

Etude de la *diversité* fonctionnelle des anticorps par une technique *cytofluorimétrique* originale

Application à la production d'anticorps monoclonaux

L'étude de la diversité des anticorps produits par une population de lymphocytes B repose sur l'analyse de caractéristiques très variées. Pour faciliter cette étude, la population des lymphocytes B peut être immortalisée par la formation de cellules hybrides. Comme chaque hybridome dérive d'un clone unique, toutes les cellules filles produisent le même anticorps dit monoclonal. Afin d'étudier la diversité de la population des lymphocytes B nous avons mis au point une nouvelle technique appelée « **Secretion Capture Report Web** ». Celle-ci permet une analyse multiparamétrique des anticorps monoclonaux sécrétés et simultanément l'isolement d'un clone présentant des caractéristiques particulières. Les résultats obtenus facilitent la mise au point et la production d'anticorps monoclonaux dont l'importance pratique dans la recherche fondamentale, la purification, la catalyse, le diagnostic et la thérapeutique est bien établie.

Les lymphocytes B sont les cellules productrices d'anticorps dont la diversité, apparemment infinie, est un des phénomènes-clés du système immunitaire. L'étude de cette diversité remonte à la fin du XIX^e siècle et trouve son origine dans la théorie de la chaîne latérale développée par Paul Ehrlich. Celui-ci avait postulé que les cellules immunes possèdent à leur surface des molécules réceptrices spécifiques, dites chaînes latérales, susceptibles de se lier à certains groupes chimiques de molécules étrangères à l'organisme appelées antigènes. Quand l'antigène est présent, les cellules produisent et relarguent dans le sang des chaînes latérales que nous qualifions aujourd'hui d'anticorps. Durant le processus dit de sélection clonale, des lymphocytes B individuels (clones) sont stimulés et sélectionnés afin de produire un et un seul type d'immunoglobuline. Ainsi la remarquable diversité des anticorps dans le sang découle directement de la population des lymphocytes B de l'organisme. Il a été estimé qu'un seul individu peut produire plus de formes différentes d'anticorps

qu'il n'existe de protéines dans l'organisme.

L'étude de la diversité des anticorps produits par une population de lymphocytes B repose sur l'analyse de caractéristiques très variées. Quels sont les types de diversités observés? Tout d'abord, au niveau génétique, une diversité moléculaire provenant de la diversité apparemment infinie du nombre de gènes codant pour les anticorps; cette première diversité est basée sur des mécanismes bien décrits de recombinaison et remaniement constant du matériel génétique. Elle conduit à un deuxième niveau de diversité, la diversité fonctionnelle, qui résulte de l'expression et de la sécrétion de l'anticorps, de sa spécificité, de son affinité, de sa région effectrice ou isotype et enfin de sa flexibilité conformationnelle. L'impact biologique de la diversité fonctionnelle des anticorps dans l'organisme est considérable. Il inclut de manière importante à la fois la spécificité et l'affinité des anticorps dans les réponses naturelles et auto-immunes, la présence de certains isotopes pour activer le complé-

ment et les mécanismes cellulaires anticorps-dépendants ainsi que les déficits immunitaires associés à une faible production d'anticorps. Bien que les mécanismes qui sont à l'origine de la forte diversité soient bien compris, l'étendue de la diversité fonctionnelle reste à être décrite.

Comment étudier la diversité de la population des lymphocytes B? La population des lymphocytes B ou « répertoire », peut être immortalisée par la formation de cellules hybrides ou hybridomes résultant de la fusion entre un clone de lymphocyte B et une cellule myéломateuse. Les hybridomes se multiplient facilement, permettant l'analyse du répertoire des lymphocytes B ainsi que l'isolement d'une fraction intéressante de ce répertoire. Comme chaque hybridome dérive d'un clone unique, toutes les cellules filles produisent le même anticorps dit monoclonal.

Le travail de thèse⁽¹⁾ de John S. Kenney effectué au sein de l'URA 491, a débouché sur la mise au point et le développement d'une nouvelle technique permettant d'analyser et d'isoler simultanément la

diversité fonctionnelle d'une population d'hybridomes de lymphocytes B. Cette technique appelée « *Secretion Capture Report Web* » (SCRW) permet une analyse multiparamétrique des anticorps monoclonaux sécrétés et simultanément l'isolement d'un clone présentant des caractéristiques particulières^[1,2]. Le SCRW consiste à encapsuler chaque hybridome dans une microgouttelette d'agarose biotinylée (fig. 1). L'anticorps sécrété par l'hybridome est capturé par un site dit de « capture » (agarose biotinylée/avidine/Ig-antisouris biotinylé) situé sur le filet d'agarose. L'addition de l'antigène rendu fluorescent permet de visualiser la présence de l'anticorps recherché. L'hybridome encapsulé ainsi caractérisé est isolé par cytométrie de flux. Un traitement ultérieur par l'agarase libère l'hybridome de la gouttelette d'agarose autorisant l'expansion clonale. Seule la technologie SCRW permet de sélectionner parmi des millions de cellules et à une vitesse de 200 cellules/sec, celle qui sécrète un anticorps spécifique de l'antigène choisi. Lors des techniques classiques de clonage de dilution limite, il est impossible par exemple de tester tous les hybridomes obtenus et les quelques cellules sécrétant l'anticorps recherché peuvent passer inaperçues empêchant de ce fait l'analyse statistique de la diversité du répertoire des lymphocytes B.

Les avantages et limites du SCRW ont été étudiés de manière exhaustive. Les hybridomes encapsulés dans l'agarose conservent une viabilité supérieure à 90 % et l'efficacité de clonage est identique à celle de cellules libres. Le taux de récupération des microgouttelettes sélectionnées par cytométrie de flux est dépendant de la qualité de la population de départ mais est généralement supérieure à 90 %. Virtuellement, tous les hybridomes restent capables de sécréter des anticorps après encapsulation. L'utilisation du filet d'agarose permet par ailleurs de mener directement, lors de la sélection de l'hybridome, des expériences de compétition entre l'anticorps et un ligand naturel de l'antigène. La cytométrie de flux est capable de séparer une gouttelette contenant un hybridome unique du reste de la préparation (gouttelettes vides ou contenant plus d'une cellule), les hybridomes vivants des morts. Elle permet ainsi d'isoler de manière reproductible les clones recherchés représentant environ un peu plus de 2 % de la population originelle. Notre technologie SCRW élimine et simplifie un grand nombre d'étapes de la technologie traditionnelle de production d'anticorps monoclonaux.

Le SCRW a été appliqué à l'étude de la diversité des anticorps sécrétés par des hybridomes de lymphocytes B. Nous avons

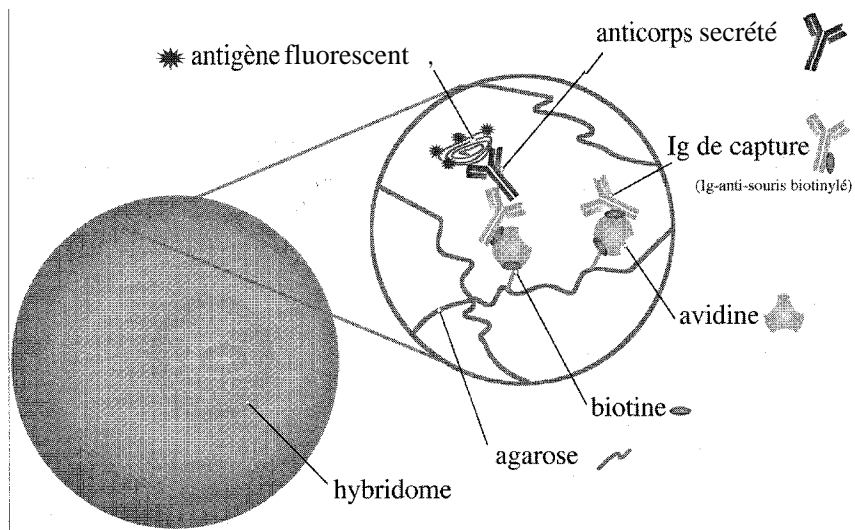


Figure 1.

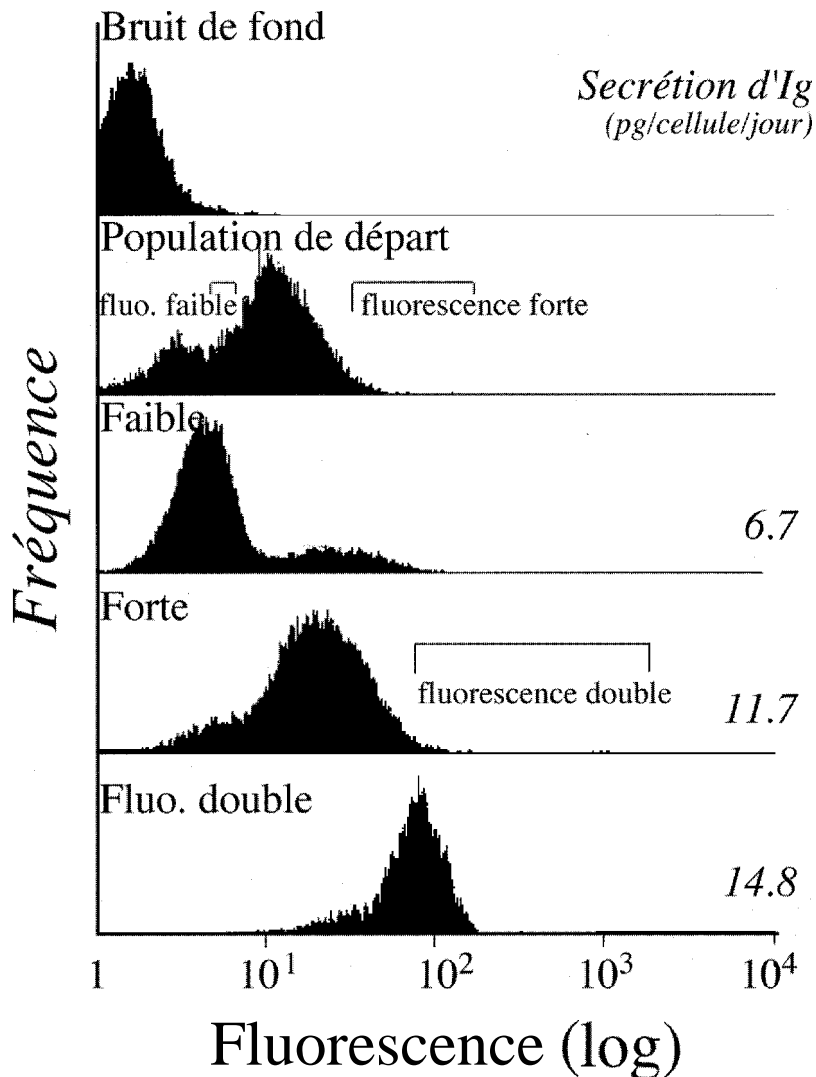
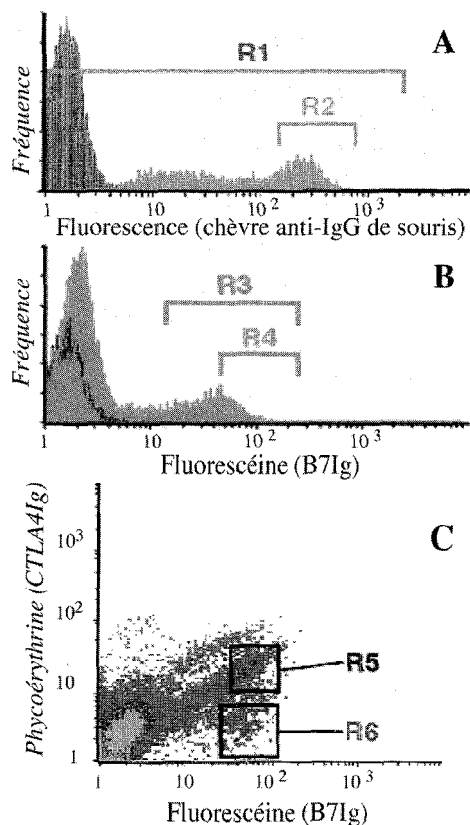


Figure 2



Expérience de compétition in situ

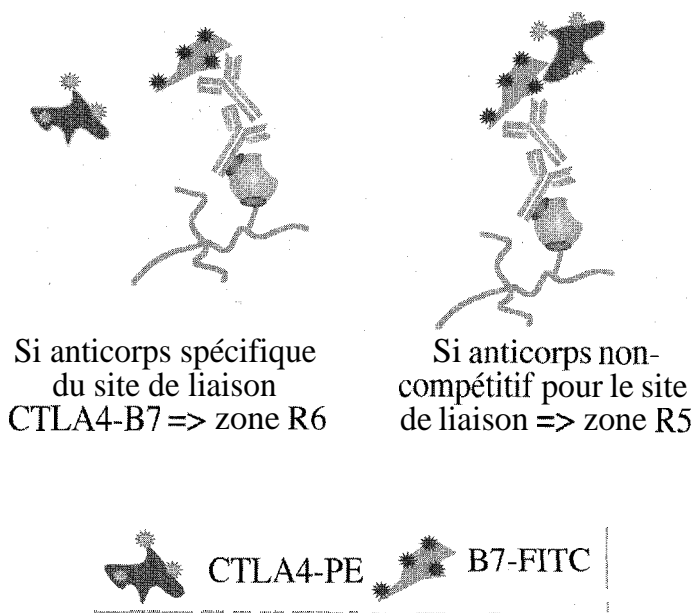


Figure 1

Régions SCRW Analyses SCRW		Réactivités ELISA (% positif)			
		Sécréteur d'IgG	spécifique de B7lg	spécifique de B7 dans B7lg	inhibe le site de liaison B7-CTLA4
R1	viable cells	96.8	52.4	40.8	1.6
R2	mouse IgG ⁺	100	73.5	44.4	7.4
R3	B7lg ⁺	100	96.6	66.9	12.6
R4	B7lg high ⁺	100	96.5	35.1	8.8
R5	B7lg ⁺ , CTLA4Ig ⁺	100	100	100	0
R6	B7lg ⁺ , CTLA4Ig ⁻	100	85.5	85.2	59.3

Tableau 1: régions Clonées [cf. fig 3) avec réactivités ELISA des hybridomes obtenus par le SCRW.

par ailleurs vérifié que l'intensité de fluorescence observée est directement proportionnelle au taux de production dosé *in vitro*. Des clones hautement producteurs d'anticorps ont été isolés et le phénotype de haute sécrétion apparaît comme héréditaire bien que des fluctuations liées à l'âge de la culture aient été observées. Ainsi, le SCRW, technique qui permet la sélection des gros producteurs, est d'une importance primordiale pour la production d'immunoglobulines (fig. 2).

Différents aspects de la diversité fonctionnelle d'hybridomes générés contre des

antigènes de types variés ont été analysés. Nous avons produit et étudié 1) des anticorps neutralisant B7^[3], une protéine de surface cellulaire au rôle important dans la réponse immunitaire (fig. 3); 2) des anticorps réagissant de manière croisée avec les cyclooxygénases I et II, enzymes clés de l'inflammation; 3) des anticorps reconnaissant le site actif d'une ectoenzyme, la NAD⁺glycohydrolase/CD38 (collaboration avec le groupe de Francis SCHUBER, Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR 75 14 CNRS); 4) des anticorps spécifiques d'une séquence de la protéine β-amyloïde, pro-

téine associée à la maladie d'Alzheimer; 5) des anticorps spécifiques de l'aminotriazole, une petite molécule organique, herbicide non sélectif.

La technique mise au point et utilisée dans le cadre de ce travail a permis d'aborder l'étude de la diversité du répertoire des lymphocytes B sous un jour nouveau. De plus, les résultats obtenus facilitent la mise au point et la production d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps sont d'une importance pratique dans la recherche fondamentale, la purification, la catalyse, le diagnostic et la thérapie.

POUR EN SAVOIR PLUS

(0) Kenney, J.S. Etude de la diversité fonctionnelle des hybridomes de lymphocytes B. *Thèse en Pharmacologie, Université Louis Pasteur, Strasbourg I*, (directeur de thèse C.D. Muller), juin 1996.

(1) Gray, F., Kenney, J.S. and Dunne, J.F. Secretion capture and report web: use of affinity derivitized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells. *J. Immunol. Methods* 182: 155 (1995).

(2) Kenney, J.S., Gray, F., Ansel M.-H. and Dunne, J.F. Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web. *Bio/technology* 13:787 (1995).

(3) Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosaire, L.S., Damle, K and Ledbetter J.A. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174:561 (1991).

John S. KENNEY*
Christian D. MULLER

Laboratoire de biophysique
URA 491 CNRS
Faculté de Pharmacie
Université Louis Pasteur
BP24
67401 Illkirch
Tél. : 03 88 67 68 30
Fax : 03 88 67 40 11

* Adresse actuelle
Antibody Solution Inc.
3 180 Porter Dr.
94304 -12 12 Palo Alto, CA, USA
Laboratoire de biophysique
URA 491 CNRS
Faculté de Pharmacie
Université Louis Pasteur
BP24
67401 Illkirch
Tél. : 03 88 67 68 30
Fax: 03886740 11

Michel MIESCH

Laboratoire de chimie organique
synthétique
UMR 7509 CNRS
Institut de Chimie
Université Louis Pasteur
BP 296/R8
67008 Strasbourg
Tél. : 03 88 41 68 12
Fax : 03 88 60 42 48