en suspension dans un spinner, sont centrifugées et resuspendues dans un faible volume avant d'être injectées à l'aide d'une seringue à l'intérieur de l'éponge où elles doivent trouver leur place. Ces différentes manipulations produisent un stress, et peuvent entraîner la mort de certaines cellules.

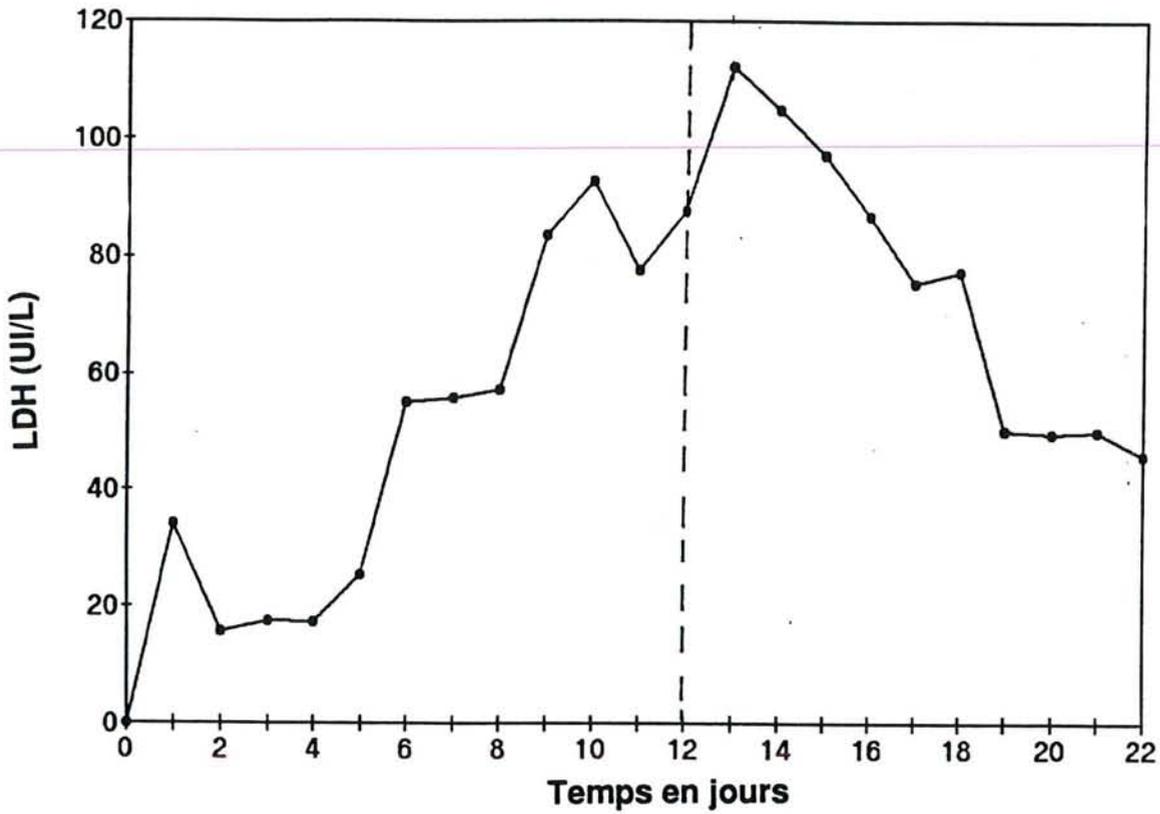


Figure 42 E

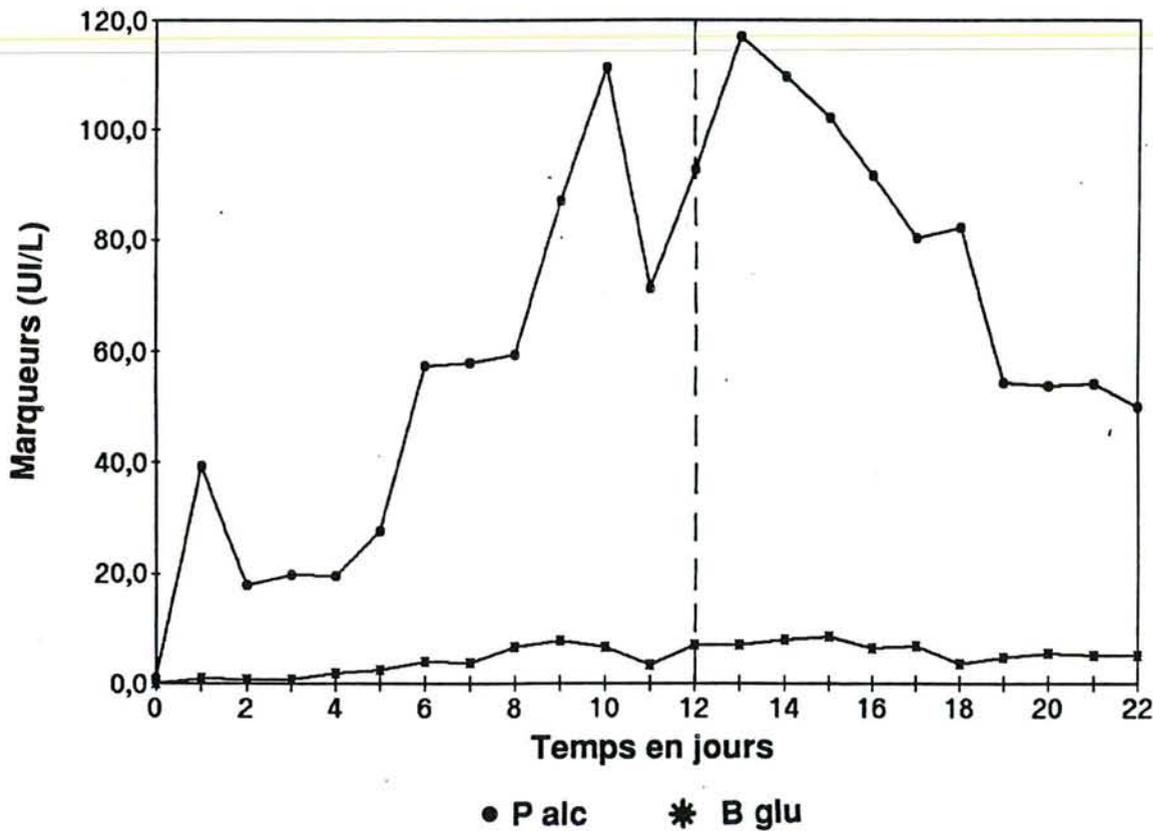


Figure 42 F

Figures 42 E et F : Evolutions des marqueurs de la viabilité et de la mort cellulaire au cours d'une culture de la souche anti-hPL en bioréacteur avec renouvellement continu en SVF pendant 12 jours puis en LS jusqu'à la fin de la culture.

Au cours de la culture on observe une évolution de cette enzyme par palier qui peut s'expliquer par un équilibre se réalisant entre les cellules qui se divisent et celles qui meurent.

A J13, la forte augmentation de la LDH est probablement due à la mort de nombreuses cellules lors du changement de milieu qui, même s'il a été progressif (3 à 4 jours), entraîne toujours un stress. Cette observation a déjà été faite tant en flacons statiques qu'en flacons agités.

Ensuite, nous observons une diminution du taux de LDH jusqu'à la fin de la culture.

Deux hypothèses peuvent être émises :

- soit la libération spécifique de LDH est inférieure en présence de LS,
- soit, et ceci a déjà été énoncé précédemment, le lactosérum ralentirait la mort cellulaire. Les cellules poussant un peu moins vite en milieu LS, à ce stade de la culture où elles ont déjà bien colonisé les espaces de l'éponge, il y aurait moins de mort cellulaire.

### *3 - 3 - 3 - 2 - 8 Etude des enzymes marqueurs de la viabilité cellulaire (Figure 42 F)*

La Pal évolue comme la LDH par paliers et suit d'assez près l'évolution de la consommation de glucose et la production de lactate.

A partir de J13 on observe une nette diminution du taux de Pal. Comme précédemment, il est possible de supposer qu'en présence de LS :

- la production spécifique de cette enzyme est inférieure,
- la croissance cellulaire est ralentie.

Quant à la  $\beta$  glucuronidase, sans doute à cause du renouvellement continu du milieu, son taux trop faible (inférieur au seuil de sensibilité du dosage), ne nous permet pas de tirer quelles que conclusions que ce soit.

### 3 - 3 - 3 - 2 - 9 Etude de la production d'anticorps (Figure 42 G)

Après une montée régulière du taux d'anticorps jusqu'à J10 puis une stabilisation de J10 à J14, nous observons à J15 une brusque augmentation de ce taux.

Ce pic s'explique facilement par le fait qu'un nombre sans doute relativement important de cellules n'ont pas supporté le changement de milieu et sont mortes en relargant une quantité importante d'anticorps. Ce phénomène a été maintes et maintes fois décrit dans la littérature.

Mais ce qui est le plus intéressant, c'est le phénomène observé en fin de culture, à savoir qu'après ce pic, il y a une stabilisation de la sécrétion à un taux plus élevé qu'en SVF. Cette constatation corrobore les observations faites en flacons spinners.

De plus, les observations précédentes nous permettant de supposer que nous sommes en présence d'un nombre moins important de cellules qu'en SVF, nous pouvons affirmer que ce substitut LS, moins cher que le SVF, présente un intérêt majeur pour la production d'anticorps.

L'objectif de notre travail restant cette production d'anticorps à moindre coût, nous avons voulu ensuite réaliser des bioréacteurs en batch pour établir un rapport entre le taux d'anticorps obtenus et la quantité de milieu utilisé.

### BIOREACTEUR hPL SVF/LS

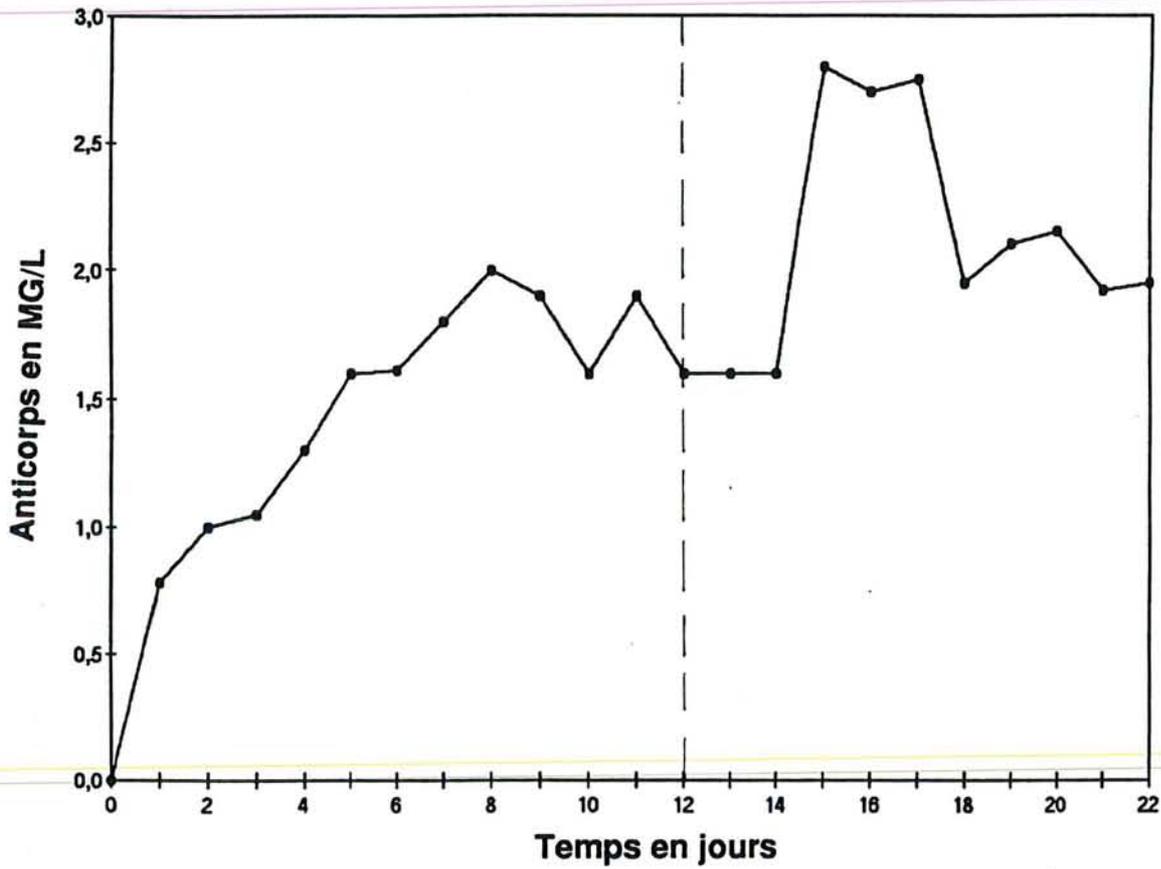


Figure 42 G

Figure 42 G : Evolution des anticorps au cours d'une culture de la souche anti-hPL en bioréacteur avec renouvellement continu en SVF pendant 12 jours puis en LS jusqu'à la fin de la culture.

### 3 - 3 - 3 - 3 - Etude comparative de différents modes de culture en masse

Une étude comparative a été établie sur les 14 derniers bioréacteurs réalisés au laboratoire afin de trouver les conditions optimales de culture permettant d'obtenir le meilleur rendement de production d'anticorps.

Le tableau n° 38 présente les quantités d'anticorps obtenus au cours d'une culture en fonction :

- de la souche cellulaire,
- du milieu de culture,
- du nombre de cellules au départ de la culture,
- de la quantité de milieu utilisée.

8 bioréacteurs ont été réalisés avec la souche Mark 3 et un système d'alimentation continue.

La souche anti-hPL a été utilisée pour les 6 autres, l'un ayant fonctionné en renouvellement continu et les 5 autres en batch, ou système fermé, de 7 jours.

Pour une meilleure approche comparative, nous raisonnerons toujours en sécrétions ramenées au litre de milieu consommé ou rapportées à  $10^9$  cellules.

Malgré tout, la sécrétion obtenue, étant particulièrement faible, avec les cellules Mark 3 lors de la culture n° 8 (à 25 mg / l /  $10^9$  cellules), nous avons préféré continuer pour les expériences suivantes avec la souche anti-hPL que nous maintenions en culture de routine.

Pour établir des comparaisons de sécrétions entre plusieurs expériences, il faudrait être certain de travailler avec des cellules se trouvant toujours au même stade de culture.

TYPE CELLULAIRE : HYBRIDOME Mark 3

N°	Date	Nombre de cellules au départ	Nombre de cellules comptées en fin de culture	Nombre de jours de culture	Sécrétion en mg / l ramenée à 10 <sup>9</sup> cellules	Quantité de milieu en litres	Mode de culture	Milieu utilisé	Total des sécrétions en mg	Sécrétion en mg / l de milieu consommé
1	7/90	6.10 <sup>8</sup>	1.10 <sup>9</sup>	15	9,45	18,4	Continu	RPMI + SVF à 10 %	9,45	0,51
2	8/90	7,5.10 <sup>8</sup>	2,8.10 <sup>9</sup>	16	9,9	26,0	Continu	RPMI + SVF à 10 %	27,90	1,07
3	11/90	7,5.10 <sup>7</sup>	7.10 <sup>8</sup>	3		3,8	Continu	RPMI + SVF à 10 %		
4	12/90	7,5.10 <sup>7</sup>	2,5.10 <sup>9</sup>	10	3,3	17,5	Continu	RPMI + SVF à 10 %	8,17	0,46
5	2/91	7,5.10 <sup>7</sup>	4,3.10 <sup>9</sup>	22	6,7	45,5	Continu	RPMI + SVF à 10 %	29,08	0,64
6	3/91	7,5.10 <sup>7</sup>	2,7.10 <sup>9</sup>	14	5,2	21,8	Continu	RPMI + SVF à 10 %	14,16	0,65
7	4/91	7,5.10 <sup>7</sup>	1,65.10 <sup>9</sup>	14	6,9	18,5	Continu	SVF 5 %	11,37	0,62
8	6/91	7,5.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	7	2,0	7,8	Continu	RPMI + SVF à 10 %	2,40	0,30

Tableau 38 : Tableau récapitulatif des 14 bioréacteurs réalisés au laboratoire : Etude comparative des taux d'anticorps en fonction de différents paramètres sur les souches d'hybridomes anti hPL et mark 3.

TYPE CELLULAIRE : HYBRIDOME ANTI-hPL

N°	Date	Nombre de cellules au départ	Nombre de cellules comptées en fin de culture	Nombre de jours de culture	Sécrétion en mg / l rapportée à $10^9$ cellules	Quantité de milieu en litres	Mode de culture	Milieu utilisé	Total des sécrétions en mg	Sécrétion mg / l de milieu consommé
9	9/91	$7,5 \cdot 10^7$	$9,2 \cdot 10^9$	22	24,7	26,4	Continu	SVF--> LS	227,14	8,6
10	4/1/92	$7,5 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^9$	7	2,0	1,4	Batch éponge	SVF	3,77	2,69
11	10/1/92	$7,5 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^9$	7	4,0	1,2	Batch en suspension	LS	4,03	3,35
12	6/2/92	$7,5 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^{10}$	7	0,45	1,4	Batch éponge	SVF + cortine	4,49	3,2
13	25/2/92	$1,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	7	1,0	1,4	Batch éponge	LS + Gln	4,25	3,03
14	3/92	$1,5 \cdot 10^8$	$5,4 \cdot 10^8$	7	5,0	1,4	Batch éponge	LS	5,15	3,67

Tableau 38 : Tableau récapitulatif des 14 bioréacteurs réalisés au laboratoire : Etude comparative des taux d'anticorps en fonction de différents paramètres sur les souches d'hybridomes anti hPL et mark 3.

Pour cela, deux solutions :

- soit l'utilisation d'une même souche, bien stabilisée et dont la sécrétion varie peu au cours du temps ;

- soit l'utilisation d'une banque de cellules conservées à  $-196^{\circ}\text{C}$  au même stade de culture dont on décongèle une cryule avant chaque début d'expérience. Les deux solutions ont leurs avantages et leurs inconvénients ; nous avons choisi la première. La souche Mark 3 étant bien stable, nous avons préféré prendre le risque d'une éventuelle diminution de sécrétion (qui n'est d'ailleurs apparue qu'après un an de travail) plutôt que d'utiliser différentes cryules, ne sachant pas comment évoluent les cellules au cours du temps à  $-196^{\circ}\text{C}$ . De plus, Hill G.W. et al (1991) ont observé comme d'autres équipes d'ailleurs, une diminution de la productivité des hybridomes après décongélation qui peut aller jusqu'à 40 %.

### *3 - 3 - 3 - 3 - 1 Effet de la concentration cellulaire de départ*

Si l'on compare les bioréacteurs 1 et 2 :

- On remarque que pour une différence d'ensemencement faible  $6.10^8$  cellules et  $7,5.10^8$ , on obtient dans un cas après 15 jours  $1.10^9$  cellules et dans l'autre après 16 jours  $2,8.10^9$ , c'est-à-dire qu'elles se sont multipliées dans le premier cas par 1,6 et dans le second par 3,7.

Les conditions de culture étant par ailleurs restées les mêmes, on peut dire que les cellules réagissent différemment selon les manipulations sans pouvoir donner d'explications. Peut-être ne se trouvaient-elles pas dans la même phase de leur cycle au moment de l'ensemencement ? Il serait intéressant de le vérifier par cytométrie de flux avant chaque expérience.

De plus, celles qui ont poussé le mieux ont aussi produit un taux d'anticorps (ramené au litre de milieu consommé) plus important. Par contre si on ramène ces taux d'anticorps produits au nombre de cellules, il est de  $9,45 \text{ mg}/10^9$  cellules dans le premier cas, et de  $9,9 \text{ mg}/10^9$  cellules dans le second et peuvent donc être considérés comme équivalents.

Cette remarque est plutôt en contradiction avec d'autres constatations faites lors de cette étude comparative.

- Si l'on compare le bioréacteur n° 2 avec le n° 6 ensemencé 9 mois après à une concentration 10 fois moins importante, on remarque que le même nombre de cellules a été obtenu après 14 jours de culture ( $2,7 \cdot 10^9$  au lieu de  $2,8 \cdot 10^9$  à 16 jours).

Par contre la sécrétion spécifique est plus faible pour le second (5,2 mg/l au lieu de 9 mg/l) ainsi que la sécrétion / litre de milieu consommé. Cela peut être dû au vieillissement de la souche évoqué précédemment (le fait que la culture ait duré 2 jours de moins ne pouvant expliquer cette diminution à lui seul). On ne peut cependant pas écarter l'influence de la concentration d'ensemencement de départ.

De plus, le réacteur n° 3 nous a permis de constater qu'en ensemencant à une concentration 10 fois inférieure à celles des bioréacteurs 1 et 2, les cellules se sont multipliées rapidement en 3 jours (temps de doublement = 15,6 h).

Nous nous sommes alors fixés à cette concentration pour toutes nos expériences :  $7,5 \cdot 10^7$  cellules, c'est-à-dire  $5 \cdot 10^4$  cellules / ml de milieu.

Ceci ne nous a posé aucun problème quelque soit la souche, jusqu'au moment où nous sommes passés en milieu LS + SCH où là, nous avons subi une série d'échecs : les cellules anti-hPL n'ayant pas poussé dans plusieurs bioréacteurs réalisés à la suite l'un de l'autre.

Après de nombreux essais, nous avons ensemencé à une concentration deux fois plus élevée et avons résolu notre problème. Ce phénomène est d'autant plus étonnant que lors de nos cultures soit en boîtes, soit en spinners, soit en réacteur avec les cellules en suspension dans le milieu, nous ne rencontrons pas ce problème. Cet élément confirme une fois de plus le fait qu'il est très difficile de comparer le comportement cellulaire lorsque les conditions de culture varient, en particulier lors du passage d'un système en suspension à un système à cellules piégées.

### *3 - 3 - 3 - 3 - 2 Evolution des cultures en fonction du temps*

Nous avons réalisé avec toujours le même ensemencement de départ ( $7,5 \cdot 10^7$  cellules) une série de réacteurs que nous avons interrompu à 3, 7, 10, 15 et 21 Jours.

Le bioréacteur n° 3 nous permet de constater qu'en 3 jours les cellules se sont multipliées par 10.

C'est donc au début de la culture, le temps d'adaptation à un nouvel environnement étant terminé, que les cellules poussent le plus vite puisqu'elles doublent entre le 3ème et 7ème jour. Il semble d'ailleurs que les cellules se multiplient par plateaux (Figure 43 B) comme si elles évoluaient en fonction de cycles réguliers. En effet, nous constatons qu'au delà de 15 jours de culture, la croissance cellulaire semble redémarrer à un taux identique à celui observé entre 0 et 7 jours (pentes de la courbe identiques).

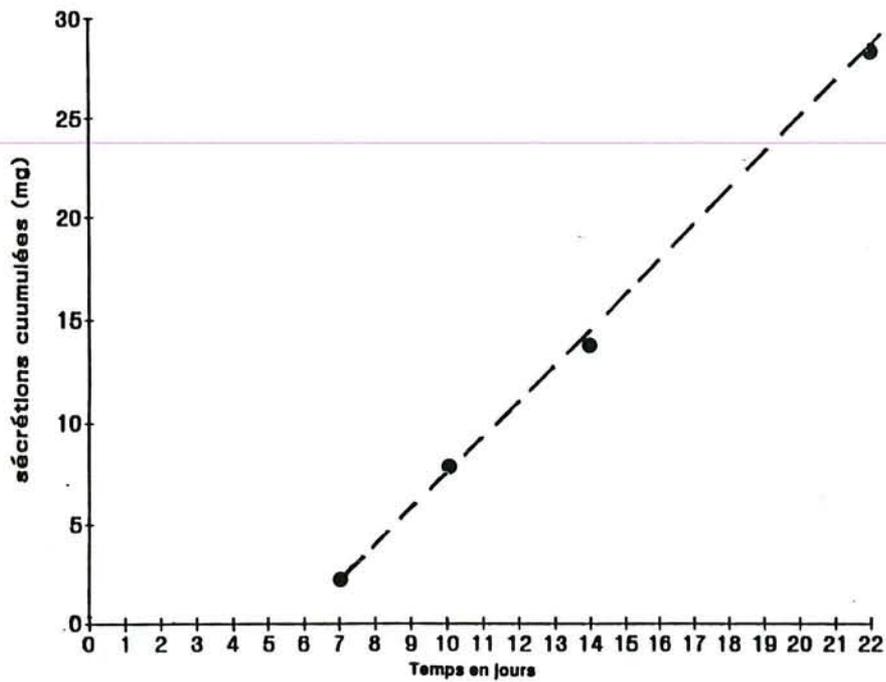
Cependant il serait prudent de confirmer ces observations en réalisant quelques bioréacteurs supplémentaires d'environ 10 jours.

La figure 43 C montre que la consommation du milieu de culture suit étroitement la concentration cellulaire au cours du temps. Les sécrétions cumulées quant à elles restent proportionnelles au temps de culture (Figure 43 A)

On peut donc s'interroger sur l'intérêt de prolonger une culture au-delà de 15 jours. Ne serait-il pas préférable de réaliser deux bioréacteurs de 15 jours au lieu d'un de 30 jours, d'autant qu'au-delà de 15 jours la consommation de milieu redevient plus importante ?.

Par contre les sécrétions ramenées au litre de milieu consommé montrent une stabilisation au-delà de 15 jours (Tableau 39).

Etude comparative de bioréacteurs  
cellules mark 3



Etude comparative de bioréacteurs  
cellules mark 3

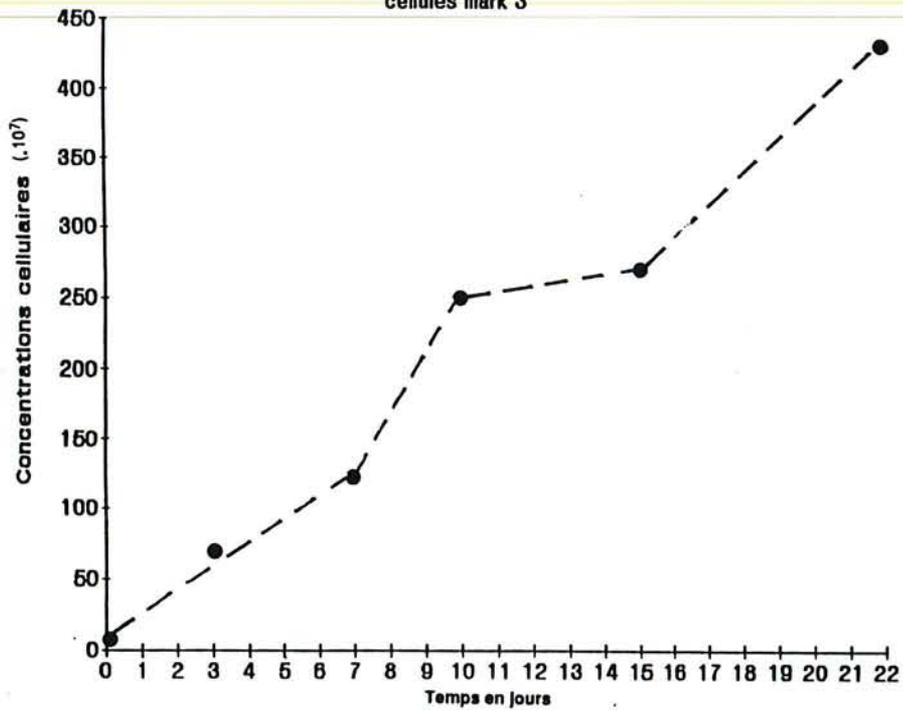


Figure 43 A et B : Evolution des concentrations cellulaires et des sécrétions dans différents bioréacteursensemencés à  $7.5 \cdot 10^7$  cellules Mark 3 dans du milieu RPMI + 10% de SVF.

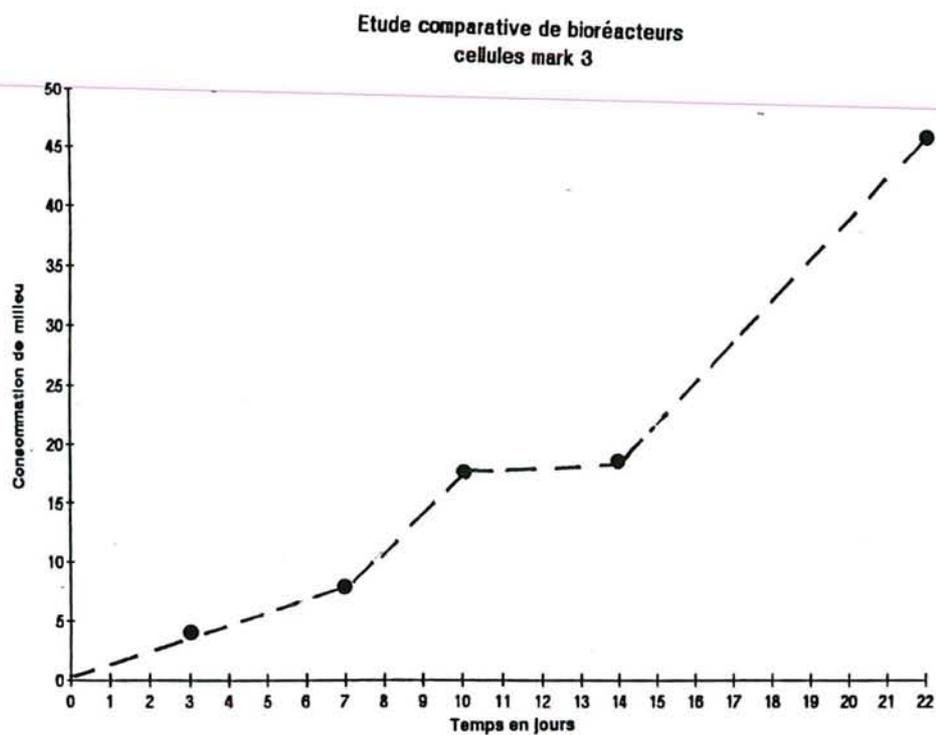


Figure 43 C : Consommation de milieu RPMI + 10% SVF en fonction du temps de culture de cellules Mark 3

Temps de culture (en jours)	7	10	14	22
Sécrétions en mg/l milieu cons.	0,3	0,45	0,65	0,65

Tableau 39 : Evolution des sécrétions ramenées au litre de milieu consommé en fonction du temps de culture.

### 3 - 3 - 3 - 3 - 3 Influence de la concentration en SVF

Si l'on compare les bioréacteurs 6 et 7 dont la seule différence est leur milieu de culture, l'un a été réalisé avec un milieu de culture supplémenté par 10 % de SVF (Bio 6), l'autre par 5 % SVF (Bio 7). On constate que le premier atteint une concentration finale de  $2,5 \cdot 10^9$  cellules alors que le second n'atteint que  $1,65 \cdot 10^9$ .

Le passage de 10 % à 5 % entraîne une diminution du nombre de cellules d'environ 1/3 et donc du taux de croissance. Mais ceci présente l'avantage de réduire le renouvellement du milieu (21,8 l à 18,5 l), puisque celui-ci est fixé en fonction de la consommation du glucose. De plus, le milieu de culture ne contenant que 5 % de SVF, une double économie est réalisée.

Par ailleurs même si la sécrétion par litre de milieu consommé est équivalente (0,65 et 0,61 mg/l), la sécrétion spécifique c'est-à-dire ramenée au nombre de cellules est supérieure (6,9 au lieu de 5,2). L'intérêt de cultiver les cellules à 5 % de SVF semble donc tout à fait évident.

Toutes ces remarques sur des bioréacteurs à renouvellement continu réalisés avec la souche Mark 3 nous ont amené à :

- ensemercer à une concentration d'environ  $5 \cdot 10^4$  cellules / ml de milieu présent (dans le bioréacteur, ce qui correspond à  $30 \cdot 10^4$  cellules réparties dans les 250 ml irrigant l'éponge.
- utiliser plutôt du milieu de culture complémenté à 5 % de SVF.
- quant à la durée de la culture, elle reste fonction des contraintes des manipulations.

### 3 - 3 - 3 - 3 - 4 Comparaison des modes de culture

Nous nous sommes ensuite intéressés au mode de culture. Cette étude a été menée sur la souche anti-hPL.

Nous avons débuté notre expérimentation par un réacteur de 22 jours en renouvellement continu (afin de le comparer à celui de 22 jours réalisé avec la souche Mark 3).

La deuxième souche a poussé deux fois plus vite ( $9,2 \cdot 10^9$  au lieu de  $4,3 \cdot 10^9$ ) avec une sécrétion ramenée au litre de milieu 10 fois plus importante, 8,6 mg/l contre 0,6 mg/l. Il n'est donc, une fois de plus, pas possible de comparer les deux souches entre elles.

La comparaison des trois premiers modes de production est intéressante car dans tous les cas la consommation de milieu est équivalente :

- 7 x 150 ml = 1,05 l en spinner
- 1,2 l en batch avec cellules en suspension
- 1,4 l en batch avec cellules dans la mousse

	Modes de culture			
	Spinner en récolte-recharge 7 J	Bioréacteur en Batch éponge 7 J	Bioréacteur en Batch suspension 7 J	Bioréacteur à renouvellement continu 22 J
Sécrétions spécifiques en mg (ramenées à 10 <sup>9</sup> cellules)	58	9,5	4,0	24,7
Total des sécrétions (en mg)	26,1	5,20	4,0	227,1
Sécrétions en mg cumulées et ramenées au litre de milieu consommé	24,8	3,70	3,40	8,6

Tableau 40 : Comparaison des sécrétions selon 4 modes de culture différents sur des hybridomes anti-hPL cultivés en milieu LS + SCH.

Si l'on considère les 3 cultures de 7 jours, la technique de production d'anticorps en spinner en mode récolte-recharge l'emporte très nettement sur les bioréacteurs en batch, puisque la concentration en Ac/l de milieu est 7 fois plus importante, de même que celle ramenée au nombre de cellules. Ceci est tout à fait logique dans le premier cas le renouvellement complet du milieu est réalisé chaque jour (150 ml) alors que dans un batch, il y a à la fois épuisement du milieu nutritif et accumulation de toxiques.

Cependant, il faut souligner qu'un bioréacteur en batch demande moins de manipulations qu'un spinner en récolte-recharge.

Maintenant si l'on compare les productions cumulées d'anticorps de 3 spinners de 7 jours et d'un bioréacteur de 22 jours, on obtient dans le même temps de culture :

$26,1 \times 3 = \underline{78,3 \text{ mg}}$  en spinner contre  $\underline{227,14 \text{ mg}}$  en bioréacteur

Par contre si l'on raisonne en quantité d'anticorps produits par litre de milieu consommé, le spinner présente un avantage puisqu'il produit 3 fois plus d'anticorps (24,8 mg contre 8,6 mg) pour la même quantité de milieu utilisé. Mais le mode de culture en bioréacteur à renouvellement continu permet d'obtenir une quantité finale d'anticorps 3 fois plus importante pour des contraintes de manipulations réduites.

### *3 - 3 - 3 - 3 - 5 Comparaison du complément de milieu de culture.*

Si l'on considère les cultures 10 et 14, c'est-à-dire des batchs de 7 jours, avec cellules piégées dans l'éponge, l'un étant en milieu SVF et l'autre en milieu LS + SCH, on remarque qu'en SVF les cellules sont passées de  $7,5 \cdot 10^7$  à  $1,9 \cdot 10^9$  et qu'en LS + SCH elles se sont simplement multipliées par 4 ( $1,5 \cdot 10^8$  à  $5,4 \cdot 10^8$ ) alors que les sécrétions par litre de milieu consommé sont de 2,7 mg en SVF et de 3,7 mg en LS + SCH. Les cellules dont la croissance était plus faible ont sécrété plus d'anticorps.

L'avantage de la culture en milieu LS est une fois de plus confirmée d'autant que si l'on ramenait la sécrétion au nombre de cellules, l'écart est encore plus évident (2 mg à 9,5 mg).

D'autre part, il est important de signaler qu'une étude comparative des rendements de purification des immunoglobulines à partir de surnageants contenant soit du SVF soit du lactosérum a montré un net avantage pour ce dernier. Ce rendement est passé de 44 à 62% pour des IgM et de 57 à 83% pour des IgG. Cette étude a été réalisée au laboratoire du Professeur Bazin après des cultures en récolte-recharge de deux souches d'hybridomes du laboratoire.

### *3 - 3 - 3 - 3 - 6 Intérêt du système "éponge"*

Si l'on compare les cultures 11 et 14, c'est-à-dire des batchs de 7 jours en milieu LS + SCH, les cellules étant dans l'un en suspension dans le bol et dans l'autre piégées dans l'éponge, on note que les cellules se multiplient 4 fois plus vite en suspension mais que leur sécrétion spécifique est nettement inférieure (4 mg au lieu de 9,5 mg).

Une fois encore, nous montrons qu'une croissance cellulaire rapide est plutôt défavorable à une bonne sécrétion.

### 3 - 3 - 3 - 3- 7 Essais de stimulation de la sécrétion

Dans le but de stimuler la sécrétion nous avons ajouté diverses molécules durant des cultures en batch telles que de la cortine ou de la glutamine. Ces expériences n'ont pas répondu à notre attente.

En effet, la cortine ajoutée à raison de 100 µl aux jours 3 et 5 de la culture semble avoir multiplié la croissance cellulaire par 5 (Bioréacteurs 10 et 12) sans toutefois augmenter sensiblement la sécrétion (7,7 mg à 3,2 mg).

Cette spécialité du laboratoire Laroche Navarron est un extrait de cortico-surrénale titré à 0,1 mg/ml de corticoïdes exprimés en hydrocortisone.

Ce stimulant métabolique grâce aux glucocorticoïdes qu'il contient joue un rôle dans le métabolisme énergétique en régulant essentiellement le métabolisme du glucose et en entraînant une conversion en glycogène des acides aminés glycoformateurs.

Par ailleurs, la glutamine, élément énergétique de la cellules, ajoutée dans le bioréacteur n° 13 au jour J<sub>4</sub> à 4 mM et au jour J<sub>6</sub> à 2 mM n'a pas amélioré la croissance cellulaire ( $4,5 \cdot 10^8$  au lieu de  $5,4 \cdot 10^8$  pour le bioréacteur n° 10), ni la sécrétion (3 mg au lieu de 3,7 mg).

Toutefois, il serait utile de compléter ces études en essayant d'autres concentrations de cortine ou de glutamine ajoutées à des temps différents de la culture.

### 3 - 3 - 3 - 4 Discussion

Les résultats précédents nous permettent d'émettre un certain nombre d'hypothèses qui restent à confirmer par de nouvelles manipulations. En effet, les paramètres influençant le comportement cellulaire "*in vitro*" sont nombreux et parfois mal déterminés (ASHIHARA et BASERGA, 1979).

Nous avons observé quelques variations concernant le taux de croissance dont les causes sont encore inconnues.

Une multiplication du nombre d'expériences pourrait apporter des éclaircissements et permettre une exploitation plus sûre. Mais devant la lourdeur des techniques et le coût important, cette répétabilité reste très limitée.

C'est en tenant compte de ces remarques que nous essayerons d'interpréter au plus juste les événements observés.

#### *3 - 3 - 3 - 4 - 1 Influence du taux d'ensemencement*

Des bioréacteurs ensemencés dans un système à renouvellement continu à des concentrations différentes (tant pour la souche Mark 3 que pour la souche anti-hPL) ont montré que la concentration cellulaire de départ influence peu la quantité de cellules obtenues en fin de culture.

En effet, deux bioréacteurs ensemencés à des concentrations cellulaires proches donnent un nombre de cellules très différent en fin de culture alors que deux autres bioréacteurs ensemencés à des concentrations très différentes donnent un nombre de cellules proches.

Ozturk et al. (1990) ont eux aussi montré que si l'on fait varier la concentration d'ensemencement de  $10^2$  à  $10^5$  cellules / ml en mode batch, le ratio de croissance varie seulement de 20 %, ce qui confirme nos résultats.

Il semblerait que d'autres paramètres qui seront développés ultérieurement, influencent le nombre de cellules obtenues en fin de culture.

Toutefois, cette même équipe a montré que ces remarques ne sont pas valables pour des cellules cultivées dans un milieu sans sérum. Elle constate que l'ensemencement de départ doit être d'au moins  $10^3$  cellules / ml et qu'à cette concentration les cellules poussent 30 % moins vite qu'à  $10^4$  ou  $10^5$ . Ceci les amène à supposer qu'il existerait un seuil critique d'ensemencement de départ au-dessous duquel la croissance ne pourrait s'établir correctement et ce pour des lignées cellulaires diploïdes normales comme pour des cellules d'hybridomes.

Cette remarque est à rapprocher des difficultés que nous avons rencontrées lors de notre culture en milieu LS + SCH où nous avons dû ensemercer à  $10^5$  cellules / ml au lieu de  $5.10^4$ .

De plus, Ozturk et al. (1990) ont constaté que la production spécifique d'anticorps monoclonaux était indépendante de la densité cellulaire de départ.

Nous pouvons, nous aussi, faire cette constatation en considérant les bioréacteurs 1 et 2 qui présentent des sécrétions spécifiques proches.

Par contre, le bioréacteur 6 à un ensemencement 10 fois moins important ne donne plus que 5,2 mg de production spécifique.

Mais dans ce cas, il est possible que ce soit le vieillissement (9 mois) de la souche qui soit responsable de cette diminution de 45 % de la sécrétion.

A moins que les cellules, lors de cette expérience, ne se soient pas trouvées dans une phase favorable à la production d'anticorps. En effet, Al Rubeai et Emery (1990), Ramirez et Mutharasan (1990), Suzuki et Ollis (1989) suggèrent que la synthèse des anticorps serait maximale dans les deux phases G0 et G1 du cycle cellulaire et préconisent de majorer cette production en bloquant les cellules à ce stade.

Par contre, si l'on raisonne en sécrétions ramenées au litre de milieu consommé, elles sont deux fois plus importantes dans le bioréacteur 2 que dans le bioréacteur 1 dans lequel les cellules se sont moins multipliées. Ceci est à rapprocher de la constatation faite par Merten (1988) qui démontre qu'un batch ensemencé à  $8.10^5$  cellules / ml produit au total deux fois plus d'anticorps qu'un ensemencé à  $4.10^5$ .

Il est donc important de distinguer les sécrétions ramenées au litre de milieu consommé de celles ramenées au nombre de cellules présentes. L'étude comparative des premières renseigne sur l'aspect du rendement économique des cultures, alors que l'étude des secondes aborde un aspect plus fondamental, l'optimisation de la production suivant l'état physiologique des cellules.

### *3 - 3 - 3 - 4 - 2 Influence de la concentration en SVF*

Les bioréacteurs 6 et 7 ont montré qu'avec une concentration en SVF inférieure on obtient un nombre de cellules en fin de culture plus faible mais une sécrétion plus importante qu'elle soit ramenée au litre de milieu consommé ou au nombre de cellules obtenu.

Il semble donc qu'une diminution de la concentration en SVF favorise la sécrétion au détriment de la croissance. Ceci est confirmé par de nombreux rapports dans la littérature (Low et al., 1987 ; Hagedorn et al., 1990)

Comme Suzuki et Ollis (1990) nous pouvons supposer que les cellules utiliseraient dans ce cas l'énergie métabolique qui leur est apportée pour la synthèse d'anticorps plutôt que pour la division cellulaire.

Les milieux utilisés pour la culture en masse qui ralentissent la pousse cellulaire, tels que ceux à faible concentration de sérum ou ceux utilisant du lactosérum, favorisent la sécrétion d'anticorps. Cette stratégie de production de molécules à haute valeur ajoutée est d'ailleurs de plus en plus utilisée. Ceci présente le double avantage d'augmenter le rendement des cultures tout en diminuant leur coût (Griffiths, 1986).

Dans notre laboratoire nous avons opté pour l'utilisation du milieu LS + SCH qui est plus économique que l'utilisation du SVF. En effet, le lactosérum est un des produits dérivés de la fabrication fromagère encore insuffisamment valorisé et disponible en grandes quantités à des prix très intéressants.

### *3 - 3 - 3 - 4 - 3 Comparaison cellules piégées ou en suspension*

Nous allons discuter de l'intérêt des systèmes à cellules piégées par rapport à la suspension.

D'une façon générale, lorsque la concentration cellulaire est inférieure à  $3.10^6$  cellules / ml, les techniques de culture (suspension, fibres creuses, batch, perfusion, ...) ont peu d'influence sur la cinétique de production des anticorps (Merten, 1988).

Par contre, au-delà de cette concentration, des différences importantes sont observées selon le mode de culture (Reuveny et al., 1986). Or dans la majorité de nos expériences, nous nous trouvons à des concentrations cellulaires de cet ordre et nous observons un certain nombre de différences.

Comme Altshuler et al. (1986) nous constatons qu'un système à cellules immobilisées produit au moins deux fois plus d'anticorps qu'un système en suspension. Lee (1991) a vérifié ces observations avec des hybridomes piégés dans des billes d'alginate. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises pour expliquer ce phénomène :

1) Lorsque les cellules sont confinées, les variations de pH, d'osmolarité, de concentration en oxygène dissous, sont probablement plus faibles que celles du milieu circulant et perturbent moins les cellules.

2) Ce confinement entraîne également une concentration supérieure en facteurs autocrines activant la croissance ou la sécrétion, comme l'interleukine 6, connue pour stimuler la synthèse des immunoglobulines (Aarden, 1989).

3) Par ailleurs, les forces de cisaillement résultant de l'agitation d'une suspension cellulaire peuvent être défavorables à la synthèse d'anticorps (Pol et al., 1990) bien que cette hypothèse soit souvent controversée.

Certains auteurs pensent au contraire que des conditions de stress pourraient favoriser la sécrétion d'anticorps (Oyaasetal, 1989 ; Lee et al., 1991).

La mesure du contenu intracellulaire en immunoglobulines, réalisée par cytométrie de flux, a montré qu'il était plus important pour des hybridomes cultivés en système immobilisé. Les concentrations obtenues en fibres creuses par Munster et al. (1991) en sont la preuve, puisqu'ils y obtiennent jusqu'à 40 fois plus d'anticorps qu'avec la même souche cultivée en

suspension. De plus, si l'on tient compte des difficultés que représentent les cultures perfusées en suspension en particulier le colmatage des filtres (Shirai et al., 1987), il devient donc tout à fait intéressant d'utiliser un système à cellules piégées.

#### 3 - 3 - 3 - 4 - 4 Modes d'alimentation

Nous allons maintenant étudier l'influence du mode de renouvellement du milieu (récolte-recharge, batch, perfusion, ...) sur la production d'anticorps.

Le système le plus défavorable lors de nos expériences a été le mode batch.

Comme de nombreux auteurs l'ont décrit (Reuveny et al., 1986) dans cette technique, il y a acidification du milieu, diminution rapide des nutriments et accumulation de toxiques qui entraînent une densité cellulaire finale plus faible ainsi qu'une production finale inférieure.

De plus, Mc Kinney (1991) a émis l'hypothèse d'un phénomène de rétro inhibition sur la sécrétion d'anticorps lorsque la concentration atteint un certain seuil, dépendant d'ailleurs de la lignée cellulaire. La dégradation des immunoglobulines par les protéases présentes dans le milieu, surtout à pH acide (Karl et al., 1990), est aussi un facteur à prendre en considération. Le renouvellement continu du milieu de culture offre le double avantage de ne pas permettre une forte accumulation d'immunoglobulines dans le milieu et d'éviter leur dégradation. Le mode batch, encore souvent utilisé en industrie, présente l'unique intérêt de manipulations très réduites, en cours de culture (pas de milieu à fabriquer, peu de surveillance) diminuant ainsi considérablement les risques de contaminations.

Le mode récolte-recharge (ou semi-continu dans la littérature) s'est montré dans nos expériences, très avantageux sur la production spécifique d'anticorps et sur le rendement de production comparés au mode perfusion. Il semblerait que sur des petits volumes (250 ml environ) la culture en suspension avec renouvellement total du milieu toutes les 24 heures soit plus favorable à la synthèse d'immunoglobulines. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Reuveny et al. (1986) qui ont comparé les modes batch, semi-continu et perfusion, ce dernier étant le meilleur pour la production d'anticorps. Mais comme l'ont souligné Seamans et al. (1990), le

choix du taux de perfusion fixé par rapport à la consommation du glucose, reflet partiel de la croissance cellulaire, reste très arbitraire. En effet, certains auteurs (Boraston et al., 1984 ; Miller et al., 1988) ont obtenu des viabilités cellulaires et des sécrétions d'Ig proportionnelles aux taux de dilution. Par contre Hiller et al. (1991) ont observé une diminution de ces deux facteurs au-delà du renouvellement total du milieu par 24 heures.

Or, dans nos expériences, nous nous trouvons rapidement dans ces conditions jusqu'à atteindre quelquefois un renouvellement complet toutes les 12 heures. Nous pouvons donc supposer que pour nos souches d'hybridomes, une perfusion trop importante serait nuisible à la production d'Ac.

De plus, le changement complet toutes les demi-heures du milieu irrigant l'éponge, ne correspond peut-être pas à un optimum.

Il serait intéressant de trouver un taux de dilution et un débit plus favorables à la production d'anticorps, non seulement en fonction du glucose, mais aussi d'autres facteurs qui restent à déterminer.

Il faut souligner qu'il est difficile de comparer un spinner de petit volume dans lequel peu de régulations sont effectuées et où les cellules se trouvent en suspension, à un bioréacteur de volume plus important où les cellules sont piégées. Il serait plus rigoureux d'établir des comparaisons de renouvellement de milieu en réalisant des récoltes-recharges dans un bioréacteur, ce qui est beaucoup plus délicat à réaliser.

Quoiqu'il en soit, le système perfusion reste intéressant car la maintenance qu'il nécessite est réduite et il permet d'atteindre de plus gros volumes avec une quantité d'anticorps finale supérieure. Enfin, les cellules, se trouvant dans des conditions plus proches des conditions physiologiques de l'organisme, croissent et sécrètent pendant des temps plus longs. Cependant, il faut souligner qu'il n'est pas prudent de prolonger une culture trop longtemps car une perte de sécrétion peut apparaître (Frame et al., 1990). Comme l'ont démontré nos expériences, les sécrétions par litre de milieu de culture consommé étant stables entre 15 et 22 jours de culture, nous pouvons donc fixer une durée optimale d'un bioréacteur en perfusion aux alentours de 20 jours.

Maintenant la comparaison de ces taux d'anticorps à ceux obtenus en ascite (paragraphe 3 - 2) montre peu de différences. En effet les taux

cumulés obtenus dans un bioréacteur en perfusion sont d'environ 70mg en 7 jours et une ascite de 10 jours donne au maximum 60 mg. Ces deux systèmes de production semblent donc être équivalents, cependant il est plus facile et moins cher de prolonger une culture "in vitro" que de multiplier le nombre des ascites. De plus, la purification des immunoglobulines à partir d'un milieu de culture est nettement plus simple et son rendement meilleur surtout s'il s'agit d'un milieu complétement en lactosérum.

Comme tous les "cultivateurs", nous avons essayé, à travers cette série de bioréacteurs comparatifs, d'établir le système de culture permettant d'obtenir la quantité d'anticorps la plus importante au meilleur coût.

Notre technique de culture en perfusion avec cellules immobilisées ne nous a pas permis d'établir avec autant de précision que d'autres équipes, les cinétiques de production spécifique d'anticorps.

Toutefois, dans le cadre de notre expérience, nous pouvons conclure que le meilleur système de production d'anticorps réunirait les conditions suivantes :

- Réacteur de 1 à 5 l
- Cellules piégées dans une mousse de polyéther
- Alimentation continue
- Renouvellement continu d'environ un volume par 24 heures
- LS + SCH comme complément du milieu de culture
- Suivi de la culture par marqueurs (glucose, LDH)
- Durée d'une vingtaine de jours environ

Il convient cependant d'apporter quelques nuances à ces grands principes qui sont fonctions :

- de la souche utilisée
- de la disponibilité du manipulateur
- de la qualité exigée pour les anticorps produits
- des crédits dont on dispose

tout en ne perdant jamais de vue les risques permanents de contamination.



## **4 - CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Il était important que nous maîtrisions aussi bien que possible les différentes étapes de la production d'anticorps monoclonaux à partir d'une molécule immunogène, et que nous conservions vivace au laboratoire une technique lourde : la culture de cellules animales.

Si le point de départ, l'immunisation, est maintenant bien maîtrisée dans des conditions "*in vivo*", quelques problèmes subsistent encore en "*in vitro*". En effet, la perte de la sécrétion des hybridomes obtenus reste inexplicquée et devrait pouvoir se résoudre par l'optimisation des milieux d'immunisation et de fusion. L'adjonction de nouvelles molécules stimulatrices, telles que les interleukines, peut être envisagée. La maîtrise de cette partie est également tributaire des progrès de la compréhension fondamentale des facteurs intervenant dans le réarrangement génique lors de l'immunisation.

Une fois les hybridomes stabilisés, le choix de la méthode de production s'impose. Bien que les ascites de souris permettent d'obtenir de fortes concentrations, il faudrait envisager de travailler sur des rats afin d'augmenter les volumes recueillis. Devant les difficultés de purification des immunoglobulines à partir de ces liquides, nous avons préféré opter pour les techniques de culture "*in vitro*".

Le système mis au point au laboratoire constitué d'un réacteur perfusé en continu à cellules immobilisées dans un support bon marché, donne des résultats encourageants.

Pourtant quelques améliorations restent encore à apporter à cette méthode qui sélectionne les hybridomes les plus sécrétants qui ne sont peut-être pas les meilleurs producteurs d'anticorps. Celles-ci passent par une meilleure compréhension du comportement des hybridomes en fonction de leurs conditions de culture. Si nous avons pu établir un certain nombre de corrélations et mettre en évidence la prépondérance de quelques voies métaboliques, beaucoup de questions restent posées.

L'approche plus fondamentale des variations du cycle cellulaire et de la synthèse des immunoglobulines par cytométrie de flux, actuellement en cours au laboratoire, en collaboration avec l'INPL, devrait répondre en partie à ces questions. De même l'optimisation des profils d'alimentation des hybridomes cultivés en continu devrait aboutir à une meilleure maîtrise de la culture en masse.

Le recyclage du milieu de culture par dialyse ou ultrafiltration, offrirait le double avantage : éliminer les inhibiteurs de croissance et de production et réduire les coûts de production dus majoritairement au milieu de culture. Il suffirait donc d'ajouter seulement, en fonction de leur consommation, les nutriments et facteurs de croissance, nécessaires au maintien des cultures.

L'avenir de la production d'anticorps monoclonaux passe sans aucun doute par des dosages "on line" d'un certains nombres de paramètres. Ce contrôle permanent devrait permettre une automatisation de l'alimentation et de la détoxification du système afin de s'approcher le plus possible de l'environnement que trouvent les cellules dans un organisme vivant.

Nous n'envisageons pas pour notre part d'aborder ces trois derniers domaines, mais l'équipe de Madame le Docteur Annie Marc y travaille et nous apportons notre collaboration aux dosages.

Des variations de facteurs physicochimiques comme le pH, osmolarité, apport d'oxygène dissous peuvent être intéressants eux aussi. L'étude de ces paramètres qu'ils soient physiques ou chimiques demande encore du temps. Elle sera d'ailleurs plus facilement réalisable en flacons spinner mais il ne faudra pas perdre de vue le fait qu'une fois établie dans ce système, il faudra la transposer en bioréacteur.

Une stimulation des sécrétions par ajout de différents éléments est elle aussi à envisager : ajout d'agents chimiques comme la carnitine et la cortine (en cours au laboratoire), le tryptophane ou d'autres acides aminés, des caséines, des vitamines, etc... Toutefois, la difficulté de ces essais réside dans le fait qu'on ne connaît pas toujours leur mode d'action. Cette voie "Pharmacologique" nous semble intéressante et nous l'avons abordée.

Ceci est d'ailleurs à rapprocher des recherches du laboratoire sur les compléments de milieu.

Ayant maintenant résolu les problèmes que nous avons rencontrés pour la stérilisation de volumes importants, nous pouvons dire que le lactosérum complété avec un sérum de cheval est un produit très intéressant pour la culture en masse d'hybridomes d'autant plus qu'actuellement de nombreuses équipes de culture cellulaire se refusent à utiliser le sérum de veau foetal.

En effet, le prion responsable de l'encéphalite bovine spongiforme (EBS) présent dans les tissus d'origine nerveuse, des "vaches folles" serait transmissible à l'homme par injection. Il n'est donc plus possible d'utiliser pour les thérapies humaines des anticorps monoclonaux produits à partir de milieux de culture ayant contenu du sérum de veau foetal. La substitution de ce dernier, par un milieu lactosérum + sérum de cheval, présente donc un avantage supplémentaire, d'autant que connaissant maintenant l'origine de ce prion, l'on sait que le cheval n'est pas susceptible de contracter cette maladie.

Une étude de reproductibilité de tous ces résultats serait nécessaire à la validation des observations qui viennent d'être énoncées. En effet, il ne faut jamais perdre de vue que nous travaillons sur du matériel vivant et qu'il n'est pas possible de maîtriser les innombrables paramètres entrant en jeu.

Enfin, une étude qualitative des anticorps produits dans ces conditions s'avère indispensable. La glycosylation de ces protéines, dont dépendent, entre autre leur spécificité et leur affinité, est en cours d'étude au laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Docteur Annie Marc.

Nous sommes conscients du chemin restant encore à faire mais ceci est stimulant.

---

Nous ne voudrions pas oublier l'aspect appliqué au domaine hospitalier. Cette technique a également pour but de nous permettre au moins pour certains paramètres, de pouvoir fabriquer nos propres réactifs. A ce titre notre laboratoire fabrique tous ses sérums étalons avec une économie certaine. Nous pensons également fabriquer des anticorps. D'ores et déjà, lorsque des dosages d'hPL nous sommes demandés, nous pouvons utiliser nos réactifs dans un système ELISA et ne plus acheter des coffrets de réactifs onéreux.

En effet, la prolifération des marqueurs à doser, le marché captif des kits de dosage, leur prix, nous laissent à penser que le budget global de la santé ne pourra suffire. C'est dans cet esprit que nous avons réalisé ces travaux que nous comptons poursuivre en établissant de nouvelles souches dont les anticorps pourront être utilisés comme réactifs de laboratoire.

---



---

**BIBLIOGRAPHIE**

**Aarden L.A.** (1989)

Hybridoma growth factor.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 557 : 192-199.

**Achihara T. and Baserga R.** (1979)

Cell synchronization.

Methods in Enzymol. LVIII : 248-263.

**Ackermans F., Nisol F. and Bazin H.** (1990)

Immunization of rats.

In Bazin H. (Eds) Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies.

CRC Press Inc. 80 - Florida, 75-85.

---

**Adema E. and Sinskey A.** (1987)

An analysis of intra-versus extracapillary growth in a hollow fiber reactor.

Biotechnology Progress, 3(2) : 74-79.

**Agy P.C, Shipley G.D. and Ham R.G.** (1981)

Protein-free medium for C1300 mouse neuroblastoma.

In vitro, 17 : 671-678.

**Alshuler G.L., Dziewulski D.M., Soweck J.A. and Belfort G.** (1986)

Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors separators.

Biotechnol. Bioeng., 28 : 646-658.

**Al Rubeai M. and Emery A.N.** (1990)

Mechanisms and kinetics of monoclonal antibody synthesis and secretion in synchronous and asynchronous hybridoma cell cultures.

J. Biotechnol., 16 : 67-86.

**Albert J.G., Srikumaron S. and Goldsby R.A. (1986)**

Production and characterization of bovine immunoglobulins from bovine-murine hybridomas.

Methods in Enzymol., 121 : 244-266.

**Asconas B.A., Anzins L. and Unanue R.E. (1969)**

Role of macrophage in the immune response.

J. Immunol., 103 : 71-74.

**Baldwin R.W. and Byers U.S. (1986)**

Les immunodrogues : des médicaments à tête chercheuse.

Biofutur, 44 : 53-55.

**Barnstable C.J., Bodmer W.F. and Brown G. (1978)**

Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis.

Cell, 14 : 9-20.

**Bazin H., Levi G. and Doria G. (1970)**

Predominant contribution of IgA antibody forming cells to an immune response detected in extra-intestinal lymphoid tissues of germ-free mice exposed to an antigen by the oral route.

J. Immunol., 105 : 1049-1053.

**Bazin H., Crzych J.M., Verwaerole C. and Capron A. (1980)**

A LOU rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas.

Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 131D : 359-366.

**Bazin H., Platteau B. and Pauwels R. (1981)**

Genetic control of the IgE reagenic immune response and its radiation-induced enhancement.

Transplant. Proc., 13 : 1369-1378.

**Bazin H., Malache J.M., Nisol F. and Delaunay T. (1990)**

Purification of rat monoclonal antibodies from ascitic fluid serum or culture supernatant.

In Rat hybridomas and Rat monoclonal antibodies. H. Bazin (Ed.) C.R.C. Press, Florida.

**Birch J.R., Boraston R. and Wood L. (1985)**

Protection of monoclonal antibodies in fermentors.

Trend in Biotechnol., 3 : 7162-7166.

**Birch J.R. and Edwards G.O. (1986)**

Production industrielle d'anticorps monoclonaux.

Biofutur, 44 : 121-133.

**Blank M., Smorodinsky I.N., Keydar I., Chaitchik S. and Shoenfeld Y. (1991)**

The production of human monoclonal anti-MMTV antibodies by in vitro immunization with anti-idiotypic antibodies.

Immunol. Lett., 28 (1) : 65-71.

**Blow A.M.J., Botham G.M., Fisher D., Goodall A.H., Tilcook C.P.S. and Lucy J.A. (1978)**

Water and calcium ions in cell fusion induced by polyethylène glycol.

FEBS Lett., 94 : 305.

**Boer M.D., Ossendorp F.A., Van Duijn G., Ten Voorde G.H.J. and Tager J.M. (1989)**

Optimal conditions for the generation of monoclonal antibodies using primary immunisation of mouse splenocytes in vitro under serum-free conditions.

J. Immunol. Methods, 121 : 253-260.

**Boerner P., Lafond R., Lu W.Z., Brams P. and Roystaon I. (1991)**

Production of antigen specific human monoclonal antibodies from in vitro primed human splenocytes.

J. Immunol., 147 : 86-95.

---

**Boitard Ch. (1990)**

Régulation de la réponse immunitaire.

Immunologie fondamentale - La Revue du Patricien n° 95, 23 avril 1990.

**Boreston R., Thompson PKW., Garland S. and Birch J.R. (1984)**

Dev. Biol. Standard, 55 : 103.

**Borrebaeck C.A.K. (1983)**

In vitro immunization of mouse spleen cells and the production of monoclonal antibodies.

Acta. Chem. Scand. Ser. B., B37 (7) : 647-648.

**Borrebaeck C.A.K. (1989)**

Strategy for the production of human monoclonal antibodies using in vitro activated B cells.

J. Immunol. Methods, 123 : 157-165.

---

**Bour J.M., Maugras M., Capiaumont J., Dousset B., Straczek J., Gelot M.A. et Nabet P. (1988)**

Marqueurs biochimiques de la prolifération et de la mort des hybridomes en culture.

Bio Sciences, 7(2) : 35-40.

**Bouriche M. (1990)**

Les bases de l'immunologie. Notions de base sur les anticorps.

Tempo Medical n° 383B, dossier n°3.

**Butler M. and Jerkins H. (1989)**

Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture.

Biotechnol., 12 : 97-110.

**Carbonnel D. (1988)**

Essais de conception et de mise au point d'un bioréacteur à cellules immobilisées.

DEA : Université de Technologie de Compiègne.

---

**Campbell P.G. and Baumreucker C.R. (1989)**

Insulin-like growth factor I and its association with binding protein bovine milk.

J. Endocrinol., 120 : 21-29.

**Carell A. and Baker L.E. (1986)**

The chemical nature of substances required for cell multiplication.

J. Exp. Med., 44 : 503-511.

**Cars M. (1983)**

Metalloimmunoassay principles and practice.

Methods in Enzymol., 92 : 445-458.

**Chantler M.S. and Hurn B.A.L. (1980)**

Production of reagent antibodies.

Methods in Enzymol., 70 : 104-142.

---

**Clark T.J.M. (1987)**

L'impact économique des anticorps monoclonaux.

Annuaire Adebio, 87 : 135-144.

**Croce C.M., Linnenbach A., Hall W., Steplewski Z., and Koprowski H. (1980)**

Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus.

Nature, 288 : 488-489.

**Damerdji O., Derouiche F., Legrand C., Capiaumont J., Bour J.M., Maugras M., Belleville F. and Nabet P. (1988)**

Utilization of whey fractions as a substitute for foetal calf serum in culture media.

Biotechnol. Techn., 2(4) : 253-258.

**Danielsson L., Möller S.A. and Borrebaeck C.A.K. (1987)**

Effect of cytokines on specific in vitro immunization of human peripheral B lymphocytes against T-cell dependent antigens.

Immunology, 51-61.

**Dean R., Karkare S., Ray N., Runstadler P. and Venkatasubramanian K. (1987)**  
Large-scale culture of hybridoma and mammalian cells in fluidized bed bioreactors.

Annals New-York Academy of Sciences, 506 : 129-146.

**Derouiche F., Bour J.M., Legrand C., Capiamont J., Belleville F., Linden G. and Nabet P. (1989)**

Improved long-term storage of hybridoma at -80°C using a bovine milk derivative.

J. Immunol. Methods., 125 : 13-18.

**Desgranges C (1986)**

Anticorps monoclonaux humains.

Biofutur, 44 : 23-25.

**Douillard J.Y. and Hoffman T. (1983)**

Enzyme linked immunosorbant assay for screening monoclonal antibody production using enzyme labeled second antibody.

Methods in Enzymol., 92 : 168-175.

**Doyle L. and Butler M. (1990)**

The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma.

J. of Biotechnol., 15 : 91-100.

**Eagle H. (1955)**

Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.

Science, 122 : 501-504.

**Eling B.V., Nicoli D.F. and Briggs J. (1983)**

Fluorescence fluctuation immunoassay.

Methods in Enzymol., 92 : 458-472.

**Erich T., Dekker B., De Beer M., Torcusma R. and Verhoef J. (1989)**

In vitro stimulation of immune spleen cells enhances the number of anti-lipid producing hybridomas.

J. Immunol. Methods 118 : 17-24.

**Erlanger B.F. (1980)**

The preparation of antigenic haptencarrier conjugates survey.  
Methods in Enzymol., 70 : 85-104.

**Esclade L.R.J., Carrel S. and Peringer P. (1991)**

Influence of the screen material on the fouling of spinfilters.  
Biotechnology and Bioengineering, 38 : 159-168.

**Familletti P. and Fredericks J. (1983)**

Mammalian cell immobilization.  
Biotechnology, 6 : 41-44.

**Fazekas de St Groth S. and Scheidegger D. (1980)**

Production of monoclonal antibodies : strategy and tactics.  
J. Immunol. Methods, 35 : 1-8.

**Feder J. and Tolbert W. (1983)**

La culture en masse des cellules de mammifères.  
Pour la science - Mars 1983 : 12-20.

**Ferry A., De Boer, M. Bert J.M., Hilgers, J P., Brunig P.F. and Tager ,  
J.M. (1986)**

Productions of murine monoclonal antibodies against human thyroglobulin  
using an in vitro immunisation procedure in serum-free medium.  
J. Immunol. Methods, 91 : 257-264.

**Figueiredo J.E., Falkenstein D., Santo L.E., Martinez T., Ribeiro R.C.J.,  
Maura L.A.R. and Draibe S.A. (1986)**

Release of lactate deshydrogenase activity by rabbit renal cortex slices  
during storage in solutions used for kidney transplantations.  
Brazilian J. Med. Biol. Res., 19 : 303-309.

**Frame K.K. and HU W.S. (1990)**

The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells.  
Biotechnol. Bioeng., 35 : 469-218.

---

**Freshney R.I. (1987)**

Instability variation, preservation.

In : Culture of animal cells a manual of basic technique. 2nd ed. Alan R. Liss Inc. New-York, 215-216.

**Galfré G., Milstein C. and Wright B. (1979)**

Rat-rat hybrid myeloma and a monoclonal anti Fd portion of mouse IgG.  
Nature, 277 : 131.

**Galfré G. and Milstein C. (1981)**

Preparation of monoclonal antibodies : strategies and procedures.  
Methods in Enzymol., 73 : 3-36.

**Gefter M.L., Margulies D.H. and Scharff M.D. (1977)**

A simple method for polyethylene glycol promoted hybridization of mouse myeloma cells.

Somatic cell. Genet., 3 : 231-239.

**Glacken M., Fleischaker R. and Sinskey A. (1983)**

Largescale production of mammalian cells and their products : engineering principles and barriers to scale-up.

Annals New-York Academy of Sciences, 413 : 355-372.

**Glacken M.W., Fleishaker R.J. and Sinskey A.J (1986)**

Reduction of waste product excretion via nutrient control : possible strategies for maximising product and cell yields in cultures of mammalian cells.

Biotechnol. Bioeng., 28 : 1376-1389.

**Glacken M.W. (1988)**

Catabolic control of mammalian cell culture.

Biotechnol., 6 : 1041-1049.

**Glaser J.H. and Sly W.S. (1973)**

Beta glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis : methods for enzymatic diagnosis.

J. Lab. Clin. Med., 82 : 969-977.

---

**Glassy M.C., Tharakau J.P. and Chan P.C (1988)**

Serumfree media in hybridoma culture and Mab production.  
Biotechnol. Bioeng., 32 : 1015-1028.

**Gluckman E., Devergier A. and Altaï M. (1985)**

Resultats du traitement des formes graves de réaction du greffon contre l'hôte par un anticorps monoclonal anti-T. OK T3.  
Actualités hématologiques, 233-236.

**Griffiths J.B. (1970)**

The quantitative utilization of amino acids and glucose and contact inhibition of growth cultures of the human diploid cell. WI-38.  
J. Cell. Sci., 6 : 739-749.

**Griffiths J.B. (1986a )**

Can cell culture medium cost be reduced ? Strategies and possibilities.  
Trends Biotechnol., 4 : 268-272.

**Griffiths G. (1986 b)**

Scaling-up of animal cell cultures.  
In : Animal cell culture, 33-68.

**Griffiths B. (1990)**

Animal cells. The breakthrough to a dominant technology.  
Cytotechnology, 3 : 109-116.

**Gürhan S.I. and Özdural N. (1990)**

Serial cultivation of suspended BHK 21/13 cells in serum-reduced and serum-free medium supplemented with various membrane protective agents.  
Cytotechnology, 3 : 89-93.

**Harrison R.F. (1907)**

Observations on the living developing nerve fiber.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 4 : 140-145.

---

**Hagedorn J. and Kargi F. (1990)**

Production of monoclonal antibodies by hybridoma cells in a flat sheck membrane reactor.

Biotechnol. Prog., 6 : 220-224.

**Hasegaiva A., Yamashita H., Hondo S., Kiyota T., Yayashi H., Yoshizaki H., Hurakami A. and Shiratsuki M. (1988)**

Protease peptone enhances production of tissue-type, plasminogen activator from human diploid fibroblasts.

Biochem. Biophys. Res. comm., 150 : 1230-1236.

**Henry C. (1980)**

Selected methods in cellular immunology.

In : MISHELL B.B., SHIIGI S.M. (Eds)

Plate Method, 77-79.

---

**Hiller G.W., Aeschlimann A.D., Clark D.A. and Blanche H.W. (1991)**

A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum free medium.

Biotechnol. and Bioeng., 38 : 733-741.

**Hoogeuraad N., Helman T. and Hoogenraad J. (1983)**

The effect of pre-injection of mice with pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production.

J. Immunol. Methods, 61 : 317-319.

**Honda R., Maeda Y., Sasakana J., Ohno H. and Tsuchida E. (1981)**

Activities of cell fusion and lysis of the hybrid type of chemical fusiogens. Structure and function of the promoter of cell fusion.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 100 : 442-448.

**Hu W.S. and Dodge T.C. (1985)**

Production of complex biological molecules in large quantity.

Biotechnology Progress, 1(4) : 209-215.

**Hu W.S., Dodge T.C., Frame K.K. and Himes V.B. (1986)**

Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells.

Derv. Biol. Stand., 66 : 279-290.

**Hunter K.W. and Bosworth J.M.Jr (1986)**

Measurement of monoclonal immunoglobulin concentration a hybridoma cultures by competitive.

Methods in Enzymol., 121 : 541-548.

**Ito Y. and Higashi K. (1961)**

Studies on the prolactin-like substance in human placenta II.

Endocrinol. Jpn, 8 : 279-287.

**Jäger V. (1990)**

Serum free media suitable for upstream and downstream processing.

ESACT 10 th meeting in : Production of biologicals from animal cells in culture.

Research-Developments and achivments-Butterworths. In Press.

**Karl D.N., Donovan M.and Flickinger M.C. (1990)**

A novel acid proteinase released by hybridoma cells.

Cytotechnol., 3 : 157-169.

**Kenney J.S., Hughes B.W., Massado M.P. and Allison A.S. (1989)**

Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies.

J. Immunol. Methods., 121 : 157-166.

**Kints J.P., Manouvriez P. and Bazin H; (1989)**

Rat monoclonal antibodies. VII. Enhancement of ascites and monoclonal antibody production in rats by pretreatment with pristane and freund adjuvant.

J. Immunol. Methods., 121 : 182-191.

---

**Klagsbrun M. and Neuman J. (1979)**

The serum-free growth of Balb/c 3T3 cells in medium supplemented with bovine colostrum.

J. Supra. Struct., 11 : 349-359.

**Knazek R.A., Gullino P.M., Kölher P.O. and Dedrick R.I (1972)**

Cell culture on artificial capillaries : an approach to tissue growth in vitro.

Science 178 : 65.

**Köhler G. and Milstein C. (1975)**

Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.

Nature, 256 : 495-497.

**Kosbor D., Roder J.C., Sierzega M.E., Cole S.P.C. and Groce M. (1986)**

Comparative phenotypic analysis of available human hybridoma fusion partners.

Methods in Enzymol., 121 : 120-140.

**Lanks K.W. (1987)**

End products of glucose and glutamine metabolism by L292 cells.

J. Biol. Chem., 21 : 10093-10099.

**Lebacqz P. (1981)**

Anticorps monoclonaux et hybridomes.

Rev. Med., 38 : 2401-2407.

**Lee G.M., Varma A. and Palsson B.O. (1991)**

Production of monoclonal antibody using free suspended and immobilized hybridoma cells : effect of serum.

Biotechnol. and Bioeng., 38 : 821-830.

**Legran P., Juy D. and Butting G. (1983)**

Rosette forming cell assay for detection of antibody-synthesizing hybridomas.

Methods in Enzymol., 92 : 175-196.

**Legrand C. (1990)**

Etude du métabolisme d'hybridomes en culture. Comparaison de l'action des différents milieux contenant soit du SVF, soit des fractions de lait bovin. Thèse de l'Université de Nancy I en Biochimie Appliquée à la Bio-industrie.

**Legrand C., Bour J.M., Jacob C., Capiaumont J., Martial A., Marc A., Wudthke M., Kretzmer, Demange C., Duval J. and Hache J. (1991)**

The lactate deshydrogenase activity of the number of dead cells in the medium of cultured eucaryotic cells as marker.

J. Biotechnol. (sous presse).

**Levy R. and Miller R.A (1983)**

Tumor therapy with monoclonal antibody.

Fed. Proc., 42 : 2650-2656.

**Littelfield J.W. (1964)**

Selection of hybrids from mating of fibroblasts in vitro and their presumed recombinaison.

Science, 145 : 709-721.

**Low K.S., Harbour C. and Barford J.P. (1987)**

A study of hybridoma cell growth and antibody production kinetics in continuous culture.

Biotechn. Technique, 1 : 239-244.

**Luben R.A. and Mohler M.A. (1980)**

In vitro immunization as an adjunct to production of hybridomas producing antibodies against the lymphokine osteoclast activating factor.

Mol. Immunol., 17 : 635-639.

**Mac Kehan W.L. (1986)**

Glutaminolysis in animal cells. In : "carbohydrate metabolism in cultured cells". Morgan M.J. (Ed).

Plenum Press, 111-150.

---

**MacLeod A.J.** (1988)

The use of plasma protein fractions as medium supplements for animal cell culture.

Advances in Biochem. Eng. Biotech., 37 : 41-56.

**Mach J.P., Buchegger F., Bischoff Delaloye A. and Delaloye B.** (1986)

Anticorps monoclonaux et imageries des tumeurs.

Biofutur, 44 : 37-42.

**Maeno M., Shimizu K., and Skikata T.** (1988)

Effective production of mouse monoclonal antibodies against influenza virus by repeated intrasplenic immunization.

Microbiol. Immunol., 32(12) : 1245-1252.

**Male D. and Pryce G.** (1986)

Agglutination assay using protein A-sensitized erythrocytes for detection of immunoglobulin in tissue culture supernatants.

Methods in Enzymol., 121 : 556-562.

**Male M., Champion B. et Cooke A.** (1988)

Immunologie : le système immunitaire et sa régulation.

W.H. Fridman (Ed.) MEDSI, Mc Grav-Hill, Paris, 1 : 2-212.

**Martin N., Brennan A., Denome L. and Schaevitz J.** (1986)

High productivity in mammalian-cell bioreactors.

In : Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies. H. Bazin (Ed.) C.R.C. Press Florida.

**Maurer H.R.** (1986)

Towards chemically-defined, serum free media for mammalian cell culture.

In: "Animal cell culture. A practical approach".

Freshney. R.I. IRL Press, 13-31.

---

**McKearn T.J., Smilek D.E. and Fitch F.N. (1981)**

Rat-mouse hybridomas and their application to studies the major of histocompatibility complex.

In : Kennett R., Mc Kearn (Eds). Monoclonal antibodies. New-York : Plenum Press, 219-247.

**McKinney K.L., Dilwith R. and Belfort G. (1991)**

Manipulation of heterogeneous hybridoma cultures for over production of monoclonal antibodies.

Biotechnol. Prog. 7 : 445-454.

**Merten O.W. (1988)**

Batch production and growth kinetics of hybridomas.

Cytotechnol., 1 : 113-121.

**Miller W.M., Blanck H.W. and Wilke C.R. (1988)**

---

A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture : effects of nutriment concentration, dilution rate and pH.

Biotechnol. Bioeng., 32 : 947-965.

**Miller W.M., Wilke C.R. and Blanch H.W. (1989)**

Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture : I - glucose pulse ans step changes.

Biotechnol. Bioeng., 33 : 477-486.

**Milstein C. (1980)**

Les anticorps monoclonaux.

Pour la science, 38 : 46-55.

**Mizrahi A. and Lazar A. (1988)**

Media for cultivation of animal cells : on overreview.

Cytotechnol., 1 : 199-214.

---

**Morgan J.F., Morton H.J. and Parker R.C. (1950)**

Nutrition of animal cells in tissue culture. I- Initial studies on a synthetic medium.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 3 : 1-8.

**Moulti-Mati F., Mati A, Capiaumont J., Belleville F., Linden G. et Nabet P. (1991)**

Rôle de la B lactoglobuline dans l'activité proliférative du lactosérum.

Lait, 71 : 543-553.

**Mueller V.W., Hawes C.S. and Jones W.R. (1986)**

Monoclonal antibody production by hybridoma growth in Freund's adjuvant primed mice.

J. Immunol. Methods, 87 : 193-201.

**Munster M.J., Kearns M.J., Steegmans U., Behrendt U. and Comer M.J. (1987)**

---

A high density culture system for the in vitro production of human and mouse monoclonal antibodies.

Bioproc. Engin., 6 : 123-125.

**Niall H.D., Hogan M.L., Sauer R., Rsemblum I.Y. and Greenwood F.C. (1971)**

Sequences of prolactin hPL-HGH evolution from primor dipeptide by gene duplication.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68 : 866-869.

**Nicholson K.G., Tyrrell D.A.J., Harrison P. and Potter C.W. (1979)**

Clinical studies of monovalent inactivated whole virus and subunit A/VSSR/77 vaccine. Serological and clinical reactions.

J. Biol. Stand., 7 : 123-125.

**Nilsson K. and Mosbach K. (1980)**

Preparation of immobilized animal cells.

FEBS Letters, 118(1) : 145-150.

---

**Norwood T.H., Zeigler C.J. and Martin G.M. (1976)**

Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol mediated somatic cell fusion.

Somatic Cell. Genet., 2 : 263-271.

**Olson L. and Kaplan H.S. (1980)**

Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77 : 5429-5431.

**Oyaas K., Berg T.M., Bakke O. and Levine D.W. (1989)**

Hybridoma growth and antibody production under conditions of hyperosmotic stress. In : R.E. Spier, J.B. Griffith, J. Stephenne and P.J. Crooy (Eds). Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses.

Butterworth, London, 212-218.

---

**Ozturk S.S. and Palsson B.O. (1990a)**

Effect of initial cell density in hybridoma growth, metabolism and monoclonal antibody production.

J. Biotechnol., 18 : 13-18.

**Ozturk S.S. and Palsson B.O. (1990b)**

Chemical decomposition of glutamine in cell culture media : effect of media, pH and serum concentration.

Biotechnol. Prog., 6 : 121-128.

**Parmentelot I. (1991)**

Essais de substitution du SVF dans les milieux de culture.

Diplôme d'ingénieur technologue de l'Université de Nancy I.

**Pauteloris E.M. (1968)**

Absence of thymus in a mouse mutant.

Nature London, 217 : 370.

**Pol L., Zijlstra G., Thalen M. and Tramper J. (1990)**

Effect of serum concentration on the production of monoclonal antibodies and shear sensitivity of a hybridoma.

Bioprocess. Eng., 5 : 241-245.

**Potter M. and Boyce C.R. (1962)**

Production of plasma cell neoplasm in Balb C mice with mineral oil adjuvant.

Nature, 183 : 1086-1087.

**Ramirez O.T., Sureshkumar G.K. and Mutharasan R. (1990a)**

Bovine colostrum or milk as a serum substitute for the cultivation of a mouse hybridoma.

Biotechnol. Bioeng., 35 : 882-889.

**Ramirez O.T. and Mutharasan R. (1990b)**

Cell cycle and growth phase-dependent variations in size distribution antibody productivity and oxygen demand in hybridomas cultures.

Biotechnol. Bioeng., 36 : 839-848.

**Randerson D. (1985)**

Large scale cultivation of hybridoma cells.

J. Biotechnol., 2 : 241-255.

**Ravoet A.M. and Bazin H. (1990)**

Selective growth of hybrids (7).

In : Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies. H. Bazin (Ed.) Florida.

**Regine J. and Westerwondt A. (1985)**

Improved fusion methods IV. Technical aspects.

J. Immunol. Methods, 77 : 181-186.

**Reuveny S., Velez D., Macmillan J.D. and Miller L. (1986)**

Factors effecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors.

J. Immunol. Methods., 86 : 61-69.

**Reuveny S., Velz D., Miller L. and Macmillan J.D. (1986)**

Comparaison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors.

J. Immunol. Methods., 86 : 61-69.

**Roder A. (1982)**

Development of a serum-free medium for cultivation of mixed cells.

Naturwissenschaften, 69 : 92-93.

**Sanchez-Madrid F. and Springer T. (1986)**

Production of Syrian and Armenian Hamster monoclonal antibodies of defined specificity.

Methods in Enzymol., 121 : 239-244.

**Sarem F. (1988)**

Contribution à l'optimisation de la culture en masse de cellules eucaryotes à partir de deux modèles : les hybridomes et les fibroblastes.

Thèse de Doctorat de 3ème cycle en Biochimie appliquée. Université de Nancy I.

**Scharff M.D., Roberts S. and Thammana P. (1982)**

Intérêt des hybridomes comme source d'anticorps.

Médecine Praticienne, n° 3 - Avril 1992.

**Schelling M. (1986)**

Increase of hybridoma formation by addition of dextran sulfate to in vitro immunization system.

Hybridoma, 5(2) : 159-161.

**Seamans T.C. and HU W.S. (1990)**

Kinetics of growth and antibody production by a hybridoma cell line in a perfusion culture.

70(4) : 241-245.

**Shay J.W.**

The biology of cell fusion in : Human hybridomas and monoclonal antibodies.  
Plenum Press - New-York - Engleman E.G, Fong S.K.H., Larrick J and  
Ranbitschek A. (Eds), 1 : 5-20.

**Shing Y.W. and Klagsbrun M. (1984)**

Human and bovin milk contains different sets of growth factors.  
Endocrinol., 115 : 273-282.

**Shintani Y., Iwamoto K. and Kazuaki K. (1989)**

IGF.1, a potent growth-promoting substance for mammalian cells from swine  
serum.  
Cytotechnol., 2 : 9-17.

**Shirai Y., Hashimoto K., Yamaji H. and Tokashiki M. (1987)**

Continuous production of monoclonal antibody with immobilized hybridoma  
cells in an expanded bed fermentor.  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 26 : 495-499.

**Stahli C., Stehelin T.H. and Miggiano V. (1983)**

Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production  
of specific hybridomas.  
Methods in Enzymol., 92 : 26-36.

**Steinitz M., Klein G., Koskimies S. and Makela O. (1972)**

EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody.  
Nature, 269 : 420-422.

**Suzuki E. and Ollis D.F. (1989)**

Cell cycle model for antibody production kinetics.  
Biotechnol. Bioeng., 34 : 1398-1402.

**Takahashi M., Steven A., Fuller S.A. and Hurrell S.G.R. (1987)**

Production of IgG-producing hybridomas by in vitro stimulation of murine  
spleen cells.  
J. Immunol. Methods, 96 : 247-253.

**Van Brunt J. (1986)**

Immobilized mammalian cells : the gentle way to productivity.  
Biotechnol., 4 : 505-510.

**Wasserman R.L. and Capra J.D. (1977)**

In glycoconjugates, Horowitz M.I. et Pigman W. eds  
Academy Press, New-York, 323-348.

**Yamada K., Ikeda I., Sugahara T., Hashizume S., Shirahata S. and Murakami I. (1990)**

Stimulation of proliferation and immunoglobulin M production by lactoferrin in human-human and mouse-mouse hybridomas cultures in serum-free conditions.  
Cytotechnol., 3 : 123-131.

**Zielke H.R., Ozand P.T., Tildon J.T., Sevdalian D.A. and Cornblath M. (1978)**

Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts.  
J. Cell. Physiol., 95 : 41-48.

**Zielke H.R., Sumbilla C.M., Sevdalian D.A., Hankins R.L. and Ozand P.T. (1990)**

Lactate : a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts.  
J. Cell. Physiol., 104 : 433-441.

**Zimmermann V. (1982)**

Electric field mediated fusion and related electrical phenomena.  
Biochim. Biophys. Acta, 694 : 227-277.



Boîte Postale 239  
54506 VANDOEUVRE-LES-NANCY CEDEX

Tél. 83.91.20.00

SERVICE SCOLARITE

DEMANDE D' AUTORISATION  
DE SOUTENANCE ET D' IMPRIMATUR

V/Réf. :  
N/Réf. :

Personne chargée du dossier : *G. BILLANT*  
Poste : *23-70*

NATURE DU DIPLOME : *Diplôme de Recherches Doctorales* . . . . .

U.F.R. CONCERNEE : *S. T. B.* . . . . .

MEMOIRE PRESENTE PAR : *Madame V.I.N. épouse CAPIAULT.ENT. J. Josette* . . . . .

TITRE DU MEMOIRE OU DE LA THESE : *Mae. expérience en culture de cellules animales : A propos de la fabrication d'Hybridomes et de la production en masse d'anticorps monoclonaux : Essais d'amélioration de la Technologie* . . . . .

DATE DE SOUTENANCE : *15 juin 1992* . . . . .

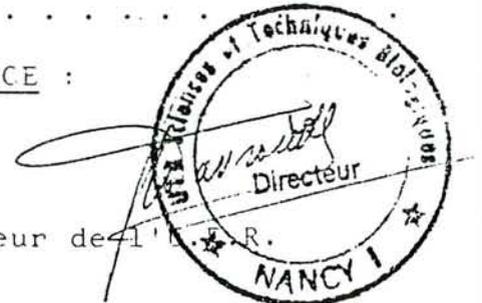
COMPOSITION DU JURY : *Pr. NABET. P. ; Mme Pr. BELLEVILLE-NABET ;*  
*Pr. BAZIN. H. ; Pr. THOMAS. D. ;*  
*Dr. ROSSIGNOL. A. ; Mme Dr. MARC. A.* . . . . .

AVIS SUR LA COMPOSITION DU JURY ET SUR LA SOUTENANCE :

*Favorable*

Nancy, le *10.5.92*

Le Directeur de l'U.F.R.



Accord de Monsieur le Président de l'Université de Nancy I pour la présentation de la soutenance et l'obtention de l'imprimatur :

Nancy, le . . . 19. MAI 1992 n°224

Le Président de l'Université



## Résumé

L'objectif principal de ce travail est l'étude des différentes étapes de la fabrication de souches d'hybridomes et de la culture en masse des anticorps monoclonaux produits.

Après une description détaillée des techniques utilisées, sont présentés les résultats des fusions réalisées après immunisation (par plusieurs antigènes) des lymphocytes de souris soit "*in vivo*" soit "*in vitro*". Ensuite sont expliqués la sélection et les différents modes de culture et de sauvegarde de ces souches d'hybridomes obtenues: anti beta lactoglobuline, anti alpha 1 antitrypsine et anti hormone lactogène placentaire.

Les productions d'anticorps monoclonaux "*in vivo*" (ascite de souris) et "*in vitro*" (bioréacteur) sont développées.

Une étude comparative de la croissance et du métabolisme des cellules cultivées dans des milieux complétés soit par 10% de sérum de veau foetal soit par 9% de lactosérum (sous produit de la fabrication fromagère peu onéreux) et 1% de sérum de cheval a été menée et nous avons mis au point un système original de culture des cellules d'hybridomes en bioréacteur: les cellules étant fixées dans une mousse de polyéther, elles sont alimentées en continu par un milieu régulé grâce à un cytotacteur et complété par un mélange de lactosérum et de sérum de cheval à 9 % et 1 %.

Des corrélations établies entre certains marqueurs biochimiques et le nombre de cellules vivantes et mortes permet le suivi du système.

Enfin, dans l'optique de production en masse d'anticorps, une série d'expériences a déterminé un certain nombre de conditions permettant d'obtenir de plus grandes quantités d'anticorps monoclonaux à un coût réduit.

The main focus of this work was the study of the different phases of the producing of hybridoma strains and their mass culture to obtain large amounts of monoclonal antibodies.

After having described in detail the techniques used, we presented our results of cells fusions after mice immunizations by various antigens as well as "*in vivo*" as "*in vitro*". Cultures type selection, and saving of the obtained strains are presented for the following strains : anti  $\beta$  lactoglobulin, anti  $\alpha$  1 antitrypsine and antiplacental lactogene hormone.

"*In vivo*" (ascetic fluid) and "*in vitro*" (bioreactors) monoclonal antibodies production was developed.

We have comparatively studied proliferation and metabolism of the cultured cells in two mediums : one complemented by 10 % of fetal calf serum (FCS) and the other with 9 % whey and 1 % horse serum. We have set up an original bioreactor using a polyether foam in which the cells are included and perfused by a regulated medium containing 9 % whey and 1 % FCS.

Some correlations have been established between biochemical markers and the number of viable and dead cells. They allowed us to check continuously the culture.

We have determined by several experiences some conditions allowing mass production of monoclonal antibodies at the lowest price.