

LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX: IMPORTANCE DE LA NATURE DE L'ANTIGÈNE UTILISÉ DANS LE RENDEMENT DE LA TECHNIQUE

Reçu le 03/07/2000 – Accepté le 21/02/2001

Résumé

Le succès de la production des anticorps monoclonaux (ACM) repose principalement sur l'immunisation de la souris, source de LB. Plusieurs facteurs sont alors à considérer dont la quantité d'antigène administrée, le nombre d'inoculations, la voie d'inoculation et la nature de l'antigène. Ce dernier facteur a fait l'objet de cette étude. En effet, une glycoprotéine de l'herpèsvirus équin-1 (EHV-1): la glycoprotéine L (gL) recombinante produite dans *E.coli* par génie génétique a été utilisée pour produire des ACM. Cette protéine recombinante, même produite dans un système cellulaire simple, la bactérie, s'est avérée immunogène car elle a induit la production d'ACM. Ces ACM appartenaient à la classe IgM. L'utilisation de diverses techniques immunologiques a montré que ces anticorps reconnaissent la protéine virale native. Ce résultat nous encourage à utiliser la bactérie pour produire des protéines immunogènes. Ceci est un grand avantage car la bactérie, peu exigeante, est facile à manipuler et se réplique rapidement.

Mots clés: Anticorps monoclonaux, immunogénicité, glycoprotéine, EHV1, antigène, protéine recombinante, E.Coli.

Abstract

The success of monoclonal antibody production relies on the immunisation of mice. A number of factors are thus important to consider: the amount of inoculated antigen, the number of inoculations, the route of inoculation and the nature of the antigen. This later was the aim of this study. Actually, a form of antigen was used to produce specific monoclonal antibodies to an equin herpes virus (EHV1) glycoprotein: the glycoprotein L (gL) produced in *E. coli*. This latter was shown to be immunogenic as it allowed the production of monoclonal antibodies of IgM class. The bacterial product was shown to be immunogenic enough to allow the production of antibodies which recognise the native form in several immunological tests where EHV1 has been used as antigen. This result is very interesting as the bacteria is easy to manipulate, fast to replicate and very economical to use.

Key words: Monoclonal antibody, immunogenicity, glycoprotein, EHV1, antigen, recombinant protein, *E.coli*.

B. AMELLAL-SAHEB

Département de Biologie
Moléculaire et Cellulaire
Institut des Sciences de la Nature
Université Mouloud Mammeri
Tizi-Ouzou (Algérie)

ملخص

نجاح عملية إنتاج أجسام مضادة منكلونية (ACM) يعتمد أساسا على تليفيح الفأرة. لهذا الغرض يجب الأخذ بعين الاعتبار عدة عوامل ومنها كمية المادة الملقحة، عدد التليفيحات، طريقته التليفيح و صفة المادة الملقحة. يرتكز هذا العمل على دراسة هذا العامل الأخير. نوعيين متميزتين من المادة التليفيحية استعملت لإنتاج ACM مخصصة لتليفيكويروتاتينات فيروس الحصان القليكوبروتين ل- (gL) الفيروسي EHV-1. هذا الأخير يعتبر المادة جد تليفيحية لأنها أنتجت عدد هام من ACM من صنف IgG بالعكس gL، المنتجة في بكتيرية *ECOLI* عن طريق العلوم الوارثية، لم تنتج رغم العدد الهام من التليفيحات إلا عدد صغير من ACM وهؤلاء كانوا من الصنف IgM. هذا المرود الضعيف باستعمال إنتاج البكتيرية *ECOLI* ناتج عن ضعف العامل المضاد.

الكلمات المفتاحية: الفيروسي EHV1، المادة الملقحة، القليكوبروتين ل (gL)، *ECOLI*.

Les anticorps monoclonaux (ACM) sont produits par des cellules dites hybridomes obtenues par la fusion de lymphocytes B (LB) avec des cellules de myélome. Les hybridomes possèdent en plus de la propriété de produire des anticorps (Ac), apportée par le LB parental, le caractère d'immortalité en culture cellulaire, apporté par l'autre cellule parentale, la cellule du myélome. Tous les ACM d'un seul clone reconnaissent un seul type d'épitope, ou de déterminant antigénique, sur un antigène. Cette propriété offre une grande spécificité aux ACM qui sont capables de reconnaître des différences minimales entre molécules ou micro-organismes. Elle est de ce fait mise à profit pour identifier, caractériser, rechercher et purifier une molécule donnée.

L'obtention d'un grand nombre de clones producteurs de l'anticorps recherché nécessite la sensibilisation d'un grand nombre de lymphocytes B par l'antigène en question [1-3]. L'immunisation de la souris est donc une phase importante qui permet d'assurer la réussite de la technique. Différentes formes d'antigène et différents programmes d'immunisation peuvent être utilisés pour induire une bonne réponse immunitaire [1,4,5]. Dans ce travail, a été entreprise la production d'ACM spécifiques à une glycoprotéine du virus équin EHV-1 pour permettre une meilleure purification; la caractérisation et l'étude de la carte épitope de cette dernière. Une protéine virale L(gL) du virus EHV-1 produite par génie génétique par *E.coli* a été utilisée comme antigène.

La gL, glycoprotéine d'enveloppe, est présente en très faible quantité relativement aux autres glycoprotéines. L'immunisation d'un animal avec EHV1 n'induirait pas une forte réponse immune vis-à-vis de gL. Cependant, s'agissant d'une glycoprotéine ayant un rôle stratégique dans le cycle viral, elle est l'objet d'intenses recherches la proposant comme sous-unité candidate à la vaccination anti-EHV1. Pour cette raison, l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques à gL s'est avérée nécessaire pour une meilleure caractérisation de la protéine et une purification efficace ainsi que pour déterminer le pouvoir protecteur de ces anticorps. Nous avons recouru au génie génétique pour l'obtention de grandes quantités l'antigène.

MATERIELS ET METHODES

Cellules

RK-13 (Rabbit Kidney cells). Ce sont des cellules de rein de lapin permissives à l'EHV-1. Elles sont utilisées pour cultiver et produire EHV-1. Elles sont utilisées également comme support d'expression des antigènes viraux, en immunofluorescence.

SP20: cellules de myélome utilisées comme partenaires des LB lors des fusions. Elles sont originaires de souris de souche Balb-c.

Réactifs

1. La solution HAT est une solution aqueuse composée d'un mélange d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine.

2. Le milieu HYHAT est un milieu de culture sélectif des hybridomes, composé de milieu DMEM additionné de la solution HAT (1%v/v), 200U/ml de pénicilline, 0.1 mg/ml de streptomycine, 10 mM d'oxaloacétate, 1 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de glutamine et 10% (v/v) de sérum de veau fœtal.

3. Le DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) est additionné de sérum de veau fœtal, de glutamine et d'antibiotiques dont la pénicilline.

4. L'IPTG, isopropyl thio-galactose, analogue du galactose, est utilisé pour induire le promoteur *lac*.

Méthodes

Production de la gL recombinante

Le gène UL1 codant la glycoprotéine L de EHV-1 a été amplifié par PCR à partir de l'ADN viral. UL1 a été cloné dans le plasmide pGEX-2T au site *BamHI*. Ce plasmide code une enzyme : la glutathion- S-transférase (GST) sous le contrôle du promoteur *lac*. Le gène UL1 a été cloné en aval de la GST donnant lieu à un gène fusionné dont l'ensemble GST-UL1 est sous contrôle du même promoteur *lac*, inductible à l'IPTG.

Préparation de l'inoculum composé de la protéine recombinante gL

La protéine virale ainsi exprimée a été purifiée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE). La bande correspondant à la protéine virale a été découpée du gel puis émulsionnée dans du "phosphate buffer saline" (PBS). Un même volume d'adjuvant de Freund (AF) a été rajouté. La mixture obtenue est utilisée pour immuniser les souris.

Production du virus

Le virus a été préparé à partir de cultures RK-13 infectées par EHV1 à une multiplicité d'infection de 0.1. Il a subi une purification sur gradient de saccharose (10-40%).

Préparation de l'inoculum viral

L'inoculum viral est composé d'un mélange de volumes équitables de solution virale contenant approximativement 10^7 pfu de virus et d'adjuvant de Freund.

Immunisation des souris

Les inocula ont été donnés aux souris à 10-15 jours d'intervalle, par voie intra péritonéale (ip).

Procédure de production d'anticorps monoclonaux

Les lymphocytes de rate de la souris immunisée sont récupérées dans du DMEM puis mélangées aux SP20 dans un rapport de 7 lymphocytes pour 1 SP20. Les cellules sont distribuées à raison de 2×10^6 lymphocytes/ml/cupule puis gardées à 37°C pour une durée moyenne de 10 jours au-delà de laquelle plusieurs clones visibles à l'œil nu apparaissent dans les cupules. Le surnageant, qui à ce stade est polyclonal, est alors analysé pour la présence d'Ac spécifiques à l'antigène en question. Les polyclones positifs sont gardés en croissance exponentielle puis monoclonés.

Les tests préliminaires consistent en une ELISA où le surnageant de chaque cupule sont testés contre EHV-1. La confirmation de la présence et de la spécificité des ACM est obtenue par analyse de ces Ac en immunofluorescence indirecte où ils sont testés contre des cellules RK-13 infectées par EHV-1 et en Western-blot contre EHV1 et la gL recombinante.

Le test de microneutralisation est également utilisé dans le but de rechercher une éventuelle activité neutralisante des ACM produits vis-à-vis de EHV-1.

L'isotype des ACM est déterminé par l'identification du type des chaînes lourde et légère de chaque ACM. Ceci a été réalisé par ELISA en utilisant un ensemble d'anticorps de chèvre anti-Ig de souris spécifiques aux différentes chaînes lourdes et légères.

Les techniques immunologiques

1. ELISA: les 96 cupules d'une plaque ELISA préalablement sensibilisées par EHV1, ont été mises en contact avec le surnageant des poly- ou monoclonales. Après une incubation de la plaque à 37°C suivie de rinçages, le conjugué (anticorps liés à la peroxydase) est additionné

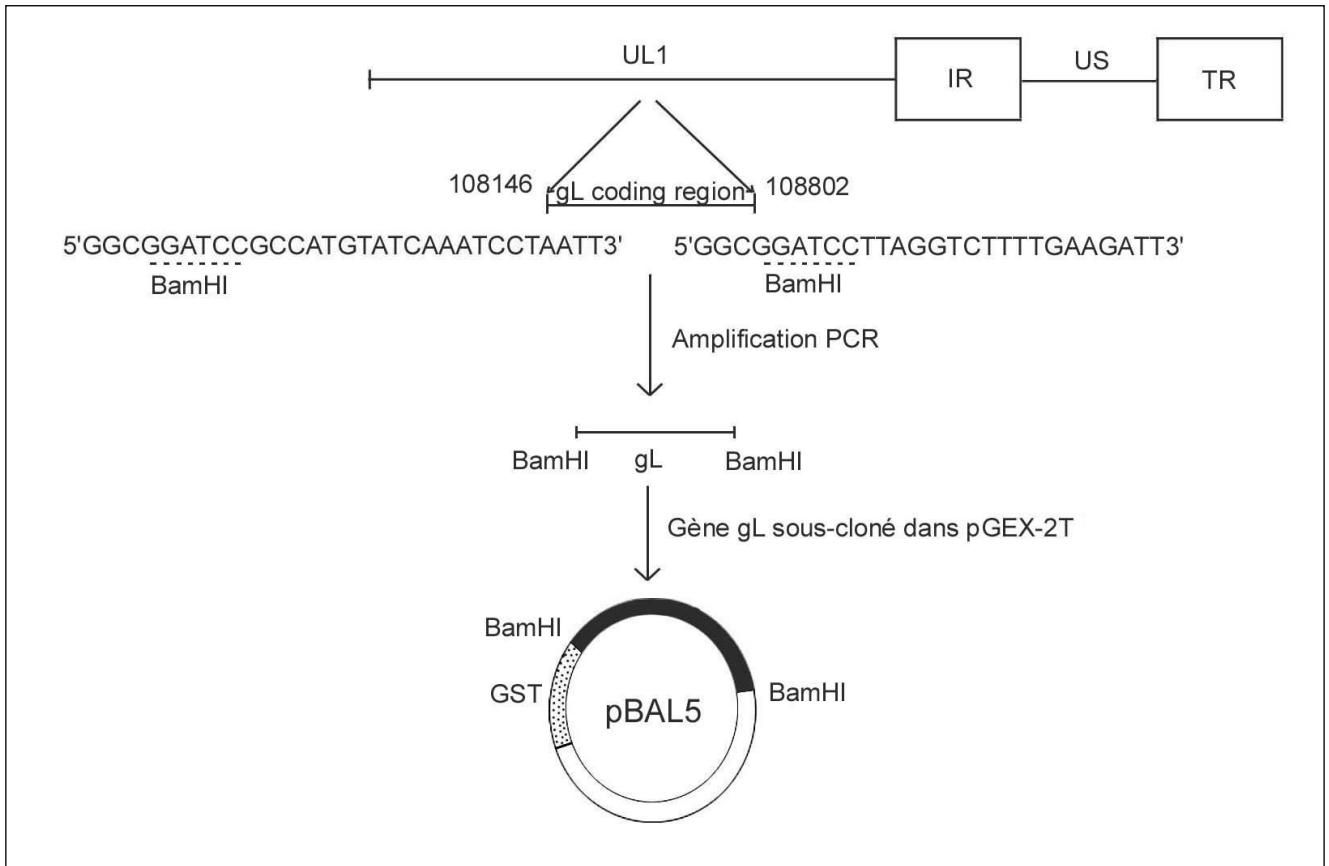


Figure 1: Stratégie de clonage du gène UL1 dans pGEX-2T.

dans les cupules. L'incubation et les lavages sont suivis de l'addition du substrat chromogène révélateur de la présence ou de l'absence d'anticorps. Dans le premier cas, l'usage de la spectrophotométrie permet le dosage de ces anticorps.

2. Western-blot: Le mélange protéique (lysats bactérien ou viral) subit une électrophorèse en fonction de la taille sur SDS-PAGE. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Cette dernière est découpée en bandelettes qui sont alors mises en contact avec les surnageants à analyser. Une incubation à 37°C, puis des rinçages de la membrane, sont suivis par l'addition du conjugué. Le substrat est enfin additionné pour révéler, en cas de présence des anticorps recherchés, de bandelettes de couleur bleu-violet [6].

3. Immunofluorescence indirecte: la technique utilisée est celle décrite par Ross et *al.* [7]. Des cellules RK-13 infectées par EHV1 ont été fixées sur des lamelles. Les surnageants à analyser sont mis en contact avec le frottis cellulaire et incubés à 37°C. Après rinçages, le conjugué est additionné pour être remplacé par de l'huile de contraste. Les lamelles sont observées sous microscopie pour une éventuelle fluorescence, révélatrice de la présence des anticorps recherchés.

4. Test de microneutralisation: le test a consisté à incuber chacun des ACM avec le virus pour permettre la fixation de l'anticorps sur ce dernier. Des cellules RK13 sont alors

additionnées au mélange. Après quelque jours d'incubation, on recherche l'effet cytopathogène (ECP). En cas d'absence d'ECP, on conclut que l'ACM est protecteur. Un témoin positif a été utilisé et a consisté en des sera polyclonaux anti-EHV1.

RESULTATS

Production de gL par génie génétique et dans *E.coli*

Un plasmide recombinant contenant le gène UL1 dans la bonne orientation est obtenu et a été désigné pBAL5. La stratégie de clonage est représentée sur la figure 1. La transformation de bactéries compétentes avec le plasmide recombinant a donné lieu à plus de 50 colonies par boîte de Petri. Une colonie transformée par le plasmide recombinant pBAL5 a été isolée et utilisée pour produire la protéine recombinante GST-gL. Une colonie bactérienne transformée par le plasmide parental pGEX2T, a été utilisée comme témoin négatif, cette dernière exprime la GST.

Identification et caractérisation de la protéine recombinante

Le gène UL1 a été exprimé avec succès dans le système bactérien. La protéine recombinante GST-gL a été identifiée et caractérisée en SDS-PAGE (fig. 2) et, en comparaison au témoin négatif, la taille de cette protéine a été déterminée et estimée équivalente à 47.5 Kda.

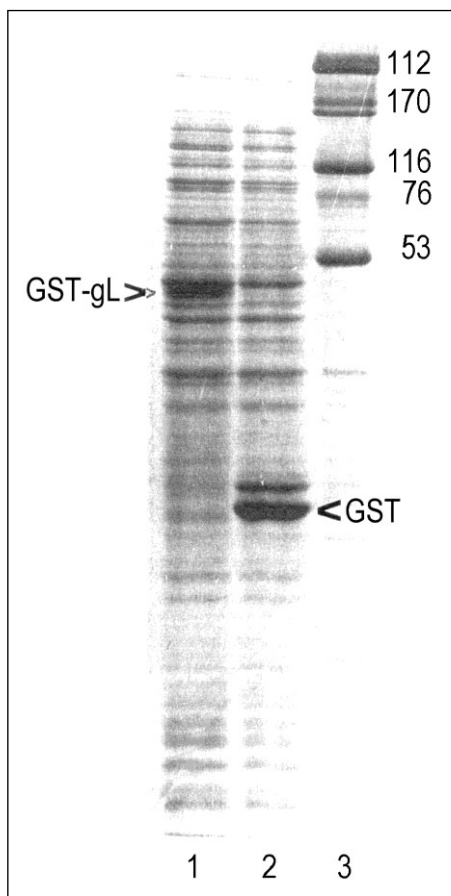


Figure 2: Identification et caractérisation de la protéine recombinante GST-gL, en SDS-PAGE. Des lysats cellulaires de cultures d'E.coli transformées avec pBAL5 (ligne 1) ou pGEX-2T (ligne 2) et induite à l'IPTG ont été séparées sur SDS-PAGE 10% dans des conditions réductrices. Poids moléculaires (ligne 3). La bactérie recombinante a exprimé une protéine fusion GST-gL de 47,5K correspondant à la taille de la GST (26K) associée à celle du produit du gène UL1 qui est de 21,5K.

Confirmation de l'identité de la protéine

La confirmation de l'identité de la protéine recombinante a été obtenue en Western-blot à l'aide d'un antisérum polyclonal R337/3 (disponible au laboratoire) contenant des anticorps spécifiques à la gL. Un sérum pré-immun, le R337/0 est utilisé comme témoin négatif. Les résultats sont représentés sur la figure 3. Une bande unique dont la taille correspond à la protéine recombinante a été révélée avec l'usage du R337/3.

Résultats des fusions

Les fusions réalisées, au nombre de 3, étaient techniquement réussies avec plus de 500 clones par fusion. Pour chaque fusion, deux souris étaient sacrifiées et deux rates utilisées. Le programme d'immunisation des souris a consisté en l'injection de cinq inocula d'antigène à 15 jours d'intervalle avant leur sacrifice. Six souris ont été utilisées pour la production d'ACM et 15 ACM de type IgM ont été obtenus (Tab.1).

Antigène	Nombre d'inoculations	Nombre de souris	Nombre d'ACM
gL	5-6	6	15
EHV1	2-3	5	23

Tableau 1: Résultats des fusions effectuées.

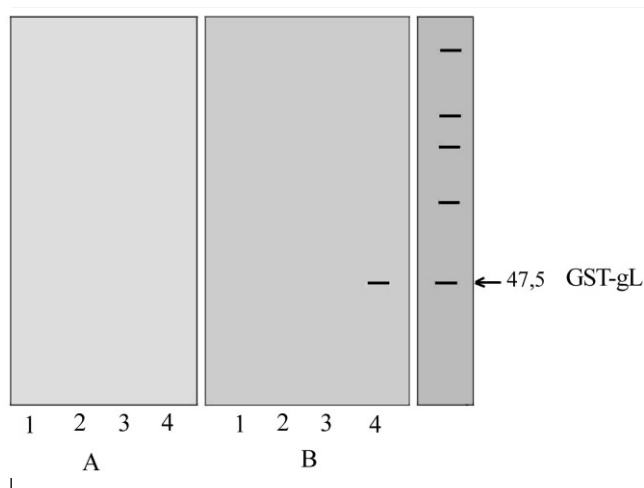


Figure 3: Identification du produit UL 1 à l'aide d'un antisérum spécifique de gL, le R337/3.

Des Western-blot ont été effectués à partir de SDS-PAGE 10% de cultures d'E.coli transformées avec pGEX-2T (lignes 1 et 2) ou pBAL5 (lignes 3 et 4). Les cellules étaient soit laissées non-induites (lignes 1 et 3) ou induites à l'IPTG (lignes 2 et 4). Les blots ont réagi avec un antisérum de lapin, le R337/3 (partie B) ou avec le sérum pré-immun, le R337/0 (partie A). La protéine recombinante a réagi avec le premier en faisant apparaître une bande unique de 47,5K.

Propriétés des ACM

Les propriétés des ACM produits sont résumées dans le tableau 2.

	Isotype	Réaction en ELISA	Réaction en WB	Réaction en IF	Activité neutralisante
Anti-gL	IgM	+++	+	+++	+/-

Tableau 2: Propriétés des ACM produits des différentes fusions.

ACM = Anticorps monoclonaux; WB = Western-blot;

IF = Immunofluorescence;

+++ = Fortement positif. +/- = Légèrement positif.

Les ACM anti-EHV1 ont été testés contre l'antigène EHV1 aussi bien en ELISA, Western-blot que Immunofluorescence.

Les ACM anti-gL recombinante ont été testés contre :

- EHV1 en ELISA
- EHV1 en IF sur cellules
- RK13 et gL en WB

Tous les ACM produits avec la gL recombinante ont donné une réaction négative en WB lorsque testés contre EHV1 en conditions réductrices ou non-réductrices.

a/ Isotype: à l'aide de la technique ELISA et d'anticorps spécifiques aux différentes chaînes lourdes des immunoglobulines, il nous a été possible de déterminer

l'isotype des ACM produits contre gL recombinante. Les 15 ACM étaient tous de type IgM.

b/ Réaction en ELISA: tous les ACM produits contre la gL recombinante ont fortement réagi en ELISA contre EHV1.

c/ Réaction en Western-blot: parmi les quinze ACM, six ont révélé une réaction positive en Western-blot contre la gL recombinante (fig.4). Aucune réaction n'a été enregistrée en Western-blot entre ces ACM et EHV-1 que ce soit dans des conditions réductrices ou non-réductrices.

Pour s'assurer de la spécificité des ACM, ils ont été testés en Western-blot contre l'antigène GST. Aucun de ces ACM n'a réagi avec la GST (fig. 4).

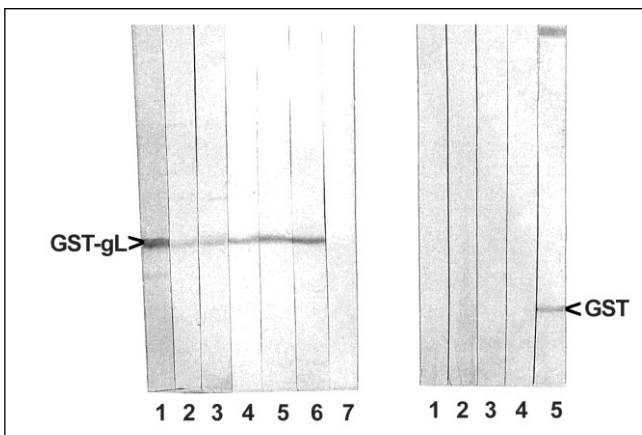


Figure 4 : Western-blot testant les ACM produits contre la GST-gL. Réaction des ACM anti-gL avec la GST-gL et pas avec la GST.

Des Western-blot ont été effectués à partir de SDS-PAGE de GST-gL (A) ou GST (B) analysés dans des conditions réductrices. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à partir de laquelle ont été formées des bandelettes mises en présence de l'antisérum de lapin, le R337/3 (A1), le R337/0 comme témoin négatif (A7) ou le sérum anti-GST utilisé comme contrôle positif de la GST (B5). Les ACM testés sont représentés sur les lignes A2-A6 et B1-B4. Aucun ACM n'a réagi avec la GST. Ils sont donc spécifiques de gL.

d/ Réaction en immunofluorescence: testés en immunofluorescence indirecte sur des cellules RK13 infectées par EHV1, tous les ACM ont reconnu l'antigène viral exprimé par les cellules et cette réaction s'est traduite par une fluorescence (fig. 5).

e/ Activité neutralisante: les ACM ont manifesté une faible activité neutralisante du virus.

DISCUSSION-CONCLUSIONS

Les propriétés des ACM produits, prises dans leur ensemble, convergent toutes vers l'idée que le produit bactérien, gL, est immunogène mais certainement moins que la protéine native. Les résultats obtenus dans cette étude, avec l'utilisation du produit bactérien sont très encourageants. Connaissant les limites de la bactérie, la

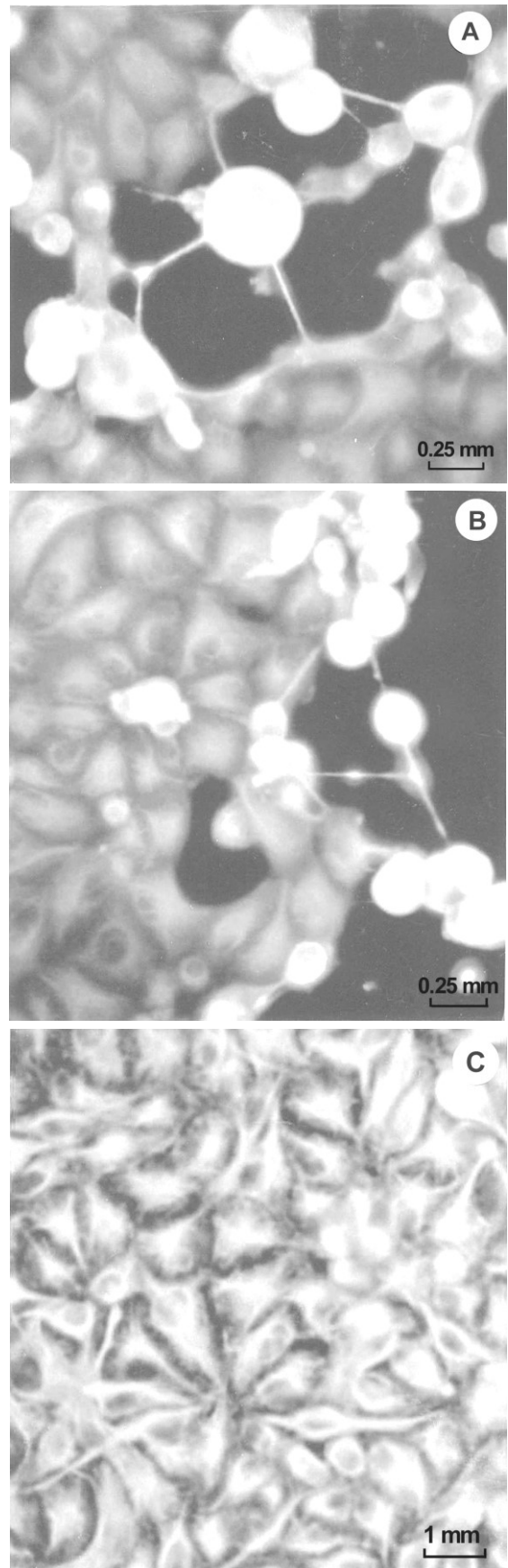


Figure 5 : Immunofluorescence indirecte: réaction des ACM anti-gL avec EHV1 exprimé sur des cellules RK-13 infectées par le virus.

Des cellules RK-13 ont été infectées par EHV1 (A, B) ou laissées non-infectées (C). Aucune fluorescence n'a été observée avec le contrôle négatif (C) malgré leur mise en contact avec un antisérum polyclonal anti-EHV1. Les cellules infectées ont réagi avec les ACM, ce qui s'est traduit par la fluorescence au niveau des figures A et B. Les ACM produits contre la protéine recombinante reconnaissent la forme native de la même protéine.

synthèse protéique est réduite à une simple chaîne peptidique dépourvue de groupements glucidiques, lipidiques ou autres [8-11]. Ceci fait sans aucun doute de la protéine recombinante, une protéine faiblement immunogène. Un autre facteur qui confirme la pauvre immunogénicité de ces antigènes est le fait qu'ils n'aient induit que des IgM. La réponse immune à la plupart des antigènes dépend des lymphocytes T et B. Ces antigènes sont alors dits T-dépendants (Td). Il y a cependant des antigènes capables de stimuler les lymphocytes B sans l'aide des lymphocytes T et sont dits T-indépendants (Tind). Les antigènes Tind sont souvent de faibles immunogènes: la gL pourrait appartenir à ce groupe d'antigènes. Malgré les fréquentes inoculations les anticorps induits sont de classe IgM. La même situation a été décrite par Bridges et al. [12] pendant qu'ils étudiaient la réponse immune anti-EHV1 chez le cheval. Dans notre cas, la gL recombinante a bel et bien induit une réponse humorale et les ACM produits ont pu reconnaître les formes natives de la gL lorsque celles-ci sont exprimées en immunofluorescence à la surface des cellules RK-13 infectées et en ELISA. Ce résultat est très intéressant sachant que le système bactérien présente plusieurs avantages que n'aurait pas son "rival", le système eucaryote. Ce dernier est certes capable de produire des protéines complexes mais est coûteux, lent, complexe et exige des conditions particulières. A l'opposé, le système bactérien est simple, rapide et peu exigeant.

Il n'est certes pas recherché l'obtention d'IgM quand on envisage la production des ACM. Cependant, dans le cas de cette étude, ces anticorps ont été très utiles. Ils ont permis de montrer que la gL pourrait être candidate à la vaccination. En effet, malgré leur nature (IgM), malgré la différence de structure entre la gL native et la recombinante dont il est question dans ce travail, ces anticorps ont manifesté une faible activité neutralisante du virus.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Virologie de l'Université de Leeds (Angleterre).

REFERENCES

- [1]- Westerwoudt R.J., "Improved fusion methods. IV- Technical aspects", *J. Immunol. Meth.*, 77, (1985), pp. 181-186.
- [2]- Taggart R.T., "Culture methods for the selection and isolation of stable antibody-producing murine hybridomas. Methods of hybridoma formation", pp. 181-193. Edited by Barta A.H. and Hirshaut Y. (1987).
- [3]- Barta A.H. and Hirshaut Y., "Current methodologies in hybridoma formation. Methods of hybridoma formation", pp. 1-33, Edited by Barta, A.H. and Hirshaut Y. (1987).
- [4]- Bazin R. and Lumieux R., Effect of the elapsed time after the final antigen boost on the specificity of monoclonal antibodies produced by B cell hybridomas", *J. Immunol. Meth.*, 112, (1988), pp. 53-56.
- [5]- Lane D., "Antibodies. A laboratory manual", Ed. Harlow E.D. (1988).
- [6]- Meredith D.M., Stocks J.M., Whittaker G.R., Halliburton I.W., Snowden B.W. and Killington R.A., "Identification of the gB homologues of equine herpesvirus types 1 and 4 as disulphide-linked heterodimers and their characterisation using monoclonal antibodies", *J. Gen. Virol.*, 70, (1989), pp. 1161-1172.
- [7]- Ross L.J.N., Watson D.H. and Wildy P., "Development and localisation of virus-specific-antigens during the multiplication of HSV in BHK21 cells", *J. Gen. Virol.*, 2, (1968), p. 155.
- [8]- Mainwaring W.I.P., Parish J.H., Pickering J.D. and Mann N.H., "Nucleic acid biochemistry and molecular biology", Blackwell scientific publications (1982).
- [9]- Davis B.D., Dulbecco R., Emsen H.N. and Ginsberg H.S. Microbiology, 4th edition (1997).
- [10]- Osterieder N., Wagner R., Pfeffer M. and Kaaden O.R. Expression of equine herpesvirus type 1 glycoprotein gp 14 in *E.coli* and in insect cells: a comparative study on protein processing and humoral immune responses, *J. Gen. Virol.*, 75, (1994), pp. 2041-2046.
- [11]- Stokes A., Cameron R.S., Marshall R.N. and Killington R.A. "High level expression of EHV-1 glycoproteins D and H and their rôle in protection against virus challenge in the C3H (H-2K) murine model", *Virus research* (1997).
- [12]- Bridges, C.G. and Edington N., "The proteins of equine herpesvirus 1 recognised by equine antisera and their ability to promote antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity", *Tierarztl rax suppl.*, 2, (1987), pp. 47-49. □