



HAL
open science

Nouvelles approches méthodologiques pour l'obtention d'anticorps humains monoclonaux

Mazhoura Ait Mebarek

► **To cite this version:**

Mazhoura Ait Mebarek. Nouvelles approches méthodologiques pour l'obtention d'anticorps humains monoclonaux. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114857 . tel-00829106

HAL Id: tel-00829106

<https://theses.hal.science/tel-00829106>

Submitted on 2 Jun 2013

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNÉE 2009 – 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1198

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 28 Novembre 2012

Par

Mazhoura AIT MEBAREK

NOUVELLES APPROCHES METHODOLOGIQUES POUR L'OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX HUMAINS

Directeur de thèse : Hervé Volland

Composition du jury :

<i>Président du jury :</i>	Karl Balabanian	CR (UMR996 INSERM-Université Paris-Sud)
<i>Rapporteurs :</i>	Yves Delneste Pierre-Guy Marnet	CR (INSERM U892, Angers) PR (UMR PEGASE, UMR 1348 INRA- AGROCAMPUS, Rennes)
<i>Examineurs :</i>	Laurent Bellanger Philippe Billiard Hervé Volland	CR (CEA, Marcoule) PR (EA 4530-Université Paris-Sud) DR (CEA, Saclay)

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNÉE 2009 – 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1198

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 28 Novembre 2012

Par

Mazhoura AIT MEBAREK

NOUVELLES APPROCHES METHODOLOGIQUES POUR L'OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX HUMAINS

Directeur de thèse : Hervé Volland

Composition du jury :

<i>Président du jury :</i>	Karl Balabanian	CR (UMR996 INSERM-Université Paris-Sud)
<i>Rapporteurs :</i>	Yves Delneste Pierre-Guy Marnet	CR (INSERM U892, Angers) PR (UMR PEGASE, UMR 1348 INRA- AGROCAMPUS, Rennes)
<i>Examineurs :</i>	Laurent Bellanger Philippe Billiard Hervé Volland	CR (CEA, Marcoule) PR (EA 4530-Université Paris-Sud) DR (CEA, Saclay)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury : le Dr Laurent Bellanger, le Pr Philippe Billiald, le Dr Yves Delneste, le Pr Pierre-Guy Marnet et le Dr Karl Balabanian, merci de me faire l'honneur de juger mon travail. Mes travaux de thèse ont été réalisés dans le Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Immunoanalyse (LERI) au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) de Saclay. Ils ont été financés par le programme IRTELIS du CEA.

Je tiens à remercier le Dr Christophe Creminon pour son accueil au sein du service, ainsi que sa bonne humeur et ses conseils scientifiques. Je te remercie également pour tes conseils, tes corrections du manuscrit et de la publication, et ton écoute tout au long de ma thèse.

Mes remerciements suivants vont au Dr Hervé Volland, directeur de ma thèse. Je te remercie de m'avoir proposée ce sujet de thèse. Le sujet de thèse de 1^{ère} année n'est plus celui que je laisse maintenant, merci de m'avoir permis de changer de thématique et de m'avoir donné la liberté et les moyens financiers pour y arriver. Merci pour toutes tes corrections notamment du manuscrit de thèse et de la publication. Merci pour ton optimisme et ta bonne humeur.

Les prochains remerciements sont pour le Dr Michel Léonetti. Par hasard après une présentation, nous avons collaboré ensemble ce qui n'était pas prévu initialement. C'est la magie du doctorat !!! On prévoit des timings, des impératifs temps/résultats, plein de choses dans un tableau prévisionnel imaginaire à l'esprit de tout thésard, mais cela ne se passe pas comme on prévoit. Je te remercie pour ton encadrement, ton soutien, pour m'avoir écoutée et motivée dans les moments difficiles. Je remercie par ailleurs les autres membres du LIAS pour leur implication dans mon sujet, notamment Alexandra Savatier et Jean-Claude Boulain, pour m'avoir fourni tous les éléments nécessaires à mes manips et pour leurs encouragements. Je remercie également le Dr Frédéric Ducancel : merci pour tes encouragements et ta bonne humeur !!! Par ailleurs, je remercie le Dr Anne Wijkhuisen: merci pour ton écoute et tes encouragements, bon nombre de fois ton épaule et tes oreilles ont été là pour moi !!! Je t'en remercie. Merci également de reprendre ma suite et de continuer sur mon sujet de thèse !!! Je pense que sans la collaboration LERI/LIAS durant la dernière année de ma thèse, mon sujet n'aurait pas donné et aboutit à ce qu'il est maintenant ! Michel et Anne bonne continuation: beaucoup de publications et de brevets !!!!!

Je tiens également à remercier Patricia Lamourette du LERI. Merci de m'avoir transmis ton savoir faire et tes connaissances de culture cellulaire. Merci pour ta disponibilité, les nombreuses fusions et les nombreux conseils ou questions auxquelles tu as répondu.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire : Corinne, pour ses encouragements et conseils notamment en matière de CV, Cécile, Marja Liisa pour les nombreux allers retours pour récupérer les poches de sang. Merci pour votre gentillesse et votre écoute. Cécile merci pour ton soutien durant ces trois ans. De même, merci à Marc Plaisance, Marie-Claire Nevers, Karine Devilliers, aux deux nouveaux thésards du LERI :

Jérôme et Ingrid bon courage pour la suite !!!!! Merci à toi Céline pour tes long mails (une page en moyenne) d'encouragements : ils m'ont beaucoup aidé et remonté le moral. Merci aussi au personnel administratif : Laurie Menez, Nicolas Caudy et Sandrine Leblois (désolée pour l'entorse du petit doigt, je pense que ma thèse y est un peu pour quelque chose !!!). Un grand merci à Vincent Morin de Bertin Pharma pour m'avoir sortie de situations difficiles avec Word et le sommaire durant les vacances d'été.

Un grand merci à Loic Jaffrelo, le post doctorant présent à mon arrivée et travaillant sur mon sujet. Tu m'as encadrée et t'ai occupé de moi durant les premiers mois de ma thèse. Merci pour ta gentillesse. Un grand merci à Karine Adel-Patient pour ses conseils et son aide sur la cytométrie en flux et sur le sujet de manière générale.

Mes sincères remerciements vont à tous les habitants du deuxième étage et du bâtiment d'en face le 152 pour la bonne ambiance : Stéphanie Morin, ma copine de thèse qui m'a écouté et conseillé, Fatoumata Sakho pour le scotcher de plaque et surtout pour ton soutien et ta gentillesse : un énorme merci, Marie-Françoise, Sandrine, Aurélie, Anne, Fabienne, Sophie Volturo pour les discussions de filles et conseils garde-robe (Sophie surtout !!), mais également Alexandre, Bertrand, le docteur à mon écoute durant mon déménagement au premier étage, Laetitia, Blanche, Romy, et tout ceux que j'ai oubliés...Je remercie également Hervé Bernard pour sa disponibilité, ses cris et fous rires qu'y m'ont bien réveillés tous les matins.

Finalement, je tiens à remercier ma famille. D'arriver jusque là n'a pas été facile. Ce n'était pas gagné d'avance. Je vous remercie Papa, Maman et les jumeaux d'avoir toujours été présents pendant ces trois années dans les bons comme les mauvais moments et bien avant encore. Merci Maman et Papa, grâce à vos sacrifices et encouragements : il y aura un docteur dans la famille !!!!! Un grand merci aux oncles et tantes qui ont également été là, à Oncle Hamid et sa femme, à Oncle Omar et sa femme Fatma qui m'ont toujours accueilli quelque soit l'heure du jour et de la nuit !!!!! Un énorme merci au Dr Rajia Bahri pour m'avoir apporté son soutien ainsi que pour toutes les corrections et discussions scientifiques. Merci aussi aux copines Pauline, Anna, Anne, merci d'être là, nos petits restos, pauses café et conversations téléphoniques à pas d'heures (décalage horaire non intégré avec Anne) m'ont aéré la tête et coupé de la thèse et du boulot.

RESUME

Les anticorps monoclonaux représentent aujourd'hui un outil de choix en thérapeutique et en diagnostic. Les anticorps thérapeutiques sont des biomédicaments en plein essor depuis les années 1970 et représentent 10% du marché des produits pharmaceutiques. Les anticorps monoclonaux sont utilisés dans divers domaines : en cancérologie, pour lutter contre les maladies auto-immunes ou en infectiologie. Le nombre des anticorps monoclonaux en développement ne cesse d'augmenter. Les premiers anticorps monoclonaux utilisés en thérapie étaient d'origine murine et leur administration à l'Homme est susceptible de déclencher des effets secondaires. De nouveaux anticorps visant à limiter voir faire disparaître ces effets indésirables tels que d'abord les anticorps chimériques, puis les anticorps humanisés et enfin les anticorps totalement humains ont été développés. Parmi ces anticorps, les anticorps totalement humains sont théoriquement « transparents » pour le système immunitaire. 9 anticorps totalement humains sont actuellement sur le marché et d'autres sont en cours de développement. Le phage display, les souris transgéniques et l'utilisation de lymphocytes B humains sont les trois stratégies mises en œuvre pour produire des anticorps totalement humains. La majorité des anticorps humains existant sur le marché sont issus du phage display et des souris transgéniques. L'utilisation des lymphocytes B humains, peu étudiée à cause d'un faible rendement et de problèmes de stabilité, a connu ces dernières années un regain d'intérêt grâce à l'immortalisation virale par le virus Epstein-Barr et à la découverte de myélomes humains. Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse a été la production d'anticorps monoclonaux humains à partir de lymphocytes B humains. Pour ce faire, deux approches basées sur l'immortalisation virale par le virus Epstein-Barr couplée ou non à une immortalisation cellulaire par des myélomes ont été mises en œuvre. La première approche utilise des lymphocytes B mémoires isolés de sang périphérique de donneurs infectés ou vaccinés. L'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB) a été utilisée comme modèle. La transformation des lymphocytes B mémoires par le virus Epstein-Barr a permis la génération de 6 lignées de lymphocytes B immortalisés produisant des IgGs anti-SEB. Après différentes tentatives d'immortalisation cellulaire avec des myélomes murins, l'immortalisation avec un hétéromyélome humain-murin HM a permis d'obtenir un hybridome, qui malheureusement perdu sa capacité de production d'IgGs anti-SEB. La deuxième approche implique une immunisation *in vitro* de lymphocytes B naïfs extraits de sang périphérique. Cette stratégie pourrait permettre la production d'anticorps humains contre

des antigènes pour lesquels il n'existe pas de donneurs infectés ou vaccinés. Deux modèles, le peptide N-terminal de la neurotoxine A de *Clostridium Botulinium A* (BoNT/A) et la protéine de fusion ZZTat101, comportant le domaine ZZ de *Staphylococcus aureus* lié covalamment à la protéine transactivatrice Tat du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1, ont été employés. Les monocytes, les lymphocytes B et lymphocytes T CD4 ont été isolés après déplétion des Natural Killer NK et utilisés pour mettre en place deux systèmes d'immunisation *in vitro* efficaces. Nous avons réussi à obtenir des IgMs dirigés contre la neurotoxine *Clostridium Botulinium A*, ainsi que des IgMs (et peut-être des IgGs) dirigés contre la protéine Tat. L'immortalisation par Epstein-Barr, nous a permis d'isoler 7 lignées de lymphocytes immortalisés sécrétant des anticorps IgMs anti-TBA-Nter humains. Malheureusement après l'immortalisation avec l'hétéromyélome humain-murin HM, aucun hybridome sécréteur d'anticorps dirigés contre *Clostridium Botulinium A* ou Tat n'a pu être obtenu. Ces résultats confirment les problèmes de rendement faible et de perte de capacité de sécrétion en anticorps rapportés par la littérature. L'immunisation *in vitro* produisant essentiellement des IgMs, la possible production d'IgGs après stimulation par la protéine ZZTat101 se révèle un résultat très intéressant. Nous avons montré que la production d'anticorps par ZZTat101 impliquait les 7 cystéines, la région 22-57 et la liaison aux héparanes sulfates de Tat. Les résultats obtenus avec ZZTat101 nécessitent d'être confirmés et approfondis. Il faudra évaluer la capacité de transfert de la production en anticorps de ZZTat101 à d'autres antigènes. L'ensemble de ces résultats fera de ZZTat101 un outil très intéressant pour l'immunisation *in vitro* et pour la vaccinologie.

Mots clés : anticorps thérapeutiques, anticorps humains, lymphocytes B, immortalisation, fusion, immunisation *in vitro*

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac = Anticorps	IL-4 = Interleukine 4
ADCC = Anticorps dependant cell cytotoxicity	kDa = kiloDalton
AMM = Autorisation de mise sur le marché	LB = Lymphocytes B
BCR = B Cell receptor	Leu-OMe = Méthyl ester de L-Leucine
BSA = albumine de sérum bovin	NK = Natural killer
CDC = Complement-dependent cytotoxicity	PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell, cellules mononucléaires circulant dans le sang
CDC = Center for disease control	PBMC NK = Peripheral Blood Mononuclear Cell, cellules mononucléaires circulant dans le sang sans NK (Natural Killer)
CDR= Complementary determining region	PBS = Phosphate buffer Saline
CMH = Complexe Majeur d'histocompatibilité	PE = Phycoerythrine
CPA = Cellule présentatrice d'antigène	PEG = Polyéthylène glycol
Da = Dalton	RPMI = Roswell Park Memorial Institute medium
EBV = Epstein-Barr virus	SCT = syndrome de choc toxique
EIA = Tampon de dilution des échantillons	SE = Entérotoxines staphylococciques
ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay	SEB = Entérotoxine B de <i>Staphylococcus aureus</i>
Fab = Fragment antigen binding	SRAS = Syndrome respiratoire aigu sévère
Fc = Fragment cristallisable	SVF = Sérum de veau foetal
FcRn = Neonatal Fc Receptor	TBA-Nter = Peptide N-terminal de <i>Clostridium Botulinium A</i>
FDA = Food and Drug Administration	TCR = T Cell receptor (récepteur des cellules T)
FITC = Fluoresceine Isothiocyanate	TLR = Toll like receptor
GM-CSF = Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	TT = Toxine tétanique
HACA = Human antichimeric antibody	VIH = Virus de l'immunodéficience humaine
HAHA = Human Anti-Human Antibodies	
HAMA= Human Anti-Mouse Antibodies	
HAT = Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine	
HM = Hétéromyélome humain-murin	
Ig = Immunoglobuline	
IL-2 = Interleukine 2	

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1 Définition, structure et synthèse des anticorps	2
1.1 Définition d'un anticorps	2
1.2 Structure d'un anticorps	2
1.2.1 Structure générale.....	2
1.2.2 Structure détaillée.....	3
1.3 Classes d'anticorps	4
1.3.1 Classes et sous classes d'immunoglobulines.....	4
1.3.2 Répartition et fonction des immunoglobulines.....	4
1.4 Organisation et réarrangements des gènes codant les immunoglobulines	6
1.4.1 Les gènes codant pour les Igs.....	6
1.4.2 Réarrangements des gènes	7
1.5 Expression du BCR et sélection des lymphocytes B dans la moelle osseuse	8
1.6 Modifications post-traductionnelles des anticorps : les glycosylations	10
2 Fonction biologique des anticorps	10
2.1 Fonction de reconnaissance : liaison à l'antigène	11
2.2 Fonctions effectrices : la cytotoxicité liée à l'anticorps	12
2.2.1 Cytotoxicité dépendante des cellules de l'immunité (ADCC)	12
2.2.2 Cytotoxicité dépendante du complément (CDC).....	12
3 Caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des anticorps	14
3.1 Affinité/Avidité	14
3.2 Demi-vie et biodistribution	15
4 Principales techniques de production des anticorps et leur utilisation	16
4.1 Anticorps polyclonaux	16
4.2 Anticorps monoclonaux murins	16
4.3 Anticorps monoclonaux de lapin	18
4.4 Les diverses utilisations des anticorps	18
4.4.1 Anticorps utilisés en diagnostic.....	18
4.4.2 Anticorps utilisés en thérapie	20
5 Les types d'anticorps thérapeutiques	21
5.1 Les anticorps chimériques	22
5.2 Les anticorps humanisés	22
5.3 Les anticorps totalement humains	23
5.3.1 Le Phage display	25
5.3.2 Les souris transgéniques.....	26
5.3.3 L'utilisation des lymphocytes B humains	27

5.4	Les anticorps optimisés	29
5.4.1	Amélioration des propriétés de fixation à l'antigène.....	30
5.4.2	Amélioration des propriétés effectrices.....	30
5.4.3	Amélioration de la demi-vie.....	33
6	<i>Les anticorps thérapeutiques sur le marché</i>	34
6.1	Les différents anticorps monoclonaux sur le marché en 2012	34
6.1.1	Bilan des types d'anticorps sur le marché	34
6.1.2	Bilan économique des anticorps sur le marché	34
6.2	Les différents formats d'anticorps monoclonaux thérapeutiques	35
6.3	Cibles et mode d'action des anticorps	36
6.3.1	Les anticorps neutralisant un antigène soluble	37
6.3.2	Les anticorps liant un antigène membranaire	37
6.4	Limitations des anticorps thérapeutiques	38
6.4.1	Les systèmes de production des anticorps et leur coût	38
6.4.2	Effets indésirables	40
	<i>OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE</i>	41
	<i>MATERIELS ET METHODES</i>	44
1	<i>Matériels utilisés</i>	45
1.1	Peptide N-terminal de la BoNT/A : TBA-Nter (2 kDa).....	45
1.2	Entérotoxine B de <i>Staphylococcus aureus</i> (SEB)	45
1.3	Tat, ses dérivés et les protéines de fusion ZZTat101	46
1.3.1	Tat et peptides Tat.....	46
1.3.2	Les protéines de fusion ZZTat101.....	47
2	<i>Culture cellulaire</i>	48
2.1	Comptage des cellules	48
2.2	Culture des différentes souches.....	48
2.3	Conservation des cellules	49
2.3.1	Congélation à -196°C.....	49
2.3.2	Décongélation à -196°C	49
3	<i>Purification des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs)</i>	49
3.1	Origine du matériel	50
3.2	Purification des PBMCs.....	50
4	<i>Préparation des cellules</i>	51
4.1	Tampon utilisé	51
4.2	Préparation des Monocytes	51
4.2.1	Purification des monocytes	51
4.2.2	Contrôle de la pureté des monocytes.....	53
4.2.3	Mise en culture des monocytes	53
4.3	Elimination des Natural Killer de la fraction négative en monocytes	53

4.3.1	Elimination des NK.....	53
4.3.2	Contrôle de l'élimination des NK	54
4.3.3	Mise en culture.....	54
4.4	Lymphocytes B	54
4.4.1	Purification des lymphocytes B.....	54
4.4.2	Contrôle de la pureté en lymphocytes B.....	55
4.4.3	Mise en culture.....	55
4.5	Elimination des Natural Killer à partir des PBMCs	56
4.5.1	Elimination des NK.....	56
4.5.2	Contrôle de l'élimination des NK	56
4.5.3	Mise en culture.....	56
4.6	Lymphocytes B mémoires.....	56
4.6.1	Purification des lymphocytes B mémoires	56
4.6.2	Mise en culture.....	57
5	<i>Immunsation in vitro</i>	57
5.1	<i>Immunsation in vitro</i> contre le peptide N-terminal de la toxine botulinique	
A (BoNT/A): TBA-Nter.....		58
5.1.1	Coculture Cellules dendritiques/PBMCs dépourvues de monocytes et de NK	58
5.1.2	Utilisation de PBMCs après élimination des cellules « Natural Killer ».....	60
5.2	<i>Immunsation in vitro</i> contre la protéine Tat101 du virus VIH-1	63
5.2.1	Rôle des composants de ZZTat101 : immunisation <i>in vitro</i> par ZZTat101, ZZ et Tat101.....	63
5.2.2	Mécanisme d'action de ZZTat101 : immunisation <i>in vitro</i> par ZZTat101 et plusieurs formes mutantes	64
5.3	Cytométrie en flux.....	65
5.3.1	Tampon utilisé.....	65
5.3.2	Principe	65
5.3.3	Marquage	65
6	<i>Immortalisation</i>.....	68
6.1	Production des virus Epstein-Barr (EBV)	68
6.2	Test qualité des Transfokits utilisés.....	68
6.3	Immortalisation des cellules par les virus EBV (Transfokit)	69
6.4	Culture des lignées immortalisées.....	69
7	<i>Fusion</i>.....	70
7.1	Les préparations préliminaires à la fusion.....	70
7.1.1	Préparation des cellules nourricières	70
7.2	Obtention d'hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques à partir des cellules immortalisées par EBV	70
7.3	Obtention des hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques à partir de lymphocytes B sanguins	71
7.4	Obtention des hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques à partir des cellules issus de l'immunsation <i>in vitro</i>	72
8	<i>Les dosages immunologiques</i>	72

8.1	Les préparations préliminaires au dosage	72
8.1.1	Les tampons utilisés	72
8.1.2	Anticorps utilisés.....	73
8.1.3	Préparation des traceurs couplés à l'ACHé	73
8.1.4	Mesure de l'activité AChE.....	73
8.1.5	Adsorption passive sur plaques de microtitration.....	74
8.1.6	Couplage de protéines à la biotine	74
8.2	Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A.....	74
8.2.1	Dosage ELISA des plasmas de donneurs de sang	74
8.2.2	Criblage des anticorps monoclonaux produits dans les surnageants de culture des immunisations <i>in vitro</i> et des hybridomes	75
8.3	Les dosages immunologiques utilisant la SEB	75
8.3.1	Dosage des IgGs anti-SEB dans les plasmas.....	75
8.3.2	Criblage des anticorps monoclonaux produits dans les surnageants de culture des immortalisations et des hybridomes.....	75
8.4	Les dosages immunologiques des anticorps anti-Tat101	76
8.4.1	Dosage ELISA des plasmas de donneurs de sang	76
8.4.2	Criblage des anticorps monoclonaux produits dans les surnageants de culture des immunisations <i>in vitro</i> et des hybridomes	76
I^{ère} Partie :	77
<i>PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX HUMAINS A PARTIR DE LYMPHOCYTES B HUMAINS DE DONNEURS INFECTES OU VACCINES PAR IMMORTALISATION VIRALE ET FUSION CELLULAIRE.....</i>		
	INTRODUCTION.....	78
1	<i>Production d'anticorps par les lymphocytes B humains</i>	79
1.1	Le virus d'Epstein-Barr	79
1.2	Les lymphocytes B mémoires	80
2	<i>Modèle d'étude : Entérotoxine B de Staphylococcus aureus (SEB).....</i>	82
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	82
2.1.1	Classification des entérotoxines staphylococciques (SEs).....	83
2.1.2	Mode d'action des entérotoxines staphylococciques (SEs).....	84
2.2	Entérotoxine B de <i>Staphylococcus aureus</i>	85
2.2.1	Structure	85
2.2.2	Voies d'expositions, toxicité et effet sur la santé	86
2.2.3	Mode d'action	87
2.2.4	Activité émétique	88
2.2.5	Mise en évidence de la toxine SEB	89
2.2.6	La SEB en tant qu'arme biologique	89
<i>RESULTATS ET DISCUSSION.....</i>		
1	<i>Méthodologie utilisée</i>	92
2	<i>Sélection des donneurs sanguins et des lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB.....</i>	93

2.1	Sélection du donneur de sang.....	93
2.2	Purification des lymphocytes B mémoires du donneur 1.....	95
3	<i>Immortalisation des lymphocytes B mémoires par le virus Epstein-Barr (EBV).....</i>	<i>96</i>
3.1	Test de la qualité de production des virus EBV.....	96
3.2	Immortalisation des lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB.....	97
4	<i>Fusion des lymphocytes B mémoires immortalisés par le virus Epstein-Barr (EBV)...</i>	<i>99</i>
4.1	Décongélation des puits immortalisés.....	99
4.2	Préparation de la fusion.....	103
4.2.1	Mise au point de la concentration d'ouabaïne.....	103
4.2.2	Vérification de l'absence d'effet de l'Hypoxantine Aminoptérine Thymidine (HAT) sur les lymphocytes B immortalisés.....	105
4.2.3	Vérification de la mortalité des myélomes sous HAT et ouabaïne.....	106
4.3	Fusion des LB immortalisés par EBV (puits 2B5) avec différents myélomes.....	106
4.4	Fusion des lymphocytes B sanguins avec l'hétéromyélome HM.....	108
4.5	Décongélation des trois puits d'immortalisation 1C2, 2C10, 1E3.....	110
4.6	Fusion des puits d'immortalisation 1C2, 2C10 avec HM.....	111
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	113
	2^{ème} Partie :	116
	PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX HUMAINS A PARTIR DE LYMPHOCYTES B HUMAINS DE DONNEURS NAIFS PAR IMMUNISATION IN VITRO.....	116
1	<i>La réponse anticorps in vivo.....</i>	<i>117</i>
1.1	La réponse anticorps T-dépendante.....	117
1.2	La réponse anticorps T-indépendante.....	119
2	<i>L'immunisation in vitro.....</i>	<i>119</i>
	PREMIER MODELE D'ETUDE.....	122
	<i>Clostridium botulinum A (BoNT/A).....</i>	122
	<i>Mise en place du protocole d'immunisation in vitro.....</i>	122
	INTRODUCTION	123
1	<i>Clostridium botulinum et ses toxines</i>	<i>124</i>
1.1	Clostridium botulinum.....	124
1.2	Les toxines botuliques produites par Clostridium botulinum	125
1.2.1	Les différents types	125
1.2.2	Leur synthèse	125
1.2.3	Mode d'action des toxines botuliques	126
1.3	Les différents modes de contamination des toxines botuliques.....	126

1.4	Les symptômes de l'intoxication	127
1.5	Diagnostic.....	127
1.6	Traitements contre le botulisme.....	128
1.7	Les différentes utilisations des toxines botuliques.....	129
1.7.1	Un outil thérapeutique.....	129
1.7.2	Une arme potentielle du bioterrorisme.....	129
RESULTATS ET DISCUSSION		131
1	<i>Vérification de l'absence d'anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma du donneur utilisé</i> 132	
2	<i>Mise au point d'un protocole d'immunisation in vitro efficace contre la TBA-Nter : comparaison de deux protocoles.....</i>	134
2.1	Protocole 1 : Elimination des lymphocytes Natural Killer (NK) et activation par des cytokines et l'antigène.....	135
2.1.1	Méthodologie utilisée.....	135
2.1.2	Vérification de l'élimination des NK, de la présence lymphocytes B, T et monocytes et mesure de l'activation de la réponse immunitaire	136
2.1.3	Dosages des anticorps anti-TBA-Nter.....	140
2.2	Protocole 2 : Activation séparée des monocytes et des lymphocytes.....	142
2.2.1	Méthodologie utilisée.....	142
2.2.2	Vérification de la présence des lymphocytes B et T et de la maturation des monocytes en cellules dendritiques.....	143
2.2.3	Dosage des anticorps anti-TBA-Nter	146
2.3	Immortalisation	148
3	<i>Production d'anticorps monoclonaux humains anti-TBA-Nter à partir du protocole comportant l'élimination des NK.....</i>	148
3.1	Vérification de l'absence d'anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma du pool de 5 donneurs utilisé.....	149
3.2	Vérification de l'absence des cellules NK, de la présence lymphocytes B, T et monocytes et mesure de l'activation de la réponse immunitaire.....	151
3.3	Dosage des anticorps anti-TBA-Nter	151
3.4	Immortalisation et fusion.....	154
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		155
DEUXIEME MODELE D'ETUDE		158
<i>La protéine transactivatrice Tat du virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1)</i>		158
INTRODUCTION		159
1	<i>La protéine transactivatrice Tat du virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1)</i> 160	
1.1	Rôle de Tat dans l'infection au VIH-1.....	160

1.2	Structure et organisation de Tat	161
1.3	Propriété autoadjuvante de Tat	162
	RESULTATS ET DISCUSSION	164
1	<i>Vérification de l'absence d'anticorps anti-Tat dans le plasma des pools de donneurs utilisés</i>	165
2	<i>Vérification de l'élimination des lymphocytes NK et de la pureté des lymphocytes B utilisés pour l'immunisation in vitro</i>	167
3	<i>Expérience préliminaire : vérification du système d'immunisation in vitro sur ZZTat101.</i>	169
4	<i>Immunisation in vitro avec ZZTat, ZZ, Tat ou un mélange ZZ+Tat</i>	171
5	<i>Détermination de la région de ZZTat impliqué dans la réponse humorale in vitro</i>	173
5.1	Rôle de la liaison avec les héparanes sulfates.....	173
5.2	Rôle des cystéines.....	175
6	<i>Production d'anticorps anti-Tat par immortalisation avec un partenaire cellulaire HM</i> 177	
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	178
	ARTICLE	181
	CONCLUSION GENERALE	206
	BIBLIOGRAPHIE	210

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure schématique d'une immunoglobuline..	3
Figure 2. Réponses anticorps primaire et secondaire.	5
Figure 3. Organisation des gènes des immunoglobulines chez l'Homme.	6
Figure 4. Diversité combinatoire des gènes d'immunoglobulines.	7
Figure 5. Maturation des lymphocytes B et production des anticorps.	9
Figure 6. Mécanismes principaux d'action des anticorps.	11
Figure 7. Les fonctions effectrices de l'anticorps.	13
Figure 8. Activités régulatrices des complexes immuns.	14
Figure 9. Production des anticorps monoclonaux d'après Köhler et Milstein.	17
Figure 10. Evolution des différents types d'anticorps thérapeutiques.	21
Figure 11. Les différents formats d'anticorps thérapeutiques sur le marché et en développement (liste non exhaustive).	36
Figure 12. Les différents effets biologiques des anticorps thérapeutiques..	38
Figure 13. Purification des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs).	50
Figure 14. Principe de la purification des monocytes par tri magnétique. Extrait de chez Miltenyi Biotec.	52
Figure 15. Principe de l'immunisation <i>in vitro</i> par coculture de cellules.	60
Figure 16. Principe de l'immunisation <i>in vitro</i> par activation des cellules dendritiques dans les PBMCs sans NK.	62
Figure 17. Production d'anticorps humains à partir de patients infectés.	81
Figure 18. Illustration de <i>Staphylococcus aureus</i> en grappes.	82
Figure 19. Expression de facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> .	83
Figure 20. Structure de la SEB avec la région variable de liaison aux lymphocytes T.	86
Figure 21. Activation spécifique et non spécifique des cellules T.	88
Figure 22. Protocole de production d'IgGs anti-SEB à partir de lymphocytes B mémoires d'un donneur immunisé contre la SEB.	92
Figure 23. Dosage des anticorps IgGs anti-SEB dans le plasma de différents donneurs.	94
Figure 24. Immortalisation. PBMCs immortalisées avec le virus EBV produits au laboratoire (A) ou par le laboratoire de référence (B).	96

Figure 25. Dosage des puits d'immortalisation de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB.	97
Figure 26. Dosage des puits d'immortalisation décongelés de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB. 4 jours après décongélation. T=30 minutes.....	100
Figure 27. Dosage des puits d'immortalisation décongelés de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB.	102
Figure 28. Gamme d'ouabaïne.	104
Figure 29. Effet HAT sur des lymphocytes B immortalisés par EBV.	105
Figure 30. Résultats de la fusion.	108
Figure 31. Hybridomes issus de la fusion des lymphocytes B sanguins avec l'hétéromyélome HM.	109
Figure 32. Dosage surnageants de décongélation de puits immortalisés de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB.	110
Figure 33. Hybridomes issus de la fusion des lymphocytes B immortalisés avec l'hétéromyélome HM. Image prise 7 jours après fusion.....	111
Figure 34. <i>Clostridium botulinum</i>	124
Figure 35. Dosage des anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma de donneur individuel.	133
Figure 36. Protocole d'immunisation <i>in vitro</i> par élimination des NK et activation cellulaire simultanée.....	136
Figure 37. Graphes de cytométrie. Vérification de l'élimination des NK, de la présence des cellules nécessaires lymphocytes B, T, monocytes.....	137
Figure 38. Graphes de cytométrie. Mesure de l'activation de la réponse immunitaire.....	138
Figure 39. Photos de microscopie d'un puits d'immunisation <i>in vitro</i> à J0 et à J7. Microscope optique.....	139
Figure 40. Dosage des IgGs et des IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation <i>in vitro</i> /élimination des NK à J7.	141
Figure 41. Graphes de cytométrie. Vérification de la présence des lymphocytes B et T.	143
Figure 42. Graphes de cytométrie. Vérification de la maturation des monocytes en cellules dendritiques 6 jours après mise en culture sur plaque.....	144
Figure 43. Photos de microscopie d'un puits d'immunisation <i>in vitro</i> à J0, J7 (J+1 jour après coculture) et J13 (J+7 jours après coculture). Microscope optique.....	145
Figure 44. Dosage des IgGs et des IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation <i>in vitro</i> /coculture après 7 jours.....	147

Figure 45. Dosage des anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma d'un pool de donneurs.	150
Figure 46. Dosage des IgGs et IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation <i>in vitro</i> après 7 jours.	152
Figure 47. Dosage des IgGs et IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation <i>in vitro</i> après 12 jours.	153
Figure 48. Structure et organisation de Tat101.	161
Figure 49. Dosage des IgGs (A) et IgMs (B) anti-Tat101 dans le plasma d'un pool de donneurs.	166
Figure 50. Graphes de cytométrie. Vérification de l'élimination des NK et de la pureté des lymphocytes B utilisés pour l'immunisation <i>in vitro</i>	168
Figure 51. Dosage des IgGs (A) et des IgMs (B) anti-peptides de Tat dans les surnageants de culture à J7.	170
Figure 52. Dosage des IgMs spécifiques de Tat après stimulation par ZZTat, de chacun de ces composants ZZ et Tat.	172
Figure 53. Dosage des IgMs après stimulation par ZZTat101 et ZZTat101Ø sur deux expériences indépendantes.	174
Figure 54. Dosage des IgMs après stimulation par ZZTat101 et des formes ZZTat22-57, ZZTat22-57 _{C(22-37)S}	176

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Anticorps monoclonaux humains approuvés ou sous étude d'approbation par la FDA.....	24
Tableau 2. Récapitulatif de l'ensemble des anticorps marqués utilisés pour les expériences de cytométrie en flux.....	67
Tableau 3. Effet HAT et/ou ouabaïne sur les myélomes.....	106
Tableau 4. Bilan des différentes fusions effectuées sur le puits de lymphocytes B immortalisés 2B5.	107
Tableau 5. Efficacité de fusion selon les ratios.....	109
Tableau 6. Action paralysante des différents sérotypes des BoNTs..	125

INTRODUCTION

1 Définition, structure et synthèse des anticorps

1.1 Définition d'un anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines, sont des glycoprotéines membranaires ou solubles, produites par des cellules spécifiques, les plasmocytes. Les plasmocytes dérivent des lymphocytes B. Les anticorps sont présents en permanence dans le corps et circulent dans les principaux liquides de l'organisme : le sang et la lymphe. Ils sont l'un des premiers acteurs de la réponse immunitaire de type humorale. Leur production est induite par la présence de molécules ou micro-organismes reconnus comme du non-soi par l'organisme. Ces molécules ou micro-organismes peuvent être de nature diverse : bactéries, virus ou parasite, sucres, lipides, peptides, composés chimiques. Les anticorps en se fixant sur ces structures permettent leur prise en charge par le système immunitaire afin de les neutraliser et/ou de les éliminer.

1.2 Structure d'un anticorps

1.2.1 Structure générale

La structure des anticorps est dite en forme de « Y » (Schroeder and Cavacini, 2010) (Figure 1). Cette structure de base est constituée de quatre chaînes d'acides aminés : deux chaînes lourdes (H pour **H**heavy) et deux chaînes légères (L pour **L**ight) reliées entre elles par des ponts disulfures. La masse moléculaire de la chaîne lourde étant d'environ 55 kDa et celle de la chaîne légère d'environ 25 kDa, la masse moléculaire de cette structure d'immunoglobuline est donc d'environ 150 kDa.

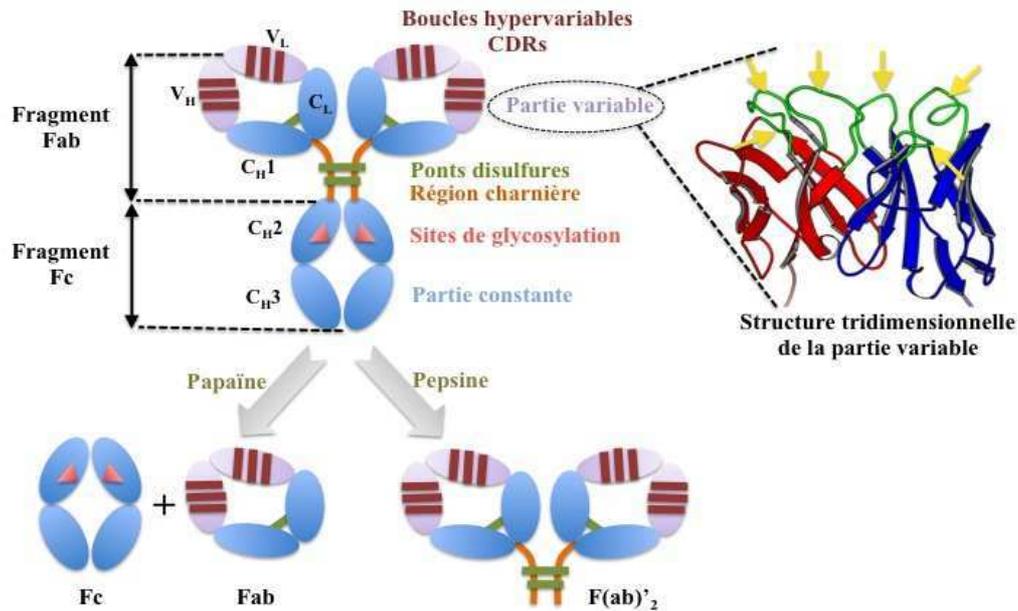


Figure 1. Structure schématique d'une immunoglobuline.

(<http://xray.bmc.uu.se/lars/Practicals/Immun/antibody.html>); les six CDRs représentés en vert sont localisés par des flèche jaunes ; rouge = VL ; Bleu = VH. La partie inférieure du schéma présente les fragments obtenus à la suite de digestions enzymatiques à la pepsine ou à la papaïne.

1.2.2 Structure détaillée

Les chaînes constituant l'anticorps sont divisées en deux régions : une région variable et une région constante. Chaque région est subdivisée en domaines de 110 à 130 acides aminés. La région variable V est constituée de deux domaines : un domaine V_L et un domaine V_H et est située dans la partie N-terminale de l'anticorps. Elle est impliquée dans la reconnaissance de l'antigène. La région constante C est constituée de quatre domaines C_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} et est localisée dans la partie C-terminale de l'anticorps (Figure 1).

La partie variable comporte six régions hypervariables également appelées CDR (**C**omplementarity **D**etermining **R**egion), constituée chacune de 5 à 15 acides aminés et formant des boucles dans la région variable (Figure 1). Des liaisons non covalentes ou faibles entre les domaines V_L et V_H permettent de rapprocher les six boucles pour former un motif constituant le paratope. Le paratope est la région de l'anticorps qui permet de lier spécifiquement une région d'un antigène donné, l'épitope. Les différents CDR pouvant être plus ou moins impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Chaque anticorps possède donc une région variable qui lui est propre et qui lie un épitope donné d'un antigène. En fonction de cette spécificité de liaison, un anticorps peut se lier à un seul antigène ou à plusieurs antigènes possédant un épitope de structure proche.

Les régions N-terminales V_H-C_{H1} et V_L-C_L peuvent être séparées du reste de l'anticorps par digestion enzymatique à la papaine, les fragments obtenus portent alors le nom de fragments Fab (**F**ragment **a**ntigen **b**inding). Le fragment Fc (**F**ragment **c**ristallisable) résiduel est responsable des fonctions effectrices de l'anticorps (activation réponse immunitaire, complexe immun, cytotoxicité, ...) (Rousseaux et al., 1986). La pepsine est également capable de digérer l'anticorps entre les ponts disulfures et le fragment Fc. Cette digestion enzymatique permet de libérer le fragment $F(ab')_2$ (Fab plus la région charnière) (Lachmann, 1971) (Figure 1). La région charnière, composée de nombreux résidus proline, thréonine et sérine, est la région située entre les fragments Fab et Fc et permet des mouvements latéraux et rotationnels allant jusqu'à 180° . Cette flexibilité de la région charnière apporte à l'anticorps la capacité d'interagir avec l'antigène au niveau de son épitope dans différents plans de l'espace (Yguerabide et al., 1970).

1.3 Classes d'anticorps

1.3.1 Classes et sous classes d'immunoglobulines

Les anticorps humains sont répartis en cinq classes ou encore en cinq isotypes : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Chaque catégorie d'anticorps est caractérisée par sa chaîne lourde. IgG : gamma, IgM : mu, IgA : alpha, IgD : delta et IgE : epsilon (van Loghem and Litwin, 1972). Chaque chaîne lourde est associée à une chaîne légère de sous classe kappa ou lambda (Bengtén et al., 2000). Pour les IgG et les IgA, il existe respectivement 4 (IgG1 à 4) et 2 (IgA1, IgA2) sous-classes dues à un polymorphisme dans les régions conservées de la chaîne lourde. La classe et la sous-classe conditionnent la structure et la fonction de l'anticorps dans la réponse immunitaire. Les anticorps peuvent être membranaires ou circulants.

1.3.2 Répartition et fonction des immunoglobulines

- Les IgMs se retrouvent en faible quantité dans le sang. Ce sont les premières Igs produites suite à l'entrée d'un « non-soi » dans l'organisme. Elles sont responsables de la réponse immunitaire primaire. Elles sont exprimées à la surface des lymphocytes B, sous forme de BCR (**B** Cell **R**eceptor) ou peuvent être circulantes. Elles sont pentamériques, cinq structures en « Y » reliées par une région J.

- Les IgGs de forme monomérique (une structure en « Y ») interviennent principalement dans les réponses immunitaires secondaires succédant à la réponse anticorps primaire (Figure 2). Elles induisent la neutralisation et la destruction des « non-soi » pénétrant l'organisme par activation du complément, des phagocytes ou des cellules cytotoxiques. A cause de leur affinité, de leur spécificité et surtout de leur durée de vie, ce sont les Igs les plus utilisés en tant qu'anticorps à visée thérapeutique (paragraphe 6 Les anticorps thérapeutiques sur le marché, Introduction).

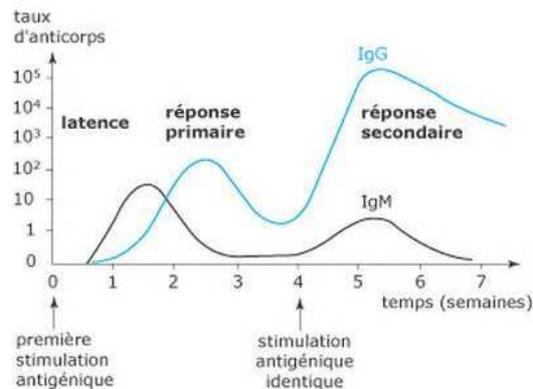


Figure 2. Réponses anticorps primaire et secondaire (Wikipédia).

- Les IgA sont présents dans le sang, mais se retrouvent majoritairement dans les fluides corporels (salive, lait, larmes, sécrétions nasales, génitales, mucus bronchique, digestif). Les IgA sont multimériques et assurent la protection au niveau des points d'entrée de l'organisme.

- Les IgD sont essentiellement exprimées à la membrane des lymphocytes B matures, mais peuvent être également circulantes mais en faible quantité. Les IgD ont la fonction de récepteur à l'antigène (BCR) (Chen and Cerutti, 2011), mais leur rôle n'est pas très bien connu.

- Les IgE sont impliquées dans les phénomènes allergiques et dans l'immunité anti-parasitaire (Stone et al., 2010). Elles se retrouvent sous forme monomérique et sont peu abondantes dans le sang.

1.4 Organisation et réarrangements des gènes codant les immunoglobulines

1.4.1 Les gènes codant pour les Igs

Les Igs sont formées de chaînes lourdes (H) et de chaînes légères (L). Chaque chaîne comporte une région variable et une région constante (Figure 1, paragraphe 1.1. Structure générale). Les gènes codants pour les chaînes lourdes et les gènes codants pour les chaînes légères des Igs sont indépendants et localisés sur des chromosomes différents. En effet, chez l'Homme les gènes codant pour les chaînes lourdes sont localisés sur le chromosome 14 et les gènes codant pour les chaînes légères sur les chromosomes 2 pour les chaînes légères κ et sur le chromosome 22 pour les chaînes légères λ .

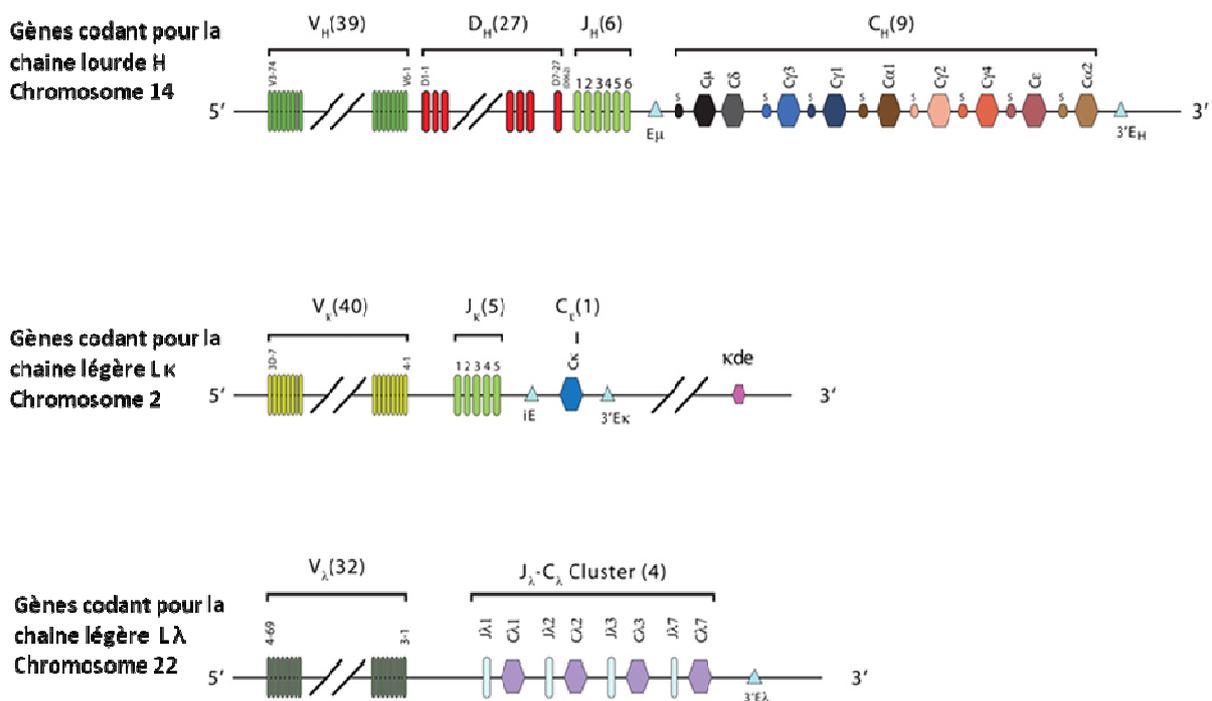


Figure 3. Organisation des gènes des immunoglobulines chez l'Homme.

H : heavy ; L légère, κ kappa, λ lambda. Les chiffres indiqués entre parenthèses correspondent au nombre de gènes fonctionnels. D'après (Schroeder and Cavacini, 2010).

Les régions variable et constante des Igs sont également codées par des gènes indépendants : le gène C pour les parties constantes, et différents fragments de gènes pour la partie variable. Deux types de fragments V et J pour les gènes codant pour la partie variable des chaînes légères et trois types de fragments V, D et J pour les gènes codant pour la partie variable des chaînes lourdes. Les immunoglobulines sont le produit de la combinaison de l'ensemble de ces gènes. Cette combinaison se fait au hasard et explique la diversité du répertoire des Igs. (Figure 3 et Figure 4). En effet, les chaînes légères sont issues de l'association V-J-C tandis que les chaînes lourdes associent les gènes V-D-J-C (Dudley et al., 2005).

1.4.2 Réarrangements des gènes

Le système immunitaire est capable de produire un nombre important d'immunoglobulines différentes permettant ainsi la protection contre des antigènes variés, jamais rencontré par l'hôte. La diversité des anticorps produits s'explique d'une part par le grand nombre de gènes codant pour les Igs et d'autre part par le nombre important de combinaisons possible, entre les différents gènes et les différents fragments de gènes variables. De plus, lors des associations des différents gènes des réappariements ou mutations peuvent survenir. Ce phénomène explique à nouveau la grande diversité des anticorps pouvant exister dans l'organisme. Ces mutations interviennent essentiellement au niveau des fragments des gènes variables V, D et J.

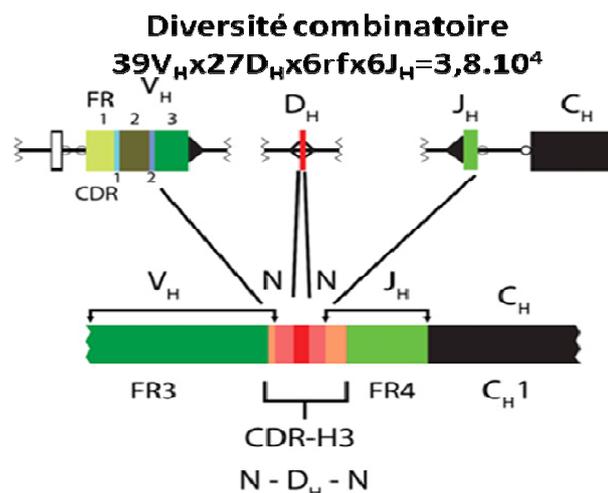


Figure 4. Diversité combinatoire des gènes d'immunoglobulines.

VDJ=gènes codant pour la partie variable des chaînes lourdes, VJ=gènes codant pour la partie variable des chaînes légères, C=gènes codant pour la région constante. D'après (Schroeder and Cavacini, 2010).

1.5 Expression du BCR (B Cell Receptor) et sélection des lymphocytes B dans la moelle osseuse

Les lymphocytes B prennent naissance dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B actifs quittent la moelle osseuse et circulent dans l'organisme via le sang et la lymphe. Néanmoins avant d'être actifs, les lymphocytes B traversent différents stades de maturation (stade pro-B, stade pré-B, stade B immature, stade B mature naïfs) au cours desquels ils acquièrent une immunoglobuline de surface spécifique, le BCR (**B Cell Receptor**). Le BCR est un récepteur membranaire caractéristique des lymphocytes B, qui leur procure la propriété de reconnaître directement et spécifiquement des antigènes. Les BCR s'acquièrent dans la moelle osseuse au cours de la différenciation des lymphocytes B. Les lymphocytes B qui reconnaissent le soi sont éliminés dans la moelle osseuse par un mécanisme de sélection négative. Cette première différenciation des lymphocytes B est indépendante de l'antigène et se déroule suivant quatre stades :

- **Progéniteur B ou pro-B**, ce stade correspond aux réarrangements des gènes codant pour les chaînes lourdes des Igs. Deux enzymes, l'enzyme de recombinaison (RAG1/2) et la TdT (Terminal deoxyribonucleotidyl Transférase) sont impliquées dans le phénomène de réappariement des chaînes lourdes. RAG est responsable de l'appariement des chaînes lourdes et TdT est responsable de l'ajout de nucléotides aux jonctions V D J assurant ainsi la diversité des chaînes lourdes (Benedict et al., 2000).
- **Précurseur B ou pré-B**, ce stade correspond à un stade de prolifération avec des réarrangements des gènes codant pour les chaînes légères des Igs.
- **B immature**, ce stade correspond à l'expression à la surface de la cellule d'une IgM et IgD formant un BCR. C'est à ce stade que se fait la sélection négative des lymphocytes B reconnaissant le soi. Au cours de ce processus les lymphocytes B qui reconnaissent un ligand endogène réarrangent les gènes codant pour les domaines variables afin de modifier leur BCR. Les cellules dont le BCR continue à être réactif au soi sont éliminées par apoptose, les autres quittent la moelle et poursuivent leur différenciation.
- **B mature**, ce stade est le stade où les lymphocytes B sont naïfs, mais circulants. Leur demi-vie en absence de rencontre avec l'antigène spécifique n'est que de 3 jours. S'ils rencontrent un antigène spécifique de leur partie variable la différenciation dépendante de l'antigène commence.

Les lymphocytes B activés par un antigène étranger reçoivent des signaux de survie, prolifèrent et subissent des phénomènes de commutation de classe (ou switch isotypique) et d'hypermutation somatique permettant d'une part la synthèse de tous les isotypes d'anticorps et d'autre part l'amélioration de l'affinité de l'anticorps pour l'antigène (Muramatsu et al., 2000). Les lymphocytes T CD4+ sont nécessaires. En effet, ils génèrent un environnement riche en cytokines responsable de la synthèse d'isotypes d'anticorps adaptés à l'antigène. A la suite de ces interactions, les lymphocytes B prolifèrent et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en lymphocytes B mémoires.

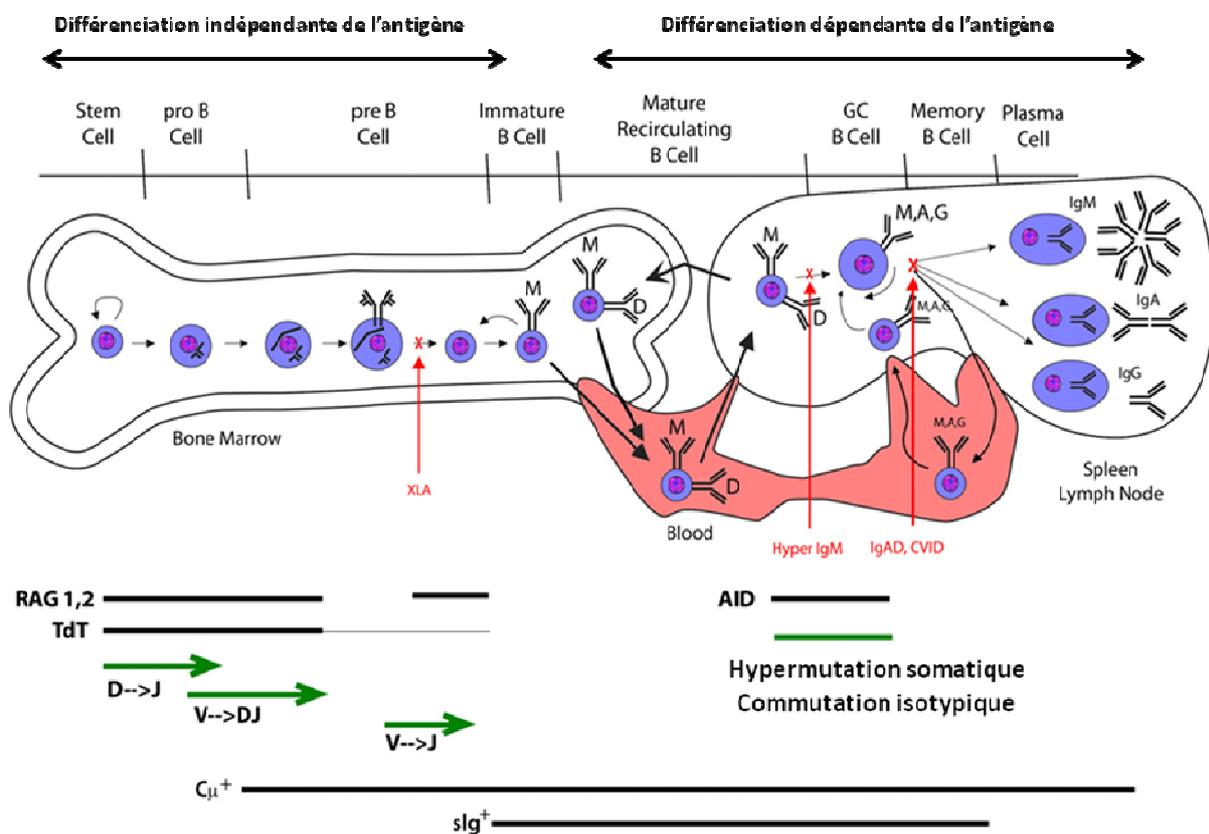


Figure 5. Maturation des lymphocytes B et production des anticorps.

La maturation et la différenciation des lymphocytes B se déroulent dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B naïfs migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) à la rencontre de leur antigène spécifique. A la rencontre avec un antigène, une seconde différenciation débute dépendante de l'antigène. Au cours de leur maturation, les lymphocytes B subissent des étapes de réarrangements géniques nécessaires à la production des anticorps et à l'élaboration d'un répertoire immunitaire diversifié. Cμ⁺:cytoplasmic μ protein, XLA : X-linked agammaglobulinemia Hyper IgM : hyper-IgM syndrome, IgAD : selective IgA deficiency, CVID : common variable immune deficiency. D'après (Schroeder and Cavacini, 2010).

1.6 Modifications post-traductionnelles des anticorps : les glycosylations

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines. Elles comportent des résidus glucidiques associés au niveau du fragment Fc. Les glycosylations au niveau du Fc jouent un rôle dans la stabilité et la fonction de l'anticorps (Arnold et al., 2007). Le nombre et la localisation des glycosylations varient en fonction de l'isotype de l'anticorps. Par exemple, les IgGs présentent deux N-glycosylations au niveau des domaines C_{H2}, sur l'asparagine 297 (Asn297) qui jouent un rôle dans l'orientation du domaine C_{H2} et donc dans l'interaction du Fc avec ses récepteurs présents à la surface des cellules effectrices. Cette glycosylation intervient également dans la stabilité des IgGs. Les résidus glucidiques du Fc des IgA et IgE semblent eux moins déterminants. Le type de glycosylation joue donc un rôle sur les fonctions effectrices *in vivo* de l'anticorps en modulant l'affinité du Fc pour son récepteur. Le motif oligosaccharidique de base des immunoglobulines comprend un heptamère bi antennaire, composée de N-acétylglucosamine et de mannose. Ce motif conservé peut être modifié par l'ajout d'un nombre variable de résidus de fucoses à sa base, de galactoses ou d'acides sialiques à ses extrémités. Ainsi, plus de 30 motifs oligosaccharidiques différents peuvent être produits à partir de la structure heptamérique de base.

2 Fonction biologique des anticorps

La fonction biologique des anticorps est de participer à la réponse immunitaire en neutralisant et/ou en éliminant les agents étrangers : bactéries, virus, parasites ou autres composés étrangers à l'organisme. Les anticorps représentent la réponse humorale de l'organisme contre les antigènes et peuvent activer la réponse cellulaire ou cytotoxique. Les antigènes présentent généralement de nombreux épitopes et sont donc reconnus par un large nombre d'anticorps présents sur les lymphocytes B. Une fois activés et différenciés, ces lymphocytes B déclenchent une réponse de type polyclonale. Plusieurs anticorps dirigés contre plusieurs épitopes d'un même antigène seront sécrétés en même temps.

2.1 Fonction de reconnaissance : liaison à l'antigène

Une fois l'anticorps synthétisé, il sera capable de lier spécifiquement l'épitope donc l'antigène contre lequel il est dirigé. La liaison de l'anticorps à son antigène représente le mécanisme central de la réponse anticorps. Cette interaction paratope/épitope, impliquant 6 à 20 acides aminés, met en jeu des liaisons non covalentes de faible énergie (interactions hydrophobes, forces de Van der Waals, forces électrostatiques et/ou liaison hydrogène) et est réversible (Mariuzza et al., 1987; Mian et al., 1991). La nature de l'antigène peut être très variée (sucres, lipides, peptides, composés chimiques, ...). La spécificité de la liaison de l'anticorps à son antigène n'est pas absolue et dans de nombreux cas, du fait de l'existence de séquences très proches ou de structures moléculaires similaires pour différentes molécules antigéniques, les anticorps sont capables de reconnaître plusieurs molécules dans un phénomène dit de "réactions croisées".

La fixation de l'anticorps à l'antigène peut avoir pour rôle de bloquer son activité biologique, c'est le cas lors de la neutralisation d'antigène soluble (toxines par exemple), mais peut aussi avoir un rôle indirect en activant les fonctions effectrices de l'anticorps via la cytotoxicité.

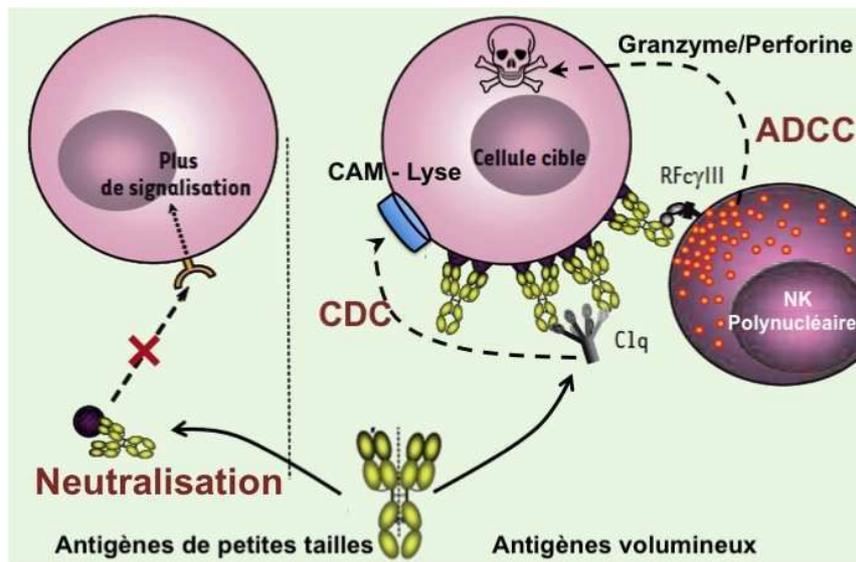


Figure 6. Mécanismes principaux d'action des anticorps.

Les anticorps peuvent éliminer les antigènes de différentes façons. Les antigènes de petites tailles (toxines, xénobiotiques, allergènes) sont neutralisés puis détruits par les phagocytes. Les antigènes plus gros (pathogènes, phagocytes) sont reconnus par les anticorps puis éradiqués par l'intermédiaire d'effecteurs cellulaires (cellules cytotoxiques, phagocytes) ou moléculaires (le système du complément). ADCC : Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity ; CDC : Complément Dependent Cytotoxicity ; CAM : Complexe d'Attaque Membranaire. D'après (Abès et al., 2009).

2.2 Fonctions effectrices : la cytotoxicité liée à l'anticorps

La région Fc assure les fonctions effectrices de l'anticorps en activant plusieurs voies cytotoxiques. Il existe deux types de cytotoxicité : la cytotoxicité dépendante des cellules de l'immunité (ADCC) et la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Ward and Ghetie, 1995).

2.2.1 Cytotoxicité dépendante des cellules de l'immunité (ADCC)

Le fragment Fc de l'anticorps se lie à son récepteur spécifique, le Fc γ R, présent à la surface de cellules intervenant dans la défense immunitaire, comme les cellules NK (Natural Killer), les macrophages ou les neutrophiles. Cela conduit à une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), caractérisée par la phagocytose ou la lyse de l'antigène (Figure 7) (Nimmerjahn and Ravetch, 2010). L'interaction Fc-Fc γ R peut également entraîner d'autres types de signaux comme la libération de médiateur de l'inflammation, l'activation des cellules B ou encore la phagocytose, c'est la réponse ADPC (Antibody Dependent Cellular Phagocytosis).

2.2.2 Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

Le fragment Fc de l'anticorps se fixe alors à la molécule C1q qui déclenche ensuite la cascade d'activation du complément, pour aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire qui finit par lyser la cellule cible (Gelderman et al., 2004) (Figure 7). Il est à noter que C1q est incapable de se lier aux IgG4 et son affinité pour le domaine C_H2 du Fc varie selon les sous classes (IgG3>IgG1>>IgG2).

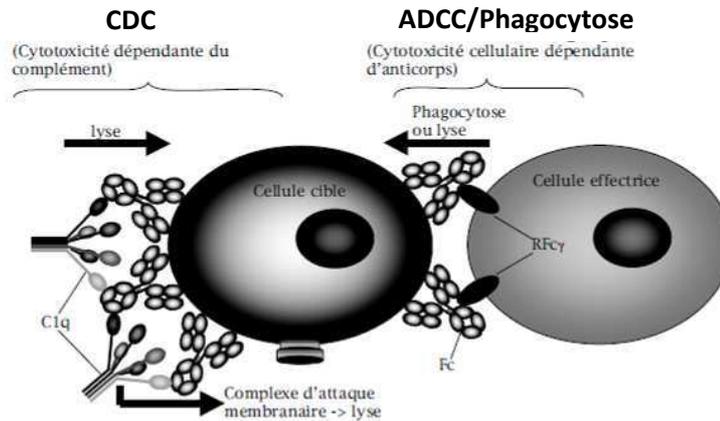


Figure 7. Les fonctions effectrices de l'anticorps. D'après (Dutertre and Teillaud, 2006).

En plus de son rôle dans la neutralisation et dans les fonctions effectrices, le complexe immun antigène/anticorps permet d'activer les autres cellules du système immunitaire notamment les cellules de l'immunité cellulaire ou cytotoxique (Lymphocyte T, Lymphocytes T cytotoxiques, macrophages) afin de conduire à l'élimination totale de l'antigène de l'organisme. De plus, lors du premier contact avec l'antigène, l'organisme est capable d'organiser une réponse contre l'antigène (voir paragraphes précédents 2.1, 2.2), mais également d'enregistrer cette réponse pour se défendre lors d'un nouveau contact avec cet antigène. La réponse est dite mémoire et consiste en la production de lymphocytes B mémoires sécrétant des anticorps spécifiques de l'antigène. Cette réponse sera déclenchée plus rapidement, en quantité plus importante et plus efficacement lors du second contact avec l'antigène. La figure suivante (Figure 8) récapitule l'ensemble des fonctions et interactions des anticorps et les rôles des complexes immuns lors de l'infection de l'organisme par un antigène. Cette figure présente le cas des Igs de type IgG, qui est la classe d'Igs la plus abondante et la plus efficace (paragraphe 1.3.2 Répartition et fonction des immunoglobulines, Introduction).

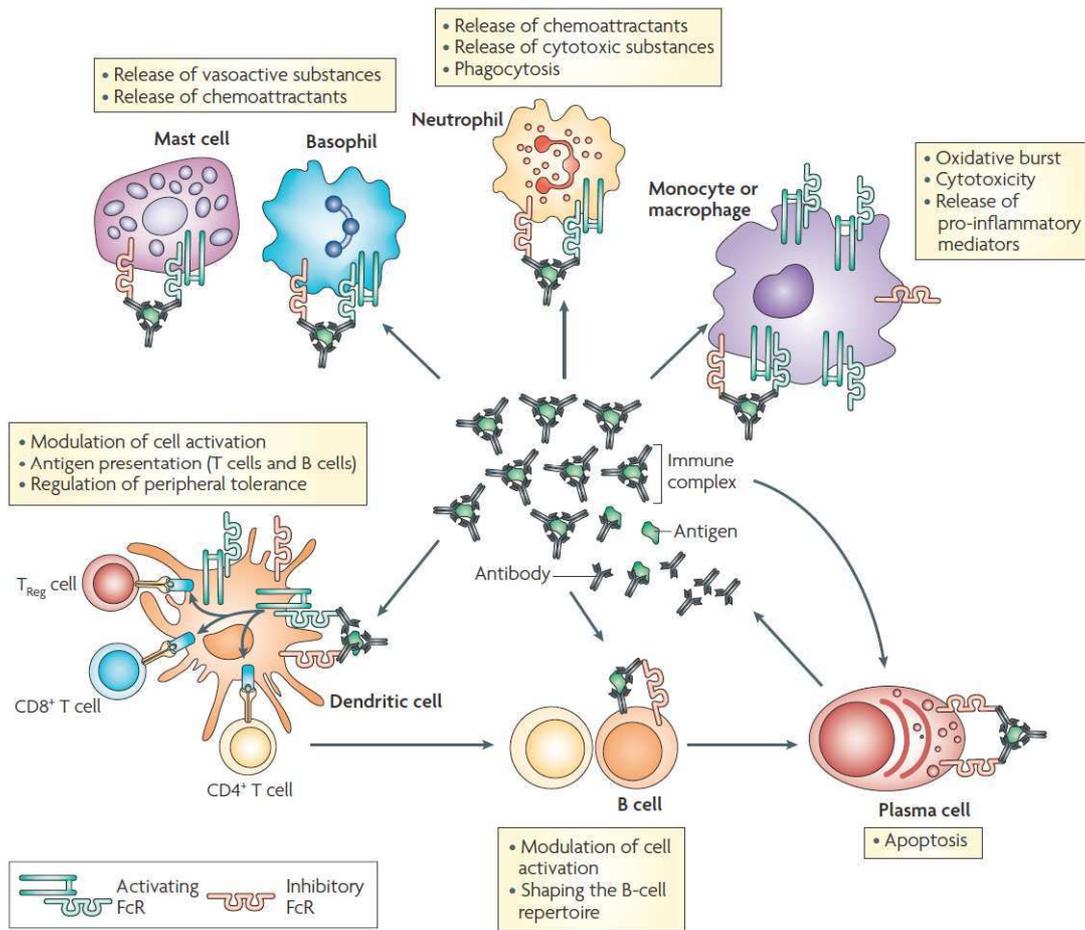


Figure 8. Activités régulatrices des complexes immuns.

Les anticorps sous forme de complexes immuns activent un certain nombre de cellules immunitaires grâce à leur interaction avec les Fc γ R. Les anticorps régulent les fonctions cytotoxiques et pro-inflammatoires des cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les granulocytes et les mastocytes. L'interaction des anticorps avec les cellules dendritiques permet la régulation de la réponse cellulaire adaptative. Sur les cellules B et les plasmocytes, l'expression sélective du récepteur Fc inhibiteur permet de moduler et d'adapter la réponse humorale. Extrait de (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

3 Caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des anticorps

3.1 Affinité/Avidité

L'affinité des anticorps est la résultante des forces attractives et répulsives établies entre un anticorps et un épitope de son antigène (Anthony et al., 2008). Elle permet de mesurer l'attraction spécifique entre un anticorps et un antigène. L'affinité est variable selon les couples anticorps/antigène, et les conditions du milieu (pH, force ionique, température).

Lors de la maturation de la réponse immunitaire, l'affinité des anticorps est améliorée, grâce à des mutations somatiques dans la région hypervariable puis à la sélection et la prolifération des lymphocytes B sécrétant les anticorps de meilleure affinité (paragraphe 1.5 Expression du BCR et sélection des lymphocytes B dans la moelle osseuse, Introduction). Ainsi, les anticorps présentent de fortes affinités naturelles pouvant atteindre l'échelle du picomolaire grâce aux étapes de maturation et de commutation isotypique. Néanmoins, à cause de la forme multimérique des anticorps, l'affinité n'est pas un paramètre adapté, car elle ne prend en compte qu'une interaction unique de l'anticorps sur son antigène. L'avidité ou affinité fonctionnelle qui représente la somme des affinités de chaque liaison paratope / épitope sur un antigène ou l'interaction globale de l'ensemble bivalent ou multivalent de l'anticorps avec les différents épitopes de l'antigène apparaît plus adapté (Hornick and Karuch, 1972). L'affinité fonctionnelle est toujours supérieure à la somme des affinités individuelle ou interaction primaire. Ce phénomène d'amplification parfois considérable (facteur 100 ou 1 000) résulte de la multivalence des molécules réagissantes. Ce phénomène explique que les IgMs soient plus avides que des IgGs qui elles ont subi le processus de maturation d'affinité.

3.2 Demi-vie et biodistribution

La demi-vie des anticorps est variable selon l'isotype de l'anticorps. Les IgM, IgD, IgA et IgE possèdent un temps de demi-vie court de 3 à 5 jours. Les IgGs présentent quant à eux le temps de demi-vie le plus long. La demi-vie des IgGs est d'environ 21 jours dans le plasma, sauf pour les IgG3 qui est d'environ 7 jours. Cette longue demie-vie est due à un recyclage des IgGs, effectué par le récepteur FcRn (**N**eonatal **Fc** **R**eceptor) exprimé par les cellules endothéliales vasculaires (Ward et al., 2003). C'est la région Fc de l'anticorps, chevauchant les domaines C_{H2} et C_{H3} qui est impliquée dans la fixation au FcRn. Ce récepteur permet le transport des IgGs par un mécanisme d'association et de dissociation à un pH environnant 7,4. Il protège ainsi les anticorps de la voie du catabolisme endothélial en les restituant intacts dans la circulation. Cela explique le maintien d'une concentration élevée en anticorps IgGs dans le plasma. Il permet également d'assurer la biodistribution des IgGs dans l'organisme. Les IgGs de par leur demi-vie sont l'isotype le plus utilisé par les laboratoires pharmaceutiques pour développer des anticorps thérapeutiques.

4 Principales techniques de production des anticorps et leur utilisation

4.1 Anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux sont capables de reconnaître plusieurs épitopes différents d'un même antigène. Ils sont produits sous forme de mélange. La production d'anticorps polyclonaux se fait par l'immunisation d'un animal, lapin, chèvre, mouton etc. avec un antigène (Harlow Ed, 1988). Les animaux immunisés permettent de récupérer dans leurs sérums un cocktail d'Igs possédant une proportion relativement faible, de l'ordre de 1%, d'anticorps dirigés contre l'antigène qui a été utilisé pour l'immunisation. Ce type d'anticorps est facile à obtenir mais pose des problèmes de sensibilité/spécificité et de production continue. Les anticorps polyclonaux offrent une faible spécificité par rapport aux anticorps monoclonaux (paragraphe suivant, 4.2), car ils sont composés par un mélange d'anticorps ciblant tous les épitopes de l'antigène utilisé tandis que les anticorps monoclonaux ciblent un unique épitope. Les anticorps polyclonaux sont généralement plus sensibles en raison de la reconnaissance de nombreux épitopes d'un antigène. Aujourd'hui, les anticorps polyclonaux sont rarement disponibles pour l'immunothérapie.

4.2 Anticorps monoclonaux murins

Les anticorps monoclonaux sont capables de reconnaître un unique épitope d'un antigène contrairement aux anticorps polyclonaux décrits précédemment. Pour obtenir des anticorps monoclonaux murins, des lymphocytes B de souris immunisées contre un antigène cible sont fusionnés *in vitro*, avec un agent de fusion membranaire, le polyéthylène glycol (PEG), à des cellules de myélomes murins. Les souches de myélome murins utilisés sont des mutants n'exprimant pas soit la thymidine kinase (TKase), soit la hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRTase), deux enzymes nécessaires à la biosynthèse *de novo* des nucléotides (Köhler and Milstein, 1975). Sans nucléotides, les cellules de myélome meurent. Ces cellules de myélome ne peuvent se développer et se multiplier qu'en produisant des nucléotides par les voies métaboliques de récupération des nucléotides. Ces voies sont inhibées par des antagonistes de l'acide folique comme l'aminoptérine. En effet, l'aminoptérine bloque la biosynthèse des nucléotides via les voies métaboliques de

récupération ou de secours. Une fois la fusion entre les lymphocytes B et les cellules de myélome réalisée, la sélection des hybridomes se fera à l'aide d'un milieu sélectif contenant de l'aminoptérine, de la thymidine et de l'hypoxanthine, les deux bases azotées qui sont les points de départ des voies de récupération.

Le résultat de la fusion aboutit à un mélange contenant alors trois types de cellules. Les cellules de la rate non fusionnées qui produisent des anticorps, mais incapables de croître *in vitro*, vont mourir après quelques jours. Les cellules de myélome non fusionnées qui sont capables de se multiplier mais sont inhibées par l'aminoptérine. Enfin, il y a des hybridomes, les cellules résultant de la fusion des cellules de myélome et des lymphocytes B. Les hybridomes sont capables de se multiplier indéfiniment car ils possèdent le génome des cellules de myélome. De plus, comme ils possèdent aussi le génome des lymphocytes, les hybridomes sont capables de biosynthétiser des nucléotides par la voie de récupération en utilisant la thymine et l'hypoxanthine du milieu. Donc seuls les hybridomes seront capables à la fois de proliférer dans ce milieu et de produire des anticorps contre l'antigène cible. La plupart des hybridomes obtenu ne vont pas produire l'anticorps recherché, un criblage pour isoler et cloner, les hybridomes sécréteurs de l'anticorps cible est réalisé. L'anticorps produit est spécifique et monoclonal pour la cible grâce à des étapes supplémentaires de dilution limites pour atteindre un stade clonal, et de criblage pour vérifier la liaison spécifique à l'antigène.

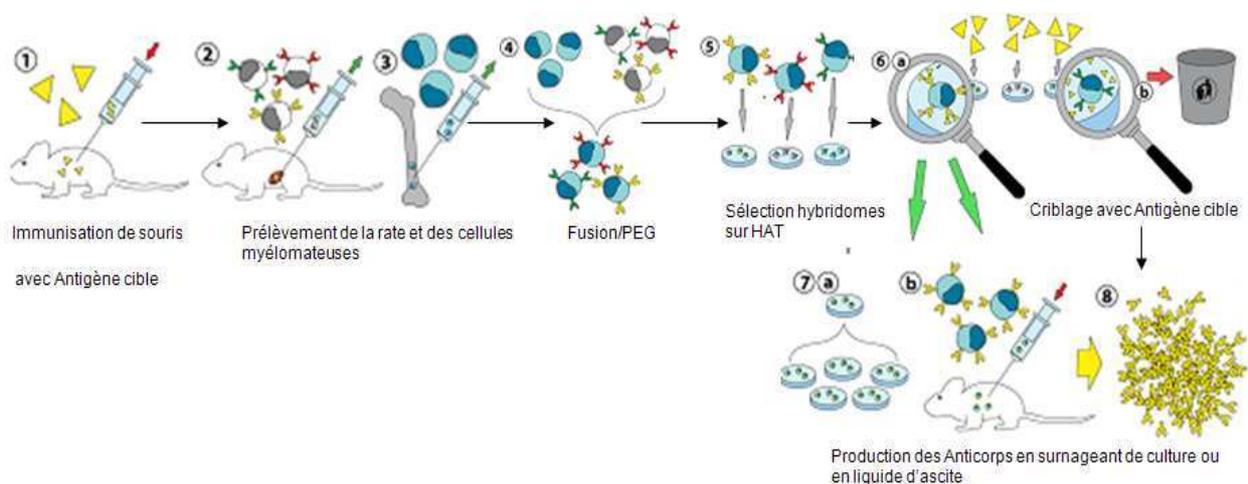


Figure 9. Production des anticorps monoclonaux d'après Köhler et Milstein. Les premières fusions ont été réalisées grâce au virus de Sendai (Littlefield, 1964; Okada, 1962; Potter, 1962) Depuis, le polyéthylène glycol a remplacé le virus de Sendai et est classiquement utilisé pour fusionner les cellules. Le milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine) permet d'éliminer les cellules non hybrides.

Ces anticorps à leur apparition ont suscité un grand intérêt pour l'immunothérapie. Aujourd'hui, ils sont moins utilisés qu'il y a trente ans, sauf dans certains cas (paragraphe 4.4.2 Anticorps utilisés en thérapie, Introduction).

4.3 Anticorps monoclonaux de lapin

Depuis longtemps, le lapin était utilisé pour produire des anticorps polyclonaux. L'élément limitant l'obtention d'anticorps monoclonaux de lapin était l'absence de partenaire de fusion, c'est-à-dire un myélome d'origine lapine. Ce myélome, le clone 240 E, fut caractérisé par l'équipe du Dr Katherine L. Knight (Spieker-Polet et al., 1995), il y a environ quinze ans. L'utilisation de ce partenaire de fusion a permis d'obtenir d'assez nombreux anticorps monoclonaux comme les anticorps SP (Rossi et al., 2005). Ces anticorps ont une forte spécificité et une forte affinité pour l'antigène. Ces caractéristiques sont liées à la plus large diversité du répertoire immunitaire du lapin comparé à celle de la souris. Néanmoins, l'utilisation du lapin comme l'animal de production reste un problème compte tenu de sa taille et des manipulations qu'il nécessite. Cependant, aujourd'hui des anticorps monoclonaux de lapin anti-protéines humaines sont parmi les meilleurs outils diagnostiques de leur domaine (anti-récepteur œstrogène, anti-cycline D1) (Huang et al., 2005), (Cheuk et al., 2004).

4.4 Les diverses utilisations des anticorps

En 1975, la découverte de Köhler et Milstein a immédiatement suscité un nouvel espoir dans le domaine médical compte tenu de la grande spécificité des anticorps monoclonaux. Les premières utilisations des anticorps en diagnostic médical (détection/dosage des antigènes), en immunothérapie (traitement des maladies) et en recherche fondamentale provoquèrent un fort intérêt.

4.4.1 Anticorps utilisés en diagnostic

Les anticorps sont largement utilisés pour l'identification d'un antigène au sein d'un mélange (liquide biologique, coupe tissulaire, suspension cellulaire, ...) et pour le dosage d'antigènes en solution. L'une des premières applications des anticorps et de l'interaction antigène/anticorps fut et continue d'être à ce jour les immunodosages pour le diagnostic de

marqueurs de maladies (VIH, CMV, ...) ou de marqueurs cellulaires. Les anticorps sont utilisés également dans la recherche fondamentale comme outils et traceurs dans des techniques comme le Western Blot ou l'immunoprécipitation. D'autre part, les anticorps ont été utilisés en imagerie médicale. Pour cela, les anticorps ont subi des modifications et ont été chimiquement marqués avec des composés fluorescents, magnétiques, radioactifs et par d'autres variétés de composés. En effet, dès le début des années 1970, plusieurs laboratoires ont étudié la faisabilité de l'utilisation d'anticorps marqués avec des radio-isotopes pour localiser par imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux (Primus et al., 1973), (Mach et al., 1974). Ces recherches ont été étendues au diagnostic de tumeurs chez l'homme (Mach et al., 1983). Le satumomab (Oncoscint[®]) une IgG radiomarké à l'indium 111, dirigé contre la glycoprotéine TAG-72 est utilisé depuis 1992 pour le diagnostic des récurrences de cancers colorectaux ou ovariens (Pinkas et al., 1999).

Dans l'imagerie, l'utilisation de marqueurs à partir de fragments d'anticorps s'est développée. En 1996, trois fragments d'anticorps et une IgG entière ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). L'arcitumomab (CEA-Scan), un fragment F(ab')₂ marqué au technétium 99m, reconnaît l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et est aussi utilisé pour le diagnostic des récurrences de cancers colorectaux (Erb and Nabi, 2000).

Cet anticorps a cependant été retiré du marché européen pour des raisons commerciales. L'imciromab (Myoscint[®]) marqué à l'indium 111, un fragment Fab dirigé contre la myosine, est utilisé pour le diagnostic des nécroses du myocarde (Sarda et al., 2001). Un autre fragment Fab, le nofetumomab (Verluma[®]) marqué au technétium 99m dirigé contre une glycoprotéine de 40 kDa est utilisé pour le diagnostic des cancers du poumon à petites cellules (Straka et al., 2000). Enfin, le capromab (Prostascint[®]), une IgG entière marquée à l'indium 111, diagnostique les récurrences des cancers prostatiques en se liant à l'antigène membranaire PSMA (**P**rostate **S**pecific **M**embrane **A**ntigen) (Murphy et al., 2000). Plus récemment en 2004, le fanolesomab (NeutroSpec[®]), une IgM entière marquée au technétium 99m, dirigée contre le CD15 a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux États-Unis pour le diagnostic de l'appendicite (Line et al., 2004). Ce dernier médicament a été retiré du marché américain suite à plusieurs déficiences cardiopulmonaires observées chez certains patients.

4.4.2 Anticorps utilisés en thérapie

L'idée d'utiliser des anticorps pour guérir des maladies remonte à la fin du 19^{ème} siècle puisque dès 1890, Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato puis Emile Roux réalisèrent des essais cliniques en utilisant du sérum d'animaux. Ils ont découvert que le sérum d'animaux, ayant subi au préalable des injections de la toxine diphtérique, conférait à l'homme une protection contre la diphtérie (Eibl, 2008). L'activité neutralisante du sérum fut rapidement attribuée aux anticorps (un terme initialement utilisé par Paul Ehrlich en 1891), gamma globulines du sérum, dont la structure fut élucidée partiellement en 1950 par Rodney Porter (Porter, 1950a, 1950b). La sérothérapie naissait. Face à cette découverte, la neutralisation de toxines par sérothérapie fut appliquée à l'homme et de nombreux chercheurs ont repris la technique afin de disposer de « médicaments » ou antidotes contre des venins de serpents et de scorpions. L'utilisation de sérum était alors le seul moyen permettant de traiter certaines maladies infectieuses comme la rougeole, les oreillons ou des infections respiratoires (Keller and Stiehm, 2000). La sérothérapie fut remplacée par la vaccination et l'antibiothérapie, car elle induisait de nombreux accidents anaphylactiques dus à l'origine animale des sérums (Smolens, 1961). Elle est toutefois toujours utilisée dans certains cas comme le traitement de maladies médiées par des toxines (tétanos, botulisme, diphtérie) ou des morsures venimeuses. L'apparition des anticorps monoclonaux murins a pu remplacer l'utilisation d'immuns sérums animaux et apporta un grand renouveau en thérapeutique. Le Muromonab ou Orthoclone OKT3[®] dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T fut le premier anticorps monoclonal thérapeutique humain utilisé à partir de l'année 1986. Son rôle a été de limiter les réactions inflammatoires intervenant dans les rejets de greffes (Cosimi et al., 1981). Néanmoins, le développement d'autres anticorps thérapeutiques murins contre de nouvelles cibles a été limité à cause de la présence d'effets secondaires importants. En effet, l'administration d'anticorps murins à l'Homme déclenche des réactions immunitaires caractérisées par la production d'anticorps humains anti-souris ou HAMA (**H**uman **A**nti-**M**ouse **A**ntibodies) conduisant dans certains cas à des chocs anaphylactiques (Schroff et al., 1985). Dans un premier temps, pour limiter les réponses immunitaires de type HAMA, seulement des fragments Fab ou Fab'₂ des anticorps murins ont été utilisés. Par exemple, pour le traitement des hépatocarcinomes, le Metuximab, un fragment (Fab'₂ radiomarqué), a été utilisé en Chine. Depuis, le développement des techniques d'ingénierie moléculaires ont permis de produire des anticorps thérapeutiques. Cependant, la médecine a encore recours aux

anticorps murins notamment en cancérologie pour des couplages à des toxines ou à des radio-isotopes (Ibritumomab, Tositumomab).

5 Les types d'anticorps thérapeutiques

Les anticorps thérapeutiques d'origine murine induisant des réactions secondaires suite à leur administration à l'Homme, développer d'autres types d'anticorps a été essentiel. De nouveaux anticorps : anticorps chimériques, humanisés puis totalement humains ont été produits (Figure 10) (Carter, 2006), (Chames et al., 2009).

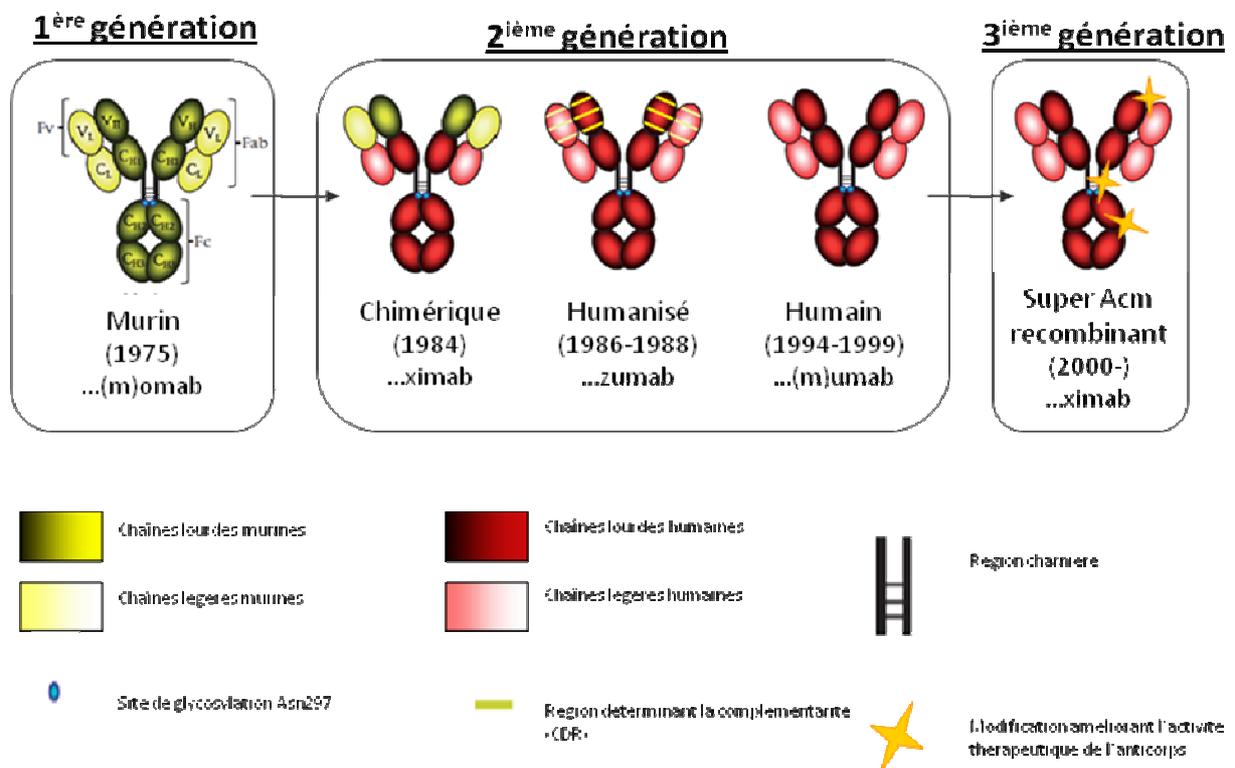


Figure 10. Evolution des différents types d'anticorps thérapeutiques. D'après (Dutertre and Teillaud, 2006).

5.1 Les anticorps chimériques

Les anticorps « chimériques » sont composés des parties constantes humaines et des parties variables murines (Figure 10) et sont obtenus par ingénierie moléculaire.

Les ADNc codant les régions variables des anticorps murins (produits par la technique des hybridomes) sont isolés et associés aux ADNc codant les régions constantes d'une IgG humaine (Morrison et al., 1984). On utilise pour cela un (ou deux) vecteur(s) d'expression contenant les ADNc codant les chaînes lourdes et légères (généralement IgG1 et C kappa) et dans lesquels les parties variables V_H et V_L de souris sont insérées, tout en respectant le cadre de lecture. Une telle construction permet d'obtenir des anticorps hybrides composés à 75% de la séquence humaine de l'Ig, pouvant interagir avec les cellules effectrices tout en conservant leur spécificité et leur affinité pour l'antigène (Siberil et al., 2005). Il a été observé qu'un changement d'isotype lors de la construction pouvait entraîner une différence dans la spécificité fine de certains anticorps chimériques ayant des régions variables identiques. Les parties constantes pourraient donc jouer un rôle sur la conformation du domaine variable (1994; Torres et al., 2005). Le premier anticorps chimérique (Fab) commercialisé, l'abciximab (ReoPro[®]) dirigé contre la glycoprotéine plaquettaire GPIIb/IIIa, est indiqué dans le traitement de maladies cardiovasculaires comme anti-coagulant (1994). Approuvé par la FDA 10 ans après la mise au point de la technique de chimérisation, il fut suivi par le rituximab (Rituxan[®] ou MabThera[®] en 1997, anti-CD20 préconisé dans le traitement de certains lymphomes, certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, ou encore certains rejets de greffe. Il existe à l'heure actuelle sept anticorps chimériques sur le marché. Cependant, bien que les anticorps chimériques soient moins immunogènes que les anticorps totalement murins, ils peuvent tout de même induire des réactions immunitaires à leur injection chez l'homme. Ces réactions immunitaires de type HACA (**H**uman **A**nti-**C**himeric **A**ntibodies) doivent être diminuées. C'est pour cela que d'autres technologies ont été développées.

5.2 Les anticorps humanisés

Les anticorps « humanisés » possèdent encore moins de séquences d'origine murine que les anticorps chimériques. En effet, ils sont constitués à 90% de séquences humaines, dans lesquelles seules les régions hypervariables (CDR) (régions en contact étroit avec l'antigène) sont d'origine murine. Ces anticorps humanisés sont obtenus par greffage des

régions hypervariables CDR des anticorps de souris sur des régions variables plus conservées (« framework » FR) des V_H et V_L humaines (Jones et al., 1986). Cette technique d'humanisation est très délicate quant à la prédiction des acides aminés à substituer. Certains résidus de la région conservée ont un rôle essentiel dans le maintien de la conformation du paratope. Leur changement peut donc affecter de façon non négligeable l'affinité de l'anticorps humanisé. Lorsque les séquences variables humaines sont modifiées, elles peuvent alors être clonées dans un vecteur contenant les séquences constantes humaines, comme cela est fait pour les anticorps chimériques. Une autre approche d'humanisation, appelée « *resurfacing* », consiste au contraire à ne changer que certains acides aminés des régions conservées du domaine variable murin pour lui donner un profil plus « humain » (Roguska et al., 1994). Le premier anticorps humanisé mis sur le marché en 1997 fut le daclizumab (Zenapax[®]). Dirigé contre le récepteur de l'IL-2 (CD25, fortement exprimé sur les lymphocytes T activés), il est indiqué pour la prévention des rejets d'allogreffes rénales. De nombreux autres anticorps humanisés entrèrent ensuite dans des essais cliniques. On en compte actuellement 15 sur le marché, dont 1 immunoconjugué, 1 fragment Fab et 1 Fab pégylé. Ces anticorps induisent beaucoup moins de réactions immunitaires "anti-souris" que leur parent murin (7% contre 20 à 40%).

5.3 Les anticorps totalement humains

Les anticorps totalement humains sont constitués exclusivement de séquences d'origine humaine. Ces anticorps sont dits invisibles ou « transparents » pour le système immunitaire des patients et évitent les réactions immunitaires observées dans le cas des anticorps murins, chimériques et humanisés (Hwang and Foote, 2005). Aujourd'hui, une grande partie des anticorps entrant en phase clinique sont complètement humains et 9 anticorps thérapeutiques humains sont actuellement sur le marché (7 nouvelles approbations depuis 2009).

Nom	Cible moléculaire	Indication thérapeutique		Approbation
Adalimumab (Humira; Abbott)	TNF-specific, IgG1κ	Rheumatoid arthritis	S	31 Dec 2002 (8 Sep 2003)
Panitumumab (Vectibix; Amgen)	EGFR-specific, IgG2κ	Colorectal cancer	P, FT, AA	27 Sep 2006 (3 Dec 2007)
Golimumab (Simponi; Centocor)	TNF-specific, IgG1	Rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	S	24 Apr 2009 (1 Oct 2009)
Canakinumab (Ilaris; Novartis)	IL-1β-specific, IgG1κ	Cryopyrin-associated periodic syndromes	P, O	18 Jun 2009 (23 Oct 2009)
Ustekinumab (Stelara; Johnson & Johnson)	IL-12/IL-23 p40-specific, IgG1	Plaque psoriasis	S	25 Sep 2009 (16 Jan 2009)
Ofatumumab (Arzerra; Genmab)	CD20-specific, IgG1	Chronic lymphocytic leukaemia	P, FT	26 Oct 2009 (19 Apr 2010)
Denosumab (Prolia; Amgen)	RANKL-specific, IgG2	Treatment of postmenopausal osteoporosis [†]	S	1 Jun 2010 (26 May 2010)
Raxibacumab	PA-specific, IgG1	Inhalation anthrax	P, FT, O	Under review by the FDA
Belimumab	B lymphocyte stimulator-specific, IgG1	Systemic lupus erythematosus	P, FT	Under review by the FDA and the EMA
Ipilimumab	CTLA4-specific, IgG1	Metastatic melanoma	P, FT, O	Under review by the FDA and the EMA

Tableau 1. Anticorps monoclonaux humains approuvés ou sous étude d'approbation par la FDA.

AA, approbation accélérée ; CTLA, cytotoxicité liée au lymphocytes T associé à un antigène ; EGFR, récepteur au facteur de croissance épidermique, EMA, Agence Européenne de Médecine, EU, Union Européenne, FDA, Organisation américaine de l'alimentation et des drogue ; Ig, Immunoglobuline, IL, interleukine ; mAb, anticorps monoclonal, P, étude prioritaire, PA, antigène de *Bacillus anthracis* ; RANK, récepteur pour l'activation du facteur nucléaire κB, S, étude standard ; TNF, tumeur necrosis facteur.

Durant les trente dernières années, plusieurs stratégies ont été envisagées et développées pour produire des anticorps monoclonaux humains. Trois principales approches existent aujourd'hui : les souris transgéniques, le phage display et l'utilisation des lymphocytes B humains. Le phage display et les souris transgéniques sont les deux techniques majoritairement utilisées pour produire des anticorps monoclonaux thérapeutiques par les grands groupes pharmaceutiques (Hoogenboom, 2005). L'utilisation des lymphocytes B humains existe, mais pose des problèmes et reste encore au stade de recherche et d'optimisation (paragraphe suivant 5.3.3 Utilisation des lymphocytes B humains, Introduction). Récemment, une nouvelle société VIVALIS s'est intéressée à la production d'anticorps humains à partir de lymphocytes B humains. Il en est de même pour de grands groupes pharmaceutiques comme SANOFI ou NOVARTIS.

5.3.1 Le Phage display

5.3.1.1 Définition

La technique du phage display a été utilisée pour exprimer différentes molécules telles que des peptides aléatoires, des enzymes, des inhibiteurs de protéases, des facteurs de transcription, des banques d'ADNc, des cytokines. Ces différentes molécules peuvent être exprimées en les fusionnant à une des protéines de la capsid du phage. Les phages exprimant la molécule d'intérêt sont sélectionnés pour leur interaction avec une autre molécule, un antigène par exemple ou un ligand cible, fixée à un support solide. Les phages reconnaissant la cible d'intérêt sont ensuite enrichis par infection d'une souche d'*E.coli*. Le phage display pour la production des anticorps consiste à cribler une banque de fragments variables d'anticorps humains exprimés à la surface de virus bactériens, les bactériophages. La banque est obtenue après extraction et clonage du répertoire des gènes des lymphocytes B humains codant pour les régions variables des anticorps (Marks et al., 1991). Une sélection des fragments d'anticorps *in vitro* permet ensuite d'isoler les séquences codant pour des fragments ayant une bonne affinité pour la cible d'intérêt. La première utilisation des phages dans la production d'anticorps fut décrite en 1990 avec anticorps humain, l'adalimumab (Humira®), mis sur le marché en 2002. Actuellement, il existe 2 anticorps sur le marché obtenus par phage display l'adalimumab (Humira®), et le Belimumab / Benlystat® approuvé en 2011.

5.3.1.2 Principe

Les domaines variables des anticorps sont extraits du répertoire de gènes de lymphocytes B naïfs ou de lymphocytes B ayant déjà rencontré la cible. Ces domaines variables sont exprimés sur des phages, soit sous forme de fragments scFv dans lesquels les domaines VH et VL sont liés de manière covalente par un court peptide, soit sous forme de fragments Fab. La combinaison des différentes chaînes lourdes (VH) et légères (VL= V κ + V λ) permet d'obtenir un répertoire de fragments d'anticorps. Cette combinaison aléatoire permet d'augmenter la diversité des anticorps obtenus. Chaque répertoire, VH et VL, peut être cloné dans deux vecteurs différents pour être recombiné *in vitro* (Hogrefe et al., 1993a; Hogrefe et al., 1993b) ou *in vivo* (Waterhouse et al., 1993) par la suite. Il est aussi possible de cloner séquentiellement chacun des gènes dans un même vecteur (Barbas et al., 1991) ou de

procéder à leur assemblage par PCR et les cloner dans un vecteur commun (Clackson et al., 1991; Clackson, 1991). Les répertoires sont combinés au hasard ce qui permet de créer de nouvelles spécificités (Marks et al., 1991) et d'obtenir un plus large panel d'anticorps pour une même cible (Baker et al., 2003), difficile à obtenir avec les autres approches à cause des faibles rendements des étapes de fusion et d'immortalisation. Les banques d'anticorps obtenus par phage display ne permettent pas la maturation d'affinité et ne conduisent donc pas au niveau de diversité observé *in vivo*. Les anticorps obtenus par cette technique nécessite souvent une optimisation de leur affinité *in vitro* par mutagenèse dirigée (Lonberg, 2005). À la suite de la sélection des meilleurs fragments et des meilleurs phages, des mutations peuvent être introduites au hasard *in vitro* (Gram et al., 1992; Hawkins et al., 1992) ou *in vivo* en infectant des souches bactériennes créant des mutations (Schaaper, 1988). Une nouvelle sélection est alors effectuée sur les nouveaux phages afin de sélectionner les meilleurs. Cette maturation artificielle permet d'obtenir des anticorps ayant une affinité identique à celle des anticorps issus d'une immunisation chez un animal. Ce type de banque permet d'obtenir des anticorps dirigés contre des molécules de l'hôte et de ne pas passer par l'immunisation des animaux et la technique des hybridomes, mais présente un temps et un coût de production élevé dû à des étapes d'optimisation importantes.

5.3.2 Les souris transgéniques

5.3.2.1 Définition

Les souris transgéniques possèdent à la place des loci de gènes d'immunoglobulines murines des loci de gènes d'immunoglobulines humaines. Ces souris expriment donc des gènes d'immunoglobulines humaines et sont capables de produire après immunisation avec un antigène-cible des anticorps totalement humains. Aujourd'hui, l'essentiel des anticorps humains utilisés (7 anticorps thérapeutiques) ou en développement sont des anticorps issus de souris transgéniques.

5.3.2.2 Principe

Les souris transgéniques sont des souris dont le répertoire des gènes des Igs a été remplacé par le répertoire des gènes des Igs humaines. La production d'anticorps humains à partir de souris transgéniques consiste à immuniser ces souris avec un antigène-cible et à

récupérer la rate contenant les splénocytes et à les fusionner avec un myélome murin pour stabiliser leur production en anticorps. Cette technique est identique à celle utilisée pour l'obtention des hybridomes murins de Kohler et Milstein excepté l'origine humaine du répertoire des gènes des Igs. Après les étapes de criblage et de sélection, des hybridomes humains sont obtenus. Des étapes de clonage par dilution limite permettent alors de produire un anticorps monoclonal contre l'antigène d'intérêt. L'avantage des anticorps humains produits par les souris transgéniques est que ces anticorps du fait de l'environnement *in vivo* ont déjà subi les étapes de maturation et de commutation et sont donc très affins. Ils n'ont pas besoin de subir des étapes de maturation d'affinité *in vitro* contrairement au phage display. Cependant, la technique des souris transgéniques est une technique coûteuse et protégée par des brevets. En effet, de grosses firmes pharmaceutiques (GenPharm, Medarex) se sont disputées les brevets de cette technologie pendant des années. De même, un des points limitant est l'intensité de la réponse immunitaire. En effet, chez les souris transgéniques la réponse immunitaire après immunisation avec une cible est plus faible que chez les souris classiques, ce qui engendre un nombre d'immunisation plus important et un coût élevé.

5.3.3 L'utilisation des lymphocytes B humains

L'utilisation *in vitro* des lymphocytes B humains fut la première technique utilisée pour produire des anticorps totalement humains (Schwaber and Cohen, 1973).

Malgré les limitations et les difficultés rencontrées avec l'utilisation des lymphocytes B (voir ultérieurement), cette technique présente des avantages et mérite des investigations et développement. Mon sujet de thèse s'intéresse tout particulièrement à l'obtention d'anticorps monoclonaux humains grâce aux lymphocytes B humains. Nous avons cherché à obtenir des anticorps humains à partir de lymphocytes B de donneurs immunisés contre une cible et à partir de lymphocytes B naïfs pour lesquels nous avons dû mettre aux point divers protocoles d'immunisation *in vitro* (paragraphe 5 Immunisation *in vitro*, Matériels et Méthodes). Dans cette introduction générale sera seulement rappelé le principe de l'utilisation de lymphocytes B, ses avantages et inconvénients.

Par la suite, dans chacune des parties de ce mémoire (1^{ère} partie et seconde partie de la thèse), qui correspondent aux deux méthodologies existantes pour obtenir des lymphocytes B humains, les principes, les protocoles et, les résultats obtenus concernant les lymphocytes B mémoires et les lymphocytes B naïfs via l'immunisation *in vitro* seront développés.

5.3.3.1 Définition

La production d'anticorps monoclonaux totalement humains est basée sur l'obtention et la purification de lymphocytes B humains. Ces lymphocytes B humains proviennent de donneurs humains. Deux types de donneurs humains sont utilisés :

- 1) des donneurs ayant déjà été en contact avec l'antigène, appelés les donneurs immunisés/infectés ou encore vaccinés,
- 2) des donneurs n'ayant jamais été en contact avec l'antigène, appelés des donneurs naïfs.

5.3.3.2 Principe

Récupérer du sang de donneurs, purifier et sélectionner les lymphocytes B humains, les fusionner avec un partenaire cellulaire de type myélome, ou un partenaire viral. La clonalité et la spécificité sont obtenues comme dans le cas de la production d'anticorps murins par des étapes supplémentaires de clonage par dilution limite et de criblage. La production des anticorps humains peut directement être initiée sur les lymphocytes B. Toutefois, la durée de vie d'un lymphocyte B est courte et les lymphocytes B ne se multiplient pas *in vitro*. C'est pour cela que dès 1970, des essais pour stabiliser les lymphocytes B humains ont porté sur les possibilités de fusionner ou d'immortaliser des lymphocytes B humains avec un partenaire cellulaire de type myélome (Schwaber and Cohen, 1973). Contrairement à la technique des hybridomes chez la souris, des difficultés pour fusionner et stabiliser les lymphocytes B humains sont apparues. D'autre part, peu de myélomes humains sont disponibles et adaptés à la fusion avec des lymphocytes B humains (Kozbor et al., 1983), (Steinitz et al., 1979). L'immortalisation avec un virus, le virus Epstein-Barr (EBV) a également été utilisée (Traggiai et al., 2004). L'EBV est un herpes virus qui possède la capacité de transformer ou d'« immortaliser » les lymphocytes B humains provoquant l'expansion clonale permanente de ces cellules. Pour améliorer le rendement et la stabilité, l'immortalisation peut être couplée à une étape supplémentaire de fusion. L'utilisation du virus d'Epstein-Barr (EBV) s'est révélée relativement efficace. Cette stratégie a permis de générer (Steinitz et al., 1979) des anticorps monoclonaux contre divers antigènes (virus, toxines...). Quelques exemples très marquants, l'obtention d'anticorps humains contre le SRAS ou contre H1N1 par l'équipe de Lanzavecchia en 2002 et 2004 à partir de lymphocytes de donneurs ayant déjà rencontré la cible (Buchacher et al., 1994), (Simmons et al., 2007; Traggiai et al., 2004). Les inconvénients majeurs de cette technique résident dans le faible rendement de l'étape

d'immortalisation et dans la difficulté à stabiliser les lymphocytes B immortalisés. Récemment pour pallier ce problème, l'addition de séquences oligonucléotidiques immunostimulatrices CpG pendant l'immortalisation a permis d'augmenter l'efficacité d'immortalisation et la stabilité des clones (Bernasconi et al., 2002). De même, l'association de la technique d'immortalisation avec celle de la fusion, impliquant des partenaires humains de fusion augmente la probabilité d'immortalisation et la stabilité des clones (Kozbor et al., 1982b).

De plus, même si l'utilisation de lymphocytes B humains permet de disposer *a priori* de l'ensemble du répertoire immunologique, l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques d'une cible est grandement favorisée lorsque les lymphocytes B proviennent d'individus immunisés/vaccinés. On peut alors sélectionner des lymphocytes B mémoires (Traggiai et al., 2004) mais cela peut se révéler difficile à réaliser dans le cas de pathogènes très virulents ou peu répandus (Toxine Charbonneuse, *Bacillus Anthracis*, *Yersinia Pestis*, VIH, Ricine, ...). Ainsi, des stratégies d'immunisations *in vitro* utilisant des lymphocytes B naïfs ont été développées. Ces stratégies permettent d'obtenir des anticorps humains contre n'importe quelle cible y compris des cibles pour lesquelles des lymphocytes B immunisés ne seraient pas disponibles. Avec l'immunisation *in vitro*, il est difficile d'obtenir des anticorps de haute affinité.

C'est pour cela que divers protocoles d'immunisation *in vitro* ont été développés (seconde partie de ma thèse). D'autre part, la majorité des anticorps obtenus par cette voie sont des IgMs.

L'obtention d'anticorps humains grâce à l'utilisation de lymphocytes B humains reste pour le moment au stade de la recherche et nécessite diverses mises au point. Cependant, cette stratégie ouvre des perspectives intéressantes notamment dans le cadre de l'immunisation *in vitro*.

5.4 Les anticorps optimisés

Une des préoccupations majeures avant les années 2000 était d'obtenir des anticorps monoclonaux thérapeutiques déclenchant peu (ou moins) de réactions immunitaires. Cet objectif a été atteint avec le développement des anticorps humanisés et totalement humains qui sont généralement bien tolérés, même si on observe parfois de faibles réponses HAHA (**H**uman **A**nti-**H**uman **A**ntibodies) pour certains anticorps (Nechansky, 2010), (Bender et al., 2007), (Getts et al., 2010). Depuis environ une dizaine d'années, l'optimisation des propriétés

fonctionnelles et/ou biochimiques des anticorps afin d'améliorer leur efficacité et leur sûreté clinique est devenu importante (Beck et al., 2010). Les propriétés fonctionnelles et/ou biochimiques des anticorps regroupent l'affinité, la spécificité, les fonctions effectrices, la pharmacocinétique, la biodistribution, l'immunogénicité et la toxicité en général. Les modifications des CDR par mutations, des isotypes, du fragment Fc, de la région charnière, du format de l'anticorps permettent d'améliorer les caractéristiques de demi-vie et d'affinité des anticorps. L'ensemble de ces modifications constituent une nouvelle catégorie d'anticorps, les anticorps optimisés.

5.4.1 Amélioration des propriétés de fixation à l'antigène

L'introduction de mutations dans le domaine variable permet de moduler l'interaction antigène/anticorps. On peut ainsi modifier la spécificité fine de l'anticorps, augmenter son affinité ou encore sa stabilité. La modification des paramètres de fixation de l'anticorps à sa cible s'effectue par mutagenèse dirigée ou aléatoire dans la région des CDRs ou la région charpente encadrant les CDRs. Une équipe a ainsi pu obtenir un anticorps dirigé contre la progestérone dont les propriétés de reconnaissance ont été améliorées par la création d'anticorps mutés possédant une plus grande spécificité (évitant des problèmes de réactions croisées précédents), tout en conservant leur affinité sub-nanomolaire (Dubreuil et al., 2006). Par ailleurs, une grande affinité d'un anticorps pour sa cible implique souvent une faible constante de dissociation, ce qui conduit à une meilleure efficacité thérapeutique. Cela est vrai pour les anticorps dirigés contre les molécules solubles comme les cytokines ou les toxines, par exemple la toxine du charbon (Maynard et al., 2002). D'autres travaux ont également montré qu'une fixation prolongée de l'anticorps sur sa cible permettait de recruter plus efficacement le C1q et induisait ainsi une activité CDC plus élevée (Teeling et al., 2004). Mais cette logique pourrait être mise en défaut pour le traitement de tumeurs solides en cancérologie, car les anticorps de forte affinité sembleraient se fixer préférentiellement aux cellules tumorales périphériques réduisant leur taux de pénétration dans les tumeurs solides (Adams et al., 2001).

5.4.2 Amélioration des propriétés effectrices

Dans le but d'améliorer l'activité thérapeutique cytotoxique de la région Fc, des études s'intéressant à l'amélioration du fragment Fc ont été menées. Ces améliorations sont

effectuées de plusieurs façons: choix de l'isotype, introduction de mutations, modification de la glycosylation, ou encore en greffage de molécules cytotoxiques.

5.4.2.1 Importance de l'isotype

Compte tenu de leur caractéristiques (forte spécificité, forte affinité, durée de vie la plus longue), les IgGs sont préférées pour les anticorps thérapeutiques par les laboratoires et les groupes pharmaceutiques. Les fragments Fc des quatre isotypes des IgGs présentent des caractéristiques différentes vis-à-vis des fonctions effectrices. En effet, les IgG1 et IgG3 sont capables de se lier aux trois types de récepteurs (FcγRI, RIIa/c, et RIII), tandis que les IgG4 se fixent uniquement aux récepteurs FcγRI et IIb et les IgG2 aux FcγRIIa. L'isotype de l'immunoglobuline conditionne donc le type de réponse cytotoxique et leur choix est de première importance pour élaborer un anticorps thérapeutique (Jefferis, 2007). La plupart des anticorps utilisés en thérapie sont des IgG1 car ils activent le plus efficacement les fonctions effectrices ADCC et CDC. Ce sont d'ailleurs ceux qui sont rencontrés le plus fréquemment naturellement (60% des IgGs totaux). En ce qui concerne les IgG3, il n'en existe actuellement aucun sur le marché compte-tenu de leur courte demi-vie sérique.

5.4.2.2 Modification de la région Fc

La conception des anticorps utilisés pour leur fonction effectrice doit également prendre en compte les types de récepteurs sur lesquels le Fc se fixe préférentiellement puisqu'ils peuvent être activateurs (FcγRI, RIIa/c et RIIIa) ou inhibiteurs (FcγRIIb). De nombreux travaux ont donc visé à manipuler la région Fc, par l'introduction de mutations, afin de moduler cette réponse effectrice. Une étude a ainsi cartographié les résidus impliqués dans la liaison aux différents récepteurs Fc (Shields et al., 2001). La mutation de certains acides aminés a permis d'augmenter spécifiquement l'affinité du Fc pour le récepteur FcγRIIIa (activateur de la fonction effectrice) et de diminuer l'affinité pour le récepteur FcγRIIb (inhibiteur) (Shields et al., 2001), (Lazar et al., 2006). La combinaison de ces mutations augmente considérablement l'activité effectrice de l'anticorps. Bien que la modulation de la réponse CDC soit moins étudiée, il est également possible d'augmenter la cytotoxicité liée au complément. Ainsi, des variants d'un anticorps anti-CD20 ont vu leur activité CDC augmentée et ceci en corrélation avec une amélioration de l'affinité pour la molécule C1q (Moore et al., 2010). De plus, des substitutions effectuées sur le même variant

ont pu être combinées de façon à améliorer la fixation au récepteur FcγR, optimisant ainsi le répertoire entier des fonctions effectrices cytotoxiques.

5.4.2.3 Amélioration de la glycosylation

La glycosylation (N-glycosylation) joue également un rôle dans la fonction effectrice de l'anticorps en participant au maintien de la structure tertiaire et de la stabilité de l'anticorps (paragraphe 1.6 Modifications post-traductionnelles des Igs, Introduction). La composition en glycanes peut donc moduler l'activité thérapeutique de l'anticorps (Jefferis, 2007). Parmi les différentes glycoformes naturelles, celles qui présentent un faible taux ou sont dépourvues de fucose possèdent une meilleure activité ADCC (Shinkawa et al., 2003). Cette amélioration passe par une augmentation de l'affinité pour le récepteur FcγRIIIa. Ainsi des équipes ont cherché à orienter le profil de glycosylation des anticorps en créant des lignées cellulaires (dérivées des cellules CHO) non productrices de fucose (Kanda et al., 2006), (van Berkel et al., 2010). Etant donné que le choix du système d'expression conditionne le profil de glycosylation, de nombreux travaux visent à modifier des organismes (levures, cellules de mammifères, cellules d'insectes) afin qu'ils produisent des anticorps ayant une glycosylation « humanisée » et optimisée pour une meilleure réponse effectrice.

5.4.2.4 Couplage chimique à des radioéléments ou molécules cytotoxiques

La cytotoxicité d'un anticorps peut également être augmentée par le couplage chimique d'éléments toxiques. Il peut s'agir du greffage de radioéléments qui délivre de fortes doses d'irradiation ciblée par l'anticorps et épargnant ainsi les tissus sains. Parmi les quatre anticorps radio-conjugués commercialisés, se trouvent deux anticorps anti-CD20 : l'ibritumomab[®] (marqué à l'indium 111 pour l'imagerie médicale et à l'yttrium 90 pour la thérapie) et le tositumomab[®] (marqué à l'iode 131) qui traitent des lymphomes. Cependant ces technologies de couplage sont lourdes et compliquées à mettre en œuvre. Leur succès est pour l'instant limité et leur utilisation réservée aux cancers relativement peu avancés (Barbet et al., 2009). Des anticorps « armés » composés d'éléments cytotoxiques moins agressifs pour l'organisme ont également été développés. Le seul immunoconjugué commercialisé est le gemtuzumab, indiqué pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës, où l'anticorps est couplé à la calichéamycine, un antibiotique puissant (provoquant des cassures de l'ADN). D'autres anticorps de ce type sont actuellement en développement clinique. Ils utilisent comme agent cytotoxique des dérivés de la maytansine, ou l'auristatine qui sont agents

antimitotiques très puissants (Haeuw et al., 2009). Des toxines peuvent également être fusionnées aux anticorps, par biologie moléculaire, pour créer des immunotoxines. On retrouve parmi elles la ricine (chaîne A), la toxine diphtérique, l'exotoxine de pseudomonas (PE38) ou encore la toxine cholérique (Sarnovsky et al., 2010). Des anticorps recombinants ont ainsi été produits, dont le BL22, un anti-CD22 fusionné au PE38, qui a permis la rémission totale de patients atteints de leucémie et pour lesquels les traitements classiques avaient échoués (Kreitman, 2009).

5.4.3 Amélioration de la demi-vie

Le récepteur FcRn peut moduler la clairance et donc la durée de vie des anticorps dans le sérum. Une optimisation de la fixation du Fc sur ce récepteur pourrait donc accroître l'efficacité des anticorps et/ou permettre de diminuer les doses thérapeutiques. La modulation de la demi-vie de l'anticorps peut s'effectuer par des substitutions d'acides aminés dans la partie Fc qui modifient son affinité pour le récepteur FcRn (augmentation de la demi-vie de l'anticorps d'un facteur deux (Hinton et al., 2004)), mais également par une optimisation des glycosylations qui améliore l'affinité au récepteur FcRn (Jefferis, 2007). Cependant, le gain d'affinité de ces mutants n'est pas forcément associé à une meilleure pharmacocinétique de ces anticorps (Datta-Mannan et al., 2007). La demi-vie des anticorps, et en particulier des fragments Fab (de plus faible masse), peut également être améliorée par un couplage chimique au polyéthylène glycol (PEG). Le principal effet de la « PEGylation » est d'augmenter la taille de la molécule de sorte qu'elle soit supérieure à la limite de filtration glomérulaire. Cette modification chimique doit être maîtrisée pour ne pas affecter les régions CDR et effectrices, sous peine de modifier la fonction de l'anticorps (Dutertre and Teillaud, 2006). Cette réaction de « PEGylation » a pu par exemple prolonger la durée de vie d'un fragment Fab dirigé contre le TNF α de 14 jours (Choy et al., 2002) ou de fragment F(ab) $'_2$ dirigés contre la toxine botulique A (Mazuet et al., 2010).

6 Les anticorps thérapeutiques sur le marché

6.1 Les différents anticorps monoclonaux sur le marché en 2012

6.1.1 Bilan des types d'anticorps sur le marché

Depuis 1986 et la mise sur le marché du premier anticorps monoclonal thérapeutique le Muromonab, 35 anticorps monoclonaux thérapeutiques et 6 protéines de fusion-Fc (ou immunoadhésines, dérivés d'anticorps (paragraphe 6.2 Les différents formats d'anticorps monoclonaux thérapeutiques, Introduction) ont été approuvés pour un usage clinique, par une ou plusieurs agences mondiales de santé publique régulant la commercialisation des médicaments (la FDA pour Food and Drug Administration aux USA, l'EMA pour European Medicines Agency en Europe, la SDFDA pour China's State Food and Drug Administration en Chine) (Beck et al., 2009), (Jiang et al., 2011).

Les anticorps sont principalement préconisés pour lutter contre les cancers (17 anticorps approuvés) et les pathologies immunologiques et inflammatoires (16 anticorps approuvés, dont un retrait le Raptiva[®] ou Efalizumab). D'autre part, des anticorps thérapeutiques sont également disponibles pour la transplantation (Muromonab, Daclizumab, Belatacept), l'infectiologie (Palivizumab), la médecine cardiovasculaire (Abciximab), l'ophtamologie (Ranibizumab) et le traitement de maladies rares, voire orphelines, pour lesquelles peu de traitements efficaces sont disponibles (Natalizumab pour la sclérose en plaque, Tocilizumab pour la maladie de Castelman). Dans le futur, de nouveaux anticorps ciblant des pathologies comme le diabète de type I ou la maladie d'Alzheimer seront mis à disposition. En effet, 4 nouveaux anticorps sont en cours d'étude clinique de phase III (l'otélixizumab et le téplizumab pour le diabète, le bapineuzumab et le solanézumab pour la maladie d'Alzheimer) en 2012.

6.1.2 Bilan économique des anticorps sur le marché

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques font partis des biomédicaments ou produits biopharmaceutiques. Les biomédicaments connaissent un succès croissant depuis les années 70. L'insuline, l'érythropoétine, l'hormone de croissance et maintenant les anticorps monoclonaux sont les plus connus des biomédicaments. Depuis dix ans, la proportion des

anticorps thérapeutiques dans le marché des biomédicaments ne cesse d'augmenter pour atteindre près de 50% en 2010. Ils représentent un marché estimé à plus de 50 milliards de dollars, ce qui correspond à environ 6% du marché total des produits pharmaceutiques en 2010. Parmi la quarantaine d'anticorps et dérivées approuvés pour un usage thérapeutique, 6 génèrent plus de 90% des ventes : l'étanercept-Enbrel™ (7,3 Md \$), le bevacizumab-Avastin® (7 Md \$), le rituximab-Rituxan® (6,9 Md \$), l'adalimumab (6,5 Md \$), l'infliximab (6,5 Md \$) et le trastuzumab-Herceptin® (5,9 Md \$). Ces 6 biomolécules se situent d'ailleurs dans les 15 produits pharmaceutiques les plus vendus en 2010 et correspondent aux meilleures ventes dans leurs indications respectives, à savoir l'oncologie et l'inflammation.

Les retombées économiques importantes générées par les anticorps thérapeutiques ont permis aux grands groupes pharmaceutiques d'investir dans la recherche et d'acquérir des compagnies de biotechnologie spécialisées dans le développement de nouveaux formats d'anticorps qui pourraient révolutionner le traitement de certaines pathologies, comme le cancer, dans les années à venir. On estime qu'en 2014, la moitié des 100 molécules les plus vendues seront des biomolécules, dont une part importante sera constituée par les anticorps monoclonaux ou dérivés (Strohl, 2009). En effet, un nombre important de biomolécules ou d'anticorps monoclonaux entrent en essai clinique. Depuis 2007, environ 40 nouveaux anticorps monoclonaux entrent chaque année en phase clinique et on compte actuellement près de 300 nouveaux anticorps et une vingtaine d'immunoadhésines en cours d'essais (phase I, II ou III) (Reichert, 2011).

6.2 Les différents formats d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

Il existe une grande diversité de format d'anticorps en fonction du mode d'action thérapeutique de l'anticorps. Aujourd'hui sur le marché, la majorité des anticorps utilisés en clinique sont des immunoglobulines entières de type IgG1. Il existe tout de même quelques IgG2 (Panitumumab, Denosumab), IgG4 (Natalizumab). Les fragments d'anticorps Fab sont présents (4) et des anticorps conjugués à des toxines, radionucléides ou à du polyéthylène glycol (PEG) sont également utilisés. Un nouveau type d'anticorps est en plein essor : les immunoadhésines. Ils représentent 7 anticorps présents sur le marché et 4 en phase III. Les immunoadhésines résultent de l'association de domaines fonctionnels d'une protéine (site de liaison d'un récepteur, d'un ligand) et du fragment Fc d'un anticorps (Capon et al., 1989). De plus, il existe en développement (essais cliniques de phase II (Wurch et al., 2009)),

un autre format d'anticorps, les dAb pour « single domain antibody », qui sont des fragments d'anticorps à domaine unique (Chames and Baty, 2009b). Ils sont exprimés naturellement chez les camélidés (lamas, chameaux), et certaines espèces de requin (Figure 11). L'avantage de telles molécules découle de leur petite taille tout en conservant une grande affinité pour leur cible. Ces molécules peuvent être utilisées seules comme petites molécules thérapeutiques, par exemple en cancérologie pour pénétrer plus facilement les tumeurs solides (Behar et al., 2009), ou comme base pour élaborer des molécules plus complexes. Un autre format correspond au anticorps bispécifiques dirigés contre des épitopes différents, étendant ainsi la fonction de l'anticorps classique (Chames and Baty, 2009a). D'autre part, un format atypique d'anticorps existe. Le Catumaxomab, une IgG2 hybride rat/souris, présente la particularité d'être le seul anticorps bispécifique (anti-CD3 et anti EpCAM) sur le marché. De façon analogue, on pourrait imaginer des fragments d'anticorps tri- ou tétra-valents, scFv ou diabodies qui pourraient faire partie de la prochaine génération de « molécules dérivées d'anticorps » (Dutertre and Teillaud, 2006).

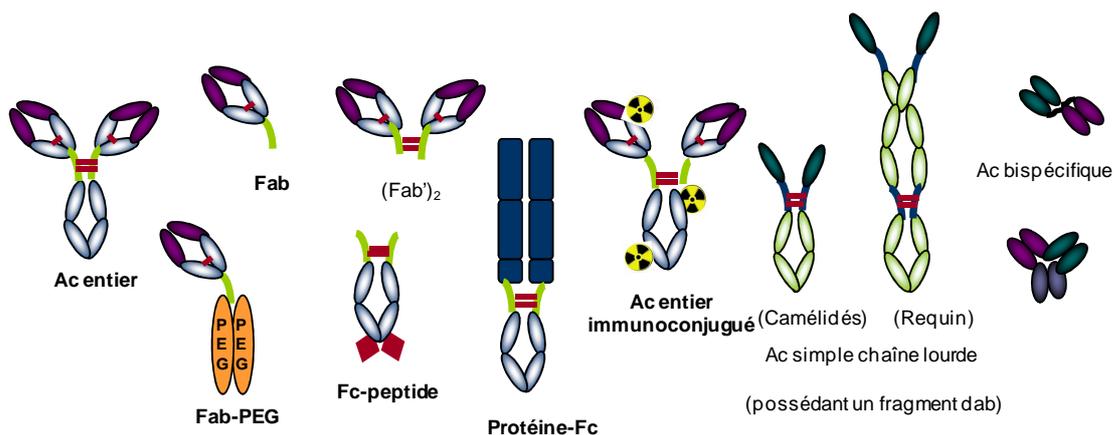


Figure 11. Les différents formats d'anticorps thérapeutiques sur le marché et en développement (liste non exhaustive). Les molécules présentes sur le marché sont écrites en gras. D'après (Beck et al., 2009).

6.3 Cibles et mode d'action des anticorps

Les anticorps utilisés à des fins thérapeutiques peuvent exercer différents modes d'action selon la cible et la pathologie à traiter (Figure 14). Le choix de la molécule cible est majeur puisque cela définit l'efficacité de l'anticorps et les effets secondaires qu'il pourrait entraîner.

Les cibles des anticorps peuvent être classées en deux types :

- 1) antigènes solubles

2) antigènes membranaires

Selon la cible, le mode d'action varie.

6.3.1 Les anticorps neutralisant un antigène soluble

La fixation d'un anticorps neutralisant a pour effet de bloquer l'activité biologique de l'antigène sur sa cible. Ainsi l'inhibition de la liaison de l'antigène (toxines, cytokines, chimiokines, ...) sur son récepteur spécifique va bloquer la voie de signalisation normalement induite. Ces anticorps neutralisants représentent un peu moins d'un tiers des anticorps sur le marché. Les molécules ciblées sont principalement des cytokines comme le TNF α (**T**umor **N**ecrosis **F**actor α) ou des interleukines (IL-12/IL-23, IL-1, IL-6). On retrouve également un composant du complément (C5) et des facteurs de croissance (VEGF (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor), et EGFR (**E**pidermal **G**rowth **F**actor). Les anticorps monoclonaux ciblant les toxines ne sont pas encore présents sur le marché mais en cours de développement. En ce qui concerne la neutralisation de virus, les anticorps agissent de la même façon en se fixant à la protéine d'enveloppe responsable de la liaison de la particule virale à sa cible cellulaire, bloquant ainsi son entrée et l'infection de la cellule (Abès et al., 2009). Les anticorps peuvent également immobiliser et agglutiner les agents infectieux, et favoriser l'opsonisation et leur destruction (phagocytose, ADCC et CDC).

6.3.2 Les anticorps liant un antigène membranaire

Les antigènes liant un antigène membranaire représentent la plupart des anticorps monoclonaux ayant reçu une AMM ou en développement. Dans ce cas, l'anticorps se lie à l'antigène présent à la surface de la cellule cible, et peut déclencher un large type d'effets (Figure 12). Les effets directs peuvent conduire à la mort cellulaire (apoptose), l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation telles que l'activation de la production de cytokines, la différenciation, la migration cellulaire ou le blocage de récepteurs membranaires. D'autres effets, cette fois-ci indirects, peuvent induire une cytotoxicité, passant par l'activation des fonctions effectrices de l'anticorps qui recrute alors des effecteurs cellulaires (ADCC) ou moléculaires (CDC) (Abès et al., 2009). Les cibles membranaires des anticorps peuvent être des récepteurs de facteurs de croissance (EGF-R, HER-2) ou de cytokines (CD25), des molécules d'adhérence impliquées dans les interactions cellulaires (Ep-CAM (**E**pithelial **C**ell **A**dhesion **M**olecule), intégrine VLA-4, LFA-1 (**L**eukocyte **F**unction **A**ssociated **A**ntigen),

molécule CD11a) ou des protéines transmembranaires (CD20, CD33, CAMPATH-1/CD52). Les nouvelles cibles en cours d'évaluation sont essentiellement des récepteurs ou des molécules impliquées dans le contrôle de l'activation cellulaire.

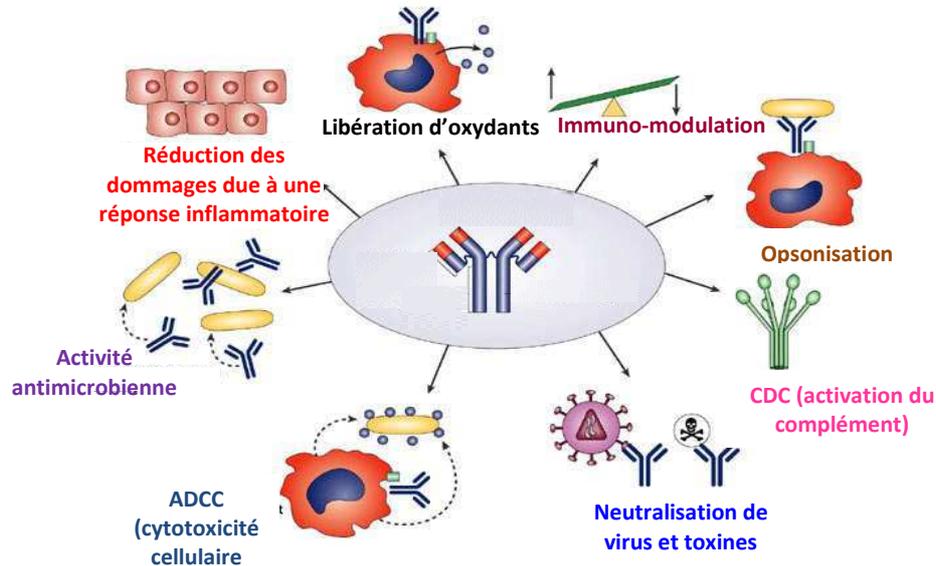


Figure 12. Les différents effets biologiques des anticorps thérapeutiques. D'après (Casadevall et al., 2004).

6.4 Limitations des anticorps thérapeutiques

Il existe des limitations importantes qui freinent l'utilisation massive des anticorps en clinique. Parmi ces limitations, la principale est celle du coût excessif des traitements et dans des cas plus rares, la survenue d'effets indésirables graves.

6.4.1 Les systèmes de production des anticorps et leur coût

Les anticorps sont produits en cellules eucaryotes à cause de leur forme multimérique ou des glycosylations post-traductionnelles qu'ils subissent. La plupart des anticorps thérapeutiques sont produits par des cellules mammaliennes de type CHO (issues d'ovaires de hamster chinois), NS0 ou SP2/0 (deux lignées de myélome murin) (Cochet and Chartrain, 2009). Des nouveautés dans les milieux de culture, dans les vecteurs d'expression et dans les lignées cellulaires utilisés ont permis d'améliorer le rendement de production en anticorps. Par exemple, des lignées cellulaires optimisées sont capables de produire plusieurs grammes d'anticorps par litre de milieu de culture contre quelques milligrammes avant optimisation (Cochet and Chartrain, 2009). 200 millions d'euros d'investissement pour 200 kg d'anticorps

par an (Olivier and Mehtali, 2009) sont nécessaires pour produire des anticorps dans ces systèmes.

D'autre part, les anticorps utilisés en thérapie sont très coûteux (nombreuses injections et doses) et représentent plusieurs milliers d'euros (de 1000 à 5000) par mois et par patient (Olivier and Mehtali, 2009). Par exemple, les patients traités avec le Rituximab reçoivent de 8 à 16 doses d'anticorps correspondant à 6 ou 12 g de Rituximab par patient (O'Brien et al., 2001). Des procédés de production coûteux superposés au coût thérapeutique mènent à développer de nouveaux systèmes de production plus économes. Ainsi, des levures (*Pichia Pastoris*), des champignons filamenteux (*Aspergillus niger*) (Ward et al., 2004), des cellules d'insectes (Edelman et al., 1997), des cellules aviaires (Olivier et al., 2010), des organismes transgéniques végétaux (feuilles de tabac) (Lai et al., 2010), ou des animaux (souris) (Tang et al., 2008) ont été utilisés pour produire à moindre coût des anticorps thérapeutiques. Le système bactérien, le système de production le moins coûteux, n'est pas adapté à la production d'anticorps entiers qui sont des protéines trop complexes. Cependant, il a été envisagé la production de petits fragments d'anticorps de type scFv par des bactéries (Arbabi-Ghahroudi et al., 2005). La découverte des anticorps de camélidés dont la partie variable n'est composée que d'une chaîne lourde, a relancé l'intérêt pour ce système de production (Harmsen and De Haard, 2007). En effet, ce petit fragment variable de 12 kDa, nommée sDAb (single domain antibody) ou VHH, est facilement produit en bactéries avec de très bons rendements. D'ailleurs, la société Ablynx produit et exploite commercialement ce type de fragments d'anticorps (les nanobodies), dont certains sont en cours d'évaluation clinique pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ou du cancer.

La recherche dans le domaine de la production des protéines thérapeutiques est très active et de nombreux systèmes de production alternatifs aux cellules mammaliennes sont en cours d'étude. Dans un avenir proche, de nouvelles plateformes de production d'anticorps monoclonaux devraient être approuvées et permettre une baisse progressive des coûts tout en améliorant les propriétés cliniques de ces agents thérapeutiques (Olivier and Mehtali, 2009). De plus, l'émergence du concept d'anticorps « biosimilaires », à la manière des versions génériques des petites molécules chimiques, devrait également contribuer à la baisse du prix des traitements (Reichert et al., 2009). Les biosimilaires sont « des nouvelles versions similaires au produit biologique de référence en termes de qualité, d'efficacité et de sécurité ». Ce sont des formes génériques des molécules dont le brevet a expiré.

6.4.2 Effets indésirables

Les anticorps possèdent un taux d'approbation de 20%. Ce taux est plus élevé que pour les petites molécules chimiques, d'environ 5% (Reichert et al., 2005). Ceci s'explique par les caractéristiques propres des anticorps : grande spécificité pour leur cible, longue demi-vie et une bonne tolérance générale chez l'homme. Cependant chez les patients traités, les anticorps thérapeutiques ne sont pas sans effet toxique, effets qui peuvent parfois être très graves et difficiles à prévoir.

Ces effets toxiques sont regroupés en cinq catégories : les infections opportunistes, le syndrome cytokinique, les pathologies autoimmunes, la toxicité d'organe et l'immunogénicité (Pallardy,2009).

OBJECTIFS DES TRAVAUX
DE THESE

Le nombre des anticorps monoclonaux utilisé en thérapeutique ne cesse d'augmenter. Les premiers anticorps monoclonaux utilisés en thérapie furent des anticorps monoclonaux issus de souris. L'administration des anticorps monoclonaux murins peut provoquer chez l'Homme des réactions immunitaires telles que la production d'anticorps anti-immunoglobulines de souris (HAMAs) ou encore des chocs anaphylactiques. Ces effets secondaires peuvent entraîner une diminution de l'efficacité thérapeutique des anticorps murins. Afin de diminuer, voire de supprimer ces effets secondaires, plusieurs stratégies ont été développées : production d'anticorps chimériques (murin/humain), humanisation des anticorps murins et production d'anticorps humains. De nombreux laboratoires et groupes pharmaceutiques se sont intéressés à la production d'anticorps humains durant ces dernières années. Aujourd'hui, il existe neuf anticorps monoclonaux humains sur le marché. Trois stratégies peuvent être utilisées pour la production d'anticorps monoclonaux humains : le phage display, les souris transgéniques et l'utilisation de lymphocytes B humains.

Le Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Immunoanalyse (LERI) est spécialisé dans la production d'anticorps monoclonaux murins et leur utilisation à des fins analytiques dans des domaines très divers, tels que les maladies à prion ou le bioterrorisme. Récemment, le laboratoire a décidé de développer la production d'anticorps monoclonaux humains à partir de lymphocytes B humains pour des applications thérapeutiques. C'est donc dans ce dernier cadre que s'insère mon projet de thèse.

Dans notre laboratoire, nous avons décidé d'utiliser les lymphocytes B en développant deux approches basées sur la technique d'immortalisation par le virus Epstein-Barr (EBV) couplée ou non à une fusion cellulaire. La première approche utilise des lymphocytes B mémoires du sang périphérique isolés à partir de donneurs infectés ou vaccinés tandis que la seconde stratégie implique l'immunisation *in vitro* des lymphocytes naïfs de sang périphérique.

Pour la première approche, nous avons utilisé comme modèle l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB), car la plupart des personnes ont été en contact avec cet antigène. Après vérification de la présence d'anticorps anti-SEB circulant dans le sang par la technique ELISA, les cellules mononuclées du sang (PBMCs) ont été extraites. Les

lymphocytes B mémoires ont été purifiés et cultivés en présence du virus Epstein-Barr (EBV) afin de les immortaliser (1^{ère} partie de la thèse).

La seconde approche implique une immunisation *in vitro* de lymphocytes B naïfs extraits de sang périphérique (2^{ème} partie de la thèse). Cette stratégie pourrait permettre la production d'anticorps monoclonaux humains contre les antigènes pour lesquels il n'existe pas de donneurs infectés ou vaccinés. Nous avons utilisé pour cette stratégie deux modèles :

- un peptide (TBA-Nter) de la partie N-terminale du domaine de liaison de la toxine botulique A qui est la toxine la plus puissante actuellement connue,
- une protéine de fusion constituée de la protéine Tat101 (14 kDa) du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et du domaine (ZZ) de 11 kDa de la protéine A de *Staphylococcus aureus* capable de lier les fragments Fc des immunoglobulines de surface.

Nous avons étudié au cours de ce travail l'influence des cytokines et des différents types cellulaires sur l'efficacité de l'immunisation « *in vitro* ». Enfin, nous avons réalisé différentes expériences afin de déterminer quelles étaient les régions de la protéine de fusion responsables de la réponse humorale « *in vitro* ».

MATERIELS ET METHODES

Dans un premier temps, les produits utilisés (peptide N-terminal de la BoNT/A (TBA-Nter), Entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB), ZZ, Tat101, ZZTat101) et leur production seront décrits. Dans un second temps, une section sera consacrée à la purification et la sélection des cellules à partir de sang et de PBMCs. Une explication de l'immortalisation par le virus Epstein-Barr et de sa production sera faite, avant de développer les différents protocoles d'immunisations *in vitro*. Une mise en place de deux protocoles d'immunisation *in vitro* avec le peptide N-terminal de la toxine botulique A sera étudiée. Par la suite, une amélioration du protocole d'immunisation *in vitro* sera réalisée avec une protéine de fusion originale, ZZTat101. Les dernières sections de ce Matériels et Méthodes seront consacrées à la fusion et la production d'hybridomes ainsi qu'aux différents dosages immunologiques permettant de révéler les anticorps spécifiques de chacune des cibles utilisées.

1 Matériels utilisés

1.1 Peptide N-terminal de la BoNT/A : TBA-Nter (2 kDa)

La synthèse du peptide BoNT/A N-terminal (peptide TBA-Nter) (H-Pro-Phe-Asn-Lys-Gln-Phe-Asn-Tyr-Lys-Asp-Pro-Val-Asn-Gly-Val-Asp-Ile-OH) est réalisée en utilisant la stratégie Fmoc/*tert*-butyl à l'aide d'un synthétiseur (Applied Biosystems 433A synthétiseur). Le clivage du peptide de la résine et la déprotection des groupements chimiques protégeant les fonctions réactives des acides aminés sont réalisés par un mélange d'acide trifluoroacétique/triisopropylsilane/eau (9.5/0.25/0.25, v/v/v). Le produit final a été précipité 2 fois dans de l'ether *tert*-butyl methyl froid et dissout dans 15% d'acide aqueux. Le peptide est par la suite purifié par HPLC sur une colonne C18.

1.2 Entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB)

L'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* provient de chez Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) (Référence S4881).

1.3 Tat, ses dérivés et les protéines de fusion ZZTat101

1.3.1 Tat101 et peptides Tat101

Tat101 et cinq peptides recouvrant la séquence de la protéine Tat101 sont utilisés P1 (1-15), P10 (46-60), P15 (66-80), P16 (71-85), P18 (86-101) (4 peptides de 15 acides aminés et un de 16 acides aminés).

1.3.1.1 Tat101

La synthèse de Tat101 est réalisée en utilisant la stratégie Fmoc/*tert*-butyl (Applied Biosystems 433A synthétiseur) sur 0.1 mmol de résine Fmoc-Asp(OtBu)-AL-PEG-PS en employant 10 excès molaire de chaque acide aminé, un mélange dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole comme agent de couplage et un mélange diisopropylethylamine/*N*-methyl pyrrolidone pour la déprotection du groupement Fmoc. L'incorporation de la Gln54 a été réalisée manuellement deux fois. Le clivage et la déprotection finale sont effectués par un mélange d'acide trifluoroacétique/triisopropylsilane/eau (9.5/0.25/0.25, v/v/v). Le produit final a été précipité 2 fois dans de l'ether *tert*-butyl methyl froid et dissout dans 15% d'acide aqueux. La protéine a été ensuite purifiée en HPLC sur une colonne Jupiter C4. Les groupements protecteurs S(tBu) ont été retirés des cystéines en utilisant un tampon phosphate 0.1 M dégazé, pH 8.5, contenant 6 M d'urée et de dithiothreitol (50 eq/Cys). Le mélange a été acidifié à pH 2.2 et purifié en HPLC sur une colonne Jupiter C4.

Les protéines Tat101 produites réduites ont été conservées à -20°C.

1.3.1.2 Peptides Tat101

Les cinq peptides de Tat101 ont été synthétisés par la stratégie Fmoc sur le synthétiseur 357 Advanced ChemTec multiple peptide. Les peptides ont été fabriqués avec une résine amide et ont été acétylés en N-terminal par de l'anhydride acétique. Le clivage et la déprotection des peptides ont été effectués comme décrit précédemment et la purification est réalisée sur une colonne Vydac C18 reverse phase (Hesperia, CA).

Les peptides et protéines synthétisés ont été caractérisés par spectrométrie de masse et par séquençage des acides aminés.

1.3.2 Les protéines de fusion ZZTat101

1.3.2.1 ZZ

On utilise un vecteur pCP dans lequel on a inséré la séquence codante pour la protéine ZZ. ZZ est obtenue suivant un protocole décrit précédemment (Drevet et al., 1997; Fromen-Romano et al., 1999).

1.3.2.2 ZZTat101

ZZTat101 a été obtenue en utilisant une séquence synthétique codant pour Tat101 (Séquence consensus déterminée auparavant) (Kittiworakarn et al., 2006).

SEQUENCE SYNTHETIQUE

GGTACCCATGGAGCCAGTAGATCCGAAACTGGAGCCCTGGAAGCATCCAG
GTAGCCAGCCTAAGACTGCTTGTAACAAGCTGCTATTGTAAAAAGTGTTGC
TTTCACTGCCAGGTTTGTTCACCAAAAAGGCCTGGGCATCTCCTATGG
CCGCAAGAAGCGCCGTCAGCGCCGCGTGCTCCGCAGGACAGCCAGACTC
ACCAGGTTTCTCTGTCCAAGCAGCCGGCATCCCAGCCCCGCGGTGACCCG
ACTGGCCCGAAGGAATCCAAGAAGAAGGTGGAGCGCGAGACCGAGACTGA
TCCGGTGGATTAGGATCC (les sites de restriction pour *KpnI* et *BamHI* sont en italiques)
La séquence codante pour Tat101 est insérée dans le vecteur pCP codant pour la protéine ZZ avec des sites de restriction *KpnI/BamHI* ouverts (Fromen-Romano et al., 1999).

1.3.2.3 ZZTat22-57

ZZTat22-57 représente la région 22-57 de Tat101 fusionnée à ZZ.

SéquenceTat22-57:

GGTACCCAGCAATAATTCCTATAGCAAAAAAAGCAGCTTTCATAGCCAGG
TGAGCTTTACCAAAAAGGCCTGGGCATTAGCTATGGCCGTAAAAAACGT
CGTCAGCGTCGTCGTTAAGGATCC (*KpnI* et *BamHI* sites de restriction en italiques). La séquence codante pour Tat22-57 est insérée dans un vecteur pCP codant pour la protéine ZZ avec des sites de restriction *KpnI/BamHI* ouverts (Fromen-Romano et al., 1999).

Au sein du laboratoire, nous disposons de deux versions de ZZTat22-57 : ZZTat22-57_{C(22-37)S} correspondant à ZZTat22-57 avec sept cystéines de Tat mutées en sérines dans la région 22-37 et ZZTat22-57 contenant les sept cystéines. 10 mM de Zinc ont été ajouté au tampon pour bloquer la formation des ponts disulfures entre les cystéines.

La même procédure que pour ZZTat101 a été utilisée pour exprimer ZZTat22-57_{C(22-37)S} et ZZTat22-57.

1.3.2.4 ZZTat101Ø

ZZTat101Ø correspond à ZZTat101 sans la capacité à lier les héparane sulfates. ZZTat101Ø a été dérivée de la forme native de ZZTat101. ZZTat101 a été acétylé en présence d'excès d'anhydride acétique (x81). 0,525 mg de ZZTat101 sont resuspendues dans 0,4 ml de tampon Phosphate pH 7,5 puis 4 µL d'anhydride acétique sont ajoutés pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. La réaction est stoppée par l'ajout de 0,1mL de Glycine 0,1M dans du tampon Phosphate pH 7,5. Le mélange réactionnel a été déposé sur une colonne PD10 et élué avec de l'acide acétique 0,5M pH 3,4. Les fractions contenant la protéine ont été lyophilisées.

2 Culture cellulaire

2.1 Comptage des cellules

L'ensemble des comptages ou numération est effectué sur Cellules de Malassez. Le nombre de cellules par ml est obtenu par la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de cellules comptées}}{\text{Nombre de bandes comptées}} \times 10^3 \times \text{facteur de dilution} = \text{Nombres de cellules/ml}$$

Le nombre de cellules totales est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Nombres de cellules/ml} \times \text{Volume Total} = \text{Nombres de cellules totales}$$

2.2 Culture des différentes souches

Les cellules des myélomes murin NS1, SP2/O-Ag14 et X63 Ag8.653 et de l'hétéromyérome humain/murin HM (gracieusement fourni par le Dr Nato, Institut Pasteur,

France) sont cultivées en milieu RPMI 1640 1X contenant 10 % de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté (la décomplémentation s'effectue par chauffage pendant 30 min à 56°C), 1 % glutamine, 1 % pyruvate de sodium et 1% pénicilline/streptomycine contenant 130 µM 8-Azaguanine (Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) et sont incubées à 37°C sous 7 % CO₂. La 8-Azaguanine empêche la dérive des myélomes.

Les hybridomes issus des fusions sont cultivés en milieu RPMI 1640 1X contenant 10% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté, 1% glutamine, 1 % pyruvate de sodium et 1% pénicilline/streptomycine et sont incubées à 37°C sous 7% CO₂.

2.3 Conservation des cellules

2.3.1 Congélation à -196°C

Les cellules sont centrifugées 10 min à 1500 tours/min, comptées (paragraphe précédent 2.1 Comptage des cellules, Matériels et Méthodes) et resuspendues à 1×10^7 cellules/ml en SVF décomplémenté additionné de 5 % de DMSO. Les cellules ainsi préparées en cryotube sont stockées 1 h à -20°C puis 24 h à -80°C avant d'être transférées en azote liquide à -196°C.

2.3.2 Décongélation à -196°C

Toutes les cellules sont décongelées à 37°C en RPMI 1640 1X puis centrifugées 10 min à 1500 tours/min et resuspendues dans le milieu de culture adéquat préchauffé à 37°C.

3 Purification des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs)

Les cellules mononuclées du sang périphérique sont composées des globules blancs ou leucocytes c'est-à-dire les monocytes et les lymphocytes. Ils sont appelés les PBMCs et sont obtenus à partir du sang grâce à une séparation par centrifugation sur gradient de densité. Après centrifugation du sang, les érythrocytes et granulocytes sédimentent au fond du tube.

Les lymphocytes et monocytes sont isolés sous la forme d'un anneau blanc au dessus du gradient de densité.

3.1 Origine du matériel

Le sang est obtenu de l'Etablissement Français du Sang de Rungis (EFS Rungis, France) sous forme de poche de donneur individuel (50 ml) ou de mélange de cinq donneurs (250 ml). Les prélèvements sanguins ont été effectués, dans la matinée, sur des volontaires sains, hommes et femmes, entre 25 et 65 ans. Le sang a été récolté dans des poches traitées au citrate de sodium. Le sang est négatif pour HIV-1/2, HTLV-I/II, HCV, HBsAg.

3.2 Purification des PBMCs

Trente mL de sang sont centrifugés sur un volume de 20 ml d'Histopaque 1077 (Histopaque de densité $1,077 \pm 0,001$, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) à 1200 g sans frein pendant 30 minutes à température ambiante. Cette étape est réalisée une ou deux fois. Le plasma est récupéré au dessus de l'anneau de globules blancs et conservés à -80°C pour des tests ultérieurs en ELISA. Les PBMCs concentrées dans un anneau au dessus du gradient de densité Histopaque (Figure 13) sont récupérées et lavées 1 fois dans du PBS (PBS: Phosphate Buffer Saline: 10 mM de phosphate de potassium pH 7.4 et 150 mM de chlorure de sodium) supplémenté en EDTA 2 mM par centrifugation à 250 g pendant 10 minutes. S'il y a des globules rouges, ils sont éliminés par une lyse à température ambiante pendant 5 minutes en tampon de lyse des globules rouges (Tampon de lyse des GRs : 8,3g NH_4Cl ; 0,84 g NaHCO_3 ; 0,5 mL EDTA 0,2M, QSP 1L eau MilliQ). Les cellules sont lavées et resuspendues dans 2 mL de PBS supplémenté en EDTA 2 mM pour être comptées.

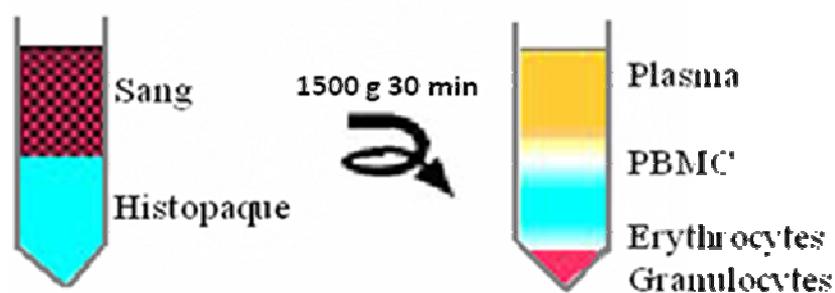


Figure 13. Purification des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs).

Les PBMCs obtenues après purification sur un gradient d'Histopaque ont été mises en culture dans un milieu RPMI-1640 1X avec 10 % SVF décomplémenté, 2 mM L-Glutamine, 50 µg/ml Pénicilline/Streptomycine et supplémenté avec 50 µM β Mercaptoéthanol.

4 Préparation des cellules

Pour nos expériences d'immunisation *in vitro* (seconde partie de ma thèse), différents types cellulaires sont utilisés : PBMCs, monocytes, monocytes déplétés en natural killer, lymphocytes B purifiés, PBMCs totaux déplétés en natural killer. L'ensemble de ces fractions cellulaires est obtenu par la technique de sélection positive/négative par billes magnétiques commercialisées par Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Allemagne).

4.1 Tampon utilisé

Pour toutes les étapes de sélection et de déplétion de cellules, les cellules et les billes magnétiques sont resuspendues en tampon MACS (tampon Miltenyi Biotec) composé de PBS pH 7,4 sans Mg²⁺ sans Ca²⁺ (Invitrogen) supplémenté avec 0,5 % BSA. Ce tampon est filtré sur 0,22 µM et dégazé à température ambiante pendant 30 minutes puis conservé tout le temps des expériences à 4°C.

4.2 Préparation des Monocytes

4.2.1 Purification des monocytes

Les monocytes représentent environ de 5 à 15% des PBMCs et sont des cellules qui évoluent en macrophages et en cellules dendritiques. Leur marqueur spécifique est le CD14. La technique de séparation cellulaire immunomagnétique (Human CD14 Miltenyi Biotec) permet d'isoler les monocytes à partir des PBMCs par sélection positive. Elle est réalisée en utilisant des microbilles magnétiques conjuguées à des anticorps monoclonaux anti-CD14 et une colonne de séparation LS (MACS, Miltenyi) (Figure 14). 5x10⁸ PBMCs sont utilisées pour la sélection des monocytes. Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot de PBMCs est resuspendu dans 4 ml de tampon MACS et incubé avec 1 ml de

microbilles anti-CD14 (Miltenyi Biotec human CD14 MicroBeads) à 4°C pendant 15 minutes.

Les PBMCs sont lavées dans un volume de tampon MACS 10 à 20 fois supérieur à leur volume initial soit 50 ml, centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à 4°C puis diluées dans 2,5 ml de tampon MACS. Le mélange cellules/microbilles est déposé sur une colonne de sélection (LS, Miltenyi Biotec) soumise à un champ magnétique. Dans ces conditions seules les cellules couplées aux microbilles via l'anticorps anti-CD14 vont rester sur la colonne. La colonne est lavée trois fois avec 3 ml de tampon MACS, puis, hors champ magnétique, les monocytes sont élués avec 5 ml de tampon MACS. La quantité de monocytes et de non monocytes (cellules non retenues sur la colonne) est alors mesurée en cellule de Malassez, et la pureté évaluée en cytométrie en flux.

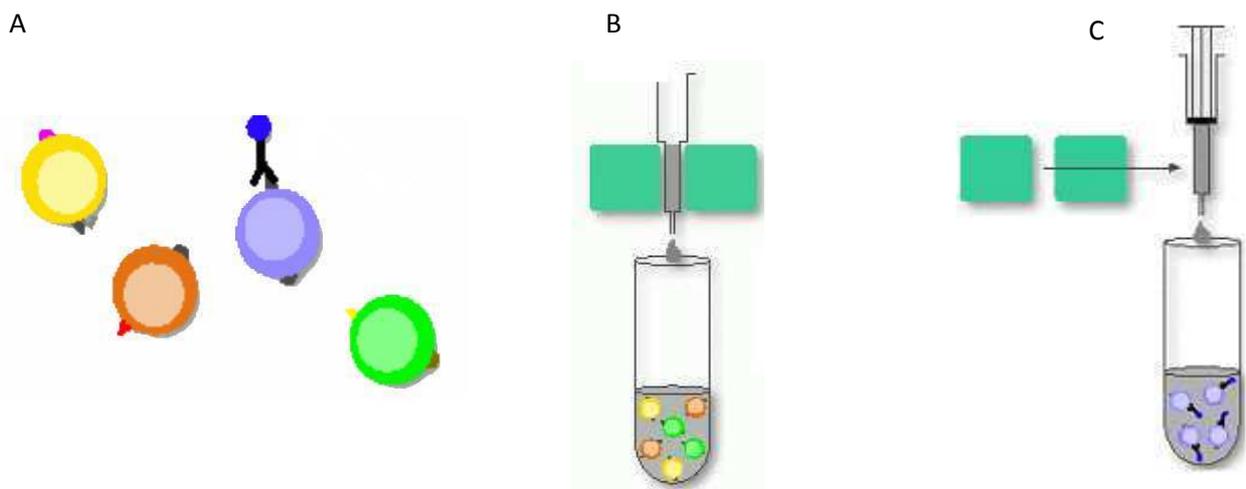


Figure 14. Principe de la purification des monocytes par tri magnétique. Extrait de chez Miltenyi Biotec.

A : Les PBMCs sont incubées en présence d'anticorps anti-CD14 couplés à des billes magnétiques

B : Les PBMCs sont déposées sur une colonne aimantée soumise à un champ magnétique

Les cellules CD14⁺ (monocytes) couplées aux billes magnétiques se fixent alors sur la colonne, les cellules CD14⁻ (non monocytes) passent à travers la colonne.

C : Les monocytes sont élués hors du champ magnétique

4.2.2 Contrôle de la pureté des monocytes

Après purification, un aliquot des monocytes est analysé par cytométrie en flux (FACS) en utilisant un marquage anti-CD14 humain-PE (phycoérythrine) (BD Biosciences, Etats-Unis). Les monocytes sont caractérisés par un phénotype CD14+.

4.2.3 Mise en culture des monocytes

500 000 monocytes humains purifiés/puits sont déposés dans une plaque 24 puits en milieu RPMI-1640 1X avec 10 % SVF décomplémenté, 2 mM L-Glutamine, 50 µg/ml Pénicilline/Streptomycine et supplémenté avec 50 µM β Mercaptoéthanol. Les monocytes sont activés par du GM-CSF 25 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 2,5 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) et de l'IL-4 50 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 5 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) et sont maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 6 jours.

4.3 Elimination des Natural Killer de la fraction négative en monocytes

4.3.1 Elimination des NK

Les cellules NK ou lymphocytes NK sont généralement définies comme des cellules cytotoxiques se présentant comme des lymphocytes pourvus de gros granules (LGL), mais ne possèdent aucun des marqueurs spécifiques des lymphocytes T (pas de CD3 ni de TCR) et des lymphocytes B (CD19, CD20 ni BCR). La plupart des cellules NK humaines expriment constitutivement les antigènes CD16 (Fc RIIIA), et CD56 (NCAM). Ils sont impliqués dans la réponse cytotoxique et représentent de 5% à 10% des PBMCs et des cellules sanguines. La technique de séparation cellulaire immunomagnétique (Human CD56 Miltenyi Biotec) permet d'éliminer les NK de la fraction obtenue après la purification des monocytes par sélection positive. Elle est réalisée en utilisant des microbilles magnétiques conjuguées à des anticorps monoclonaux anti-CD56 et une colonne de séparation LS (MACS, Miltenyi). 3x10⁸ cellules de la fraction négative en monocytes sont utilisées. Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes à 4°C, les cellules culotées sont resuspendues dans 2,4 ml de tampon MACS et incubées avec des 600 µl d'anticorps anti-CD56 (Miltenyi Biotec human CD56

MicroBeads) à 4°C pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées dans un volume de tampon MACS 10 à 20 fois supérieur à leur volume initial soit 50 ml, centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à 4°C et diluées dans 1,5 ml de tampon MACS. Le mélange cellules/Microbilles est déposé sur une colonne de sélection (LS, Miltenyi Biotec) soumise à un champ magnétique. Dans ces conditions seules les cellules couplées aux microbilles via l'anticorps anti-CD56 vont rester sur la colonne. La colonne est lavée trois fois avec 3 ml de tampon MACS. La fraction sans natural killer passe à travers la colonne et est récupérée avec le lavage. Une numération est alors effectuée en cellule de Malassez, et la pureté évaluée en cytométrie en flux.

4.3.2 Contrôle de l'élimination des NK

Après déplétion, un aliquot de la fraction négative en monocytes et sans NK est analysé par cytométrie en flux (FACS) en utilisant un marquage anti-CD56 humain-PE (phycoérythrine) (BD Biosciences, Etats-Unis). Les monocytes dépourvus en NK sont caractérisés par un phénotype CD14+/CD56-.

4.3.3 Mise en culture

Deux millions de cellules dépourvues en monocytes et en NK humains sont déposés par puits d'une plaque 24 puits en milieu RPMI-1640 1X avec 10 % SVF décomplémenté, 2 mM L-Glutamine, 50 µg/ml Pénicilline/Streptomycine et supplémenté avec 50 µM β Mercaptoéthanol et sont maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 6 jours.

4.4 Lymphocytes B

4.4.1 Purification des lymphocytes B

Le lymphocyte B est la cellule responsable de l'immunité humorale et de la production des anticorps. Il existe différents types de lymphocytes B, mais le plasmocyte correspond au lymphocyte B différencié en cellule productrice d'anticorps. Les lymphocytes B représentent 10 à 15 % des lymphocytes sanguins. Leurs marqueurs membranaires spécifiques sont le CD19 ou le CD20. La technique de séparation cellulaire immunomagnétique (Human CD20 Miltenyi Biotec) permet d'isoler les lymphocytes B à partir des PBMCs par sélection

positive. Elle est réalisée en utilisant des microbilles magnétiques conjuguées à des anticorps monoclonaux anti-CD20 et une colonne de séparation LS (MACS, Miltenyi). 5×10^8 PBMCs sont utilisées pour la sélection des lymphocytes B. Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes à 4°C, les PBMCs culotées sont resuspendues dans 4 ml de tampon MACS et incubées avec des 250 µL d'anticorps monoclonaux anti-CD20 (Miltenyi Biotec human CD20 MicroBeads) à 4°C pendant 15 minutes.

Les PBMCs sont lavées dans un volume de tampon MACS 10 à 20 fois supérieur au volume de cellules soit 50 ml, centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à 4°C et diluées dans 2,5 ml de tampon MACS pour être déposées sur colonne. Les cellules CD20+ sont capturées par les microbilles via l'anticorps et sont immobilisées sur la colonne sous l'action d'un champ magnétique. La colonne est lavée trois fois avec 3 ml de tampon MACS, puis, hors champ magnétique, les lymphocytes B sont éluées avec 5 ml de tampon MACS. La quantité de lymphocytes B et de non lymphocytes B est alors mesurée en cellule de Malassez, et la pureté évaluée en cytométrie en flux.

4.4.2 Contrôle de la pureté en lymphocytes B

Après purification, un aliquot des cellules CD20+ et un aliquot des cellules CD20- sont analysés par cytométrie en flux (FACS) en utilisant soit un marquage anti-CD20 humain-FITC (BD Biosciences, Etats-Unis) ou anti-CD19 humain-PE (phycoérythrine) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Les lymphocytes B sont caractérisés par un phénotype CD19+, le niveau de pureté atteint est d'environ 95 %.

4.4.3 Mise en culture

Un million de lymphocytes B sont déposés par puits d'une plaque 24 puits en milieu RPMI-1640 1X avec 10 % SVF décomplémenté, 2 mM L-Glutamine, 50 µg/ml Pénicilline/Streptomycine et supplémenté avec 50 µM β Mercaptoéthanol. Les plaques sont incubées à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

4.5 Elimination des Natural Killer à partir des PBMCs

4.5.1 Elimination des NK

La procédure déjà décrite (paragraphe 4.3 Elimination des NK de la fraction négative en monocytes, Matériels et Méthodes) est appliquée en employant 5×10^8 de PBMCs.

4.5.2 Contrôle de l'élimination des NK

Après déplétion, un aliquot des PBMCs, des PBMCs sans NK (PBMC NK⁻) et des NK⁺ sont analysés par cytométrie en flux (FACS) en utilisant un marquage anti-CD56 humain-PE (phycoérythrine) (BD Biosciences, Etats-Unis). Les PBMCs sans NK sont caractérisés par un phénotype CD56⁻.

4.5.3 Mise en culture

Un million de PBMCs NK⁻ sont déposés par puits d'une plaque 24 puits en milieu RPMI-1640 1X avec 10 % SVF décomplémenté, 2 mM L-Glutamine, 50 µg/ml Pénicilline/Streptomycine et supplémenté avec 50 µM β Mercaptoéthanol et sont maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 7 jours.

4.6 Lymphocytes B mémoires

4.6.1 Purification des lymphocytes B mémoires

Le lymphocyte B mémoire représente la réponse secondaire en anticorps. Leur marqueur spécifique est le CD27. Il est dit qu'ils représentent environ 10% à 15% des PBMCs. La technique de séparation cellulaire immunomagnétique (Human CD27 Miltenyi Biotec) permet d'isoler les lymphocytes B mémoires à partir des PBMCs par sélection positive. Elle est réalisée en utilisant des microbilles magnétiques conjuguées à des anticorps monoclonaux anti-CD27 et une colonne de séparation LS (MACS, Miltenyi). 5×10^8 PBMCs sont utilisées pour la sélection des lymphocytes B mémoires. Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes à 4°C, les PBMCs culotées sont resuspendues dans 4 ml de tampon MACS et incubées avec des 1 ml d'anticorps anti-CD27 (Miltenyi Biotec human CD20 MicroBeads) à 4°C pendant 15 minutes. Les PBMCs sont lavées dans un volume de tampon

MACS 10 à 20 fois supérieur au volume de cellules soit 50 ml, centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à 4°C et diluées dans 2,5 ml de tampon MACS pour être déposées sur colonne. Les cellules CD27⁺ sont capturées par les microbilles via l'anticorps et sont immobilisées sur la colonne sous l'action d'un champ magnétique. La colonne est lavée trois fois avec 3 ml de tampon MACS, puis, hors champ magnétique, les lymphocytes B mémoires sont élués avec 5 ml de tampon MACS. Les quantités de lymphocytes B mémoires et des autres types cellulaires sont mesurées en cellule de Malassez.

4.6.2 Mise en culture

Les lymphocytes B mémoires sont centrifugés à 1500 g 10 minutes à température ambiante et resuspendues dans un Transfokit pour immortalisation (paragraphe 6 Immortalisation, Matériels et Méthodes).

5 Immunisation *in vitro*

L'immunisation *in vitro* permet de déclencher une réponse immunitaire sur des cellules naïves. Notre but a été l'obtention d'anticorps de type IgM et IgG contre diverses cibles d'intérêt. Deux cibles nous ont intéressées le peptide N-terminal de la toxine botulinique A (TBA-Nter) (2 kDa) et la protéine transactivatrice du virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1, Tat101 (14 kDa). Différents protocoles d'immunisation *in vitro* contre ces différents antigènes ont été utilisés dans ce travail de thèse, toujours dans le but d'optimiser au mieux la réponse immunitaire obtenue. A partir de sang humain, les PBMCs ont été isolées comme décrit précédemment (paragraphe 3 Matériels et Méthodes) et les différents types cellulaires nécessaires à ces travaux de thèse ont été purifiés à partir des PBMCs (paragraphe 4 Matériels et Méthodes).

5.1 Immunisation *in vitro* contre le peptide N-terminal de la toxine botulinique A (BoNT/A): TBA-Nter

Deux types de protocoles ont été développés :

- immunisation *in vitro* sur une coculture cellules dendritiques/cellules dépourvues de monocytes et de NK (Cellules monocytes⁻/NK⁻)
- immunisation *in vitro* sur un ensemble de PBMCs sans NK dont les monocytes ont été maturés en cellules dendritiques.

La plupart des expériences (sauf exception précisée dans le texte) sont réalisées en milieu RPMI-1640 1X avec 10 % SVF décomplémenté, 2 mM L-Glutamine, 50 µg/ml Pénicilline/Streptomycine et supplémenté avec 50 µM β Mercaptoéthanol, que nous appellerons milieu de culture.

5.1.1 Coculture Cellules dendritiques/PBMCs dépourvues de monocytes et de NK

Ce type d'immunisation se déroule en plusieurs étapes et sur une période de temps de 15 à 20 jours.

A J0 : Les monocytes purifiés à partir des PBMCs sont mis en culture pendant 6 jours avec du GM-CSF 25 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 2,5 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) et de l'IL-4 50 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 5 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml), cytokines permettant la maturation des monocytes en cellules dendritiques. En parallèle, les cellules monocytes⁻/NK⁻ sont cultivées pendant 6 jours à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

A J6 : 1) Un aliquot de monocytes traités par GM-CSF et par IL-4 est utilisé en cytométrie en flux pour évaluer la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. Un aliquot des cellules monocytes⁻/NK⁻ est également marqué. Les différents marquages réalisés sur ces cellules sont : anti-CD3 humain marqué PE-Cy5, anti-CD11c humain marqué PE, anti-CD14PE humain, anti-CD20 humain FITC, anti-CD40 humain FITC, anti-CD80 humain FITC, anti-CD83 humain FITC, anti-CD86 humain FITC et anti-HLADR humain FITC (BD Biosciences, Etats Unis) (paragraphe 5 Cytométrie en flux, Matériels et Méthodes).

2) La fraction monocytes maturée en cellules dendritiques est activée avec l'antigène TBA-Nter : peptide N-terminal de la TBA à 10 µg/ml. Le jour de la stimulation, le peptide TBA-Nter, 1 mg lyophilisé, est resuspendu dans un 1 ml de milieu de culture, puis 10 µl de la solution (soit 10µg) sont ajoutés dans les puits.

3) Des cytokines et des séquences immunostimulatrices sont ajoutées sur la fraction monocytes⁻/NK⁻. De IL-2 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml), de IL-4 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Allemagne) et des CpG à 2,5 µg/mL (10 µl d'une solution mère à 250 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (CpG ODN 2006 5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3', Eurogentec, Liège, Belgium).

A J7 : Le lendemain de la stimulation, les cellules sont mises en coculture et sont mélangées selon le ratio cellule dendritique/PBMCs monocytes⁻/NK⁻ 1/4. Les cellules dendritiques étant adhérentes, la fraction PBMCs monocytes⁻/NK⁻ est homogénéisée et est ajoutée dans les puits contenant les cellules dendritiques.

A J10 : Trois jours après la coculture, les cellules mélangées sont restimulées avec l'antigène TBA-Nter à 10 µg/ml (10 µl d'une solution mère à 1 mg/ml sont ajoutés dans les puits (soit 10 µg/ml)) et IL-2 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml), IL-4 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Allemagne) et CpG à 2,5 µg/mL (10 µl d'une solution mère à 250 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (CpG ODN 2006 5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3', Eurogentec, Liège, Belgium).

A J14 : Les surnageants de culture sont prélevés pour doser la présence d'anticorps IgM et/ou IgG anti-TBA-Nter selon un ELISA décrit ultérieurement (paragraphe 8.2.2 Matériels et Méthodes). Un ml de milieu de culture est ajouté dans les puits, maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

A J21 : Les surnageants de cultures sont prélevés et de nouveau dosés pour la présence d'anticorps IgM et/ou IgG anti-TBA-Nter par ELISA (paragraphe 8.2 Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A, Matériels et Méthodes). Les puits sont repris avec 1 ml de milieu de culture et maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

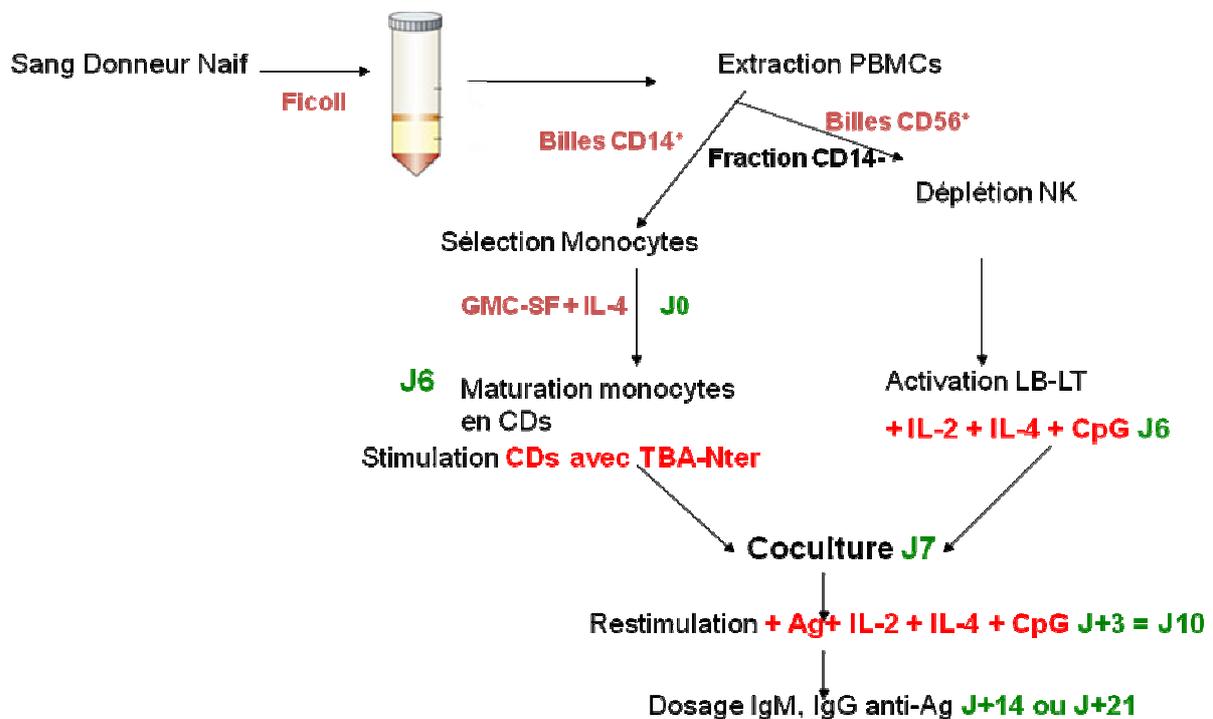


Figure 15. Principe de l'immunisation *in vitro* par coculture de cellules.

5.1.2 Utilisation de PBMCs après élimination des cellules « Natural Killer »

Ce type d'immunisation se déroule sur une période plus courte que le protocole par coculture. En effet, l'ensemble des opérations est effectuée dans un même puits. Le principe est de maturer les monocytes présents dans la fraction dépourvue en NK des PBMCs et d'initier une réponse immunitaire en ajoutant l'antigène : TBA-Nter, des cytokines et séquences immunomodulatrices CpG.

5.1.2.1 Description du protocole

A J0 : Les PBMCs purifiés selon le protocole précédent (paragraphe 3 Matériels et Méthodes) et déplétées en NK (paragraphe 4 Matériels et Méthodes) sont mises en culture sur plaque 96 puits à raison de 2×10^6 cellules/puits. Les monocytes présents sont maturés par l'ajout de GM-CSF 25 ng/ml (10 μ l d'une solution mère à 2,5 μ g/ml sont ajoutés

dans les puits de volume final 1 ml) et de l'IL-4 50 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 5 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) en présence de IL-2 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml), de IL-4 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Allemagne) et de CpG à 2,5 µg/mL (10 µl d'une solution mère à 250 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (CpG ODN 2006 5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3', Eurogentec, Liège, Belgium). L'ajout de 10 µg/ml de l'antigène TBA-Nter (1 mg est resuspendu dans un 1 ml de milieu de culture puis 10 µl de la solution est ajouté dans les puits pour faire 10 µg) a pour but de stimuler une réponse immunitaire spécifique de ce peptide. Les cellules sont gardées 7 jours à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂. A J0, les différents marquages réalisés précédemment sont réalisés (anti-CD3 humain marqué PE-Cy5, anti-CD11c humain marqué PE, anti-CD14PE humain, anti-CD20 humain FITC, anti-CD40 humain FITC, anti-CD80 humain FITC, anti-CD83 humain FITC, anti-CD86 humain FITC et anti-HLADR humain FITC (BD Biosciences, Etats Unis) (paragraphe 5 Cytométrie en flux, Matériels et Méthodes)).

A J3 : Trois jours après la première stimulation, les cellules sont restimulées avec l'antigène TBA-Nter à 10 µg/ml (10 µl d'une solution mère à 1 mg/ml sont ajoutés dans les puits (soit 10 µg/ml)) et de IL-2 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml), de IL-4 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Allemagne) et des CpG à 2,5 µg/mL (10 µl d'une solution mère à 250 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (CpG ODN 2006 5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3', Eurogentec, Liège, Belgium).

A J7 : Quatre jours après la seconde stimulation, les surnageants de cultures sont prélevés pour doser la présence d'anticorps IgM et IgG anti-TBA-Nter selon l'ELISA décrit plus loin (paragraphe 8.2 Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A, Matériels et Méthodes). Un ml de milieu de culture est ajouté dans les puits et maintenu à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂. A J7, les différents marquages réalisés précédemment sont réalisés (anti-CD3 humain marqué PE-Cy5, anti-CD11c humain marqué PE, anti-CD14PE humain, anti-CD20 humain FITC, anti-CD40 humain FITC, anti-CD80 humain FITC, anti-

CD83 humain FITC, anti-CD86 humain FITC et anti-HLADR humain FITC (BD Biosciences, Etats Unis) (paragraphe 5 Cytométrie en flux, Matériels et Méthodes)).

5.1.2.2 Cinétique de dosage

Afin d'étudier l'apparition des IgGs caractéristiques de la réponse secondaire, des boosts ou des re-stimulations par l'antigène TBA-Nter à 10 µg/ml (10 µl d'une solution mère à 1 mg/ml sont ajoutés dans les puits (soit 10 µg/ml)) et IL-2 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml), IL-4 à 10 ng/ml (10 µl d'une solution mère à 1 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Allemagne) et CpG à 2,5 µg/mL (10 µl d'une solution mère à 250 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (CpG ODN 2006 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3', Eurogentec, Liège, Belgium) ont été effectués à J3 et J7.

Les surnageants de cultures ont été prélevés à J12 pour dosage d'anticorps IgM et IgG anti-TBA-Nter selon un ELISA décrit dans la suite (paragraphe 8.2 Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A, Matériels et Méthodes).

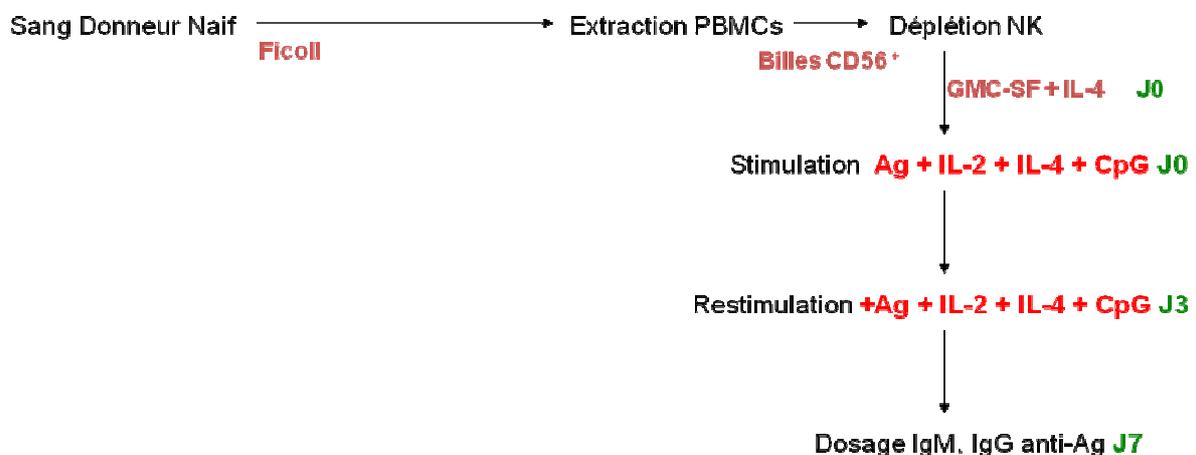


Figure 16. Principe de l'immunisation *in vitro* par activation des cellules dendritiques dans les PBMCs sans NK.

5.2 Immunisation *in vitro* contre la protéine Tat101 du virus VIH-1

Pour procéder à l'immunisation *in vitro* par Tat101, différents types cellulaires ont été utilisés : PBMCs totaux, des PBMCs sans NK et des lymphocytes B purifiés (paragraphe 3, 4 Matériels et Méthodes). Différentes formes de Tat101 et différentes protéines de fusion réalisées avec Tat101 ont été testées comme immunogène. Tat est connu comme étant une molécule adjuvante chez la souris (Kittiworakarn et al., 2006). D'autre part, *in vivo* chez la souris, il a été décrit que l'injection d'une protéine de fusion associant Tat101 et le domaine ZZ de *Staphylococcus aureus* qui permet d'augmenter l'immunogénicité des molécules (Léonetti et al., 1998), à des effets stimulants sur la production d'IgGs (Gadzinski et al., 2012; Léonetti et al., 2010). La protéine de fusion ZZTat101 a été testée dans notre système d'immunisation *in vitro* pour évaluer sa capacité à activer la réponse immunitaire sur des cellules humaines.

Nous avons déposé 1×10^6 cellules/puits dans une plaque de 24 puits en milieu de culture

Le protocole d'immunisation *in vitro* suivant a été utilisé :

- Une immunisation *in vitro* en présence de ZZTat101 et de chacun de ses dérivés ZZ et Tat101 ou un mélange ZZ + Tat101 sur des PBMCs, PBMCs NK⁻ et des lymphocytes B purifiés.

Le même protocole a été utilisé pour diverses formes de ZZTat101 : ZZTat22-57_{C(22-37)S} et ZZTat22-57, ZZTat101Ø.

5.2.1 Rôle des composants de ZZTat101 : immunisation *in vitro* par ZZTat101, ZZ et Tat101

A J0 : Des PBMCs, des PBMCs NK⁻ et des lymphocytes B purifiés ont été stimulés soit par 10 µg de ZZTat101 (200 µg de ZZTat101 lyophilisés sont resuspendus dans 1 ml de milieu de culture et 50 µl de cette solution sont déposés dans les puits), par ZZ (3,2 mg de ZZ lyophilisés sont resuspendus dans 1 ml d'eau MilliQ et 3,2 µl de cette solution sont déposés dans les puits), par Tat101 (100 µg de Tat lyophilisés sont resuspendus dans 1 ml de milieu de culture, et 100 µl de cette solution sont déposés dans les puits) ou soit par une coculture ZZ +

Tat101 (5 µg correspondant à 1,6 µl de la solution précédente à 3,2 mg/ml de ZZ + 5 µg correspondant à 50 µl de la solution précédente de Tat101 à 100 µg/ml).

A J3 : Les cellules sont restimulées par 5 µg ou 10 µg de chacun des composants à partir des solutions utilisées à J0.

A J7 : Les surnageants de cultures sont prélevés pour doser la présence d'anticorps IgM et IgG anti-Tat selon un ELISA décrit dans le paragraphe 8.4, Les dosages immunologiques des anticorps anti-Tat, Matériels et Méthodes. Les puits sont complétés avec 1 ml de milieu de culture et maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

5.2.2 Mécanisme d'action de ZZTat101 : immunisation *in vitro* par ZZTat101 et plusieurs formes mutantes

A J0 : Des PBMCs, des PBMCs NK⁻ et des lymphocytes B purifiés ont été stimulés par soit 10 µg de ZZTat101 (125 µg de Tat lyophilisés sont resuspendus dans 1 ml de milieu de culture et 80 µl de cette solution sont déposés dans les puits), 10 µg de ZZTat22-57_{C(22-37)S} (100 µg de lyophilisés sont resuspendus dans 1 ml de milieu de culture, et 100 µl de cette solution sont déposés dans les puits), 10 µg de ZZTat22-57 (100 µg de ZZTat22-57 lyophilisés sont resuspendus dans 1 ml de milieu de culture et 100 µl de cette solution sont déposés dans les puits) ou soit 10 µg de ZZTat101Ø (100 µg de ZZTat101Ø lyophilisés sont resuspendus dans 1 ml de milieu de culture et 100 µl de cette solution sont déposés dans les puits).

A J3 : Les cellules sont restimulées par 10 µg de chacun des composants à partir des solutions utilisées à J0.

A J7 : Les surnageants de cultures sont prélevés pour doser la présence d'anticorps IgM et IgG anti-Tat selon un ELISA décrit dans la suite (paragraphe 8.4, Les dosages immunologiques des anticorps anti-Tat, Matériels et Méthodes). Les puits sont complétés par 1 ml de milieu de culture et maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

5.3 Cytométrie en flux

5.3.1 Tampon utilisé

L'ensemble des réactifs, cellules et anticorps sont dilués en PBS (PBS: Phosphate Buffer Saline: 10 mM de phosphate de potassium pH 7.4 et 150 mM de chlorure de sodium) supplémenté avec 1 % d'albumine sérique bovine (BSA).

5.3.2 Principe

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'étudier simultanément différentes caractéristiques physiques et biologiques de cellules isolées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres, défilent à grande vitesse devant un faisceau laser. Chaque cellule va diffracter la lumière soit dans l'axe du laser (le capteur correspondant est le FSC forward scatter) soit à 90° de l'incidence du laser (le capteur est le SSC side scatter). Ces deux signaux nous donnent respectivement des informations sur la taille et la structure (granulosité) de chacune des cellules. Le laser permet également d'exciter des fluorophores présents sur la cellule tels que FITC ou PE excitable à la même longueur d'onde mais qui émettent à des longueurs d'ondes différentes. Les signaux mesurés, sont visualisés, après traitement informatique, sous forme de graphiques bidimensionnels (nuages de points). Pour ces études le cytomètre trois couleurs Guava (Millipore, Billerica, Massachusetts, United States) a été utilisé.

5.3.3 Marquage

Les marquages sont réalisés à J0 (le jour de la purification des cellules) pour évaluer la pureté des cellules obtenus après purification, sélection ou élimination et à J7 (7 jours après immunisation *in vitro*) pour évaluer la différenciation des cellules reflétant l'activation de la réponse immunitaire. Les anticorps utilisés sont des marqueurs membranaires spécifiques de chaque type de cellules utilisés lors de l'immunisation *in vitro*.

Sur une plaque 96 puits, 100 000 cellules/puits sont marquées avec différents anticorps couplés à un fluorophore (BD Biosciences, Etats-Unis) pendant 35 min à 4°C à l'obscurité. L'ensemble des anticorps marqués utilisés sont présentés dans le tableau ci-après (Tableau 2). Après centrifugation à 1500 rpm pendant 10 minutes à 4°C, le milieu contenant les anticorps marqués est éliminé et les cellules sont lavées avec 100 µl de PBS supplémenté avec 1 %

d'albumine sérique bovine (BSA). Les cellules sont fixées à température ambiante à l'obscurité avec 4% paraformaldéhyde (4% PFA) pendant 15 minutes. Après centrifugation à 1500 rpm à 4°C, le milieu contenant le paraformaldéhyde est éliminé et les cellules sont lavées avec 130 µl de PBS supplémenté avec 1 % d'albumine sérique bovine (BSA).

Anticorps marqués	Rôle	Dilution/Volume/Concentration	Fournisseur
Souris anti-CD3 humain-PE-Cy5 (monoclonal)	Marqueur Lymphocytes T	20 µl pur	BD Biosciences
Souris anti- CD11c humain – PE (monoclonal)	Marqueur cellules dendritiques	20 µl pur	BD Biosciences
Souris anti-CD40 humain-FITC (monoclonal)	Marqueur cellules dendritiques et activation réponse immunitaire	20 µl 1/4	BD Biosciences
Souris anti-CD80 humain-FITC (monoclonal)	Marqueur cellules dendritiques, lymphocytes B et activation réponse immunitaire	20 µl 1/5	BD Biosciences
Souris anti-CD83 humain-FITC (monoclonal)	Marqueur cellules dendritiques et activation réponse immunitaire	20 µl pur	BD Biosciences
Souris anti-CD86 humain-FITC (monoclonal)	Marqueur cellules dendritiques, lymphocytes B et activation réponse immunitaire	20 µl 1/5	BD Biosciences
Souris anti-HLADR humain-FITC (monoclonal)	Marqueur lymphocytes B et activation réponse immunitaire	20 µl 1/125	BD Biosciences
Souris anti-CD20 humain-FITC (monoclonal)	Marqueur lymphocytes B	20 µl pur	BD Biosciences
Souris anti-CD19 humain-PE (monoclonal)	Marqueur lymphocytes B	10 µl 1/25	Miltenyi Biotec
Souris anti-CD56 humain-PE (monoclonal)	Marqueur Natural Killer	20 µl 1/125	BD Biosciences
Souris anti-CD14 humain-FITC (monoclonal)	Marqueur Monocytes	20 µl pur	BD Biosciences

Tableau 2. Récapitulatif de l'ensemble des anticorps marqués utilisés pour les expériences de cytométrie en flux.

6 Immortalisation

6.1 Production des virus Epstein-Barr (EBV)

Les virus Epstein-Barr (EBV) sont produits par la lignée cellulaire B95-8ATCC (souche sauvage de Marmouset). Les B95-8 sont une lignée de lymphocytes B de singe Marmouset transformés par le virus Epstein-Barr (EBV). Les B95-8 sont capables de libérer le virus EBV dans le milieu de culture. Après centrifugation, le surnageant de culture est récupéré et utilisé pour transformer ou immortaliser des lymphocytes B humains. Les cellules B95-8 sont mises en culture en milieu RPMI 1640 1X supplémenté avec 15% SVF, 1% Antimycotique + 2% L-Glutamine dans des flasques 25 cm² en position debout à 37°C et avec une atmosphère en CO₂ à 5%. Plusieurs passages des cellules sont effectués jusqu'à atteindre 50 à 200 ml à 2x10⁶ cellules/ml. A partir de là, les cellules sont mises en culture dans un milieu appauvri en SVF, en milieu RPMI 1640 1X supplémenté avec 5% SVF, 1% Antimycotique + 2% L-Glutamine dans des flasques 25 cm² en position debout à 37°C et avec une atmosphère en CO₂ à 5% pendant 11-13 jours. La viabilité cellulaire chute et le virus est libéré dans le milieu de culture. Au 13^{ième} jour, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tr/min à température ambiante. Les surnageants de culture contenant les virus sont récupérés et filtrés sur filtre MILLEX 1,2 µm. Les surnageants de culture sont répartis dans des cryotubes selon le mélange suivant : 1 ml de surnageant de culture + 2 ml milieu culture RPMI1640 1X 15% SVF+1% Antimycotique + 2% L-Glutamine + 1 ml Cyclosporine à la concentration 2,5 µg/ml. Les cryotubes (volume final de 4 ml) sont ensuite congelés à -80°C. Ces cryotubes contenant 4 ml de virus seront appelés pour la suite des Transfokits. Au moment de leur utilisation, les Transfokits sont décongelés suivant le protocole précédent de décongélation (paragraphe 2.3.2 Décongélation, Matériels et Méthodes).

6.2 Test qualité des Transfokits utilisés

L'efficacité des virus EBV produits sous forme de Transfokits est évaluée sur des PBMCs. Le virus EBV est un virus permettant d'infecter ou d'immortaliser spécifiquement les lymphocytes sanguins (Lymphocytes B ou T). Les Transfokits produits permettent d'infecter 3 à 4 millions de cellules. Afin de tester la qualité des Transfokits produits, une infection des PBMC est réalisée. 4 millions de PBMCs (paragraphe 3 Purification PBMCs Matériels et Méthodes) sont resuspendues dans un Transfokit. 100 µl du mélange sont

distribués dans chaque puits d'une plaque 96 puits contenant des PBMCs irradiées servant de cellules nourricières, à 37°C et avec une atmosphère en CO₂ à 5%. Des CpG à 2,5 µg/ml (10 µl d'une solution mère à 250 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (CpG ODN 2006 5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3', Eurogentec, Liège, Belgium) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque 96 puits est cultivée en position oblique pour favoriser le contact entre les cellules. La culture est examinée à partir du 8^{ième} jour après l'infection. A cette date, les PBMCs infectées par les EBV du Transfokit doivent former des grappes de cellules à spicules.

6.3 Immortalisation des cellules par les virus EBV (Transfokit)

4 millions de lymphocytes B mémoires purifiés CD27+ ou 4 millions de cellules issues d'immunisation *in vitro* par la TBA-Nter sont resuspendues dans un Transfokit. 100 µl du mélange sont distribués dans chaque puits d'une plaque 96 puits contenant des PBMCs irradiés servant de cellules nourricières, à 37°C et avec une atmosphère en CO₂ à 5%. Des CpG, 10 µl à 2,5 µg/ml (10 µl d'une solution mère à 250 µg/ml sont ajoutés dans les puits de volume final 1 ml) (CpG ODN 2006 5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3', Eurogentec, Liège, Belgium) sont ajoutés dans chaque puits (solution mère à 1 mg/ml, dilution 1/400 dans RPMI 1640 1 X). La plaque 96 puits est incubée en position oblique. La culture est examinée à partir du 8^{ième} jour après l'infection. A cette date, les cellules immortalisées sont sous forme de grappes de cellules à spicules.

6.4 Culture des lignées immortalisées

Les lignées cellulaires immortalisées obtenues sont mises en expansion en milieu de culture RPMI1640 1X 15% SVF + 1% Antibiotique Pénicilline/Streptomycine + 2% L-Glutamine en plaque de 24 puits, puis en plaques de 6 puits enfin en boîte de Pétri avant congélation pour sauvegarder les cellules. La glutamine est ajoutée tous les 8 jours.

7 Fusion

7.1 Les préparations préliminaires à la fusion

7.1.1 Préparation des cellules nourricières

La fusion cellulaire et l'obtention des hybridomes sécréteurs d'anticorps pour être efficaces nécessitent la présence de cellules nourricières. Les cellules nourricières sont obtenues par irradiation de PBMCs puis déposées sur les microplaques 96 puits à 5×10^4 cellules/puits en milieu de culture sélectif utilisé pour la fusion. Après quelques jours, elles forment une monocouche au fond des puits qui accueilleront les cellules après la fusion. Ces cellules nourricières irradiées produisent des cytokines et des éléments nutritifs pour la survie des hybridomes après fusion. Les PBMCs sont obtenues selon le protocole de purification et de récupération à partir des poches de sang (paragraphe 3 Purification PBMCs, Matériels et Méthodes). Les cellules sont comptées puis irradiées à 2 gray/min pendant 17 min 30 (générateur X FAXITRON (référence 43855D)). Les cellules sont lavées et congelées à -196°C à 1.10^7 cellules/ampoule avant leur utilisation. Au moment de leur utilisation, les cellules irradiées sont décongelées suivant le protocole précédent de décongélation et déposées sur microplaques 96 puits à 5×10^4 cellules/puits.

7.2 Obtention d'hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques à partir des cellules immortalisées par EBV

Les cellules immortalisées sont fusionnées avec divers partenaires myéломateux : myélomes murins NS1, SP2/O-Ag14 et X63 Ag8.653 et un hétéromyélome humain/murin (HM) pour obtenir des hybridomes sécréteurs d'anticorps. Les cellules immortalisées sont lavées par une centrifugation à 1500 rpm à température ambiante puis mélangées à des cellules de myélome murin (lignée de cellules tumorales NS1, SP2/O-Ag14 et X63 Ag8.653) ou à des cellules d'hétéromyélome humain/murin HM dans des proportions 5 :1 ou 2 :1 respectivement. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml de polyéthylène glycol à 50% (PEG 400, agent permettant la fusion membranaire, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) ajouté goutte à goutte. Les cellules sont lavées et reprises en milieu sélectif HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) contenant 5 μM ouabaine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Les cellules issues

de la fusion sont alors réparties en microplaques 96 puits de culture contenant une monocouche de PBMCs irradiées et incubées à 37°C, 7 % CO₂. Le milieu sélectif HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine) permet d'éliminer les cellules de myélome et l'ouabaine est une drogue permettant l'inhibition de la pompe Na/K ATPase des cellules immortalisées par EBV conduisant ainsi à leur mort cellulaire. Dans ces conditions, seules les cellules hybrides (hybridomes) ayant les caractéristiques des deux cellules mères (cellules immortalisées sécrétant l'anticorps d'intérêt et capacité de cellule tumorale à se diviser perpétuellement) sont aptes à proliférer. Après 10 jours de culture la présence d'hybridomes est évaluée en microscopie et la présence d'anticorps dans le surnageant est détecté à l'aide d'un test immunologique spécifique pour chaque cible (paragraphe suivant, paragraphe 8 Les dosages immunologiques, Matériels et Méthodes).

Les hybridomes, sécréteurs d'anticorps spécifiques pour leur antigène, sont clonés par la méthode de « dilution limite » de façon à obtenir une population identique de cellules sécrétant le même anticorps. Cette technique consiste à diluer les hybridomes en microplaque de culture de façon à obtenir statistiquement 1 cellule tous les 20 puits. Différents clonages à différentes concentrations 100, 50, 10 et 1 cellules/ml sont testés. Après dix jours de culture, la présence d'anticorps est détectée comme écrit précédemment et les clones d'intérêts sont cultivés jusqu'à ce qu'ils atteignent une concentration de 10⁷ cellules/ml. Les cellules sont ensuite congelées en présence de DMSO dans l'azote liquide.

7.3 Obtention des hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques à partir de lymphocytes B sanguins

Les lymphocytes B (LB) sanguins sont purifiés à partir des PBMCs totaux issus de sang de donneurs (EFS Rungis, France). Les PBMCs sont purifiés comme décrit précédemment (paragraphe 3 Matériels et Méthodes). Les cellules LB sont extraites des PBMCs totaux par une sélection positive sur billes magnétiques CD20 humain (paragraphe 4.4.1 Purification lymphocytes B, Matériels et Méthodes). Les lymphocytes B sont lavés puis mélangés à des cellules d'hétéromyélome HM en employant des rapports (5 :1 ou 2 :1, lymphocytes B : myélome). Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml de polyéthylène glycol 50% (PEG 400, agent permettant la fusion membranaire, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) ajouté goutte à goutte. Les cellules sont lavées et reprises en milieu sélectif HAT (Hypoxanthine Aminoptérine

Thymidine). Les cellules issues de la fusion sont alors réparties en microplaques 96 puits de culture contenant des PBMCs irradiées et incubées à 37°C, 7 % CO₂. Dans ces conditions, seules les cellules hybrides (hybridomes) ayant les caractéristiques des deux cellules mères sont aptes à proliférer. Après 10 jours de culture la présence d'hybridomes est évaluée en microscopie.

7.4 Obtention des hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques à partir des cellules issus de l'immunisation *in vitro*

Après 7 jours d'immunisation *in vitro*, les cellules contenues dans les puits positifs, sécrétrices d'anticorps contre la cible choisie (TBA-Nter, Tat101) (1 ou 2 puits) sont fusionnées avec l'hétéromyélome humain/murin HM. Les cellules sont lavées puis mélangées à des cellules d'hétéromyélome HM en employant un rapport 2 :1, cellules immunisées : myélome. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml de polyéthylène glycol 50 % (PEG 400, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) ajouté goutte à goutte. Les cellules sont lavées et reprises en milieu sélectif HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine). Les cellules issues de la fusion sont alors réparties en microplaques 96 puits contenant des PBMCs irradiées et incubées à 37°C, 7 % CO₂. Après 10 jours de culture la présence d'hybridomes est évaluée en microscopie et la présence d'anticorps spécifiques contre la cible d'intérêt (TBA ou Tat101) est recherchée par un dosage immunoenzymatique spécifique (paragraphe suivant, paragraphe 8 Les dosages immunologiques, Matériels et Méthodes).

Les hybridomes, sécréteurs d'anticorps spécifiques pour leur antigène, sont clonés par la méthode de « dilution limite » avant congélation (paragraphe 7.2, Matériels et Méthodes).

8 Les dosages immunologiques

8.1 Les préparations préliminaires au dosage

8.1.1 Les tampons utilisés

Pour tous les tests immunologiques, les anticorps, les réactifs et les échantillons sont dilués en tampon EIA composé de tampon phosphate 0.1 M pH 7.4 contenant 0.15 M NaCl, 0.1% BSA et 0.01% d'azide de sodium.

Les plaques sont lavées trois fois en tampon de lavage, tampon composé de tampon phosphate 0.01 M pH 7.4 contenant 0.05% de Tween 20.

8.1.2 Anticorps utilisés

- Pour doser les anticorps IgM humain, un anticorps de lapin anti-IgM humain à 1,1 µg/ml (Jackson ImmunoResearch) est utilisé. Pour obtenir un signal proportionnel à la quantité d'IgM humain, un anticorps secondaire de souris anti-Immunoglobulines de lapin marqué à l'acétylcholinestérase (AChE) est utilisé à la concentration de 2,5 UE/ml.

- Pour doser les anticorps IgG humain, un anticorps de souris anti-IgG humain (Meridian Life Science) couplé à l'AChE (G4) est utilisé.

8.1.3 Préparation des traceurs couplés à l'AChE

L'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7), a été extraite des organes électriques des anguilles *Electrophorus electricus*, et purifiée selon le protocole précédemment décrit (Grassi et al., 1989). Les anticorps utilisés comme l'anticorps de souris anti-Immunoglobulines de lapin (SAL-AChE) ou l' anticorps de souris anti-IgG humain sont couplés à l'AChE sous sa forme tétramérique globulaire (appelée G4 et obtenue après trypsinolyse), grâce au réactif hétérobifonctionnel *N*-succinimidyl-4-(*N*-maleimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) selon le protocole précédemment décrit (Grassi et al., 1989).

8.1.4 Mesure de l'activité AChE

L'activité de l'AChE est mesurée en utilisant la méthode d'Ellman (Grassi et al., 1989). La solution utilisée pour cette mesure (dénommée au sein du laboratoire « réactif d'Ellman ») comprend un mélange d'iodure d'acétylthiocholine $7.5 \cdot 10^{-4}$ M (substrat de l'enzyme) et de l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque à $2.5 \cdot 10^{-4}$ M (DTNB oxydé) contenu dans du tampon phosphate 0.1 M pH 7.4. L'enzyme hydrolyse l'acétylthiocholine qui conduit à la formation de thiocholine, dont le thiol réduit ensuite le DTNB. Le DTNB ainsi réduit absorbe fortement dans le visible (λ max 414 nm) et produit une coloration jaune. L'activité enzymatique est exprimée en Unité Ellman (UE), 1 UE étant définie comme la quantité d'enzyme induisant une augmentation de l'absorbance d'une unité pendant 1 min dans 1 ml de milieu, pour un trajet optique de 1 cm.

8.1.5 Adsorption passive sur plaques de microtitration

Les protéines et peptides (Ag: peptide TBA-Nter, Tat101, peptides Tat (P1, P10, P15, P16, P18) ou Neutravidine) sont adsorbés passivement dans les plaques de microtitration 96 puits Maxisorb (Nunc, Danemark) après dilution dans du tampon phosphate 50 mM pH 7.4 de façon à obtenir entre 0.1 µg et 0.5 µg de protéines par puits (100 µl/puits). Après 18 h de réaction à température ambiante, les puits sont lavés et saturés avec 300 µl de tampon EIA pendant 18 h à 4°C ou 3 h à température ambiante. Toutes les plaques sont ensuite conservées à 4°C.

8.1.6 Couplage de protéines à la biotine

Plusieurs molécules, SEB, peptide TBA-Nter et ZZTat101 sont couplées à la biotine pour être utilisés comme traceur dans des tests immunoenzymatiques. Ces protéines sont mélangées à l'ester de biotine-N-hydroxysuccinimide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) dissous en DMF anhydre, dans un rapport molaire de 1 :3 pour la SEB, 1:20 pour le peptide TBA-Nter, 1 :4,5 pour ZZTat101 en tampon borate 0.1 M pH 9 (400 µl final). Après 30 min d'incubation à température ambiante, 100 µl de tampon Tris-HCl 1M pH 8 est ajouté pour réagir 1 h à température ambiante. Finalement du tampon EIA est ajouté à la préparation pour atteindre une concentration de 100 µg/ml, et des aliquots sont congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

8.2 Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A

8.2.1 Dosage ELISA des plasmas de donneurs de sang

Les échantillons de plasma dilués (50 µl/puits) sont incubés 18 h à 4°C dans les puits d'une plaque de microtitration préalablement revêtus de peptide N-terminal de la BoNT/A (0,1 µg/puits) en présence ou non du même peptide à 25 µg/ml (50 µl/puits). Après lavage, 100 µl de traceur soit l'anti-IgM humain à 1,1 µg/ml pour la détection des IgMs ou l'anti-IgGhumain marqué à l'AChE à 2,5 UE/ml pour la détection des IgGs sont ajoutés dans les plaques pour une réaction de 18 h à 4°C.

Pour la détection des IgMs, après lavage, 100 µl de SAL (souris anti-lapin) couplée à l'AChE (2,5 UE/ml) sont ajoutés dans chaque puits et incubés pour 3 h de réaction à température ambiante ou 18h à 4°C.

Les plaques sont ensuite lavées et 200 µl/puits du réactif d'Ellman sont ajoutés. L'absorbance à 414 nm est alors mesurée après 1h, 2h, 4h de réaction à température ambiante.

Pour la détection des IgGs, les plaques sont lavées et 200 µl/puits du réactif d'Ellman sont ajoutés. L'absorbance à 414 nm est alors mesurée après 1h, 2h, 4h d'incubation à température ambiante.

8.2.2 Criblage des anticorps monoclonaux produits dans les surnageants de culture des immunisations *in vitro* et des hybridomes

50 µl de surnageants de culture pur ou dilué au 1/10 sont transférés dans une plaque de microtitration 96 puits revêtue avec l'antigène Fc-TBA (peptide N-terminal, TBA-Nter) (0,1 µg/puits) 18 h à 4°C. Le protocole d'analyse des réponses IgM ou IgG est identique à celui décrit dans le paragraphe 8.2.1, Matériels et Méthodes.

8.3 Les dosages immunologiques utilisant la SEB

8.3.1 Dosage des IgGs anti-SEB dans les plasmas

50 µl de SEB-biot à 0,5 µg/ml sont ajoutés dans les plaques dont la paroi des puits a été préalablement revêtue de neutravidine (5µg/ml 100µl/puits). Après 18h de réaction à 4°C, les plaques sont lavées et 50µl (en duplicat) de plasma à différentes dilutions sont déposés dans les puits. Après lavage, 50µl de traceur anti-IgG-G4 (2.5 UE/ml) sont ajoutés. Après 3 h de réaction à température ambiante ou 18h à 4°C, les plaques sont lavées et 200 µl/puits du réactif d'Ellman sont déposés dans les puits. L'absorbance à 414 nm est alors mesurée après 1 h, 2 h, 4 h d'incubation à température ambiante.

8.3.2 Criblage des anticorps monoclonaux produits dans les surnageants de culture des immortalisations et des hybridomes

Le protocole expérimental appliqué à 50µl de surnageant de culture est identique au paragraphe 8.3.1, Matériels et Méthodes.

8.4 Les dosages immunologiques des anticorps anti-Tat101

Tous les dosages sont réalisés en présence et ou en absence de la protéine Tat ou de ces 5 peptides en compétition.

8.4.1 Dosage ELISA des plasmas de donneurs de sang

Les échantillons de plasma dilués (50 µl/puits) sont incubés 18 h à 4°C en plaque de microtitration préalablement revêtue de Tat ou des 5 peptides décrits paragraphe 1.3.1 Tat et peptides Tat, Matériels et Méthodes (0,1 µg/puits). Pour chaque dilution, l'incubation est réalisée en présence ou non (tampon EIA seul) de la molécule qui a été adsorbée en solution à 2 µg/ml (50 µl/puits). Le protocole d'analyse des réponses IgM ou IgG est identique à celui décrit dans le paragraphe précédent 8.2.1, Matériels et Méthodes.

8.4.2 Criblage des anticorps monoclonaux produits dans les surnageants de culture des immunisations *in vitro* et des hybridomes

Les surnageants de culture dilués ou non (50 µl/puits) sont incubés 18 h à 4°C en plaque de microtitration préalablement revêtue de Tat ou des 5 peptides décrits paragraphe précédent 1.3.1 (0,1 µg/puits). Pour chaque dilution l'incubation est réalisée en présence ou non (tampon EIA seul) de la molécule qui a été adsorbée en solution à 2 µg/ml (50 µl/puits). Le protocole d'analyse des réponses IgM ou IgG est identique à celui décrit dans le paragraphe 8.2.1, Matériels et Méthodes.

1^{ère} Partie :

PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX HUMAINS A PARTIR DE LYMPHOCYTES B HUMAINS DE DONNEURS INFECTES OU VACCINES PAR IMMORTALISATION VIRALE ET FUSION CELLULAIRE

INTRODUCTION

Dans la première partie de ma thèse, nous avons décidé de produire des anticorps monoclonaux humains à partir de lymphocytes B humains de donneurs infectés ou vaccinés. Nous avons choisi de produire des anticorps contre l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*. Pour cela, nous avons isolés des lymphocytes B mémoires à partir de sang contenant des IgGs spécifiques de l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*. Ces lymphocytes B mémoires ont été par la suite immortalisés en utilisant le virus Epstein-Barr. Cette immortalisation a été suivie ou non d'une fusion avec un partenaire myélomateux. Dans un premier temps, la méthodologie d'obtention des Acs humains par immortalisation grâce au virus Epstein-Barr sera détaillée. Dans une seconde section, quelques éléments à propos de l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* et de la nécessité de produire des Acs humains dirigés contre cette toxine seront donnés avant de présenter et de discuter les résultats obtenus.

1 Production d'anticorps par les lymphocytes B humains

Les lymphocytes B humains sécréteurs d'Acs ont une durée de vie courte (environ 5 jours). Comme dans la technique des hybridomes murins, pour stabiliser la production en Ac, une immortalisation est nécessaire. Dans les années 1970, des essais ont porté sur les possibilités d'immortaliser c'est-à-dire de fusionner des lymphocytes B humains avec un partenaire cellulaire myélomateux (Schwaber and Cohen, 1973). Fusionner avec un myélome et stabiliser les hybridomes humains s'est avéré très difficile. De plus, peu de myélomes humains ont été disponibles et adaptés à la fusion des lymphocytes B humains à ce moment (Kozbor et al., 1983). Par conséquent, d'autres approches d'immortalisation ont été testées. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) a été utilisé par de nombreux groupes comme agent d'immortalisation (Simmons et al., 2007; Traggiai et al., 2004).

1.1 Le virus d'Epstein-Barr

Le virus Epstein-Barr, aussi appelé EBV ou virus de l'herpès 4 (HHV-4) est un virus appartenant à la famille des Herpesviridae. Le virus Epstein-Barr cause plusieurs maladies dans le monde dont la mononucléose infectieuse et le lymphome de Burkitt. Il existe deux types de virus EBV : EBV-1 et EBV-2.

Le virus Epstein-Barr a pour réservoir l'Homme. Son cycle viral est composé de phase de réplication et de phase de latence. Les cellules cibles du virus sont les lymphocytes B humains. En effet, l'antigène CD21 spécifiquement présent sur les lymphocytes B humains est la porte d'entrée du virus dans les cellules. Après pénétration dans les lymphocytes B, le virus grâce à ses nombreux gènes (environ 100) et ses diverses protéines va se répliquer et se mettre en phase de latence (qui peut durer très longtemps s'il n'y a pas eu réactivation du virus). Cette propriété d'infecter spécifiquement les lymphocytes B humains avec le virus EBV pour permettre leur expansion permanente clonale a été utilisé pour produire des Acs humains *in vitro* en absence d'antigène. Des premiers travaux, dans le laboratoire de Danuta Kozbor en 1981, ont permis de produire des anticorps spécifiques de la toxine tétanique à partir de lymphocytes B humains immortalisés avec le virus EBV (Kozbor and Roder, 1981). L'inconvénient majeur de la technique d'immortalisation réside dans le faible rendement de l'étape d'immortalisation et dans la difficulté à stabiliser les lymphocytes B immortalisés. Danuta Kozbor proposa d'examiner la possibilité de fusionner les lymphocytes B immortalisés avec des partenaires myéломateux murins ou humains (Kozbor et al., 1982a). Ses travaux couplant l'immortalisation et la fusion furent repris en 1984, pour produire des anticorps anti-CMV et anti-TT (Emanuel et al., 1984; Kozbor and Roder, 1981; Kozbor et al., 1982b). L'utilisation des lymphocytes B humains permet de disposer *a priori* de l'ensemble du répertoire immunologique. Cependant l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un antigène est grandement favorisée lorsque les lymphocytes B proviennent d'individus immunisés. Ainsi, l'utilisation des lymphocytes B mémoires et de l'immortalisation a permis de générer de nombreux anticorps monoclonaux humains.

1.2 Les lymphocytes B mémoires

Les lymphocytes B mémoires dérivent des lymphocytes B. Après reconnaissance des antigènes par les lymphocytes B (lors de la réponse immunitaire primaire), certains lymphocytes B se différencient en lymphocytes B mémoires et d'autres en plasmocytes, sécréteurs d'anticorps. Les lymphocytes B mémoires ont pour rôle de mémoriser les propriétés de l'antigène les ayant activés, afin de créer une réponse immunitaire plus rapide, plus longue, plus intense et plus spécifique dans le cas d'une seconde infection par ce même antigène (réponse immunitaire secondaire). De plus, les lymphocytes B mémoires ont une durée de vie beaucoup plus longue que les plasmocytes. Les lymphocytes B mémoires sont

des cellules présentes dans les organes lymphoïdes secondaires. Produire des anticorps à partir de ce type cellulaire représente une avancée considérable. Récemment, le laboratoire de Antonio Lanzavecchia en Suisse s'est intéressé à produire des anticorps humains à partir de lymphocytes B mémoires spécifiques du coronavirus SRAS. A partir de prélèvement de sang d'un patient ayant survécu à l'épidémie du coronavirus SRAS en 2004, les lymphocytes B mémoires sécrétant d'IgGs spécifiques du SRAS de ce donneur ont été sélectionnés par un système de billes magnétiques et immortalisés avec le virus Epstein-Barr. Après clonage par dilution limite des lymphocytes B ainsi immortalisés, des IgGs monoclonales, spécifiques du SRAS ont été isolées (Traggiai et al., 2004). De même des anticorps anti-H1N1 et des anticorps anti-HIV ont été obtenus suivant la même stratégie (Buchacher et al., 1994; Simmons et al., 2007; Traggiai et al., 2004; Yu et al., 2008).

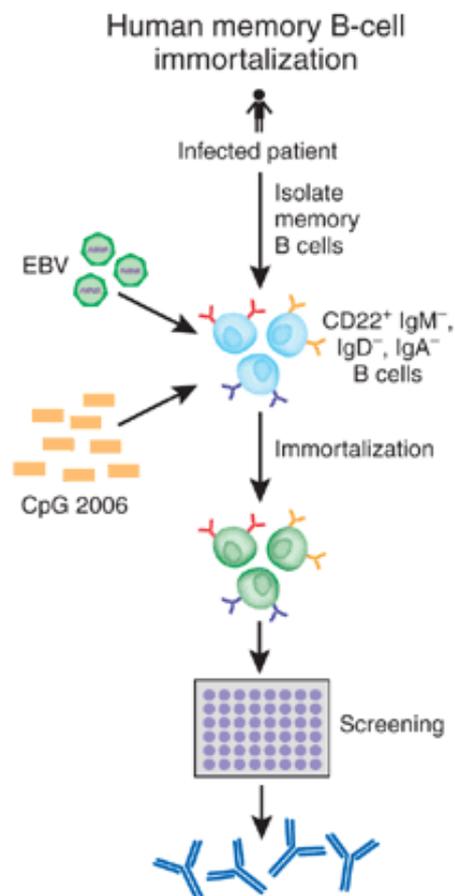


Figure 17. Production d'anticorps humains à partir de patients infectés.

La méthode permettant l'obtention d'anticorps humains passe par l'immortalisation de lymphocytes B mémoires issus d'individus exposés à l'antigène. Les LB mémoires sont isolés à partir des leucocytes du sang périphérique, puis immortalisés à l'aide du virus Epstein-Barr (EBV) en présence de CpGs ODN 2006. Les cellules transformées sécrétant des anticorps sont ensuite sélectionnées et isolées par dilutions limites, ce qui conduit à la production d'anticorps monoclonaux totalement humains. Extrait de (Marasco and Sui, 2007).

Lanzavecchia a proposé de cultiver les lymphocytes immortalisés en présence d'oligonucléotides CpG ODN 2006 pour pallier les éventuels problèmes de rendement ou de stabilité décrits précédemment dans la littérature. L'ajout des CpG permet une sécrétion plus forte en Acs, une meilleure prolifération et stabilité des lymphocytes B (Bernasconi et al., 2002). Les CpGs agissent via la voie TLR4/TLR9 permettant la prolifération et la stimulation des lymphocytes B *in vitro* en absence d'antigène (Poltorak et al., 1998), (Krieg, 2002).

Aujourd'hui, de nombreux protocoles de production d'anticorps monoclonaux humains, utilisant des lymphocytes B ou des lymphocytes B mémoires spécifiques d'une cible ou ayant déjà été en présence de la cible, existent. Les anticorps sont produits après immortalisation virale avec l'EBV, après la fusion avec un partenaire murin ou humain ou encore après une étape d'immortalisation virale avec l'EBV couplée à une fusion avec un partenaire myélomateux. (Bernasconi et al., 2002; Buchacher et al., 1994; Drozdowski et al., 2010; Karauzum et al., 2012; Kozbor et al., 1982a; Kozbor and Roder, 1981; Kozbor et al., 1982b; Simmons et al., 2007; Traggiai et al., 2004; Yu et al., 2008).

Au cours de cette étude, nous avons cherché à obtenir des anticorps humains contre l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB).

2 Modèle d'étude : Entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB)

2.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est une bactérie de type Gram positive de 0,5 à 1,5 µm de diamètre. *Staphylococcus aureus* représente une cause majeure d'infections humaines puisque 1 à 5% des infections observées sont liées à *Staphylococcus aureus*.

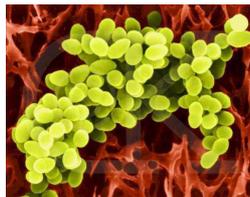


Figure 18. Illustration de *Staphylococcus aureus* en grappes.

D'après <http://swampie.wordpress.com/2008/02/17>, http://www.laborspiez.ch/fr/dok/fa/pdf_f/fact_Sheet_SEB_fr.pdf

En milieu hospitalier, il est connu que 10 à 20% des septicémies sont dues à *Staphylococcus aureus* (www.Medix.free.fr). De plus, *Staphylococcus aureus* est souvent impliquée dans des intoxications alimentaires (Le Loir et al., 2003) et cause le syndrome de choc toxique (SCT) (Bohach et al., 1990). Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* est dû à sa capacité de synthèse de nombreux facteurs de virulence. Ces facteurs de virulence sont regroupés en deux types : des protéines de surface et des protéines solubles secrétées à l'extérieur de la cellule. Ces facteurs sont secrétés et/ou synthétisés à des moments différents en fonction de la phase de croissance bactérienne (Figure 19).

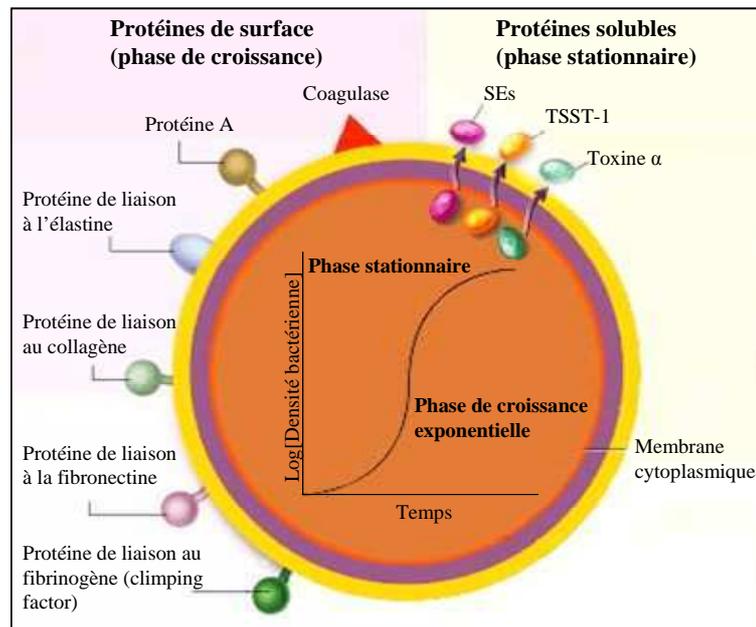


Figure 19. Expression de facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*.

Ce schéma présente les principales protéines de surface et secrétées de *S. aureus*. D'après (Lowy, 1998).

Parmi, les facteurs de virulence sécrétés par *Staphylococcus aureus*, les entérotoxines staphylococciques (SEs) sont à l'origine des intoxications alimentaires et la toxine TSST-1 responsable elle du syndrome de choc toxique (SCT).

2.1.1 Classification des entérotoxines staphylococciques (SEs)

Les entérotoxines sont classées en fonction de leur antigénicité. Neuf types antigéniques majeurs ont ainsi été rapportés pour les entérotoxines : SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI et SEJ (Monday and Bohach, 1999). En 1962, un système de nomenclature alphabétique a été développé par Casman, Bergdoll et Robinson (Casman, 1963a). Dans ce système les entérotoxines sont désignées par une lettre suivant l'ordre de leur

découverte de SEA à SEJ. SEF a été ultérieurement reclassé comme TSST-1 (Bergdoll et al., 1981). Les entérotoxines produites par *Staphylococcus aureus* possèdent des similarités dans leurs séquences de nucléotides et d'acides aminés. Elles peuvent être divisées en trois grands groupes : un premier groupe formé de SEA, SEE et SED avec une homologie comprise entre 51 et 81%, un deuxième groupe intégrant SEB et SEC (SEC1, SEC2, SEC3) (42 à 67% d'homologie) et un troisième groupe comportant TSST-1 et SPEB qui partagent des acides aminés clés avec les autres toxines mais ayant un faible taux d'homologie (moins de 28%). SEJ est plus proche du 1^{er} groupe avec 64 à 66 % d'homologie tandis que SEI et SEH sont plus distantes des autres entérotoxines (Balaban and Rasooly, 2000; Ulrich et al., 1995; Van den Bussche et al., 1993). Ces dernières années, 11 nouvelles entérotoxines ont été découvertes par génotypage, nomenclaturées de K à U, mais n'ont pas encore été isolées pour le moment (Jarraud et al., 2001; Lina et al., 2004; Pocsfalvi et al., 2008). En plus de leur homologie de séquence d'acides aminés, la plupart des entérotoxines partagent plusieurs régions bien conservées et possèdent une structure tertiaire très similaire (par exemple SEB, SEA, TSST-1 et SEC) (Papageorgiou and Acharya, 2000).

2.1.2 Mode d'action des entérotoxines staphylococciques (SEs)

Les entérotoxines sont des protéines produites par des bactéries ayant contaminées des aliments. Les entérotoxines staphylococciques (SEs) agissent comme des toxines puissantes au niveau gastro-intestinal. Elles sont résistantes aux protéases gastro-intestinales telles que la pepsine et la trypsine et gardent ainsi leur activité dans le tractus gastro-intestinal après ingestion. Elles sont résistantes à la chaleur et donc peuvent persister dans les matrices alimentaires après la disparition des bactéries. De plus, elles sont stables dans une large gamme de pH (entre 4 et 10) (Balaban and Rasooly, 2000; Dinges et al., 2000; Johnson et al., 1991). Les entérotoxines provoquent des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et de la diarrhée deux à six heures après l'ingestion de l'aliment contaminé (Balaban and Rasooly, 2000; Cowell et al., 2002). Dans des cas sévères, des maux de tête, des températures en dessous de la normale ou de la fièvre, une hypotension, du sang et du mucus dans les selles peuvent avoir lieu. Cependant, la maladie est rarement fatale (Cowell et al., 2002; Evenson et al., 1988). La quantité de toxine nécessaire pour causer une intoxication est très faible puisqu'une dose de l'ordre de 100 ng d'entérotoxines pour une prise alimentaire suffit à provoquer les symptômes d'intoxication (Papageorgiou and Acharya, 2000). Dans presque tous les cas d'intoxications alimentaires par les entérotoxines staphylococciques, les

aliments ou l'un des ingrédients ont été contaminés par des souches de *Staphylococcus aureus* et exposés temporairement à des températures permettant la croissance de ces bactéries. Ces accidents surviennent lors d'un défaut de processus de réfrigération ou lorsque la préparation du produit comporte une étape dont la température permet la croissance de la bactérie (par exemple préparation du fromage). Les aliments impliqués dans ces intoxications diffèrent: le lait, le fromage, les volailles, les produits à base de viande et les conserves. Dans presque tous les cas, le réservoir de *Staphylococcus aureus* est l'homme et la contamination se fait lors de la manipulation des aliments avant ou après traitement par la chaleur. En effet, ces toxines sont thermostables et même si la bactérie est éliminée par le chauffage, l'activité biologique des toxines reste intacte. Cependant, la stabilité des entérotoxines vis-à-vis de la chaleur dépend de la nature de la matrice alimentaire, du pH du milieu, de la concentration en sel et de la concentration en glucose.

2.2 Entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*

L'entérotoxine B (SEB) est une protéine ayant une masse de 28,4 kDa. Elle est l'une des entérotoxines produites par *Staphylococcus aureus* et est considérée comme étant la plus dangereuse. SEB comme les autres entérotoxines staphylococciques (SEs) est un superantigène. Un superantigène est capable de lier à la fois les lymphocytes T au niveau du récepteur T des lymphocytes T (TCR) et le CMH II des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (paragraphe plus loin 2.2.3.1 Activité superantigénique). En tant que superantigène, la SEB provoque une dérégulation du système immunitaire par l'activation des lymphocytes humains T, entraînant une surproduction des cytokines. Cette production de cytokines semble être à l'origine du syndrome de choc toxique (SCT). Des études *in vitro* ont montré que ces toxines pouvaient dans certains cas inhiber la réponse immunitaire humorale et empêcher ainsi la formation d'anticorps.

2.2.1 Structure

La SEB est la mieux connue des entérotoxines staphylococciques. Elle est constituée de deux domaines (I et II) reliés par une boucle de six résidus et séparés par une cavité superficielle. Le domaine I, le plus petit, est formé par 5 feuillets β (1 à 5) et trois hélices α (2, 3 et 5) et correspond à la séquence 30-120. Dans ce domaine deux résidus cystéines (Cys 93 et Cys 113) forment un pont disulfure qui se situe dans une boucle très mobile et qui dépasse

un peu du corps compact de la molécule. Le domaine II est formé de 6 feuillets β (6 à 11) antiparallèles et de 2 hélices α (1 et 4) et correspond aux acides aminés 127 à 239. Le site de liaison au récepteur TCR des lymphocytes T se situe dans la cavité superficielle formé par les deux domaines et le site de liaison au complexe majeur d'histocompatibilité CMH II se trouve dans un site adjacent (sites de l'activité superantigénique) (Kappler et al., 1992; Papageorgiou et al., 1998).

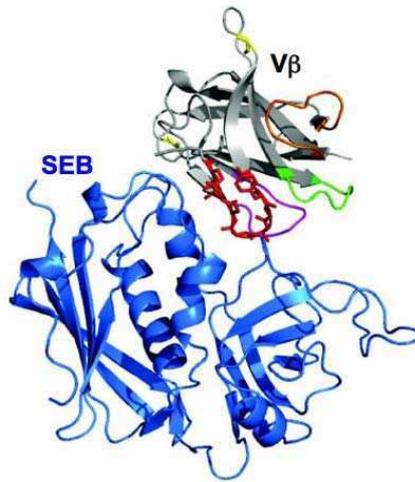


Figure 20. Structure de la SEB avec la région variable de liaison aux lymphocytes T. D'après <http://sciencedaily.com/releases/2007/05/070521145512.htm>, http://www.laborspiez.ch/fr/dok/fa/pdf_f/fact_Sheet_SEB_fr.pdf.

2.2.2 Voies d'expositions, toxicité et effet sur la santé

Les symptômes de l'intoxication par la SEB sont différents selon que la toxine a été ingérée ou inhalée. La valeur ED_{50} (dose efficace) orale des SEB est de $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ et la toxicité (DL_{50}) par inhalation de $20 \mu\text{g}/\text{kg}$. Par conséquent, environ $25 \mu\text{g}$ de SEB absorbées par voie orale entraînent l'apparition de symptômes significatifs dans 50 % des cas. Dans la littérature spécialisée, il est décrit que la sensibilité peut varier fortement d'un individu à l'autre.

2.2.2.1 Intoxication alimentaire (voie alimentaire)

Peu de temps après l'ingestion orale (2 à 4 heures), une hyper salivation accompagnée de nausées fait son apparition, suivie de vomissements subits, de crampes abdominales et de diarrhées. Dans les cas d'intoxication orale, il n'apparaît normalement aucun problème respiratoire ni aucune fièvre. Là encore, des doses élevées peuvent causer un choc septique voire la mort.

2.2.2.2 Intoxication par inhalation (acte de malveillance)

L'intoxication se manifeste après une incubation de 3 à 12 heures par l'apparition brutale d'un syndrome pseudo-grippal (fièvre, frissons, céphalées et myalgies) et de toux sèche. Des symptômes respiratoires (douleurs thoraciques rétro-sternales et dyspnée) sont observés dans les formes plus sévères. Des formes respiratoires graves sont possibles avec œdème aigu du poumon et décompensation respiratoire. La production excessive de cytokines par les cellules T activées par la SEB augmente la perméabilité vasculaire et peut conduire à un œdème pulmonaire étendu (Mattix et al., 1995). Des symptômes digestifs, nausées ou vomissements, sont observés fréquemment. La fièvre peut persister jusqu'à 5 jours et la toux pendant 4 semaines, les malades étant incapables de reprendre leur activité avant 2 semaines (Rusnak et al., 2004). D'autres symptômes tels que des problèmes respiratoires, des nausées, un état de faiblesse voire des œdèmes pulmonaires peuvent se manifester en cas de concentration élevée. La maladie est rarement mortelle.

Les symptômes cliniques d'intoxication par inhalation de la SEB sont similaires à ceux provoqués par de nombreux pathogènes à cible respiratoire (adénovirus, Influenza virus, mycoplasma, etc). Une intoxication par la SEB doit être suspectée devant la survenue brutale et très rapprochée dans le temps (24 heures) d'un syndrome fébrile respiratoire (grippal) chez un grand nombre de personnes avec une exposition géographique commune et une évolution favorable dans la grande majorité des cas.

2.2.3 Mode d'action

La SEB possède deux activités : l'activité superantigénique à l'origine du syndrome de choc toxique (SCT) et l'activité émétique, à l'origine des vomissements.

2.2.3.1 Activité superantigénique

L'activité superantigénique résulte de l'interaction directe de la SEB avec le récepteur TCR sur les lymphocytes T et le CMH II présent sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Un antigène normal est présenté par le récepteur T des lymphocytes T (TCR) après dégradation intracellulaire dans les cellules présentatrices d'antigène (CPA), sous forme de peptides associés aux molécules du CMH II ou I (Figure 21). Cette reconnaissance de l'antigène par les cellules T est une étape primordiale dans la réponse immunitaire cellulaire

et la clé de sa spécificité. Un nombre très restreint de cellules T peuvent reconnaître un antigène spécifique présenté par le CMH des CPA (Davis and Bjorkman, 1988). Un superantigène interagit avec les cellules T par une reconnaissance spécifique des récepteurs T (TCR) (reconnaissance du domaine V β). Il est donc capable de lier le récepteur T aux molécules CMH II des CPA (Figure (B) 21) déclenchant une activation non spécifique de cellules T (prolifération massive) et une forte production de cytokines et d'interleukines contribuant au mécanisme de toxicité de la SEB et des autres SEs (Kappler et al., 1994; Marrack et al., 1990). Cette activation dramatique des cellules T (près de 20% de l'ensemble des cellules T) cause le syndrome de choc toxique.

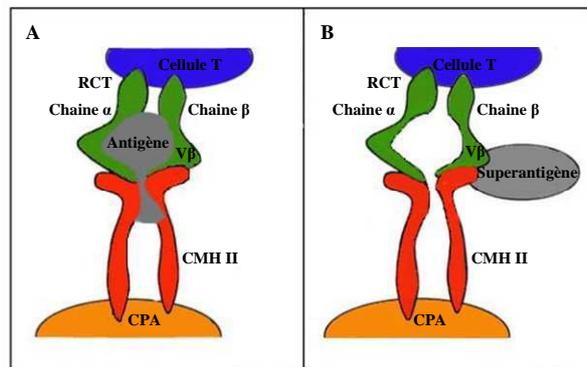


Figure 21. Activation spécifique et non spécifique des cellules T.

- A-** Activation des cellules T par un antigène conventionnel. Le peptide (antigène) est présenté à la surface de la CPA par le CMH II. Ce complexe attire les cellules T portant un récepteur RCT avec une chaîne V β spécifique de l'antigène présenté.
- B-** Activation non spécifique des cellules T par un superantigène. Le superantigène se fixe directement au CMH II et se lie à la chaîne V β du RCT initiant une activation non spécifique des cellules T. D'après (Balaban and Rasooly, 2000).

2.2.4 Activité émétique

L'activité émétique existe chez la SEB et chez les autres entérotoxines staphylococciques (SEs). C'est une activité mal caractérisée. Les symptômes d'intoxication alimentaire provoqués par la SEB peuvent avoir différentes origines: effet direct sur l'épithélium intestinal et/ou stimulation des mastocytes et libération massive des leucotriènes et de l'histamine agissant sur le nerf vague et stimulant ainsi le centre émétique (Arbuthnott et al., 1990). La SEB possède une cystéine qui semble être impliquée dans l'activité émétique (Hovde et al., 1994). Une hypothèse suggère que l'activité émétique facilite le passage de la SEB à travers l'épithélium intestinal et permet ainsi à la toxine de rejoindre la circulation sanguine et d'interagir avec les cellules T conduisant à l'activité super antigénique (Hamad et al., 1997).

2.2.5 Mise en évidence de la toxine SEB

L'entérotoxine B staphylococcique (SEB) est facilement identifiable en tant que protéine à l'aide des méthodes immunologiques. Il existe sur le marché des systèmes de mise en évidence rapide, appelés Lateral Flow Assays (immunochromatographie sur membrane), présentant une bonne sensibilité (Limite de Détection = < 10 ppb ou < 10 ng/ml), qui permettent d'identifier la SEB en une vingtaine de minutes (fabricant: NBC-Sys). Ce test est avant tout conçu pour des solutions aqueuses et prélèvements par frottis. Un kit ELISA est également disponible dans le commerce (fabricant: R-Biopharm, D) et permet de mettre en évidence différents sérotypes de SEB dans les denrées alimentaires. De même, dans les analyses de laboratoire classiques, on utilise des méthodes immunologiques comme ELISA Sandwich (plaques de microtitration à 96 puits) ou des systèmes multiplex (X-Map Luminex Technology, BioPlex 200 de Bio-Rad), mais également des procédés de spectrométrie de masse comme Peptide-Map.

2.2.6 La SEB en tant qu'arme biologique

Dans le domaine militaire, la SEB est reconnue comme agent incapacitant. De petites quantités suffisent pour provoquer de forts symptômes d'intoxication ayant en peu de temps un effet complètement incapacitant sur les personnes affectées. Cependant, les intoxications létales sont rares. L'utilisation de cet agent peut, si le nombre de patients est élevé, paralyser rapidement une infrastructure médicale. La SEB est considérée comme une arme biologique potentielle (facile à synthétiser, à lyophiliser et à aérosoliser) et son potentiel « incapacitant » à l'égard d'un très grand nombre de personnes simultanément a été largement étudié aux Etats-Unis dans les années 1960. La dose « incapacitante » par inhalation pour 50% de la population exposée (DE50) a été estimée par modélisation à 0,4 ng/kg et la dose létale pour 50 % de la population exposée (DL50) à 0,02 µg/kg (Gill, 1982; Ler et al., 2006). Les DL50 et DE50 n'ont pas été déterminées pour les autres voies d'exposition. Une utilisation sous forme d'aérosols ou une contamination de la chaîne alimentaire à des fins malveillantes sont possibles.

Aujourd'hui, il n'existe ni vaccins ni traitements contre la SEB. Néanmoins, un vaccin nommé STEBVax est en début d'étude clinique (Boles et al., 2003; Stiles et al., 2001; Ulrich et al., 1998) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00974935>).

De plus, compte tenu des nombreux effets néfastes pouvant être causés par la SEB (intoxication alimentaire ou agent de malveillance), disposer de solutions et de réponses contre la SEB est nécessaire. L'immunothérapie par injection intraveineuse d'IgG ayant déjà fait ses preuves contre d'autres toxines, des laboratoires ont développé des anticorps humains contre la SEB. Des publications ont fait état de la production d'anticorps chimériques et d'anticorps humains contre la SEB (Drozdowski et al., 2010; Karauzum et al., 2012; Tilahun et al., 2011). Cette année un laboratoire a produit des anticorps humains de type IgGs dirigés contre la SEB à l'aide du phage display (Karauzum et al., 2012). D'autre part, récemment la purification de lymphocytes B humains et leur fusion avec un hétéromyélome, le CB-F7, par électrofusion sans immortalisation virale par l'EBV a permis l'obtention de 3 hybridomes sécréteurs d'anticorps contre la SEB (Drozdowski et al., 2010; Grunow et al., 1988; Karauzum et al., 2012; Tilahun et al., 2011) (Larkin et al., 2010).

RESULTATS ET DISCUSSION

Etant donné qu'il n'existe aucune thérapie actuellement disponible pour traiter une intoxication à l'entérotoxine B (SEB) et compte tenu de son utilisation potentielle à des fins terroristes, nous nous sommes appliqués à produire des anticorps monoclonaux humains dirigés contre la SEB grâce à la technique d'immortalisation par le virus Epstein-Barr (EBV) couplée ou non à la fusion cellulaire avec un myélome.

1 Méthodologie utilisée

Aujourd'hui, il existe de nombreuses techniques pour produire des anticorps humains (souris transgéniques, phage display, lymphocytes B), nous avons essayé de produire des anticorps humains en utilisant la méthodologie développée dans le laboratoire d'Antonio Lanzavecchia à savoir la purification et l'immortalisation de lymphocytes B mémoires de donneurs ayant déjà rencontré la SEB. Les anticorps peuvent être directement obtenus après clonage par dilution limite à partir des lymphocytes B immortalisés, ce qui est le cas pour les anticorps anti-SRAS et anti-H1N1 (Buchacher et al., 1994; Simmons et al., 2007; Traggiati et al., 2004). Nous avons décidé de coupler l'étape d'immortalisation à celle de la fusion cellulaire avec un myélome. En effet, des publications font l'état de couplage de l'immortalisation et de la fusion pour stabiliser et augmenter le rendement d'obtention d'anticorps (Emanuel et al., 1984; Kozbor and Roder, 1981; Kozbor et al., 1982b).

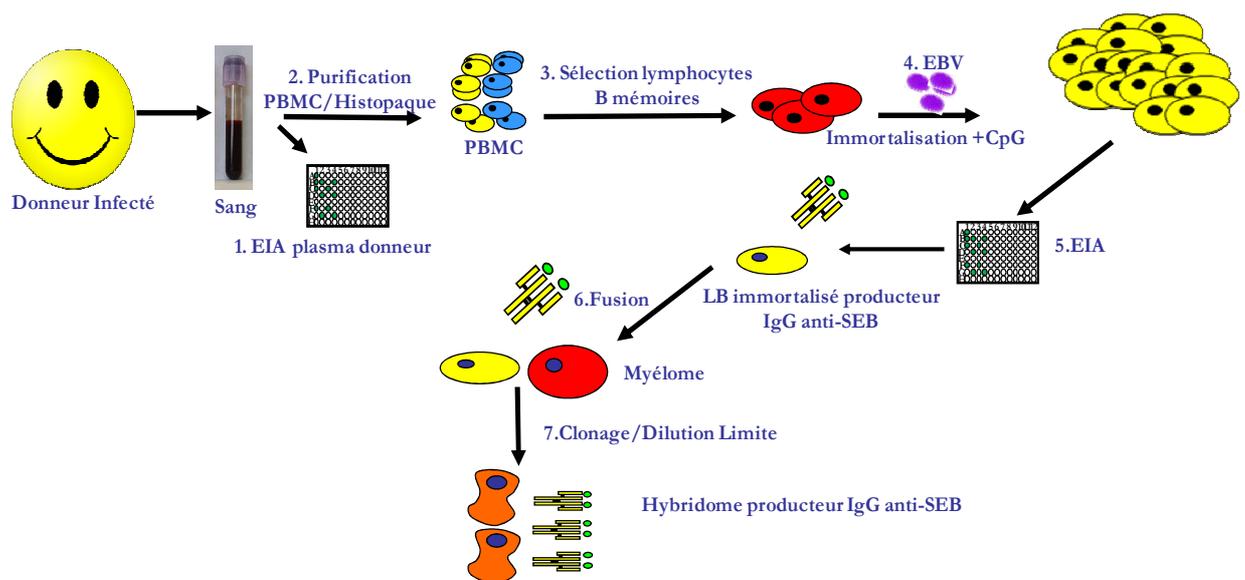
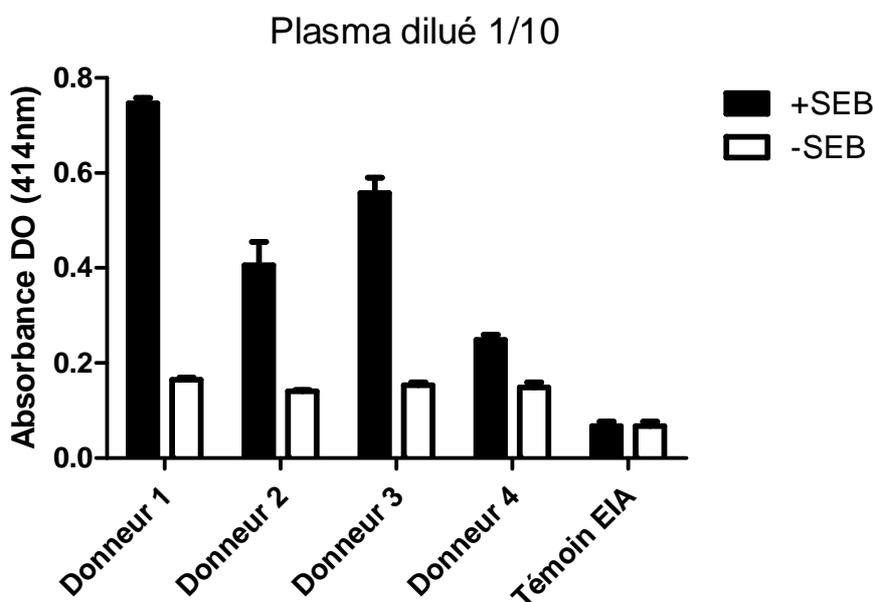


Figure 22. Protocole de production d'IgGs anti-SEB à partir de lymphocytes B mémoires d'un donneur immunisé contre la SEB.

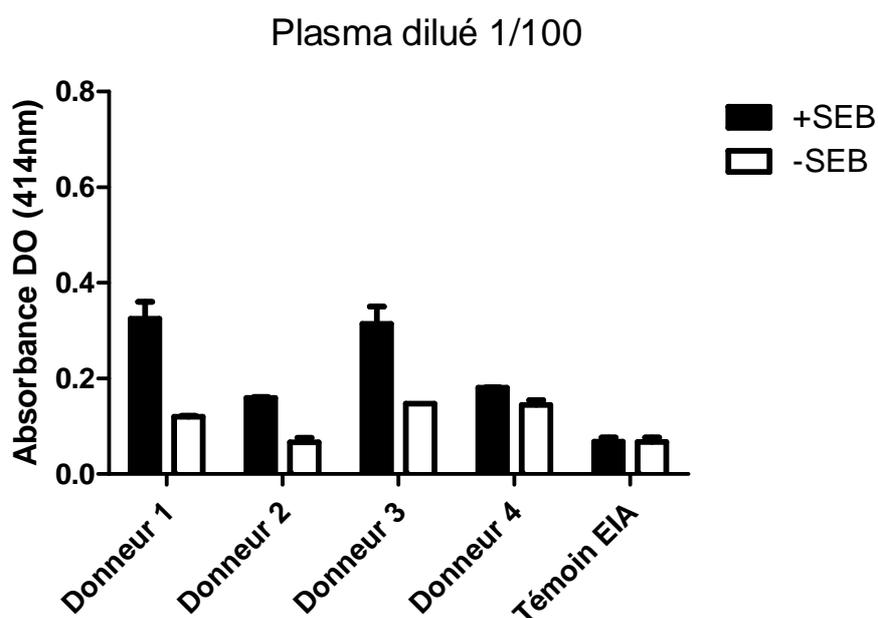
2 Sélection des donneurs sanguins et des lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB

2.1 Sélection du donneur de sang

Nous étions intéressés par produire des anticorps humains anti-SEB à partir de donneurs humains ayant déjà rencontré notre cible, la SEB. Dans une première expérience, il a fallu vérifier la présence d'IgGs dirigés contre la SEB dans le plasma des donneurs utilisés. La présence d'IgGs anti-SEB dans le plasma des donneurs reflétait la présence de lymphocytes B mémoires spécifiques de la SEB. Pour cela, les plasmas de 4 donneurs, dilués au 1/10 et au 1/100, ont été incubés une nuit sur une plaque recouverte de neutravidine (5 µg/ml) en présence ou pas de SEB-biotinylée (0,5 µg/ml) puis un traçeur spécifique des IgGs humaines totales est ajouté pour détecter la présence d'IgGs anti-SEB (paragraphe 8.3 Les dosages immunologiques utilisant la SEB, Matériels et Méthodes). Le témoin EIA (tampon de dilution des échantillons) est utilisé comme contrôle négatif. Chaque dilution de plasma est testée en duplicat, la moyenne des points est ensuite analysée. Les plasmas contenant des IgGs anti-SEB sont les plasmas dont les signaux en présence de la SEB-biotinylée sont supérieurs à ceux observés en absence de SEB-biotinylée, et à ceux observés pour le contrôle négatif.



1/10	Ratio+/- SEB-biotinylée
Donneur 1	4,28
Donneur 2	3,18
Donneur 3	3,68
Donneur 4	1,62



1/100	Ratio+/- SEB-biotinylée
Donneur 1	2,95
Donneur 2	2,13
Donneur 3	2,36
Donneur 4	1,17

Figure 23. Dosage des anticorps IgGs anti-SEB dans le plasma de différents donneurs.

50 µl de plasmas dilués au 1/10 ou au 1/100 de chaque donneur sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques de titration où la neutravidine a préalablement été adsorbée. La SEB-biotinylée et l'IgGh-G4 sont ajoutés avant l'incubation en réactif d'Ellman. La densité optique est alors mesurée à 414 nm après 30 minutes d'incubation. Un tableau donne pour chaque dilution de plasma le rapport entre la présence et l'absence de SEB-biotinylée. SEM sur les barres d'erreurs.

Le choix de la SEB comme antigène d'intérêt fut motivé par des travaux visant à doser la réponse en Acs notamment IgGs contre diverses protéines de *Staphylococcus aureus* chez des donneurs sains. Cette étude a montré la présence d'Acs spécifiquement dirigés contre *Staphylococcus aureus* et contre la SEB (Bell et al., 1987; Colque-Navarro et al., 2010; Dryla et al., 2005). Comme attendu, nous avons constaté que les plasmas des 4 donneurs testés présentent des différences de signaux en présence et en absence de SEB (ratio des signaux obtenus allant de 1 à 4). Les plasmas testés contenaient donc des IgGs dirigés spécifiquement contre la SEB (Figure 23). Ceci reflète la présence de lymphocytes B et notamment lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB chez les 4 donneurs testés. De plus, les niveaux en IgGs anti-SEB sont variables selon les donneurs. Nous avons pu constater que quelque soit la dilution testée le plasma du donneur 1 présente la plus grande différence de signal en présence/absence de SEB-biotinylée (ratio de 4,28 au 1/10 et de 2,95 au 1/100). Le sang du donneur 1 contenant la plus grande quantité d'IgGs anti-SEB, il a été utilisé pour purifier les lymphocytes B mémoires.

2.2 Purification des lymphocytes B mémoires du donneur 1

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées par un Histopaque (paragraphe 3 Purification PBMCs, Matériel et Méthodes). Environ $5 \cdot 10^8$ PBMCs ont été utilisées pour sélectionner les lymphocytes B mémoires. Les lymphocytes B mémoires possèdent un marqueur spécifique le CD27. Grâce à une sélection positive utilisant des billes magnétiques sur lesquelles un anticorps dirigé contre le CD27 a été couplé, environ $1,8 \cdot 10^6$ lymphocytes B mémoires ont été purifiés. Ces lymphocytes B ont été immortalisés par le virus Epstein-Barr. Ce nombre de cellules ($1,8 \cdot 10^6$) apparaît faible. Mais, il est connu que le sang bien qu'étant la source la plus accessible des cellules, n'est pas le compartiment le plus riche en lymphocytes. En effet, les amygdales représentent une source plus importante en terme de lymphocytes B et donc de lymphocytes B mémoires.

3 Immortalisation des lymphocytes B mémoires par le virus Epstein-Barr (EBV)

3.1 Test de la qualité de production des virus EBV

Les virus Epstein-Barr (EBV) ont été produits au sein du laboratoire à partir de la lignée cellulaire B95-8 de singe Marmouset. Ces cellules sont capables sous différents stimuli de sécréter le virus EBV. Après environ 3 semaines de culture, ces cellules libèrent dans le surnageant de culture les virus EBV. Ces virus sont récupérés par centrifugation et conservés sous forme de Transfokits (paragraphe 6.1 Production des virus Epstein-Barr, Matériels et Méthodes). Un Transfokit est capable d'infecter 3 à $5 \cdot 10^6$ PBMCs et $1 \cdot 10^6$ lymphocytes B mémoires.

Afin de vérifier la capacité d'infection des virus EBV produits, 2 séries de $4 \cdot 10^6$ cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées par un Histopaque et infectées soit par 1 transfokit produit au sein du laboratoire soit par un transfokit de référence produit dans un laboratoire à Reims (CHU de Reims - Hôpital Robert Debré - Laboratoire d'Immunologie J Cohen) en présence de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de CpG. Les CpG sont des séquences immunomodulatrices favorisant l'immortalisation (Bernasconi et al., 2002). Après environ 8 jours de culture, des grappes caractéristiques de l'infection à EBV sont observables et illustrent l'infection des lymphocytes B présents dans les PBMCs. Ces grappes sont aussi bien observées avec le Transfokit produit au sein du laboratoire que celui provenant du laboratoire de référence (Figure 24). La présence de cyclosporine A dans les Transfokits inhibe l'infection des lymphocytes T et leur effet sur les lymphocytes B ayant été infectés par EBV.

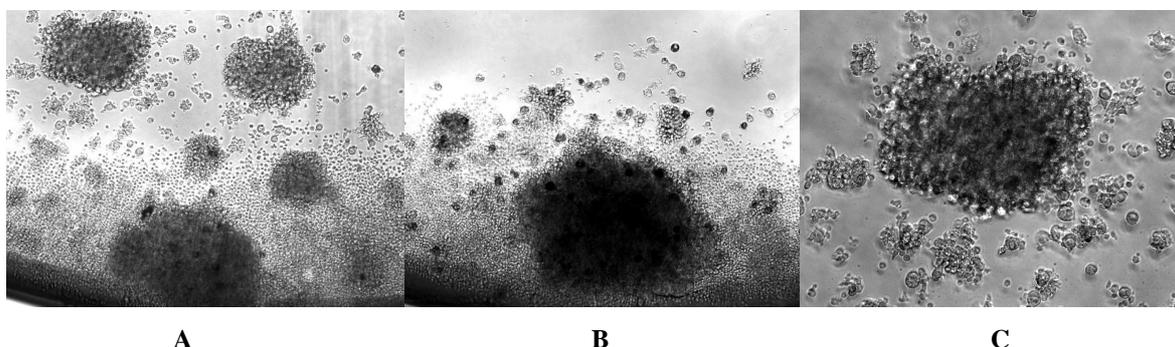
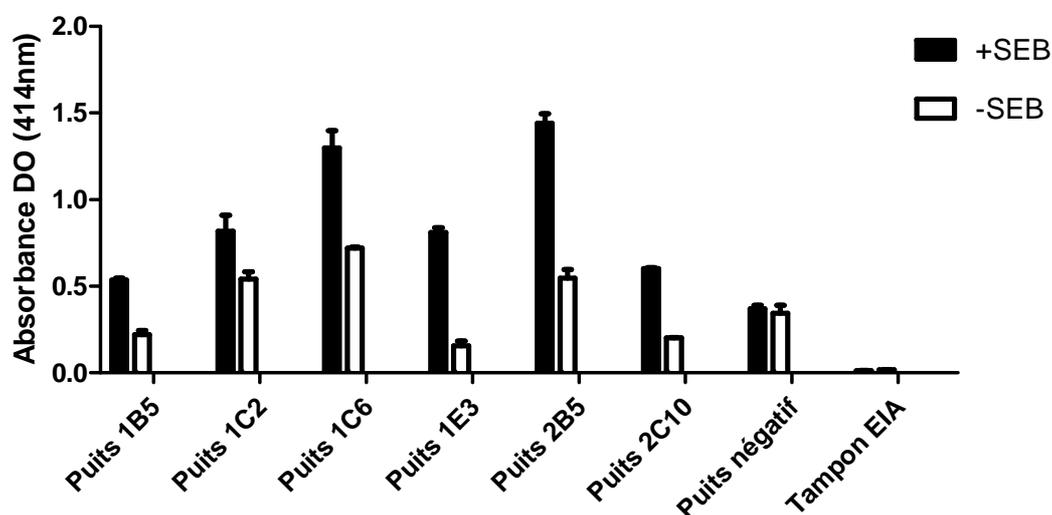


Figure 24. Immortalisation. PBMCs immortalisées avec le virus EBV produits au laboratoire (A) ou par le laboratoire de référence (B). Un grossissement de la grappe permet de visualiser les spicules caractéristiques de l'immortalisation (C) (microscope optique x200 ou x400).

3.2 Immortalisation des lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB

Les lymphocytes B mémoires ($1,8.10^6$) sélectionnés précédemment ont été immortalisés avec 2 Transfokits produits au sein du laboratoire. 80 puits d'immortalisation ont été obtenus. Environ après un mois d'immortalisation et de culture, les surnageants de culture sont testés par le dosage ELISA précédemment décrit. 6 puits présentent une augmentation du signal en présence de SEB biotinylée et sont illustrés dans la Figure 25 ci-après. Ces puits (**1B5, 1C2, 1C6, 1E3, 2B5, 2C10**) contenant des lymphocytes B mémoires immortalisés sécréteurs d'IgGs anti-SEB sont mis en expansion puis leur contenu est congelé pour les conserver.



	Ratio +/- SEB-biotinylée
1B5	2,23
1C2	1,55
1C6	1,92
1E3	4,57
2B5	2,50
2C10	2,97

Figure 25. Dosage des puits d'immortalisation de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB. 50 μ l des surnageants de culture purs sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques de titration où la neutravidine a préalablement été adsorbée. La SEB-biotinylée et l'IgGh-G4 sont ajoutés avant la réaction avec le réactif d'Ellman. La densité optique est alors mesurée à 414 nm après 30 minutes d'incubation. Un tableau donne le rapport entre la présence et l'absence de SEB-biotinylée.

D'après ces résultats (Figure 25), 6 puits : **1B5, 1C2, 1C6, 1E3, 2B5, 2C10** présentent des signaux en présence de SEB-biotinylée 2 à 4 fois plus fort que sans SEB. Le rendement obtenu est faible puisque seuls 6 puits immortalisés sur 80 puits d'immortalisation sécrètent des IgGs anti-SEB. Pour améliorer cette technologie et augmenter le rendement en Acs, des techniques d'enrichissement des lymphocytes B spécifiques de la cible ont été étudiées. Ainsi Kozbor et Roder observent une augmentation de la production en anticorps anti-toxine tétanique (TT) après sélection des lymphocytes B fixant spécifiquement l'antigène TT et élimination des autres lymphocytes B (Kozbor and Roder, 1981). De même, le groupe de Lanzavecchia avant immortalisation avec le virus EBV sélectionnait grâce à des billes magnétiques les lymphocytes B mémoires spécifiques du SRAS (Traggiai et al., 2004). Afin d'améliorer notre rendement, nous pourrions sélectionner les lymphocytes B mémoires sécrétant spécifiquement des IgGs anti-SEB par un système de billes magnétiques spécifiques de la SEB. D'autre part, une étape de criblage employant l'ELISA décrit précédemment pour l'analyse des lymphocytes B mémoires totaux permettrait de sélectionner les meilleurs lymphocytes B mémoires avant immortalisation. De plus, ces étapes supplémentaires d'enrichissement et de concentration cellulaire pourraient également être effectuées après l'immortalisation par le virus EBV.

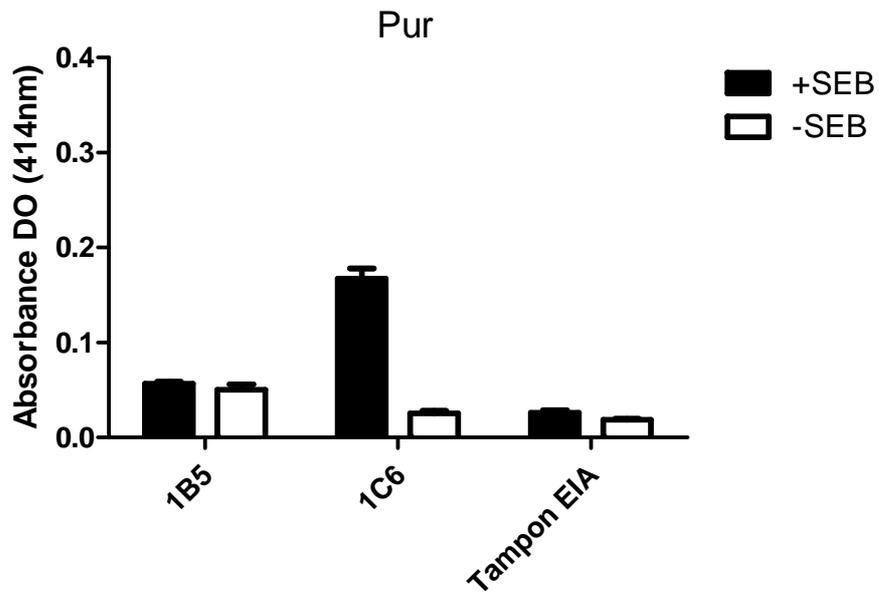
En parallèle de la congélation, les cellules des 6 puits sont cloné par dilution limite (clonage large 50 cellules/ml et 10 cellules/ml) pour isoler la cellule productrice d'IgGs anti-SEB. Malheureusement, aucune cellule sécrétrice n'a pu être isolée. Après un premier clonage, les cellules sont présentes mais ont perdu l'expression d'IgGs spécifiques de la SEB. Ceci soulève le problème de la stabilité de sécrétion des lignées immortalisées par EBV. Le problème de la stabilité de sécrétion en anticorps spécifiques des cellules pourrait être résolu en cultivant les cellules immortalisées en présence de CpG, séquence favorisant l'immortalisation et la survie des lymphocytes (Bernasconi et al., 2002; Krieg, 2002) ou d'interleukines comme les interleukines 6 ou 2 (IL-6, IL-2) impliquées dans la prolifération des lymphocytes B. Certaines équipes, pour limiter le coût induit par l'utilisation des ces molécules, ont décidé d'ajouter une étape d'immortalisation cellulaire (fusion avec un myélome), à celle de l'immortalisation virale.

4 Fusion des lymphocytes B mémoires immortalisés par le virus Epstein-Barr (EBV)

Compte tenu des problèmes de stabilité rencontrés lors des clonages des LB mémoires immortalisés, nous avons décidé de fusionner les puits contenant les LB mémoires immortalisés sécréteurs d'IgGs anti-SEB. Il a été décrit dans la littérature que la fusion avec un partenaire cellulaire de type myélome après une immortalisation augmenterait la stabilité des LB immortalisées (Kozbor et al., 1983; Kozbor et al., 1982a; Kozbor and Roder, 1981; Kozbor et al., 1982b). Divers partenaires myéломateux murins, humains ou de type hétéromyélome ont été utilisés pour fusionner ce type de cellules. Au laboratoire, nous disposons de plusieurs myélobes murins (Sp2O/O, NS1, X63) et d'un hétéromyélome humain/murin HM (don de l'Institut Pasteur, Paris). Dans un premier temps, il a fallu décongeler les lymphocytes B mémoires immortalisés pour vérifier la production en IgGs spécifiques de la SEB et ensuite fusionner.

4.1 Décongélation des puits immortalisés

Une ampoule de chacun des puits d'immortalisation 1B5 et 1C6 est décongelée. La décongélation s'effectue selon la procédure connue : décongélation rapide de l'ampoule à 37°C pour éviter les effets néfastes du DMSO et resuspension en milieu de culture préchauffé à 37°C. Le lendemain de la décongélation, un premier criblage des surnageants de culture pur ou dilué au 1/10 est réalisé avec le test ELISA décrit dans le paragraphe précédent 2.1. A ce stade nous n'avons obtenu aucun signal. Un nouveau dosage ELISA est réalisé 4 jours après la décongélation pour voir si les puits sont positifs. Une lecture à 30 minutes est réalisée.



Pur	Ratio+/- SEB-biotinylée
1B5	1
1C6	6

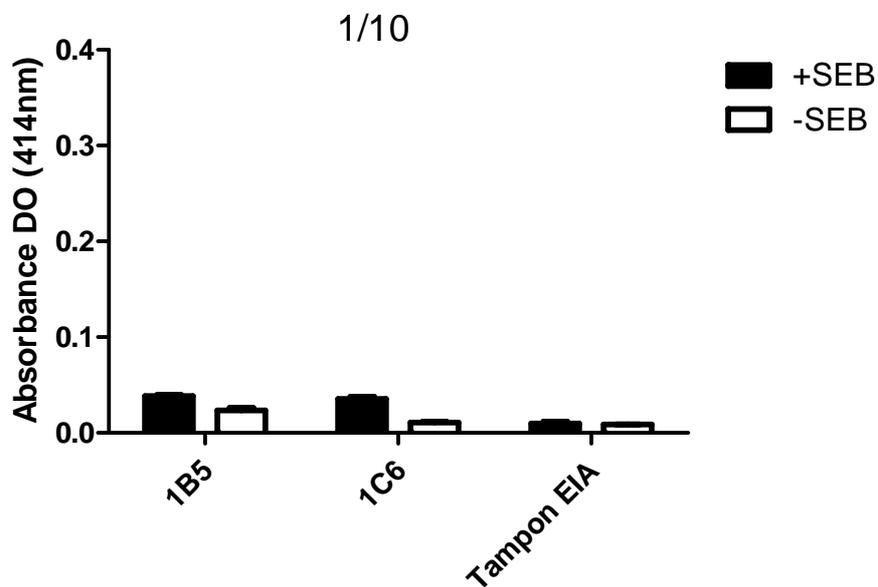


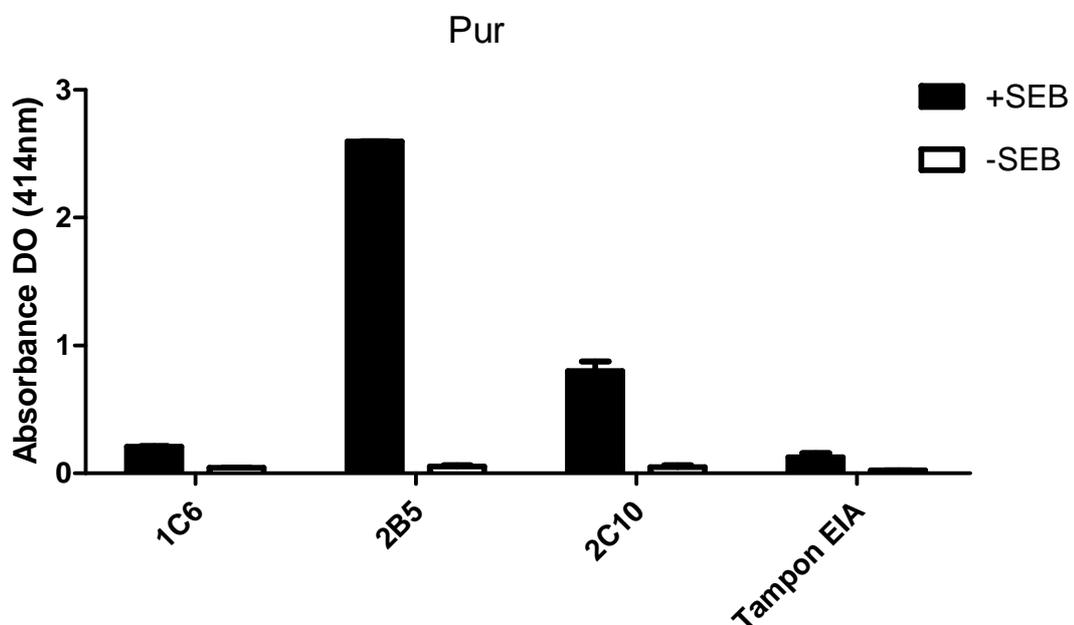
Figure 26. Dosage des puits d'immortalisation décongelés de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB. 4 jours après décongélation. T=30 minutes.

50 µl des surnageants de culture de décongélation purs ou dilués 1/10 sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques de titration où la neutravidine a préalablement été adsorbée. La SEB-biotinylée et l'IgGh-G4 sont ajoutés avant la réaction avec le réactif d'Ellman. La densité optique est alors mesurée à 414 nm après 30 minutes d'incubation. Un tableau donne le rapport entre la présence et l'absence de SEB-biotinylée.

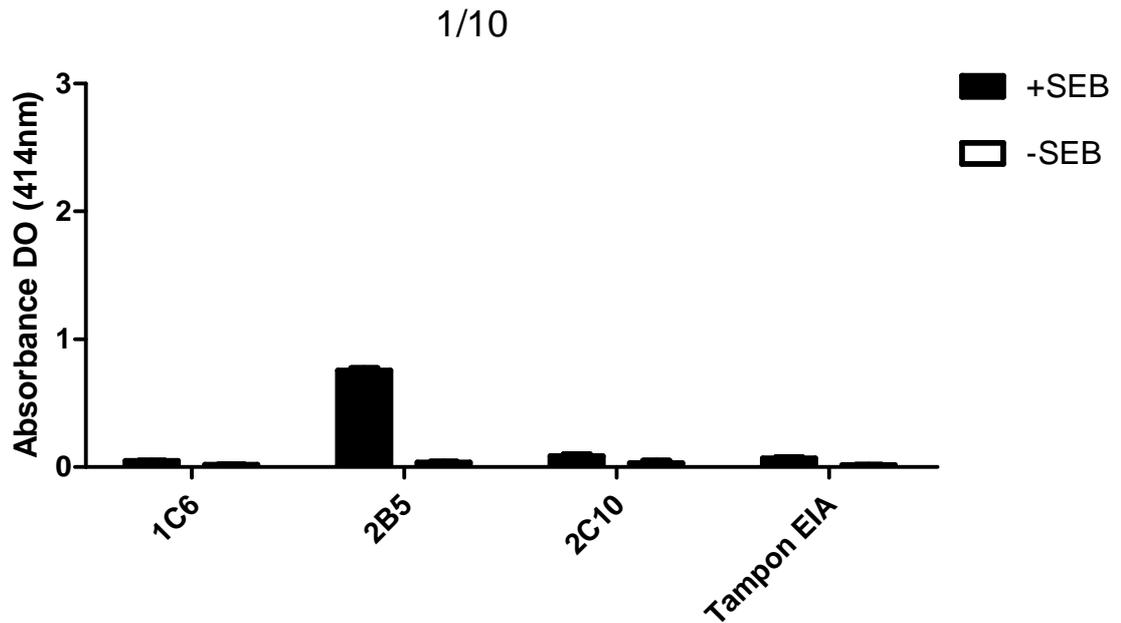
En comparant ces résultats avec ceux obtenus pour 1B5 et 1C6 avant congélation au même temps de lecture 30 minutes (Figure 25 versus Figure 26), nous pouvons constater que le taux d'IgGs anti-SEB est inférieur après l'étape de congélation/décongélation. En effet, avant congélation le puits 1B5 présentait une DO d'environ 0,500 (0,546) (Figure 25), alors qu'après décongélation, la DO est d'environ 0,05 (Figure 26). De même, le puits 1C6 présente une forte diminution de signal, passant d'environ 1,4 avant congélation (Figure 25) en DO à environ 0,167 après décongélation (Figure 26).

Le premier dosage réalisé au lendemain de la décongélation pour lequel aucun signal n'a été obtenu, montre que la production d'anticorps par les lymphocytes B immortalisés par EBV est moins importante ou plus longue à se mettre en place que celle des hybridomes murins.

La diminution de signal observable à 30 minutes avant et après congélation témoigne d'une perte d'expression. Nous avons décongelé les cellules de deux autres puits, 2B5 et 2C10 présentant des signaux élevés avant congélation, et une autre ampoule du puits 1C6 pour voir si la perte de signal observée ne serait pas due à un problème lors de la congélation/décongélation ou à une instabilité propre de ce type de cellules. Les surnageants de culture de ces puits sont testés après 4 jours de décongélation purs et dilués au 1/10 selon l'ELISA +/- SEB-biotinylée décrit paragraphe 2.1.



Pur	Ratio+/- SEB-biotinylée
1C6	4,95
2B5	48
2C10	16



1/10	Ratio+/- SEB-biotinylée
1C6	2,45
2B5	21
2C10	2,7

Figure 27. Dosage des puits d'immortalisation décongelés de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB.

50 µl des surnageants de culture de décongélation purs ou dilués 1/10 sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques de titration où la neutravidine a préalablement été adsorbée. La SEB-biotinylée et l'IgGh-G4 sont ajoutés avant réaction avec le réactif d'Ellman. La densité optique est alors mesurée à 414 nm après 1 h d'incubation. Un tableau donne le rapport entre la présence et l'absence de SEB-biotinylée.

Les signaux observés (Figure 27) pour les cellules du puits 1C6 et 2C10 sont du même ordre de grandeur que le témoin tampon EIA. Nous pouvons donc en conclure que les lymphocytes B immortalisés en croissance dans les puits ont perdu leur capacité de sécrétion d'IgGs anti-SEB.

Concernant le puits 2B5, les rapports entre les signaux en présence et absence de SEB-biotinylée sont respectivement de 21 et 48 pour les surnageants dosés dilués au $1/10^{\text{ième}}$ ou purs. Ainsi l'étape de congélation/décongélation peut avoir des effets néfastes plus ou moins importants sur la production d'anticorps par des lymphocytes B immortalisés par EBV.

Ainsi la capacité de production des immunoglobulines serait plus ou moins stable en fonction des cellules.

A la vue de ces résultats les cellules correspondant au puits 2B5 ont été utilisées pour l'étape de fusion.

4.2 Préparation de la fusion

Compte tenu de la diversité des protocoles de fusion de lymphocytes B immortalisés présentés dans la littérature, soit fusion avec des partenaires murins, avec des partenaires humains ou de type hétéromyélome (Dessain et al., 2004; Kudo et al., 1988), nous avons décidé d'étudier différents paramètres de ces protocoles. Pour cela, nous avons effectué diverses fusions dans différentes conditions (ratio, milieu de culture, différents partenaires myélomateux) afin de trouver le protocole le mieux adapté. Avant d'effectuer la fusion, dans une première série d'expérience, nous avons comparé la mortalité des lymphocytes B immortalisés et celle des différents myélomes utilisés en présence d'ouabaïne.

4.2.1 Mise au point de la concentration d'ouabaïne

Contrairement aux lymphocytes B normaux, les lymphocytes B ayant subi une étape d'immortalisation ne meurent pas après quelques jours. En effet, l'immortalisation par le virus EBV permet l'expansion clonale et permanente de lymphocytes B. Une drogue appelée l'ouabaïne (ou g-strophanthine), un glycoside cardiotonique intervenant dans la perméabilité des cellules et plus précisément dans le transport actif des ions Na^+/K^+ , induit la mort cellulaire des lymphocytes B immortalisés en agissant sur la pompe Na/K ATPase (Roder et al., 1986). De nombreuses publications utilisent l'ouabaïne à des concentrations différentes allant de 2×10^{-6} M (Kudo et al., 1988) à 10×10^{-6} M (Kozbor et al., 1982a), ou encore 3×10^{-10}

M (A.Tissent, 2007). En premier lieu, nous avons réalisé une gamme d'ouabaïne dans le milieu de culture afin de déterminer la concentration la mieux adaptée, avec les lymphocytes B immortalisés issus du puits 2B5. Environ 200 000 lymphocytes B immortalisés ont été cultivés en présence ou non d'ouabaïne. Deux gammes d'ouabaïne ont été testées : la première allant de 5×10^{-4} M à 5×10^{-10} M et la seconde allant de 3×10^{-4} M à 3×10^{-10} M d'ouabaïne.

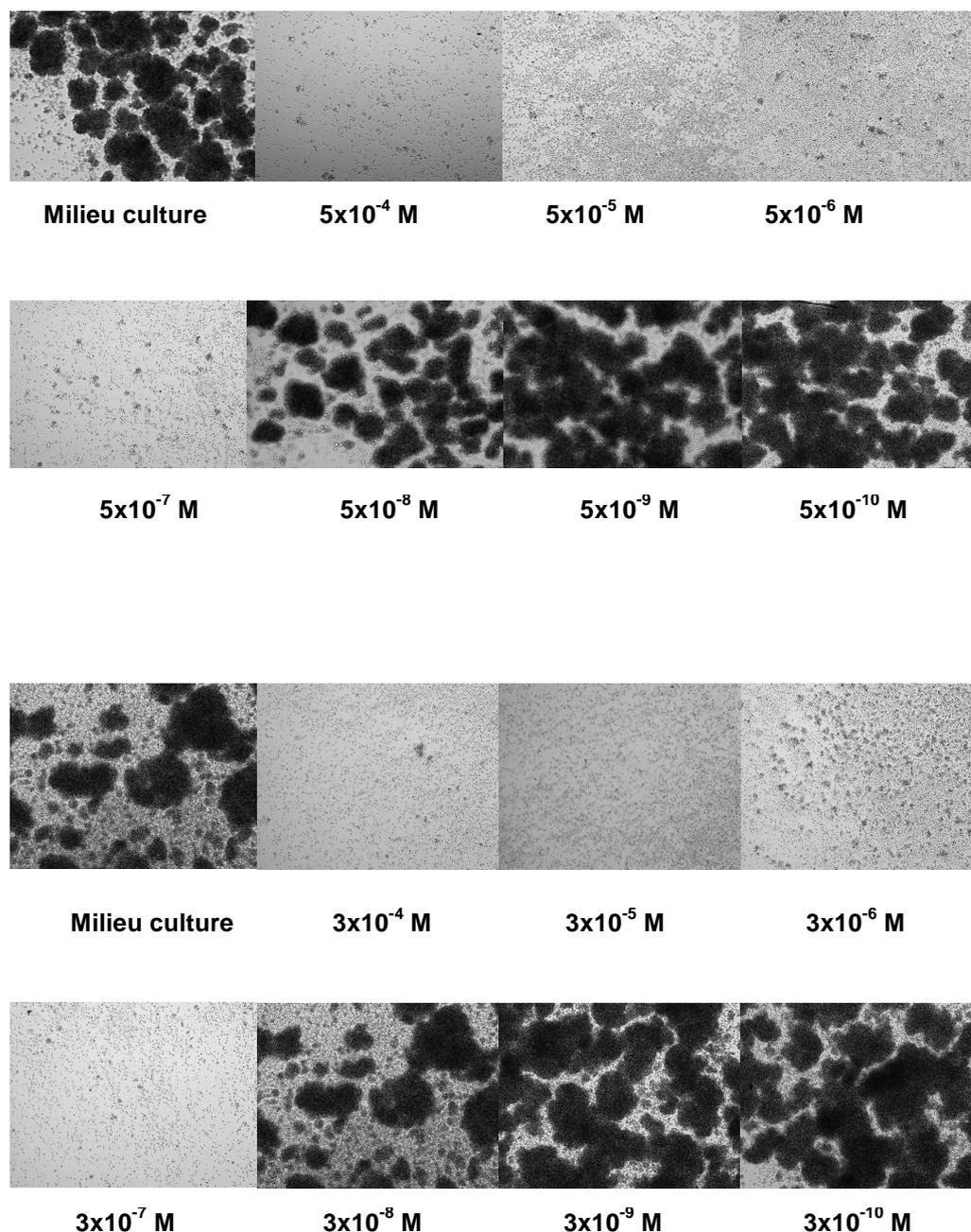


Figure 28. Gamme d'ouabaïne.

200 000 cellules/puits sontensemencés en plaque 24 puits et la mortalité est évaluée 4 jours après au microscope optique grossissement x40.

Les résultats obtenus au cours des deux expériences sont très similaires (Figure 28). En absence d'ouabaine les lymphocytes B immortalisés 2B5 présentent une croissance normale. L'ajout d'ouabaine à des concentrations allant de 5×10^{-4} M à 5×10^{-6} M induit une disparition totale des grappes caractéristiques des lymphocytes B immortalisés. A partir de la concentration 3×10^{-8} M d'ouabaine jusqu'à 3×10^{-10} M, l'ouabaine n'a aucun effet sur la croissance lymphocytes B immortalisés. En effet, on observe des grappes de cellules, reflétant une croissance cellulaire. Entre 3×10^{-5} M et 5×10^{-7} M de ouabaine, il y a une inhibition partielle de la croissance des lymphocytes B immortalisés.

La concentration d'ouabaine la plus faible qui permet d'induire une mortalité cellulaire totale des lymphocytes B immortalisés est celle à 5×10^{-6} M. Cette concentration sera utilisée lors de toutes les expériences de fusion.

4.2.2 Vérification de l'absence d'effet de l'Hypoxantine Aminoptérine Thymidine (HAT) sur les lymphocytes B immortalisés

Les myélomes de souris ou humains utilisés dans les fusions sont déficients en une enzyme, l'hypoxanthine guanosine phosphoryl transférase (HGPRT). Dans un milieu de culture contenant de l'Hypoxantine, de l'Aminoptérine et de la Thymidine, leur croissance est inhibée (Köhler and Milstein, 1975). Nous avons voulu savoir si l'Hypoxantine Aminoptérine Thymidine (HAT) ajouté dans le milieu de culture de la fusion pour induire la mortalité du myélome avait un effet sur la croissance des lymphocytes B mémoires immortalisés. Pour cela, 200 000 lymphocytes B immortalisés 2B5 ont été mis en culture avec du milieu de culture contenant ou pas de l'HAT 50 x (concentration préconisée par le fournisseur) en présence ou non de l'ouabaine à 5×10^{-6} M.

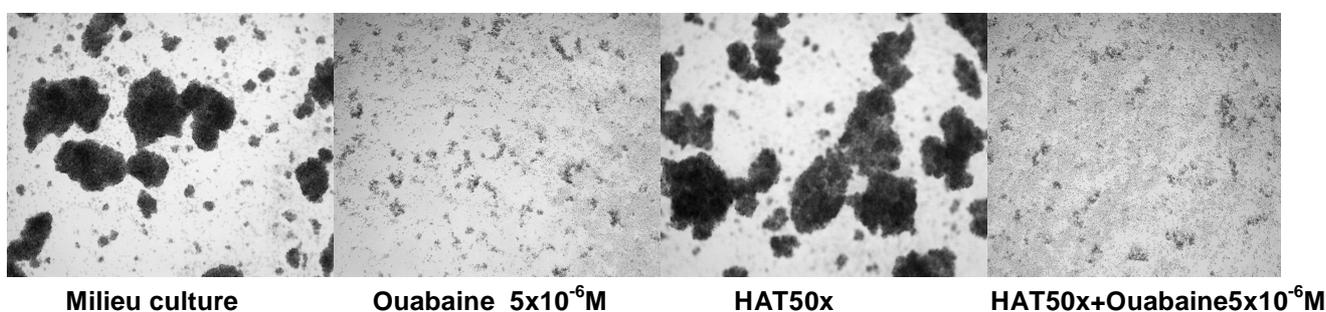


Figure 29. Effet HAT sur des lymphocytes B immortalisés par EBV. 200 000 cellules/puits sont ensemencés en plaque 24 puits et la mortalité est évaluée à 4 jours après en observation au microscope optique grossissement x40.

On peut observer sur la Figure 29 que l'ajout de l'HAT 50 x n'induit aucun effet sur la croissance des lymphocytes B immortalisés. Par contre, l'ajout d'ouabaine avec ou sans HAT induit un ralentissement de croissance.

4.2.3 Vérification de la mortalité des myélomes sous HAT et ouabaine

L'ouabaine agit spécifiquement sur les cellules immortalisées par EBV, nous avons voulu cependant vérifier l'absence d'effet de l'ouabaine sur les myélomes. Environ 200 000 cellules des différents myélomes sont incubés avec de l'HAT, de l'ouabaine à 5×10^{-6} M ou les 2 ensemble. Après quelques jours, la mortalité ou la croissance des cellules est observée au microscope.

Myélome	HAT	OUABAINÉ 5×10^{-6} M	HAT+OUABAINÉ 5×10^{-6} M
NS1	Mort	Croissance	Mort
SP2/0	Mort	Croissance	Mort
X63	Mort	Croissance	Mort
HM	Mort	Croissance	Mort

Tableau 3. Effet HAT et/ou ouabaine sur les myélomes. 200 000 cellules/puits sont ensemencés en plaque 24 puits et la mortalité est évaluée à J4 en observation au microscope optique grossissement x40.

Nous pouvons constater que tous les myélomes meurent en présence de HAT. L'ajout d'ouabaine ne provoque aucun effet sur les myélomes, car elle n'agit pas sur leur pompe Na/K ATPase (Roder et al., 1986).

4.3 Fusion des LB immortalisés par EBV (puits 2B5) avec différents myélomes

Le puits 2B5 présente le meilleur taux d'IgGs anti-SEB. Pour stabiliser cette production, différentes fusions ont été effectuées, employant différentes conditions de culture, différents myélomes et plusieurs ratios (lymphocytes B/ myélome). Le tableau suivant présente les différentes conditions utilisés et leurs résultats.

Ratio LB-Myélome	PARTENAIRE MYELOME	NOMBRE CELLULES LB EBV 2B5	NOMBRE CELLULES MYELOME	MILIEU CULTURE	CHANGEMENT MILIEU CULTURE	PRESENCE HYBRIDOMES
2-1	HM	$7,5 \cdot 10^7$	$3,75 \cdot 10^7$	MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M	2	NON
3-1	Sp20/0	$7,5 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	MC+HAT50X	MC+HAT50X+ OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M LENDEMAIN	NON
1-1	HM	$4,1 \cdot 10^7$	$4,1 \cdot 10^7$	MOITIE FUSION MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M, AUTRE MOITIE DANS MC SANS AGENT SELECTIF	3	NON
1,5-1	HM	$4,1 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^7$	MOITIE FUSION MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M, AUTRE MOITIE DANS MC SANS AGENT SELECTIF	3	NON
1,5-1	HM/Sp20/0/X6 3	$9,3 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	MOITIE FUSION MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M, AUTRE MOITIE DANS MC SANS AGENT SELECTIF	3	NON
2-1	HM	$3,3 \cdot 10^7$	$1,65 \cdot 10^7$	MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M	3	NON
4-1	HM	$5,3 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M	3	NON
8-1	HM	$5,3 \cdot 10^7$	$6,6 \cdot 10^7$	MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M	3	NON
16-1	HM	$5,3 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^6$	MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M	3	NON
5-1	HM	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$	MC+HAT50X+OUABAIN $5 \cdot 10^{-6}$ M	3	NON

Tableau 4. Bilan des différentes fusions effectuées sur le puits de lymphocytes B immortalisés 2B5.

Nous pouvons voir d'après le tableau précédent (Tableau 4) que quelque soient les conditions, le myélome et les ratios, la fusion avec les lymphocytes B immortalisés ne conduit pas à l'obtention d'hybridomes. Ceci est illustré par les photos de microscopie suivantes.

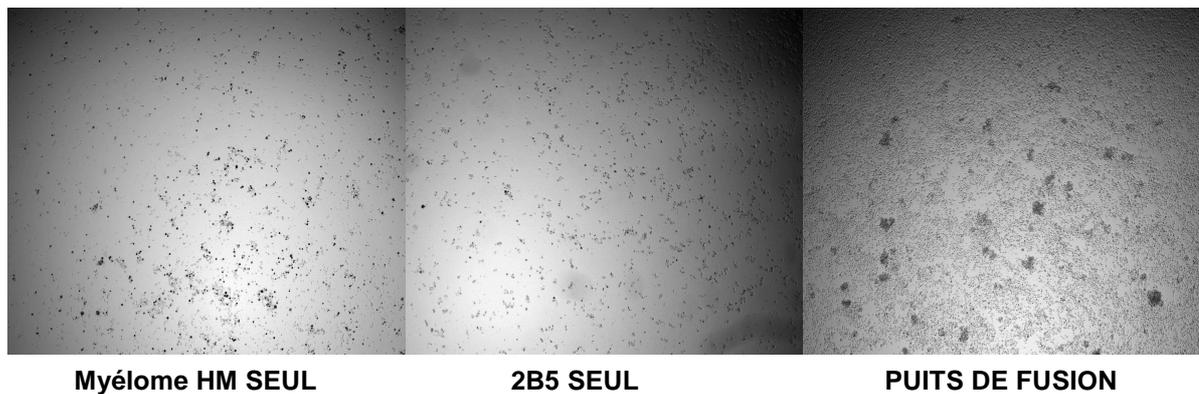


Figure 30. Résultats de la fusion.

Les produits de fusion sont ensemencés en plaque 96 puits sur lit de cellules nourricières. La présence d'hybridomes est évaluée par lecture au microscope optique grossissement x40. Les cellules de l'hétéromyéelome HM seul et les lymphocytes B immortalisés seuls sont employés comme contrôle.

Pour vérifier le rôle de l'immortalisation virale par le virus EBV dans l'absence d'hybridomes, nous avons fusionné des lymphocytes B n'ayant pas subi d'immortalisation avec le partenaire de fusion nous semblant le plus adéquat, l'hétéromyéelome humain/murin HM.

4.4 Fusion des lymphocytes B sanguins avec l'hétéromyéelome HM

Pour cette étude, 4 fusions utilisant des ratios (lymphocytes B humains/hétéromyéelome HM) de 5-1 et 2-1 ont été réalisés. A partir de cellules mononuclées du sang (PBMCs), les lymphocytes B sanguins ont été purifiés par sélection positive à l'aide de billes paramagnétiques sur lesquelles était greffé un anticorps anti-CD20. Après fusion les cellules ont été resuspendues dans un milieu nourricier sélectif contenant de l'HAT. Cette expérience a été réalisée 4 fois. Après 7 jours de culture, les 5 plaques de fusion réalisées pour chaque ratio sont lues.

Pour chacun des ratios utilisés, des hybridomes sont présents dans des puits de fusion.

	Ratio 2-1	Ratio 5-1
Expérience 1	10%	65%
Expérience 2	5%	73%
Expérience 3	0%	96%
Expérience 4	48%	97%

Tableau 5. Efficacité de fusion selon les ratios. Pourcentage d'efficacité de fusion (nombre de puits comportant des hybridomes sur les 96 puits de la plaque de fusion). Les produits de fusion sont ensemencés en plaque 96 puits sur lit de cellules nourricières. La présence d'hybridomes est évaluée par lecture au microscope.

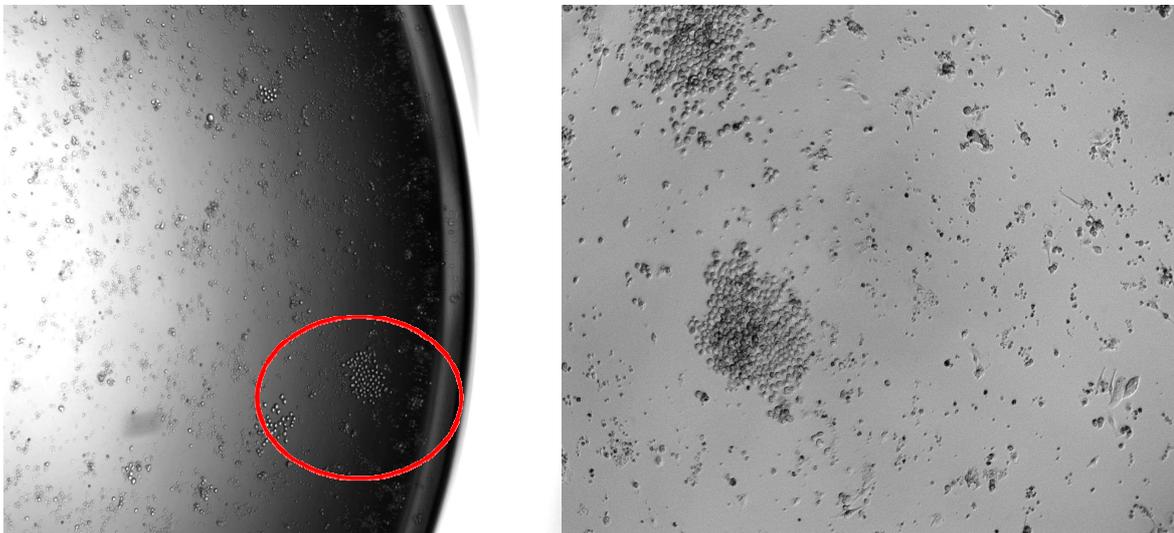


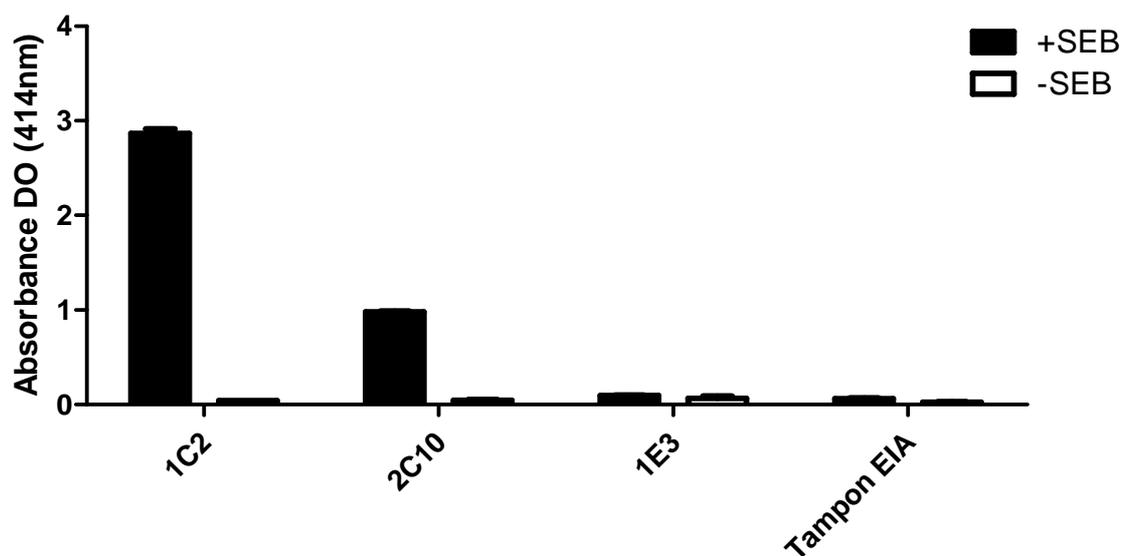
Figure 31. Hybridomes issus de la fusion des lymphocytes B sanguins avec l'hétéromyélome HM. Image prise 7 jours après fusion. Microscope optique grossissement x40 et x100.

La fusion des lymphocytes B sanguins avec l'hétéromyélome HM conduit à l'obtention d'hybridomes quelque soit le ratio utilisé. Cependant le ratio 5-1 donne une meilleure efficacité de fusion. Dans un deuxième temps nous avons voulu vérifier que les hybridomes ainsi obtenus avaient gardé leur capacité à produire et sécréter des anticorps. Pour cela, 50 μ l des surnageants de culture sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques de titration où un anticorps de lapin anti-immunoglobulines humaines (RAH) a préalablement été adsorbé. L'IgGh-G4 traceur des IgGs totales humaines est ajouté avant réaction avec le réactif d'Ellman. La densité optique est alors mesurée à 414 nm après 1 h d'incubation et a révélé la présence d'IgGs sécrétés par les hybridomes sanguins. Cette expérience nous permet donc de

confirmer que l'hétéromyélome HM et les conditions de culture sont adéquats pour l'obtention d'hybridomes producteurs d'anticorps. Nous avons décidé d'utiliser ces conditions de culture et ce myélome pour fusionner les lymphocytes B immortalisés sécréteurs d'IgGs anti-SEB précédemment congelés (3 puits).

4.5 Décongélation des trois puits d'immortalisation 1C2, 2C10, 1E3

Une ampoule de chacun des puits d'immortalisation 1C2, 2C10 et 1E3 est décongelée. La décongélation s'effectue selon la procédure connue : décongélation rapide de l'ampoule à 37°C pour éviter les effets néfastes du DMSO et resuspension en milieu de culture préchauffé à 37°C. 4 jours après la décongélation, on dose les anticorps anti-SEB dans chacun des surnageants de culture avec le test ELISA décrit dans le paragraphe précédent 2.1, Sélection du donneur de sang.



	Ratio+/- SEB-biotinylée
1C2	69
2C10	18
1E3	1

Figure 32. Dosage surnageants de décongélation de puits immortalisés de lymphocytes B mémoires sécréteurs d'IgGs anti-SEB.

50 µl des surnageants de culture de décongélation purs sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques de titration où la neutravidine a préalablement été adsorbée. La SEB-biotinylée et l'IgGh-G4 sont ajoutés avant la réaction avec le réactif d'Ellman. La densité optique est alors mesurée à 414 nm après 1 h d'incubation.

Comme attendu, certains des lymphocytes B précédemment immortalisés ont perdu leur capacité de sécrétion des IgGs anti-SEB (puits 1E3). Par contre on observe (Figure 32) que des lymphocytes B immortalisés, issus des puits 1C2 et 2C10, continuent de sécréter des IgGs anti-SEB. Par conséquent les cellules des puits 1C2 et 2C10 sont fusionnées avec l'hétéromyélome HM selon le ratio 5-1. Les cellules correspondant au puits 1E3 sont également fusionnées pour servir de contrôle négatif.

4.6 Fusion des puits d'immortalisation 1C2, 2C10 avec HM

13×10^7 cellules 1C2 sont fusionnées avec $2,6 \times 10^7$ cellules d'hétéromyélome HM. 15×10^7 cellules de 2C10 sont fusionnées avec 3×10^7 cellules d'hétéromyélome HM. 14×10^7 cellules de 1E3 sont fusionnées avec $2,8 \times 10^7$ cellules d'hétéromyélome HM. Les produits de fusion sont resuspendus dans un milieu de culture contenant de l'HAT 50X et de l'ouabaine à la concentration de 5×10^{-6} M puis déposés sur 5 plaques 96 puits contenant des cellules nourricières. Ces cellules nourricières (cellules mononuclées du sang (PBMCs) irradiées), produisent des facteurs de croissance favorisant la survie et la croissance des hybridomes. Après 7 jours et un changement de milieu, les plaques de fusions sont lues pour détecter la présence d'hybridomes.



Figure 33. Hybridomes issus de la fusion des lymphocytes B immortalisés avec l'hétéromyélome HM. Image prise 7 jours après fusion. Microscope optique x40.

Pour les trois fusions, 100% des puits de fusion présentent des hybridomes.

Comme attendu aucun des anticorps anti-SEB n'a été détecté, par le test immunoenzymatique, dans les surnageants de la fusion des cellules issus du puits 1E3. De même l'ensemble des puits de la fusion des cellules de 2C10 se sont révélés négatifs pour la présence d'anticorps anti-SEB. Par contre, nous avons pu identifier un puits de la fusion des cellules issues de 1C2 qui contenait un hybridome et pour lequel on obtenait un signal positif avec le test immunoenzymatique. Afin d'isoler et de stabiliser cet hybridome nous avons réalisé un clonage par dilution. Malheureusement au cours de ce clonage cet hybridome a perdu sa capacité de production d'IgGs anti-SEB.

CONCLUSIONS ET **PERSPECTIVES**

Du fait de l'absence de traitement contre l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB), et de la possibilité de s'en servir à des fins malveillantes, le développement d'outils thérapeutiques efficaces semble pertinent. Dans ce contexte, il est intéressant d'évaluer l'effet de l'immunothérapie, nous avons cherché à produire des anticorps dirigés contre la SEB.

Dans un premier temps, le dosage sous un format immunoenzymatique spécifique de la SEB nous a permis de détecter la présence d'IgGs anti-SEB dans les plasma des donneurs de sang utilisé. La présence d'IgGs spécifiquement dirigés contre la SEB est le reflet de la présence de lymphocytes B sécréteurs d'anticorps dirigés contre la SEB. Nous avons mis au point un protocole d'immortalisation efficace des lymphocytes B mémoires utilisant le virus Epstein-Barr (EBV). Nous avons ainsi réussi à obtenir 6 puits de lymphocytes B immortalisés par le virus Epstein-Barr et sécréteurs d'anticorps IgGs anti-SEB. Par contre, nous avons été confrontés à un problème de stabilité des lymphocytes B immortalisés et à une perte de la capacité de sécrétion en anticorps anti-SEB. Pour pallier ces problèmes, nous avons exploré différentes pistes. La première a consisté à cloner par dilution limite les lymphocytes B afin d'isoler la cellule sécrétrice d'anticorps et la stabiliser. Ces lymphocytes B immortalisés étant des grosses grappes, isoler une cellule s'est révélé compliqué voire impossible. Une seconde piste étudiée a été de coupler l'étape d'immortalisation virale à une immortalisation cellulaire avec un myélome.

Nous avons exploré différents protocoles d'immortalisation cellulaire impliquant des myélomes murins et un hétéromyélome humain/murin et les lymphocytes B immortalisés. Malheureusement, malgré diverses conditions de fusion aucun hybridome ne fut obtenu. Afin de mettre au point un protocole permettant la fusion de lymphocytes B humains, nous avons comparé différentes conditions de fusion avec l'hétéromyélome HM qui nous paraissait être le partenaire de fusion le plus adéquat. Pour cette étude, nous avons utilisé des lymphocytes B humains purifiés à partir de sang de donneurs. Cette étude nous a permis d'obtenir des hybridomes et donc de sélectionner les conditions les plus favorables pour la fusion. En utilisant ces conditions, nous avons réussi à obtenir un hybridome sécréteur d'anticorps anti-SEB à partir de lymphocytes B préalablement immortalisés. Au cours des étapes de clonages nécessaire pour l'isolation et la stabilisation du clone, l'hybridome a malheureusement perdu sa capacité de production d'anticorps anti-SEB.

Malgré les limitations et les difficultés rencontrées avec cette technique, les anticorps humains issus de donneurs infectés ou vaccinés présentent un attrait en recherche et devraient être développés, ce qui demanderait notamment d'améliorer la stabilité et le rendement des

étapes d'immortalisation virale (partenaire virale EBV) et cellulaire (fusion avec un partenaire myélomateux). On pourrait également envisager d'obtenir l'ADN codant pour les anticorps humains par PCR à partir des grappes de cellules obtenues après immortalisation et qui produisent un anticorps d'intérêt. Par la suite cet anticorps pourrait être produit dans des cellules de mammifères après transfection par un plasmide contenant cet ADN.

2^{ème} Partie :

PRODUCTION D'ANTICORPS

MONOCLONAUX HUMAINS

A PARTIR DE

LYMPHOCYTES B HUMAINS

DE DONNEURS NAIFS

PAR IMMUNISATION *IN*

VITRO

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la production d'anticorps monoclonaux humains à l'aide de lymphocytes B naïfs, extraits de sang périphérique, grâce à l'immunisation *in vitro*. L'immunisation *in vitro* consiste à stimuler *in vitro* par l'ajout d'un antigène-cible des lymphocytes B pour induire la production d'anticorps dirigés contre l'antigène. Cette stratégie pourrait permettre la production d'anticorps monoclonaux humains contre des antigènes pour lesquels il n'existe pas de donneurs infectés ou vaccinés. Mettre en place des protocoles d'immunisation *in vitro* nécessite une bonne connaissance sur le fonctionnement du système immunitaire, des lymphocytes B et de la réponse anticorps *in vivo*. Dans un premier temps, la réponse anticorps *in vivo* et la stimulation des lymphocytes B suite à la pénétration d'un agent étranger dans l'organisme seront présentés. Dans un second temps, seront présentés les résultats obtenus par immunisation *in vitro* avec deux molécules modèles, le peptide N-terminal de la toxine botulique A (TBA-Nter) et la protéine transactivatrice Tat101 du virus de l'immunodéficience de type 1 (VIH-1).

1 La réponse anticorps *in vivo*

In vivo, la production d'anticorps spécifiques d'un antigène engage des lymphocytes B, des lymphocytes T, des cellules présentatrices d'antigène (CPA), des cytokines et des molécules de costimulation. Deux types de réponses anticorps existent selon la nature de l'antigène: la réponse T-dépendante et la réponse T-indépendante.

1.1 La réponse anticorps T-dépendante

La réponse anticorps T-dépendante implique des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Elle est basée sur la reconnaissance combinée de l'antigène par les lymphocytes T et B. La réponse T-dépendante nécessite la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes B, et en parallèle la reconnaissance de l'antigène par des CPA qui vont activer les lymphocytes T CD4+. Les lymphocytes B et T spécifiques de l'antigène vont ensuite interagir ensemble pour déclencher la production d'anticorps.

Quand un agent étranger, un antigène, pénètre l'organisme, les CPA, généralement des cellules dendritiques, le capturent, l'endocytent et le présentent sous forme de peptides antigéniques à la surface cellulaire via leur CMH II. Parallèlement, les lymphocytes B naïfs qui circulent en permanence dans l'organisme capturent également l'antigène via leur Igs de

surface, le BCR (B Cell Receptor), l'endocytent et le présentent à la surface cellulaire sur leur CMH II. Seuls les lymphocytes B dont le BCR reconnaît spécifiquement l'antigène vont être impliqués. Le complexe peptide antigénique/CMH II des CPA va activer via leur TCR les lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Les lymphocytes T CD4⁺ activés vont ainsi reconnaître sur les lymphocytes B activés des peptides issus du même antigène. Les lymphocytes T CD4⁺ activés et spécifiques de l'antigène vont stimuler par contact direct et par sécrétion de cytokines et molécules de costimulation les lymphocytes B spécifiques de l'antigène (Goodnow, 1997; Goodnow and Cyster, 1997). Cette stimulation va déclencher leur prolifération, la commutation de classe des Igs de l'isotype IgM vers les isotypes IgA, IgG, IgE et leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en lymphocytes B mémoires (Pape et al., 2007). Les lymphocytes T CD4⁺ avec l'interaction de leur molécule CD40 sur les lymphocytes B par leur ligand CD40L peuvent moduler la commutation isotypique vers des classes et sous-classes particulières d'anticorps. Ainsi, chez les souris, les lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IFN γ favorisent la commutation de classe des Igs vers des IgG2a, les lymphocytes T CD4⁺ producteurs de TGF- β favorisent les IgG2b et IgG3 alors que les lymphocytes T CD4⁺ sécréteurs d'IL-4 favorisent les IgG1 et IgE (Deenick et al., 2005). Chez l'homme, quelque soit la sécrétion des lymphocytes T CD4⁺, les IgG1 sont majoritairement produits (Plotkin, 2008). La réaction T-dépendante est rapide, des IgMs et de faibles taux d'IgGs apparaissent dans le sang quelques jours après l'entrée de l'antigène dans l'organisme. Cette réponse constitue la réponse anticorps primaire. Ces anticorps produits ont une faible affinité, car il n'y a pas eu de processus d'hypermutation/sélection. Cette réaction a une durée de vie courte et la plupart des cellules meurent par apoptose au bout de quelques jours. Une fois l'antigène éliminé grâce aux anticorps produits (neutralisation, cytotoxicité lié aux anticorps, paragraphe 2 Fonctions biologiques des anticorps, Introduction), une mort cellulaire a lieu et conduit à l'élimination des lymphocytes T et B impliqués dans la réponse. Une nouvelle exposition à l'antigène entraîne la réactivation des lymphocytes B mémoires générés lors de la première réponse. Cette activation ne nécessite pas l'aide des lymphocytes T et donne lieu à des niveaux de réponse anticorps plus élevés avec une cinétique plus rapide que lors de la première immunisation. Les anticorps majoritairement produits lors de cette seconde exposition sont des IgGs, un pic est d'ailleurs atteint en 7 jours.

1.2 La réponse anticorps T-indépendante

La réponse T-indépendante comme son nom l'indique ne nécessite pas de lymphocytes T, mais implique des lymphocytes B et l'antigène. Cette réponse est induite par des antigènes particuliers : de gros antigènes (polymères, polysaccharides, lipopolysaccharidiques) exprimant des motifs répétés. Quand ces antigènes pénètrent l'organisme, ils sont capables d'aller se fixer directement sur les BCR des lymphocytes B. Les lymphocytes B expriment plusieurs BCR ou Ig de surface sur leur membrane. Ces antigènes sont capables d'agréger les BCR à la surface des lymphocytes B grâce aux structures répétitives qu'ils possèdent. Ils sont à l'origine du « capping » ou regroupement des BCR qui permet d'apporter les signaux nécessaires à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Chez les rongeurs, au cours de la semaine qui suit l'immunisation, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes subissant un niveau moyen de commutation isotypique d'IgM vers IgG et IgA. Chez l'homme, l'immunisation par les polysaccharides génère la production d'IgG d'affinité moyenne présentant des mutations dans les régions variables (Lucas and Reason, 1999; Zhou et al., 2004). Après leur différenciation, les plasmocytes spécifiques des antigènes T persistent quelques temps avant de mourir par apoptose. Les antigènes T-indépendant n'induisent pas de réponse B mémoire et une seconde exposition induira une nouvelle réponse primaire.

L'immunisation *in vitro* tente de reproduire les interactions *in vivo* nécessaires entre les différents types cellulaires pour l'activation et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Ces dernières années de nombreux laboratoires se sont intéressés à développer des anticorps contre des cibles pour lesquels ils n'existent pas de donneurs déjà immunisés, par immunisation *in vitro*. Différents anticorps dirigés contre l'insuline, la myoglobine, la bactérie Gram + *Propionibacterium acnes*, la toxine tétanique, la toxine cholérique, la glycoprotéine gp120 du virus VIH-1 ou contre un récepteur le FcεRIα ont été produit (Borrebaeck, 1983; Borrebaeck et al., 1987, 1988; Chin et al., 1994; Dueñas et al., 1996; Ichikawa et al., 1999; Jung et al., 2008; Shim et al., 2001; Tomimatsu et al., 2009; Volkman et al., 1982).

2 L'immunisation *in vitro*

Chez l'homme, pour déclencher la production d'anticorps, l'antigène, des lymphocytes B et T et les cellules dendritiques sont nécessaires (excepté dans le cas des gros antigènes,

paragraphe 1.2). Les stratégies d'immunisation *in vitro* visent à recréer à partir des cellules mononuclées du sang périphérique l'environnement nécessaire à l'activation de la réponse immunitaire et à la production d'anticorps. Il apparaît à première vue difficile de stimuler *in vitro* des lymphocytes T et des lymphocytes B, de les activer et de les faire se différencier en plasmocytes pour produire des anticorps (James and Bell, 1987; Lagacé and Brodeur, 1985; Olsson et al., 1983). Pourtant, malgré ces difficultés, le sang reste la source privilégiée d'obtention de cellules. Il permet du fait d'un accès facilité de pouvoir multiplier les expériences. Néanmoins, le sang et les cellules mononuclées qu'il contient constituent une source appauvrie en lymphocytes et en particulier en lymphocytes B contrairement aux amygdales (ganglions). Pourtant, les premières publications à ce sujet par le groupe de Borrebaeck montrent une production d'anticorps contre les cibles choisies dans leur étude (myoglobine, KLH, gélatine) à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs). Le système d'immunisation *in vitro* de Borrebaeck repose sur la purification des cellules mononuclées du sang (PBMCs) sur gradient de Ficoll, sur leur traitement avec un agent particulier le Leu-OMe (méthyl ester de L-Leucine) et sur l'addition de cytokines ou de lymphokines en présence de l'antigène d'intérêt (Borrebaeck et al., 1987, 1988; Danielsson et al., 1987). La présence de cellules telles que des lymphocytes Natural Killer ou des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques inhiberait l'activation de la réponse immunitaire et la production d'anticorps. En effet, les cellules cytotoxiques pourraient éliminer l'antigène avant même qu'il n'ait vu les cellules ou éliminer les cellules portant l'antigène. Pour éviter cela, on utilise le Leu-OMe, agent provoquant la lyse des cellules riches en lysosome tel que les Natural Killer ou les monocytes exprimant le récepteur pour le facteur 3 du complément ou encore les lymphocytes T cytotoxiques (Borrebaeck et al., 1988; Thiele et al., 1983). De ce fait, Borrebaeck dispose d'un pool de cellules comprenant lymphocytes B, lymphocytes T, cellules dendritiques, pool adéquat et efficace à l'immunisation *in vitro*. L'ajout de l'antigène et des lymphokines mime l'environnement d'activation et permet une prolifération et une différenciation des cellules. Borrebaeck a montré que des PBMCs traités avec le Leu-OMe en présence de l'antigène et des cytokines augmentent de 10 fois la production en anticorps comparé aux PBMCs non traités avec Leu-OMe. De même, il montre que la présence de l'antigène est nécessaire, en effet avec la coculture de cellules adéquates et les cytokines mais sans antigène la production en anticorps chute de 40 fois. L'ajout des cytokines favorise la réponse. Aujourd'hui, la majorité des publications sur l'immunisation *in vitro* utilise le Leu-OMe et diverses cytokines notamment un cocktail IL-2, IL-4, et des séquences immunostimulatrices, les CpG (Brams et al., 1993a; Ichikawa et al., 1999; Shim et al., 2001).

Récemment le groupe de Lanzavecchia a montré l'importance des CpG dans la stimulation et la survie des lymphocytes B (Bernasconi et al., 2002).

L'immunisation *in vitro* est une technologie induisant majoritairement des anticorps de type IgM contre les cibles choisies. Ces anticorps sont en général de faible ou d'affinité intermédiaire (Borrebaeck, 1988; Borrebaeck et al., 1988) illustrant ainsi la réponse primaire en anticorps. Des publications ont montré la production d'anticorps de type IgG contre des cibles à l'aide d'une double immunisation *in vitro*. Deux immunisations *in vitro* successives en présence de cytokines, de l'antigène et surtout d'un anti-CD40 ont conduit à obtenir des anticorps IgGs dirigés contre la toxine tétanique, ou la gp120 (Chin et al., 1994; Dueñas et al., 1996; Zafiroopoulos et al., 1997; Zafiroopoulos et al., 2000).

Aujourd'hui, pour produire des anticorps à partir de lymphocytes B naïfs, des protocoles d'immunisation *in vitro* utilisant l'antigène seul (Kudo et al., 1988), ou l'antigène en présence de cytokines (Danielsson et al., 1987; Wohlleben et al., 1996) ou encore l'antigène, les cytokines et des CpG sont décrits (Jung et al., 2008; Tomimatsu et al., 2009). Les cellules issues de l'immunisation *in vitro* peuvent être immortalisées avec un partenaire viral (EBV) ou un partenaire cellulaire de type myélome (fusion avec des myélomes murins ou hétéromyélome) pour stabiliser leur production en anticorps.

Dans notre système d'immunisation, nous avons tenté de reproduire la réponse anticorps sans utiliser le Leu-OMe, mais en purifiant à l'aide de billes magnétiques toutes les cellules nécessaires à une réponse anticorps (lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes). Dans un premier temps, nous avons dû mettre en place un protocole d'immunisation *in vitro* efficace. Pour cela, nous avons comparé deux protocoles. Le premier protocole est basé sur une activation par des cytokines et l'antigène des cellules mononuclées du sang (PBMCs) après élimination des Natural Killer (NK). Le deuxième protocole consiste à activer séparément des monocytes et des lymphocytes (B et T) puis à les cocultiver. Afin d'évaluer ces deux protocoles d'immunisation *in vitro*, nous avons utilisé comme modèle le peptide N-terminal de la toxine botulique A.

Une fois le protocole mis en place, nous avons essayé de l'optimiser avec un second modèle d'étude, la protéine Tat101 du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1.

Dans une première partie, je vais présenter le modèle d'étude de la toxine botulique A et les résultats obtenus dans la mise en place du protocole d'immunisation *in vitro*, puis dans une seconde partie je m'intéresserai au modèle de la protéine Tat101 du VIH-1 et aux résultats obtenus avec cette protéine.

PREMIER MODELE D'ETUDE

Clostridium botulinum A

(BoNT/A)

Mise en place du protocole
d'immunisation *in vitro*

INTRODUCTION

Nous avons utilisé la toxine botulique A et en particulier un de ses fragments pour mettre au point un système d'immunisation *in vitro* efficace contre cette molécule. La toxine botulique A nous a semblé un bon modèle. En effet, en absence de médicaments efficaces contre cette toxine, l'immunothérapie paraît indiquée pour lutter contre ses effets. Nous avons donc cherché à produire des anticorps humains par immunisation *in vitro* contre le peptide N-terminal de la toxine botulique A qui correspond à son domaine de liaison sur les cellules. Dans une première partie, les toxines botuliques seront décrites avant de présenter dans une seconde partie les résultats obtenus lors de la mise au point du protocole d'immunisation *in vitro* et sur la production d'anticorps contre cette toxine.

1 *Clostridium botulinum* et ses toxines

1.1 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum est une bactérie de type Gram + capable de sporuler (Figure 34). Elle se retrouve dans le sol, l'eau et les fèces. *Clostridium botulinum* a pu être isolée dans différentes parties du monde (Europe, Asie, Afrique, Australie, Amérique du Nord et du Sud) ainsi que dans des sédiments marins (Holdeman, 1970), (Johnson and Bradshaw, 2001). Les spores peuvent se retrouver dans les aliments. *Clostridium botulinum* produit des toxines mortelles pour l'homme et les animaux. Ces toxines appelées les toxines botuliques induisent des paralysies progressives causées par l'inhibition de la libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire. Les toxines botuliques, à l'origine du botulisme, sont les plus puissantes toxines actuellement connues.

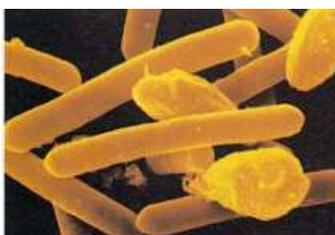


Figure 34. *Clostridium botulinum*.

Sous forme de bacille est représentée la forme végétative tandis que les spores sont rondes. D'après www.noraxx.ca/images/Clostridium_botulinum.jpg (image par microscopie électronique).

1.2 Les toxines botuliques produites par *Clostridium botulinum*

1.2.1 Les différents types

Lorsque les conditions environnementales le permettent, *Clostridium botulinum* produit et libère ses toxines. *Clostridium botulinum* peut produire sept types ou sérotypes de toxines, de A à G. Au sein d'un même sérotype, des sous-types basés sur des variations de séquences en acides aminés existent. Par exemple, le sérotype A possède 5 sous-types (BoNT/A1 à BoNT/A5) (Arndt et al., 2006), (Carter et al., 2009). Ces différents types sont capables d'agir au niveau de la terminaison nerveuse du neurone mais n'ont pas tous le même mode d'action. Ainsi, ces toxines exercent des activités toxiques différentes et présentent des durées de vie variables de 1 jour à plus d'un mois. Le sérotype A est le plus dangereux et le plus toxique causant des paralysies sur des longues périodes (4 mois).

	BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/E	BoNT/F
Sévérité du botulisme	Forte	moyenne	Pas de cas	Très moyenne	-
Durée d'action thérapeutique chez l'homme	> 4mois	~ 2mois	~ 4 mois	~ 4 sem.	~ 4 sem.
Paralysie chez les rongeurs	1-2 mois	1-3 sem.	-	4-7 jours	1 sem.

Tableau 6. Action paralysante des différents sérotypes des BoNTs. D'après (Poulain and Humeau, 2003).

1.2.2 Leur synthèse

La bactérie *Clostridium botulinum* synthétise une toxine appelée neurotoxine botulique (BoNT) de 150 kDa. Certaines toxines sont produites à l'intérieur de la cellule et s'échappent à travers la paroi tandis que d'autres sont libérées après l'autolyse des cellules (Johnson and Bradshaw, 2001). Une fois libérée dans le milieu, la neurotoxine botulique (BoNT) de 150 kDa va se complexer à des protéines accompagnatrices non toxiques (ANTPs) également produites par *Clostridium botulinum*. Les protéines accompagnatrices protègent la toxine lors de l'intoxication, rendant le complexe plus toxique (Sugiyama, 1980).

Les toxines botuliques s'associent à une ou plusieurs ANTPs dont la composition varie selon les sérotypes et les conditions de culture. Les toxines botuliques sont ainsi présentes sous forme de complexes de taille de 300 à 900 kDa.

1.2.3 Mode d'action des toxines botuliques

Les toxines botuliques s'associent à des protéines non toxiques formant ainsi des complexes botuliques de grande taille. Ces complexes du fait de leur grande résistance à l'environnement ne sont pas dégradés lors de leur passage dans l'estomac et l'intestin. C'est ainsi que les toxines botuliques traversent la muqueuse intestinale. Elles diffusent alors par voie sanguine et lymphatique et se fixent sur les extrémités des neurones dans lesquels elles pénètrent par endocytose. Les toxines botuliques clivent par protéolyse une des trois protéines formant le complexe SNARE qui a un rôle majeur dans l'exocytose des vésicules synaptiques. De ce fait la libération de l'acétylcholine dans l'espace des jonctions neuro-musculaires du système nerveux autonome (parasymphatique) est inhibée, ce qui se traduit cliniquement par une paralysie. La liaison de la toxine à la jonction neuromusculaire est irréversible. La toxine botulique ne franchit pas la barrière hémato encéphalique, ce qui explique l'absence d'atteinte du système nerveux central.

1.3 Les différents modes de contamination des toxines botuliques

Le botulisme et ses toxines ne sont pas contagieux. On distingue actuellement chez l'homme quatre modes de contamination par les toxines botuliques :

- **le botulisme d'origine alimentaire** résultant de l'ingestion d'un aliment contaminé par *Clostridium botulinum* et dans lequel la toxine botulique a été produite. C'est le seul mode actuellement en cause en France. La toxine est directement ingérée avec l'aliment contaminant, habituellement une conserve de fabrication artisanale. Le botulisme humain est une maladie rare avec environ 10 à 25 cas par an en France.

- **le botulisme néonatal ou toxi-infection** lié à la production endogène de toxines après germination de spores de *Clostridium botulinum* dans l'intestin. La flore digestive du nouveau-né est incomplètement constituée et/ou fonctionnelle et n'a donc pas d'effet inhibiteur sur la croissance de la bactérie.

- **le botulisme par blessure ou inoculation** causé par le développement de *Clostridium botulinum* et la production de toxines botuliques au niveau des plaies contaminées. La toxine passe alors directement dans la circulation générale.

- **le botulisme par colonisation de l'intestin adulte** similaire au botulisme néonatal dans sa pathogénèse. Il apparaît chez des enfants âgés et des adultes qui ont subi une chirurgie de l'intestin ou qui souffrent d'un gros déséquilibre de leur flore intestinale.

1.4 Les symptômes de l'intoxication

Les symptômes sont une sécheresse de la bouche et des muqueuses, des troubles de la vision, des réflexes cardiovasculaires anormaux, des troubles digestifs (nausée, vomissement) et beaucoup d'autres symptômes qui précèdent l'apparition des troubles moteurs, à savoir une paralysie qui affecte les muscles du crâne, du cou, des membres puis du diaphragme. La mort intervient suite à un arrêt respiratoire ou à une seconde infection lors d'une assistance respiratoire prolongée. Ces symptômes apparaissent entre 12 h et 72 h après l'intoxication (Arnon et al., 2001). Les différentes toxines provoquent toutes les mêmes symptômes. La sévérité des symptômes et la rapidité de la période d'incubation dépendent de la quantité de toxine absorbée et du sérotype (Arnon et al., 2001). Le sérotype A est responsable des formes les plus sévères, en particulier d'une forte atteinte des muscles de la respiration (Woodruff et al., 1992).

1.5 Diagnostic

Le diagnostic est réalisé sur les échantillons de patients (sérum, fèces, aspiration gastrique) ou sur des échantillons de nourriture suspectée. Des tests rapides et fiables comme les ELISA et des tests bandelettes sont disponibles. La spectrométrie de masse peut également être utilisée pour détecter des peptides libérés par les toxines. Une nouvelle technique développée utilisant un test fluorimétrique *in vitro* permet d'avoir des résultats comparables au test standard dans un délai de 2 h avec une sensibilité de 60 pg de toxine (Poras et al., 2009). Les tests biologiques utilisant des souris sont les standards de référence pour la détection et la quantification des toxines, avec des résultats obtenus entre 6 et 96 h et des sensibilités de détection de 0.03 ng de toxine (Arnon et al., 2001).

1.6 Traitements contre le botulisme

Aujourd'hui, il n'existe pas d'antibiotiques pour lutter contre le botulisme. Un vaccin basé sur une anatoxine pentavalente (A-E) détoxifiée par l'ajout de formaldéhyde et reformulée est utilisé actuellement par les forces armées américaines en prévention d'une intoxication. Cette vaccination n'est pas appliquée à des fins préventives au reste de la population mondiale. En cas d'intoxication aux toxines botuliques, le seul traitement est l'immunothérapie et la respiration artificielle. L'immunothérapie consiste en l'administration passive d'antitoxines. Deux antitoxines sont principalement utilisées : l'antitoxine équine bivalente et une antitoxine humaine :

- l'antitoxine équine préparée à partir de sérum de cheval contient des anticorps bivalents (anti-sérotypes A et B). Cette antitoxine est la plus couramment utilisée. Il existait également deux autres antitoxines équines la trivalente ABE et l'heptavalente ABCDEFG, mais qui ne sont plus disponibles.

- la BabyBIG ou BIG-IV (human Botulism Immun Globulin IntraVenous) est une antitoxine pour traiter le botulisme infantile. C'est une préparation d'IgS obtenue à partir de sérum humain et provenant de volontaires immunisés avec 5 sérotypes (A-E). Cette antitoxine est utilisée pour le traitement des intoxications dues aux sérotypes A et B.

Ces antitoxines doivent être administrées le plus tôt possible, idéalement dans les 24 h qui suivent l'apparition des symptômes, car elles ne peuvent neutraliser que la toxine circulante qui ne s'est pas encore fixée aux neurones (Tacket et al., 1984).

Bien que ces antitoxines soient efficaces, elles posent néanmoins certains problèmes. L'antitoxine équine induit des réactions immunitaires secondaires, allant jusqu'aux chocs anaphylactiques. De plus, la demi-vie courte des IgS (5 à 7 jours) limite leur efficacité. L'antitoxine humaine ne pose pas le problème des effets secondaires, mais plutôt celui de la disponibilité des donneurs. Pour pallier ces soucis, des équipes ont développé des anticorps chimériques (murin/humain) et humain contre la toxine botulique A notamment. Ainsi, le groupe de Marks a produit des anticorps chimériques et des anticorps humains en utilisant la technologie du phage display pour réaliser des banques d'anticorps (scFv) à partir de souris ou d'humains immunisés (Amersdorfer et al., 1997),(Nowakowski et al., 2002). D'autre part, Adekar à partir du sang d'un volontaire immunisé avec un vaccin existant a isolé les lymphocytes B mémoires et les a fusionnés avec des cellules de myélome pour produire un anticorps dirigé contre la toxine botulique A (Adekar et al., 2008b). Cependant, l'immunisation de volontaires sains non pas pour les protéger contre une infection mais pour

obtenir des lymphocytes B mémoires peut constituer un problème éthique. L'immunisation *in vitro* contre la toxine botulique A nous a semblé une bonne alternative.

1.7 Les différentes utilisations des toxines botuliques

1.7.1 Un outil thérapeutique

La toxine botulique est utilisée en médecine et en cosmétique. En médecine, la toxine botulique du fait de son action paralysante est devenue un outil pour traiter certaines maladies, ou syndromes humains causés par l'hyperréactivité des nerfs périphériques.

Par exemple, la toxine botulique A a été utilisée pour traiter le strabisme et le spasme hémifacial ainsi que différents types de dystonie, syndrome de contraction continue et involontaire des muscles qui comprend le blépharospasme (contraction des paupières), dystonie crânienne, oromandibulaire, cervicale et laryngée (Mahant et al., 2000). Son utilisation peut également s'étendre aux torticolis, migraines, troubles des cordes vocales, paralysies spasmodiques, l'hyperhidrose (transpiration excessive), ainsi qu'à d'autres troubles associés à une hyperréactivité musculaire, une hypersécrétion glandulaire et à la douleur. Aujourd'hui, la toxine botulique A trouve tout son intérêt en cosmétique. La toxine botulique A est utilisée comme médicament, sous la dénomination commerciale de Botox[®] (Allergan) et de Dysport[®] (Ipsen), pour lutter contre les rides (Wohlfarth et al., 2004). La toxine botulique B a également été commercialisée sous le nom de Neurobloc[®] (Elan Pharmaceuticals).

1.7.2 Une arme potentielle du bioterrorisme

La toxine botulique est la toxine la plus puissante actuellement connue (Gill, 1982). La dose mortelle chez l'homme a été estimée à 1 ng/kg par injection intraveineuse ou sous-cutanée du sérotype A, alors que la DL_{50} est de 3 ng/kg par inhalation. Les modes de dissémination des toxines sont l'inhalation ou l'ingestion. Le sérotype A est le plus dangereux. En raison de leur extrême toxicité, de leur disponibilité et de leur relative facilité de production, les toxines botuliques sont considérées comme arme potentielle bioterroriste, classées comme agent de catégorie A par le CDC (Centre de Contrôle et de prévention des Maladies ou Center for Disease Control and Prevention). Dans les années 1930, l'armée japonaise a testé la toxine botulique A sur des prisonniers en leur donnant de la nourriture contaminée. Plus récemment (en 1990), l'Iraq a admis avoir produit 19000 L de toxines

botuliques concentrées, ce qui représente environ trois fois la quantité nécessaire pour faire disparaître l'ensemble de l'espèce humaine par inhalation (Arnon et al., 2001).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de cette étude est de produire des anticorps monoclonaux humains à but thérapeutique, à partir de lymphocytes B naïfs. Nous avons utilisé comme antigène le peptide N-terminal de la toxine botulique A (TBA-Nter) d'environ 2 kDa. Nous avons produit des anticorps dirigés contre ce peptide par immunisation *in vitro* couplée à une étape d'immortalisation soit virale (avec l'EBV) soit cellulaire (fusion avec un myélome murin-humain, l'hétéromyélome HM).

1 Vérification de l'absence d'anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma du donneur utilisé

L'objectif de cette étude étant la production d'anticorps par immunisation *in vitro*, à partir de donneurs humains n'ayant jamais rencontré notre cible, le peptide TBA-Nter, nous avons vérifié l'absence d'anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma du donneur utilisé. En effet comme nous l'avons décrit précédemment, certaines personnes peuvent avoir été traitées avec de la toxine botulique ce qui peut provoquer une réponse immunitaire et donc la production d'anticorps. Pour cela, le plasma d'un donneur individuel, dilué en série de 1/10 au 1/10⁶, a été incubé une nuit sur une plaque recouverte avec de la TBA-Nter couplée à la BSA (TBA-NterBSA) (1 µg/ml) et une plaque recouverte avec de la BSA (1 µg/ml) en présence ou non du peptide TBA-Nter en compétition (25 µg/ml). Des traceurs spécifiques des IgMs humaines et des IgGs humaines totales sont ajoutés pour détecter la présence d'IgMs et d'IgGs anti-TBA-Nter (paragraphe 8.2 Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A, Matériels et Méthodes). Le témoin EIA (tampon de dilution des échantillons) est utilisé comme contrôle négatif.

Chaque dilution de plasma est testée en duplicat. Les valeurs représentées dans les graphes de la figure suivante correspondent à la différence entre les signaux obtenus sur la plaque recouverte avec de la TBA-Nter couplé à la BSA (TBA-NterBSA) et ceux observés sur la plaque recouverte de BSA.

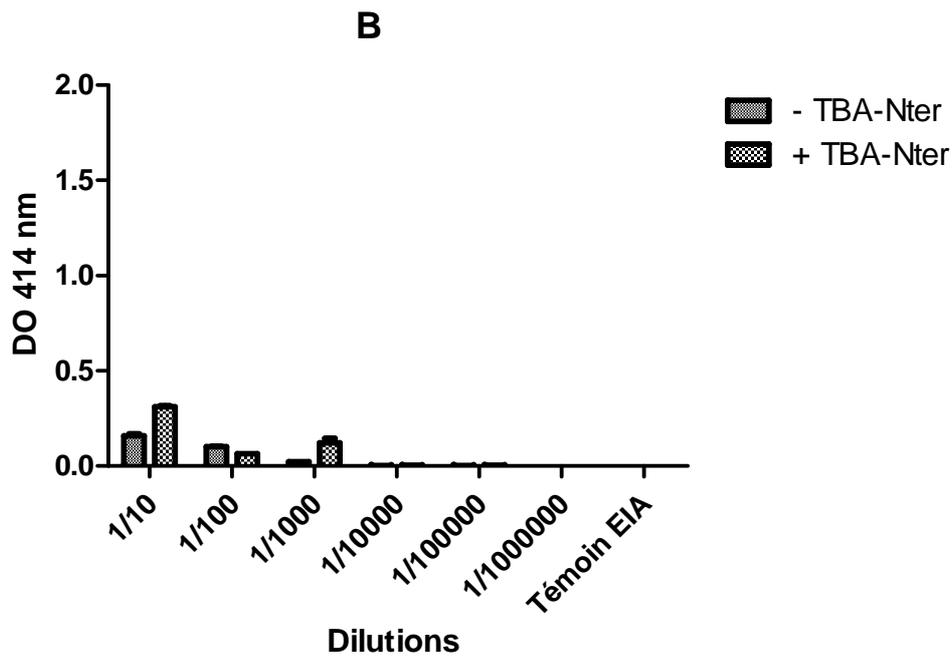
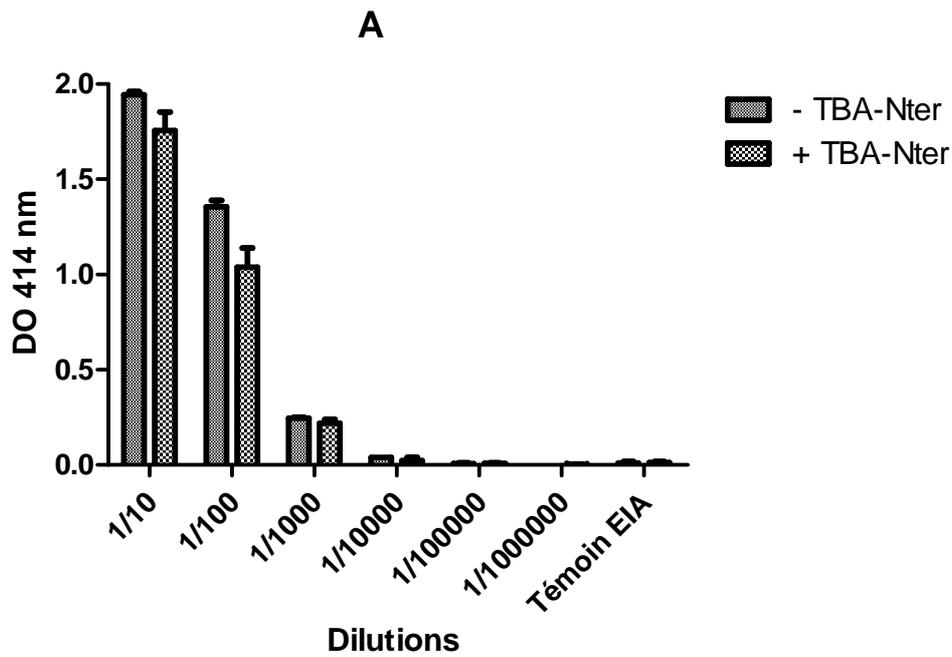


Figure 35. Dosage des anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma de donneur individuel.

50 μ l de plasma d'un donneur individuel dilué du 1/10 au 1/10⁶ est testé à l'aide d'un immunodosage comparant les résultats obtenus sur des plaques de titration où soit l'immunogène TBA-NterBSA soit la BSA a préalablement été adsorbée. Le peptide TBA-Nter à 25 μ g/ml (50 μ l) est ajouté ou non en compétition. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs, graphe (A)) et IgGh-G4 (détection IgGs, graphe (B)) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm.

Le choix de la TBA comme antigène d'intérêt fut en partie motivé par le fait que dans la population peu de personnes ont déjà été exposées à la toxine botulique A excepté les personnes ayant recours depuis quelques années à la technique de rajeunissement BoTox. Comme attendu, nous avons constaté que le plasma du donneur testé ne présente pas de différences de signaux en présence et en absence du peptide TBA-Nter pour les IgMs (Figure 35 (A)). On observe des différences de signal pour les IgGs, pour les dilutions 1/10 et 1/1000 (Figure 35 (B)). On peut considérer que ces différences sont inhérentes à la variabilité du dosage plutôt qu'à la présence d'anticorps anti-TBA-Nter qui aurait dû se traduire par des signaux plus faibles en présence du peptide TBA-Nter. Le plasma testé ne contenait donc pas d'anticorps dirigés spécifiquement contre le peptide N-terminal de la TBA. Ceci illustre l'absence de lymphocyte B sécréteurs d'anticorps dirigés contre le peptide N-terminal de la toxine botulique A chez le donneur utilisé. L'immunisation *in vitro* en utilisant les cellules sanguines issues du sang de ce donneur a donc été réalisée.

2 Mise au point d'un protocole d'immunisation *in vitro* efficace contre la TBA-Nter : comparaison de deux protocoles

Pour l'immunisation *in vitro* nous avons évalué deux protocoles :

- le premier protocole est basé sur une activation par des cytokines et l'antigène des cellules mononuclées du sang (PBMCs) après élimination des Natural Killer (NK).
- le deuxième protocole consiste à cocultiver des monocytes maturés en cellules dendritiques et stimulés avec l'antigène avec des lymphocytes B et T activés avec des interleukines et des CpG.

2.1 Protocole 1 : Elimination des lymphocytes Natural Killer (NK) et activation par des cytokines et l'antigène

2.1.1 Méthodologie utilisée

Cette première stratégie d'immunisation *in vitro* est basée sur l'élimination des Natural Killer (NK) des cellules mononuclées du sang (PBMCs) et l'activation des cellules par un cocktail de cytokines et par l'antigène, le peptide TBA-Nter. En effet, les NK pourraient inhiber l'activation de la réponse immunitaire et la production d'anticorps contre notre cible (paragraphe précédent 2 Immunisation *in vitro*). Ce protocole se déroule sur sept jours. Le premier jour (J0), une élimination des NK par des billes magnétiques à partir de 5×10^8 PBMCs est effectuée. Les NK possèdent un marqueur membranaire spécifique le CD56. Des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD56 (Miltenyi Biotec human CD56 MicroBeads) permettent d'éliminer les NK après passage sur colonne en présence d'un aimant (paragraphe 4 Préparation des cellules, Matériels et Méthodes). Après passage sur colonne, la fraction sans NK est récupérée soit ($3,75 \times 10^8$ cellules). Le taux de récupération des PBMCs NK⁻ (75%) est satisfaisant étant donné que les cellules NK⁻ représentent un pourcentage de 5 à 12 % des PBMCs. Nous décidons d'utiliser le maximum de ces cellules et de réaliser 24 puits d'immunisation *in vitro*. Sur cette fraction PBMCs NK⁻ contenant tous les types de cellules nécessaires à l'immunité primaire, des cytokines de type GM-CSF et IL-4 sont ajoutées pour permettre la maturation des monocytes en cellules dendritiques. En parallèle, le peptide TBA-Nter et un cocktail d'autres cytokines comprenant de l'IL-2 et l'IL-4 et des CpG (séquences immunomodulatrices stimulant la prolifération et la différenciation des lymphocytes B,) est ajouté. La concentration de 10 µg/ml en antigène étant la concentration la plus décrite dans la littérature pour ce type de protocole (Borrebaeck, 1983; Borrebaeck et al., 1987, 1988; Chin et al., 1994; Dueñas et al., 1996; Ichikawa et al., 1999; Jung et al., 2008; Shim et al., 2001; Tomimatsu et al., 2009; Volkman et al., 1982), c'est donc celle que nous utiliserons.

Au troisième jour (J3) après la première stimulation, une seconde stimulation avec à la fois l'antigène et le cocktail de cytokines IL-2, IL-4 et CpG est effectuée pour favoriser une réponse anticorps et peut être une commutation isotypique vers des IgGs. Au septième jour (J7), les surnageants de culture sont testés (Figure 36).

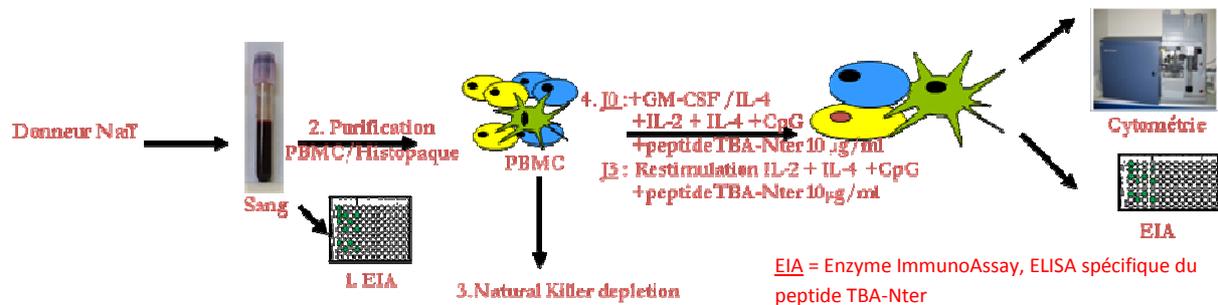


Figure 36. Protocole d'immunisation *in vitro* par élimination des NK et activation cellulaire simultanée.

2.1.2 Vérification de l'élimination des NK, de la présence de lymphocytes B, T et de monocytes et mesure de l'activation de la réponse immunitaire

Afin de vérifier que les NK ont bien été éliminés et que les lymphocytes T, B ainsi que les monocytes sont bien présents, des expériences de cytométrie en flux utilisant des anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques de chacun des types cellulaires et couplés à des fluorophores sont réalisées. D'autre part, à J7 les mêmes marquages sont réalisés. Par comparaison avec J0, nous pourrions déterminer s'il y a eu prolifération des cellules.

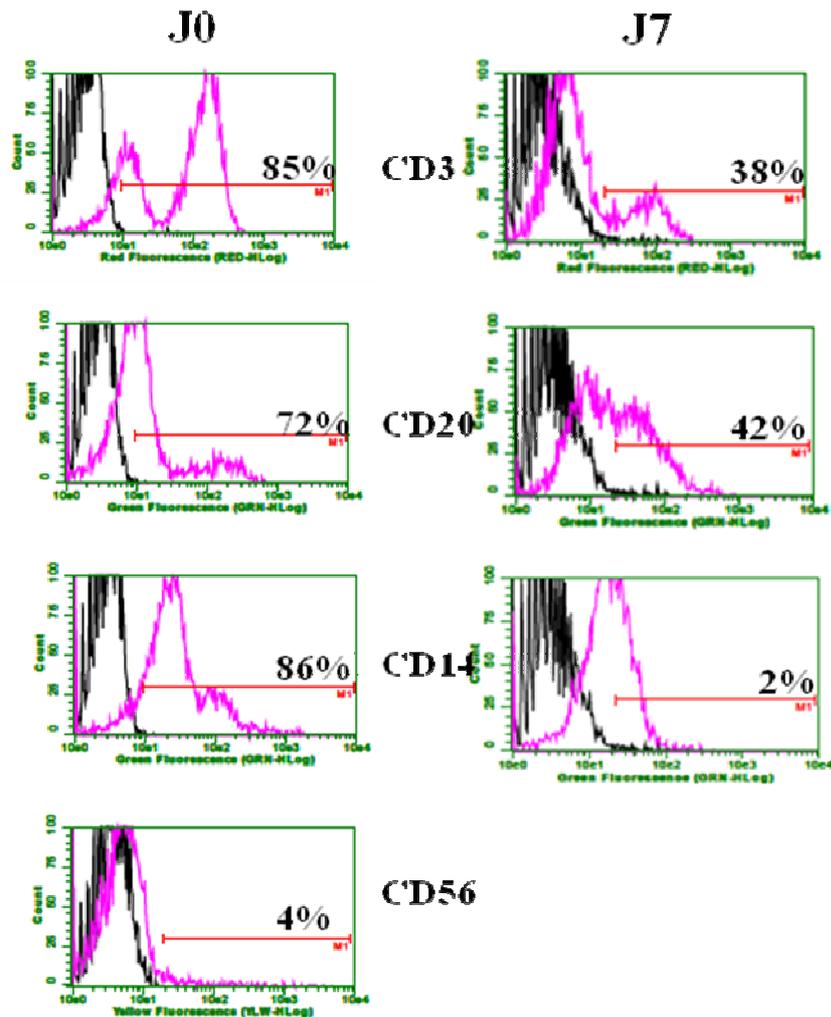


Figure 37. Graphes de cytométrie. Vérification de l'élimination des NK, de la présence des cellules nécessaires lymphocytes B, T, monocytes.

100 000 cellules à J0 et à J7 sont marquées avec des anticorps spécifiques de chacun des types cellulaires couplés à des fluorophores pendant 35 min à 4°C. (anticorps anti-CD3 humain marqué au PE-Cy5 (lymphocytes T), anticorps anti-CD20 humain marqué FITC (lymphocytes B), anticorps anti-CD14 humain couplé FITC (monocytes) et anticorps anti-CD56 humain couplé au PE (NK)).

Dans la population des cellules utilisées pour l'immunisation *in vitro* 4 % des cellules sont CD56+, les cellules NK n'ont donc été que partiellement éliminées (Figure 37).

Les marqueurs membranaires spécifiques des lymphocytes T, des lymphocytes B et des monocytes sont respectivement les CD3, CD20 et CD14. On observe sur la Figure 37, un fort pourcentage de cellules positives à J0 pour CD3, CD20 et CD14. Ces forts marquages pourraient s'expliquer par une fixation non spécifique des anticorps utilisés. Pour pallier ce problème, l'utilisation d'un isotype contrôle de chaque marqueur aurait été nécessaire. Entre J0 et J7, pour les cellules CD14+ (monocytes), on observe une diminution du pourcentage qui pourrait être due à la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. Pour

confirmer cette différenciation, nous disposons d'anticorps dirigés contre des marqueurs de cellules dendritiques, le CD11c (cellules dendritiques), le CD40 (cellules dendritiques et activation réponse immunitaire), le CD86 (cellules dendritiques, lymphocytes B et activation réponse immunitaire) et HLADR (marqueur lymphocytes B et activation réponse immunitaire). Ces marqueurs vont également nous permettre de visualiser l'activation des lymphocytes B et de la réponse immunitaire. Ces différents marqueurs sont utilisés avec des cellules non immunisées « *in vitro* » et avec des cellules immunisées à sept jours, J7.

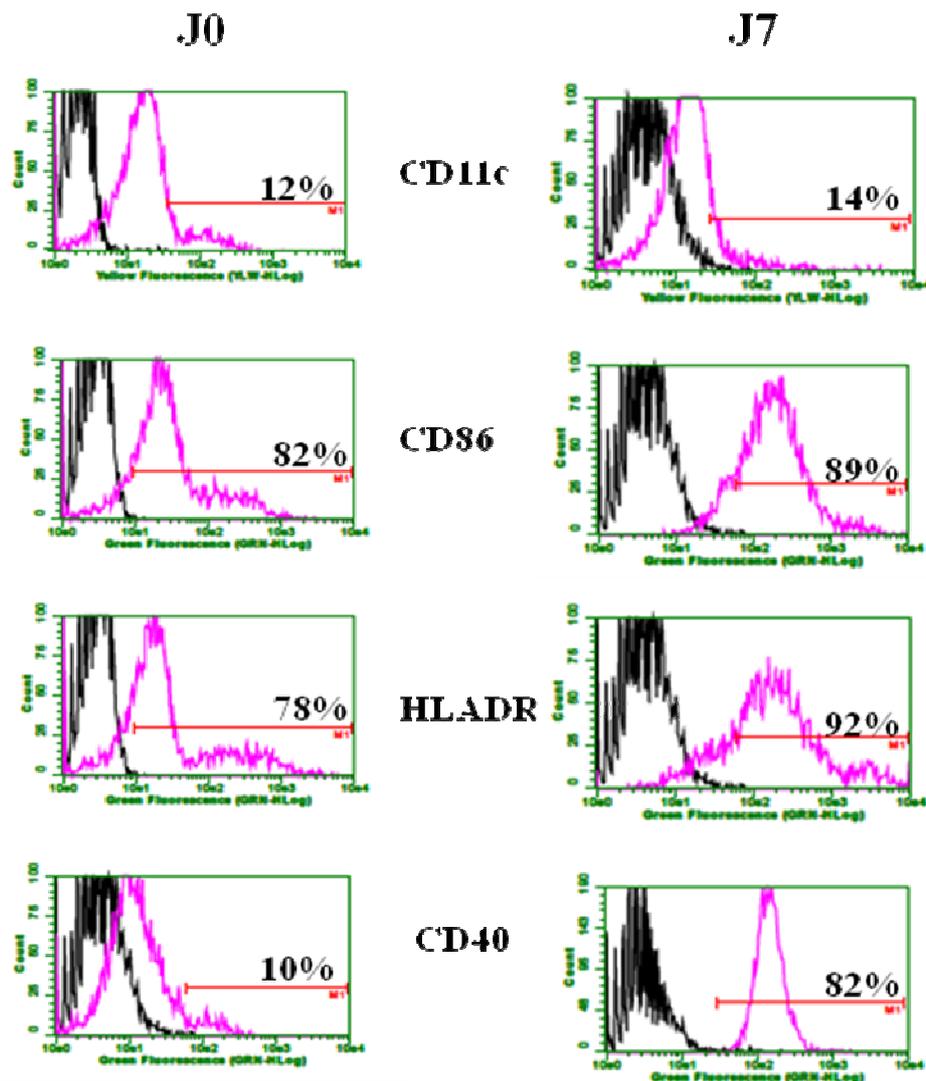


Figure 38. Graphes de cytométrie. Mesure de l'activation de la réponse immunitaire.

100 000 cellules à J0 et J7 sont marquées avec des anticorps spécifiques de différents marqueurs : CD11c (cellules dendritiques), CD40 (cellules dendritiques et activation réponse immunitaire), CD86 (cellules dendritiques, lymphocytes B et activation réponse immunitaire) et HLADR (marqueur lymphocytes B et activation réponse immunitaire) pendant 35 min à 4°C.

On note sur la Figure 38 une augmentation du pourcentage de l'ensemble des cellules marquées par les différents anticorps utilisés après immunisation « *in vitro* ». Cela confirme la différenciation de monocytes en cellules dendritiques et l'activation de la réponse immunitaire. Pour compléter ces résultats de cytométrie, nous avons observé les cellules avant et après immunisation « *in vitro* » au moyen d'un microscope optique.

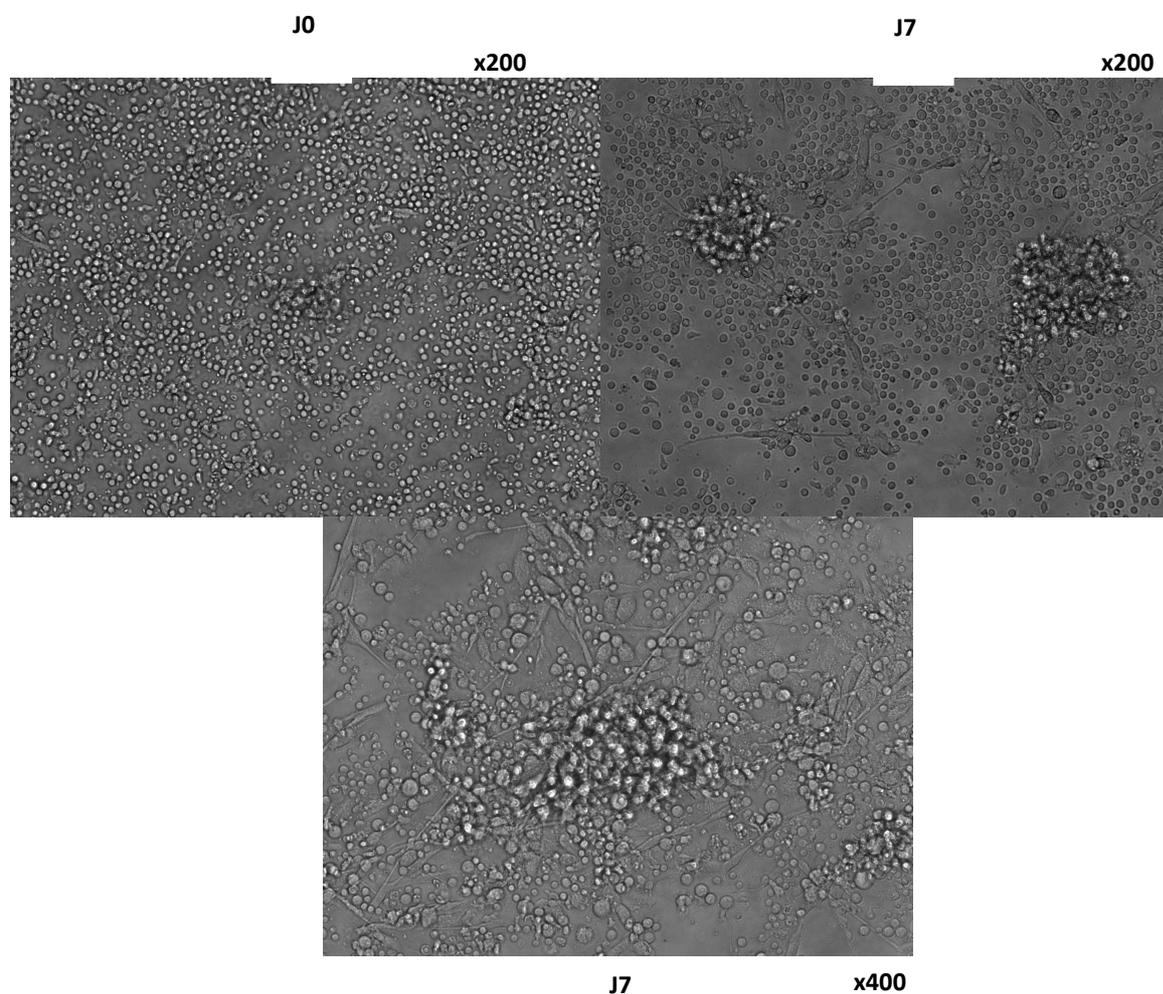


Figure 39. Photos de microscopie d'un puits d'immunisation *in vitro* à J0 et à J7. Microscope optique.

Avant stimulation J0 (Figure 39), les cellules sont rondes. Après 7 jours de stimulation « *in vitro* » J7 (Figure 39), on observe des cellules de forme étoilée caractéristique des cellules dendritiques. On observe également un amas cellulaire caractéristique d'une prolifération de lymphocytes. Ces changements de morphologie des cellules viennent donc confirmer nos résultats de cytométrie.

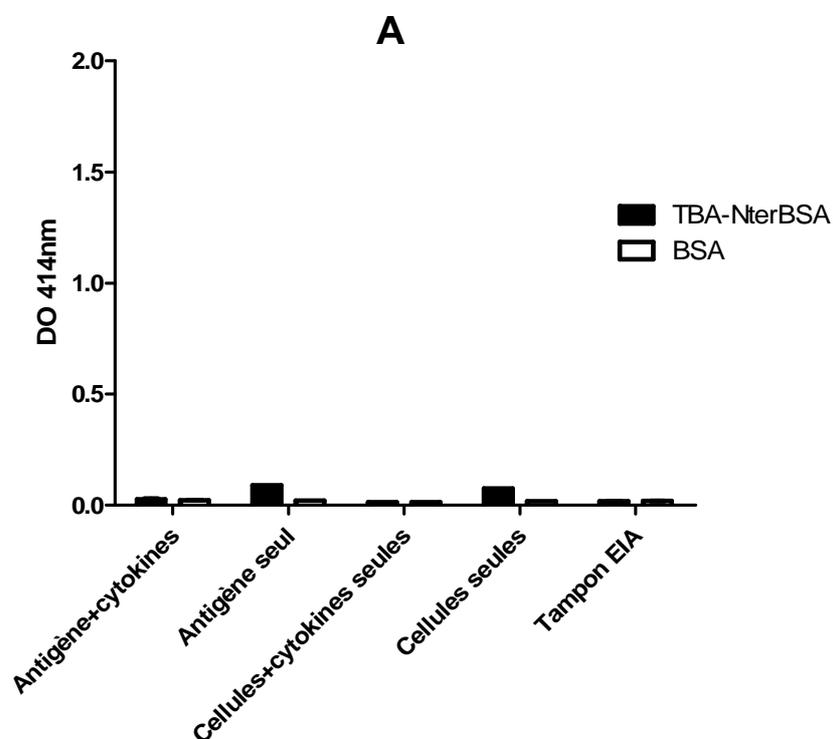
Afin de déterminer si l'activation de la réponse immunitaire induite par l'immunisation « *in vitro* » a débouché sur la production d'anticorps spécifiques du peptide

TBA-Nter, un dosage de ces anticorps (IgMs et IgGs) a été effectué dans les surnageants de culture après sept jours d'immunisation *in vitro*.

2.1.3 Dosages des anticorps anti-TBA-Nter

A J7, les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* (n=24) sont testés purs et au 1/10 selon un test ELISA utilisant des plaques recouvertes avec de la TBA-Nter couplé à la BSA (TBA-NterBSA) (1µg/ml) et des plaques recouvertes avec de la BSA (1µg/ml).

Des traceurs spécifiques des IgMs humaines et des IgGs humaines totales sont ajoutés pour détecter la présence d'IgMs et d'IgGs anti-TBA-Nter (paragraphe 8.2 Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A, Matériels et Méthodes). En parallèle on réalise ce même dosage avec des surnageants correspondant à des cellules stimulées avec l'antigène seul (n=1), avec les cytokines seules (n=1) ou non stimulées (n=1). Un témoin sans cellules (Tampon EIA) est également réalisé.



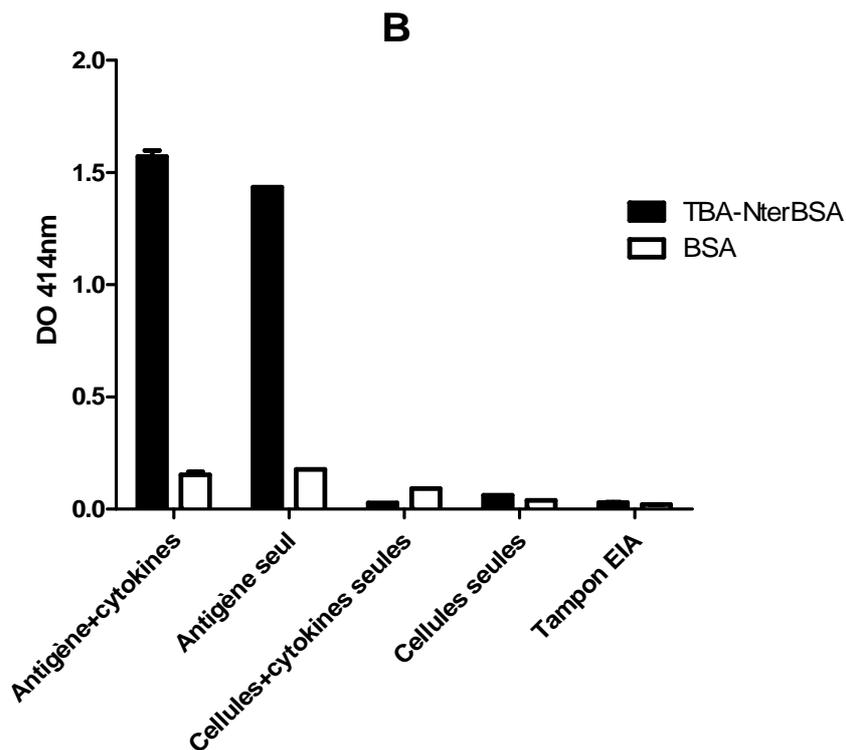


Figure 40. Dosage des IgGs et des IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro*/élimination des NK à J7.

50 µl des surnageants de culture purs pour le dosage des IgGs (A) ou dilués au 1/10 pour le dosage des IgMs (B) sont testés à l'aide d'un dosage utilisant des plaques revêtues de l'immunogène TBA-NterBSA ou de BSA seule. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs) et IgGh-G4 (détection IgGs) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm.

On observe sur la Figure 40 (A) que les signaux obtenus lors du dosage IgGs avec les surnageants purs sont très faibles. Les différences d'environ 0.04 DO entre les plaques TBA-NterBSA et BSA seules pour la stimulation avec l'antigène seul ou avec les cellules sans stimulation ne sont pas significatives. D'autre part, aucune différence de signal n'est observée entre les deux types de plaques pour les surnageants des cellules immunisées *in vitro*. On peut conclure de cette expérience que le protocole d'immunisation utilisé ne permet pas la production d'IgGs spécifiques du peptide TBA-Nter.

Concernant le dosage des IgMs (Figure 40 (B)) on note, pour les surnageants des cellules traitées suivant le protocole d'immunisation *in vitro* ou avec l'antigène seul, des signaux beaucoup plus élevés sur la plaque TBA-NterBSA que sur la plaque BSA seule. Cette différence révèle la production d'IgMs spécifiques du peptide TBA-Nter dans ces deux conditions de culture. Par contre comme attendu aucune différence n'est observée pour les autres conditions de culture (cytokines seules et cellules seules).

De façon surprenante l'immunisation *in vitro* avec l'antigène seul semble aussi efficace que l'immunisation avec ajout de cytokines dont le rôle est d'activer la réponse immunitaire. Cela

pourrait être dû à la présence de lymphocytes B mémoires réactivés par l'antigène. Cependant dans ce cas de figure, cette réactivation devrait induire également la production d'IgGs spécifiques du peptide TBA-Nter (voir paragraphe 1.1 la réponse T-dépendante), ce qui n'est pas notre cas. On peut envisager pour expliquer ce résultat que l'antigène seul active l'ensemble des cellules nécessaires à la réponse immunitaire (lymphocytes T, monocytes) et ainsi induire la production des cytokines impliquées dans l'activation des lymphocytes B. Il faut cependant rester prudent dans nos hypothèses car un seul puits a été réalisé avec l'antigène seul.

L'absence d'IgGs spécifiques tend à démontrer que l'immunisation *in vitro* a déclenché une réponse immunitaire primaire impliquant des lymphocytes B naïfs.

De même dans la littérature, la majorité des anticorps obtenus suite à l'immunisation *in vitro* sont des IgMs (Borrebaeck, 1988; Borrebaeck et al., 1988) (Borrebaeck, 1983; Borrebaeck et al., 1987, 1988; Chin et al., 1994; Dueñas et al., 1996; Jung et al., 2008; Tomimatsu et al., 2009; Volkman et al., 1982).

Nous avons testé un second protocole d'immunisation *in vitro* dans lequel les monocytes et les lymphocytes sont activés séparément puis co-cultivés.

2.2 Protocole 2 : Activation séparée des monocytes et des lymphocytes

2.2.1 Méthodologie utilisée

Nous avons testé un second protocole d'immunisation *in vitro* basé sur la coculture de monocytes et de lymphocytes (B et T) préalablement activés. Les monocytes (CD14+) sont purifiés à partir de PBMCs (5×10^8 cellules) grâce à des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD14 déposées dans une colonne avec un aimant. Deux fractions sont obtenues après passage sur la colonne : la fraction CD14+ qui correspond à la fraction retenue sur la colonne contenant les monocytes et la fraction CD14- correspondant à la fraction non retenue sur la colonne dépourvue de monocytes. La fraction CD14+ représente environ 5×10^7 cellules. Les monocytes ainsi obtenus sont incubés avec du GMC-SF, de l'IL-4 pendant 6 jours pour permettre leur maturation en cellules dendritiques sur une plaque 24 puits puis on ajoute le peptide TBA-Nter pendant 24 heures. En parallèle, on élimine les cellules NK (CD56+) de la fraction CD14- grâce à des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD56. A partir de la fraction CD14- contenant environ 3×10^8 cellules, nous réussissons à récupérer environ 2×10^8 cellules sans NK. Cette fraction contenant les lymphocytes B et T

contenus dans cette fraction (CD14⁻ NK⁻) est cultivée pendant 6 jours dans une seconde plaque de 24 puits. Ce protocole est plus long que le précédent, 14 jours contre 7 jours. Afin de pouvoir comparer les résultats de ces deux protocoles, ils ont été réalisés avec le sang d'un même donneur. En effet il est connu que les cellules issues de sang de différents donneurs ne répondent pas de la même manière à l'immunisation *in vitro* (Matsumoto et al., 2006; Yamashita et al., 2002).

Au sixième jour (J6) nous réalisons une expérience de cytométrie en flux pour mesurer le niveau d'activation des monocytes et vérifier la présence des lymphocytes T et B dans la fraction CD14⁻ NK⁻.

2.2.2 Vérification de la présence des lymphocytes B et T et de la maturation des monocytes en cellules dendritiques

Après 6 jours de culture on vérifie que des lymphocytes T et B sont bien présents dans la fraction CD14⁻ NK⁻ et que les monocytes de la fraction CD14⁺ se sont différenciés en cellules dendritiques. Pour ce faire, on réalise des expériences de cytométrie en flux utilisant les mêmes anticorps que précédemment (paragraphe 2.1.2).

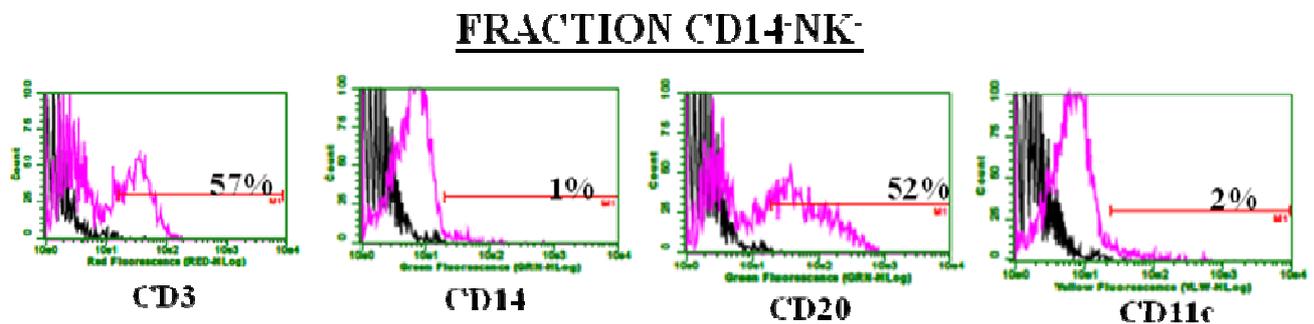


Figure 41. Graphes de cytométrie. Vérification de la présence des lymphocytes B et T.

100 000 cellules de la fraction CD14⁻NK⁻ sont incubées avec des anticorps spécifiques de chacun des marqueurs des différentes cellules : CD3 (lymphocytes T), CD14 (monocytes), CD20 (lymphocytes B) et CD11c (cellules dendritiques) couplé à des fluorophores pendant 35 min à 4°C.

On observe sur la Figure 41 des forts pourcentages pour les cellules CD3⁺ et CD20⁺. Cela démontre la présence de lymphocytes T (CD3⁺) et lymphocytes B (CD20⁺) dans la fraction CD14⁻ NK⁻. Par contre les pourcentages très faibles (moins de 5%) mesurés pour les cellules CD14⁺ et CD11c⁺ sont dûs à une absence presque totale de monocytes et de cellules dendritiques.

FRACTION CD14⁺

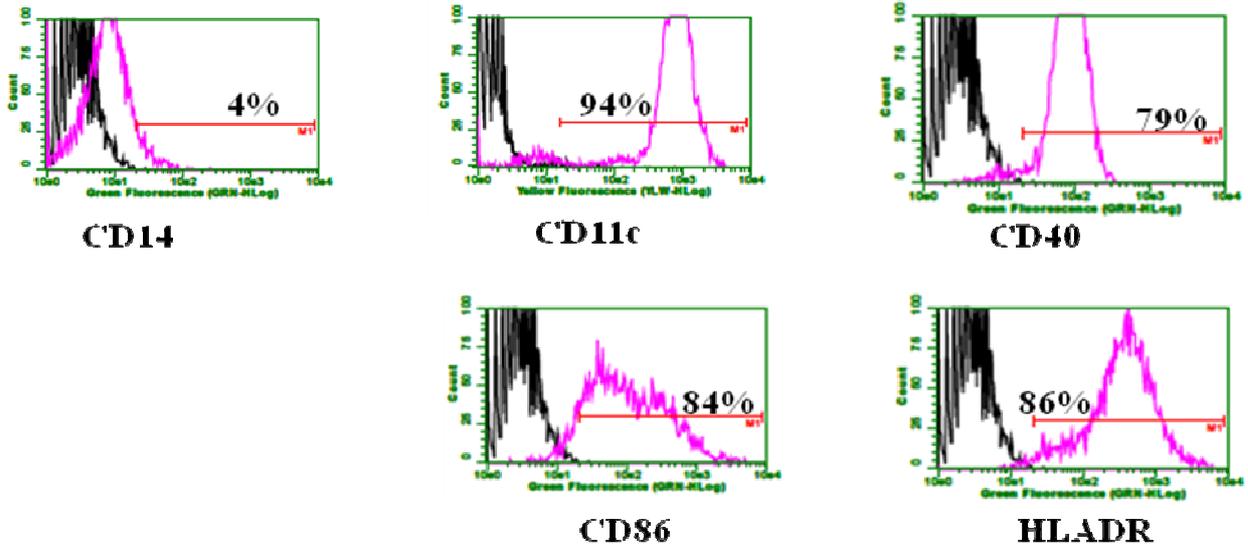


Figure 42. Graphes de cytométrie. Vérification de la maturation des monocytes en cellules dendritiques 6 jours après mise en culture sur plaque.

100 000 cellules des fractions CD14⁺ cultivées avec GMC-SF+IL-4 sont marquées avec des anticorps spécifiques des marqueurs de différentes cellules : monocytes (CD14⁺) et cellules dendritiques (CD11c⁺). On utilise également des anticorps spécifiques de marqueurs de l'activation de la réponse cellulaire (CD40, CD80 et HLADR). Ces anticorps sont incubés pendant 35 min à 4°C avant la mesure par cytométrie

Pour la fraction CD14⁺, on observe sur la Figure 42 un fort marquage de cellules CD11c⁺ (94%) qui correspondent aux cellules dendritiques. Ces cellules dendritiques proviennent de la différenciation des monocytes (CD14⁺) pour lesquelles on obtient un faible marquage (4%). D'autre part, on remarque des taux de marquage très élevés pour les cellules CD40⁺, CD86⁺ et HLADR qui révèlent l'activation de la réponse immunitaire.

L'ensemble de ces marquages témoigne donc d'une bonne différenciation des monocytes en cellules dendritiques et de l'initiation de la réponse immunitaire dans la fraction de la coculture.

Compte tenu des résultats obtenus en cytométrie, la fraction CD14⁺ différenciée en cellules dendritiques est mise en contact avec l'antigène, le peptide TBA-Nter, durant 24 h. En parallèle, la fraction CD14⁻ NK⁻ est incubée avec le cocktail de cytokines précédent (IL-2, IL-4 et CpG) durant 24 h. Le lendemain les 2 fractions cellulaires : CD14⁺ ayant vu l'antigène et la fraction CD14⁻ NK⁻ ayant vu les cytokines sont mélangées. La coculture va durer 7 jours. Trois jours après le début de la coculture (J10), une restimulation avec l'antigène et les cytokines est effectuée.

Afin d'observer les modifications de morphologie des cellules au cours des différentes étapes J0 le jour de la purification des cellules, J7, le lendemain de la coculture et J13, sept jours après la coculture), nous avons observé les cellules au microscope optique.

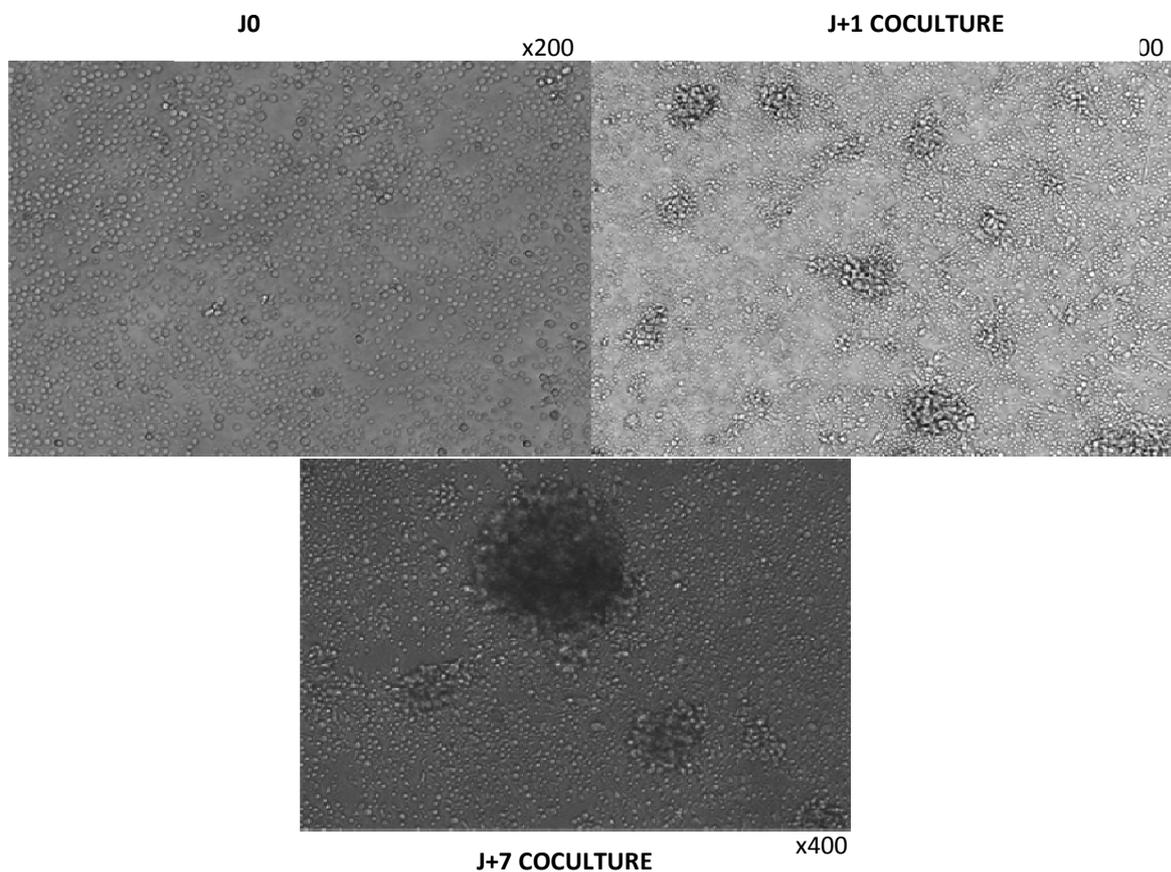


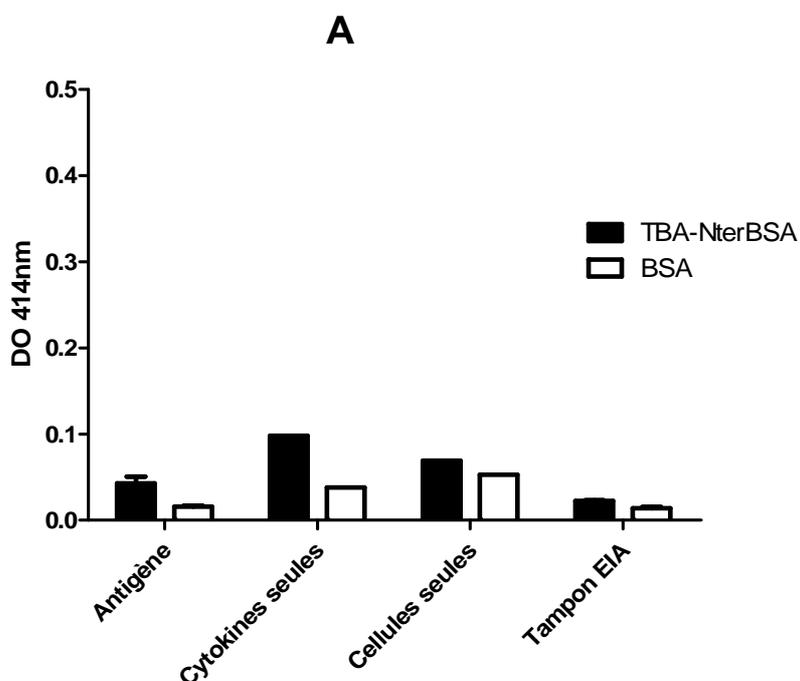
Figure 43. Photos de microscopie d'un puits d'immunisation *in vitro* à J0, J7 (J+1 jour après coculture) et J13 (J+7 jours après coculture). Microscope optique.

A J0, avant stimulation, les cellules sont rondes et ne sont pas différenciées (Figure 43). Après 6 jours de stimulation avec GMC-SF+IL4 suivis d'1 jour de coculture avec les cytokines et l'antigène (J+1 Coculture), nous pouvons distinguer des amas de cellules caractéristiques de la prolifération des lymphocytes et des cellules en forme d'étoile caractéristiques des cellules dendritiques. Après 7 jours de coculture (J+7 Coculture), on observe la disparition des cellules de formes étoilées alors que les amas cellulaires ont grossi. Cela démontre que les lymphocytes continuent à proliférer.

2.2.3 Dosage des anticorps anti-TBA-Nter

Pour vérifier l'efficacité de l'immunisation *in vitro* en termes de production d'anticorps spécifiques de TBA-Nter, nous réalisons le dosage de ces anticorps dans les surnageants de culture.

Après 7 jours de coculture J7, les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* (n=24) sont testés purs et au 1/10 selon un test ELISA comme décrit précédemment (paragraphe 2.1.3) pour détecter la présence d'IgMs et d'IgGs anti-TBA-Nter (paragraphe 8.2 Les dosages immunologiques utilisant la BoNT/A, Matériels et Méthodes). En parallèle on réalise ce même dosage avec des surnageants correspondant à des cellules stimulées avec les cytokines seules (n=1) ou non stimulées (n=1). Un témoin sans cellules (Tampon EIA) est également réalisé.



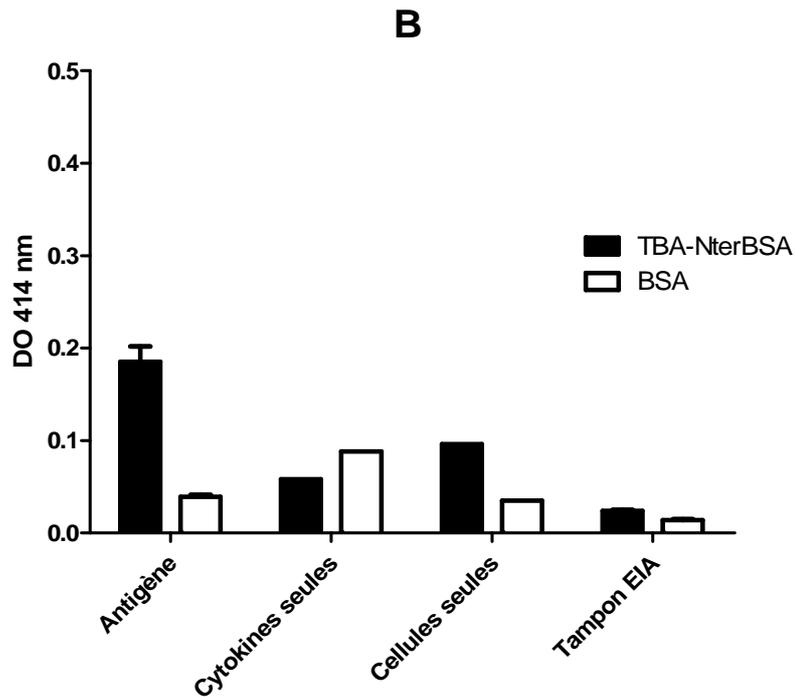


Figure 44. Dosage des IgGs et des IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro*/ coculture après 7 jours.

50 µl des surnageants de culture purs pour le dosage des IgGs (A) ou dilués au 1/10 pour le dosage des IgMs (B) sont testés à l'aide d'un dosage utilisant des plaques revêtues de l'immunogène TBA-NterBSA ou de BSA seule. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs) et IgGh-G4 (détection IgGs) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm.

Comme pour le premier protocole on observe sur la Figure 44 (A) que les signaux obtenus lors du dosage IgGs avec les surnageants purs sont très faibles. Les faibles différences observées entre les plaques TBANter-BSA et BSA ne sont pas suffisantes pour affirmer qu'une production d'IgGs spécifiques s'est produite.

Concernant le dosage des IgMs (Figure 44 (B)) on note, pour les surnageants des cellules traitées avec l'antigène et les cytokines (colonne Antigène), des signaux plus élevés sur la plaque TBANter-BSA que sur la plaque BSA seule. Cette différence de l'ordre d'une unité d'absorbance lorsque l'on dose ces mêmes surnageants purs, révèle la production d'IgMs spécifiques du peptide TBA-Nter. Les différences de signaux observées pour les autres conditions sont plus faibles et sont du même ordre que pour les dosages effectués avec les surnageants purs.

Il faut noter que ce deuxième protocole semble moins efficace que le premier pour la production IgMs spécifiques du peptide TBA-Nter. En effet, les différences de signaux

obtenus pour les surnageants du premier protocole (comparables en terme de dilution) sont beaucoup plus importantes.

Ces résultats montrent que nous avons réussi à mettre au point deux protocoles d'immunisation *in vitro*. Ces deux protocoles sont capables de mimer la réponse primaire en anticorps *in vivo* puisqu'ils induisent la production d'IgMs contre notre cible.

Le but initial étant de produire des anticorps monoclonaux humains anti-TBA-Nter après immunisation *in vitro*, les puits sont immortalisés par EBV afin de pouvoir les cloner.

2.3 Immortalisation

Après immunisation *in vitro*, un puits de chaque protocole présentant un fort signal est immortalisé à l'aide d'un transfokit et des CpG (paragraphe 6 Immortalisation, Matériels et Méthodes). Pour ce qui concerne les cellules issues de l'immunisation *in vitro* après élimination des NK, 89 des 100 puits mis en culture après immortalisation présentaient des cellules sécrétant des IgMs anti-TBA-Nter. Dans le cas des cellules issues de l'issue l'immunisation *in vitro* par coculture, seuls 9 des 90 puits mis en culture après immortalisation présentaient des cellules sécrétant des IgMs anti-TBA-Nter. Cette différence de rendement entre les deux protocoles pourrait s'expliquer par une plus faible concentration de lymphocytes B producteurs d'IgMs anti-TBA-Nter comme semble le montrer les différences de concentration en IgMs mesurés précédemment.

Malheureusement, comme précédemment observé lors des expériences d'immortalisation des lymphocytes issus de personnes immunisées, les clones obtenus ne sont pas stables. Après quelques jours de culture, l'ensemble des puits se sont révélés négatifs pour la production en IgMs anti-TBA-Nter.

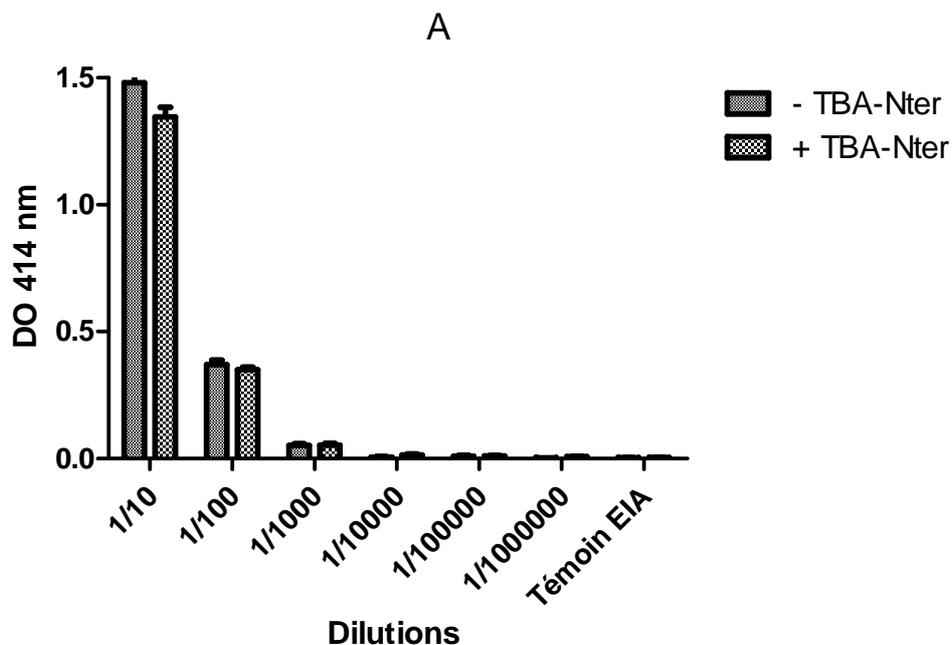
3 Production d'anticorps monoclonaux humains anti-TBA-Nter à partir du protocole comportant l'élimination des NK

Pour confirmer et améliorer les résultats précédents, nous avons utilisé le protocole impliquant l'élimination des cellules NK des PBMCs qui semble donner les meilleurs résultats. Pour cette nouvelle étude, nous avons choisi d'évaluer l'influence du nombre de stimulations sur l'immunisation « *in vitro* ».

Brièvement, nous éliminons les cellules NK dans un lot de 5×10^8 PBMCs. Sur cette fraction PBMCs NK⁻ contenant tous les types de cellules nécessaires à l'immunité primaire, des cytokines de type GM-CSF et IL-4 sont ajoutées pour permettre la maturation des monocytes en cellules dendritiques. En parallèle, le peptide TBA-Nter et un cocktail d'autres cytokines comprenant de l'IL-2 et l'IL-4 et des CpG est ajouté. A J3 une seconde stimulation (restimulation) avec l'antigène et le cocktail de cytokines IL-2, IL-4 et CpG est effectuée dans certains puits. A J7, les surnageants de culture sont prélevés afin de doser les anticorps anti-TBA-Nter. Les puits sont rechargés en milieu de culture et une troisième stimulation avec l'antigène et le cocktail de cytokines IL-2, IL-4 et CpG est effectuée dans certains puits. A J12, les surnageants de culture sont prélevés afin de doser les anticorps anti-TBA-Nter.

3.1 Vérification de l'absence d'anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma du pool de 5 donneurs utilisé

Pour cette étude, nous avons décidé d'utiliser des pools de cinq donneurs proposés par l'EFS, ce qui permet de disposer d'un lot de PBMCs plus important. Comme précédemment, nous avons vérifié l'absence d'anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma du pool de 5 donneurs utilisé (voir paragraphe 1).



B

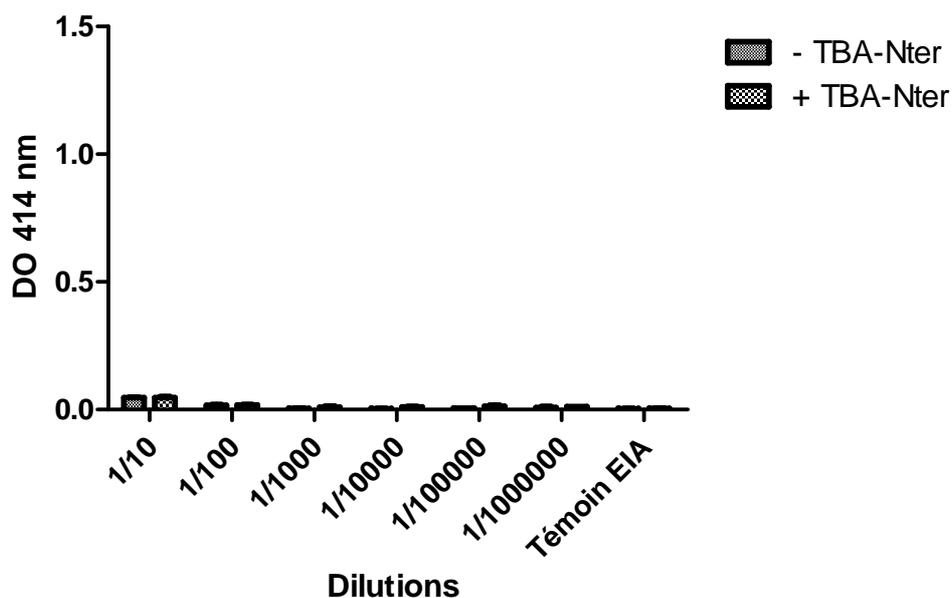


Figure 45. Dosage des anticorps anti-TBA-Nter dans le plasma d'un pool de donneurs.

50 μ l de plasma d'un pool de 5 donneurs dilué du 1/10 au 1/10⁶ est testé à l'aide d'un immunodosage comparant les résultats obtenus sur des plaques de titration où soit l'immunogène TBA-NterBSA soit la BSA a préalablement été adsorbée. Le peptide TBA-Nter à 25 μ g/ml (50 μ l) est ajouté ou non en compétition. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs, graphe A) et IgGh-G4 (détection IgGs, graphe B) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm.

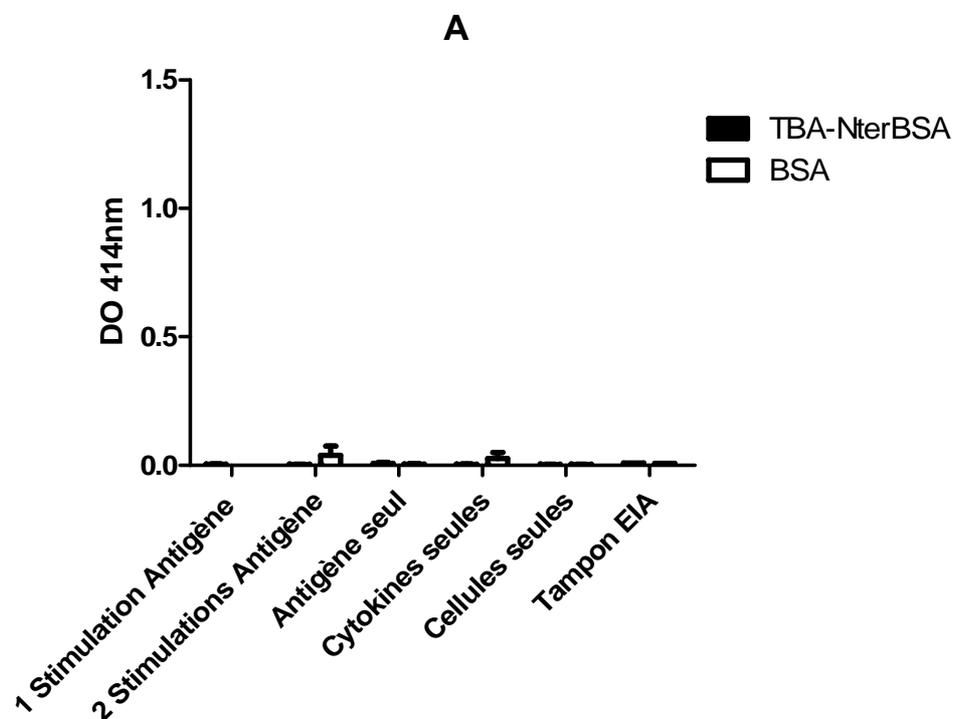
Les résultats obtenus lors de ces dosages sont très similaires à ceux obtenus précédemment avec le sang d'un seul donneur (paragraphe 2.1) puisqu'aucune différence de signal significative n'est observée en absence ou présence du peptide TBA-Nter. Ce pool de sang ne contient donc pas d'IgMs et d'IgGs dirigés spécifiquement contre le peptide TBA-Nter ce qui démontre l'absence de lymphocytes B sécréteurs d'anticorps dirigés contre le peptide TBA-Nter. L'immunisation *in vitro* peut donc être réalisée en utilisant ce sang issu de 5 donneurs. Nous utiliserons désormais ce conditionnement qui nous permet de disposer d'un plus grand nombre de cellules.

3.2 Vérification de l'absence des cellules NK, de la présence lymphocytes B, T et monocytes et mesure de l'activation de la réponse immunitaire

Comme précédemment lors du premier protocole d'immunisation *in vitro*, nous avons vérifié l'élimination des NK, de la présence lymphocytes B, T et monocytes et de l'activation de la réponse immunitaire par des expériences de cytométrie de flux. Les résultats obtenus sont identique à savoir : élimination seulement partielle des cellules NK, prolifération des lymphocytes B, différenciation de monocytes en cellules dendritiques et activation de la réponse immunitaire (2% cellules NK+ après passage sur colonne, reste des résultats non présentés).

3.3 Dosage des anticorps anti-TBA-Nter

A J7, les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés purs pour rechercher la présence d'IgMs et/ou d'IgGs anti-TBA-Nter selon le test utilisé auparavant.



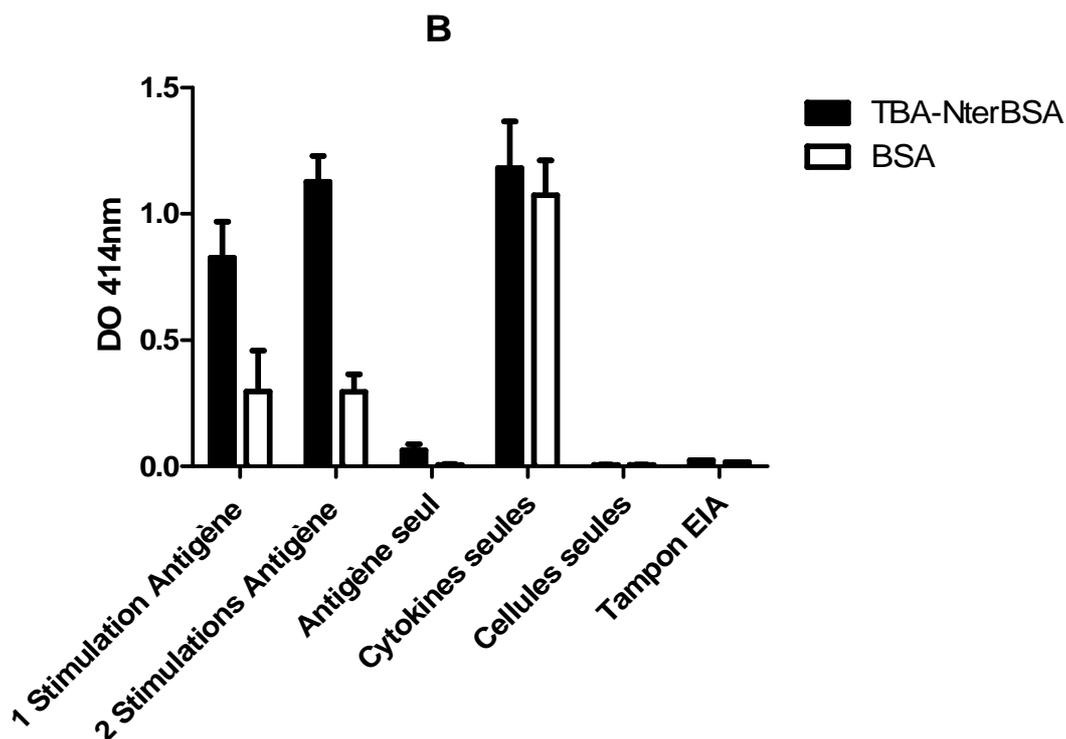


Figure 46. Dosage des IgGs et IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* après 7 jours.

50 μ l des surnageants de culture purs pour le dosage des IgGs (A) et pour le dosage des IgMs (B) sont testés à l'aide d'un dosage utilisant des plaques revêtues de l'immunogène TBA-NterBSA ou de BSA seule. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs) et IgGh-G4 (détection IgGs) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm.

Comme on peut l'observer sur la Figure 46 (A) les signaux obtenus pour les IgGs sont toujours très faibles même après 2 stimulations, montrant clairement l'absence de commutation isotypique des IgMs vers des IgGs au niveau de la réponse spécifique. Concernant les IgMs anti-TBA-Nter (Figure 46 (B)), les résultats obtenus montrent une augmentation de leur concentration suite à la deuxième stimulation. On note également des signaux élevés pour les cellules stimulées avec les cytokines seules quelque soit la phase solide utilisée pour le dosage (TBA-NterBSA ou BSA seule). Ces signaux résultent probablement de la présence d'IgMs non spécifiques du peptide TBA-Nter qui s'adsorbent sur la BSA et sont détectées par l'anticorps traceur IgMh. En effet, il est connu que les IgMs sont les immunoglobulines qui induisent le plus de liaisons non spécifiques lors de dosages immunologiques sur plaque. Lors du premier protocole d'immunisation *in vitro* avec des PBMCs NK⁻, les signaux obtenus avec une stimulation employant les cytokines seules étaient beaucoup plus faibles (environ 0.1DO). On peut donc en conclure que la deuxième stimulation avec les cytokines seules induit une très forte prolifération non spécifique des lymphocytes B engendrant une forte augmentation de la production des immunoglobulines

(IgGs et IgMs). Mais cette hypothèse reste à vérifier car les signaux obtenus sur BSA lors de la double stimulation avec les cytokines sont beaucoup plus faibles.

A J12, les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont également testés purs pour la présence d'IgMs et/ou d'IgGs anti-TBA-Nter.

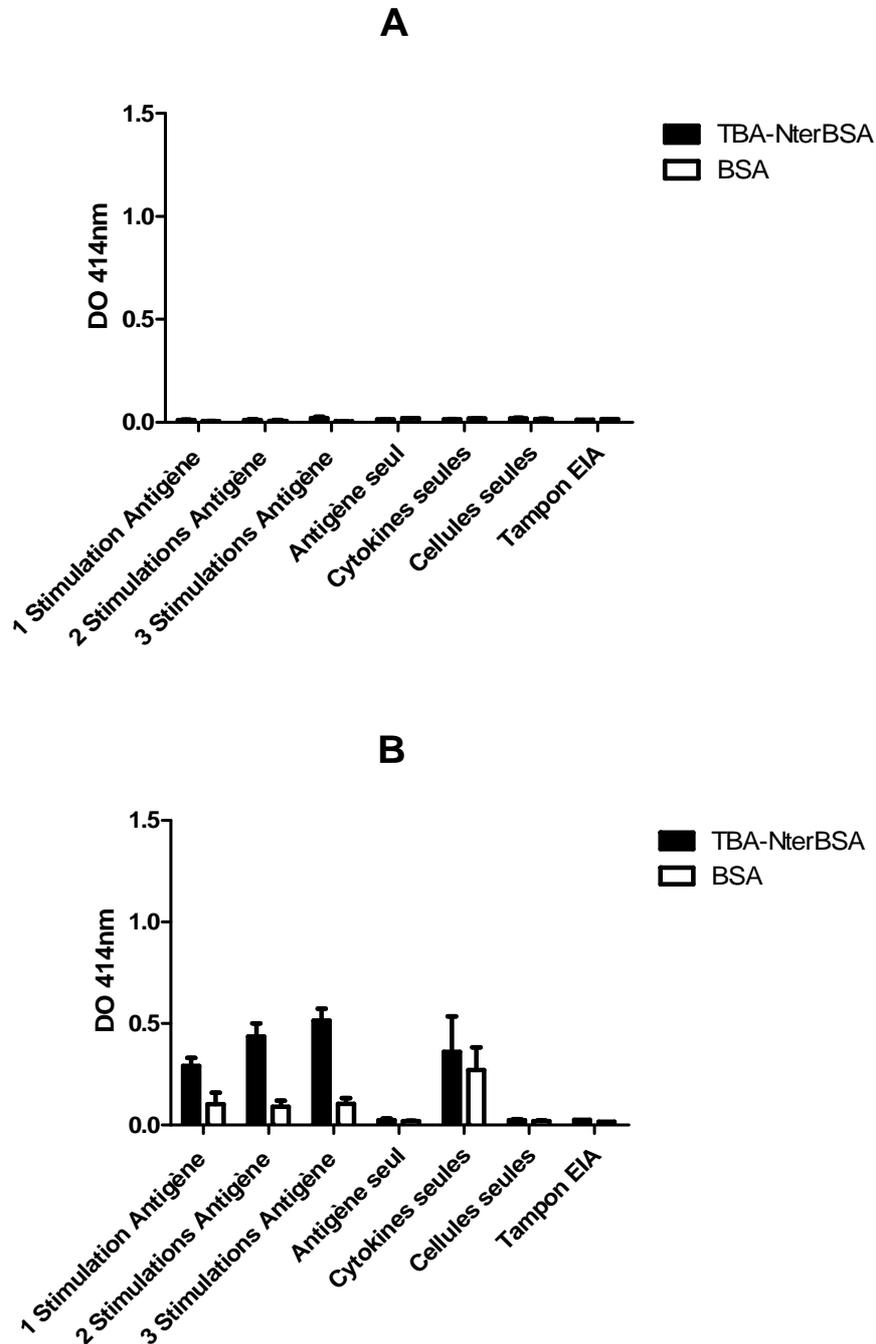


Figure 47. Dosage des IgGs et IgMs anti-TBA-Nter dans les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* après 12 jours.

50 μ l des surnageants de culture purs pour le dosage des IgGs (A) et pour le dosage des IgMs (B) sont testés à l'aide d'un dosage utilisant des plaques revêtues de l'immunogène TBA-NterBSA ou de BSA seule. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs) et IgGh-G4 (détection IgGs) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm.

Le dosage des IgGs et IgMs spécifiques du peptides TBA-Nter (Figure 47 (A) et (B)) montre qu'il n'a aucun changement significatif après la deuxième stimulation et la troisième stimulation au niveau du profil de production. Par contre on peut noter une baisse des signaux mesurés à J12 probablement dûe à une mortalité cellulaire au cours du temps.

3.4 Immortalisation et fusion

Les cellules du puits présentant le meilleur signal lors du test pour la détection des IgMs anti TBA-Nter ont été immortalisées avec le virus EBV suivant le protocole précédemment décrit. Après un mois de culture, 7 des 30 puits réalisés présentent des IgMs anti-TBA-Nter dans leurs surnageants.

Les autres puits de l'immunisation *in vitro* ont été fusionnés avec l'hétéromyélome HM mais aucun hybridome n'a été obtenu. Sur les 7 puits contenant des lymphocytes B immortalisés sécréteurs d'IgMs anti-TBA-Nter, nous avons voulu étudier l'effet de l'acridine orange sur la commutation isotypique. En effet récemment, des publications ont décrit l'effet de l'acridine orange, agent intercalant de l'ADN sur la commutation des IgMs en IgGs (Paizi et al., 1995; Spira et al., 1996). Nous avons testé cet agent à différentes concentrations et après plusieurs clonages en dilution limite, malheureusement sans réussir à obtenir des IgGs anti-TBA-Nter. D'autres stratégies, comportant notamment l'utilisation de cytokines ou des UV qui induiraient la commutation isotypique pourraient être évaluées (Aversa et al., 1994; Avery et al., 2008; Coffman et al., 1993; Pène et al., 2004; Rosén and Klein, 1983).

CONCLUSIONS ET **PERSPECTIVES**

L'objectif de cette étude était d'établir un protocole permettant l'obtention d'anticorps monoclonaux humains spécifiques d'une cible d'intérêt à partir de lymphocytes B naïfs. Pour atteindre cet objectif, il était nécessaire de mettre au point une immunisation *in vitro* afin de stimuler la différenciation de ces lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps dirigés contre notre cible. De plus pour cloner ces plasmocytes et assurer une production illimitée en anticorps, une étape d'immortalisation est indispensable. Nous avons choisi comme cible modèle un peptide de la toxine botulique A. Ce choix a été basé sur deux critères :

1) l'obtention d'anticorps monoclonaux humains dirigés contre la toxine botulique et potentiellement neutralisant est d'un intérêt thérapeutique évident;

2) rares étant les personnes susceptibles d'avoir été en présence de toxine botulique A, il devait donc être plus aisé d'obtenir du sang de donneurs naïfs vis-à-vis de ce peptide.

Dans un premier temps, le dosage sous un format immunoenzymatique spécifique du peptide N-terminal de la toxine botulique A, nous a permis de mettre en évidence l'absence d'IgMs et d'IgGs anti-TBA-Nter dans le plasma des donneurs de sang utilisé.

Puis nous avons testé deux protocoles d'immunisation *in vitro*:

- 1) élimination des Natural Killer (NK) et activation par des cytokines et l'antigène
- 2) activation séparée des monocytes et des lymphocytes suivie d'une coculture.

Nos résultats montrent que ces deux protocoles permettent de déclencher une réponse anticorps primaire qui se traduit par la production d'IgMs spécifiques de la cible. Cependant le premier protocole donne de meilleurs résultats au niveau de la réponse en IgMs spécifiques. L'augmentation du nombre de stimulation avec les cytokines et l'antigène au cours de ce protocole a permis d'améliorer légèrement cette réponse en IgMs, mais pas de déclencher une réponse en IgGs spécifiques.

D'autre part aucune méthode d'immortalisation (à l'aide de l'EBV ou d'un myélome) n'a permis d'obtenir des clones stables des lymphocytes B producteurs d'anticorps anti-TBA-Nter. Nous avons précédemment montré que la fusion entre les lymphocytes B humains et l'hétéromyélome HM était réalisable. Les problèmes que nous rencontrons sont dûs soit à des modifications induites par l'immortalisation avec l'EBV qui empêche l'obtention d'hybridomes stables, soit au faible pourcentage de lymphocytes B humains producteurs d'anticorps spécifiques de notre cible qui rend très aléatoire une fusion après immunisation *in vitro*.

Pour pallier ces problèmes, nous pourrions envisager de réaliser un enrichissement des lymphocytes B stimulés qui se différencient en plasmocytes. En effet comme lors de leur différenciation les lymphocytes B perdent leurs immunoglobulines membranaires, nous

pourrions éliminer les lymphocytes B non stimulés à l'aide de billes magnétiques fonctionnalisées par le greffage d'un anticorps anti-Immunoglobuline humaines. Un enrichissement des lymphocytes B basé sur ce principe a déjà été décrit par Kozbor et Roder 1981 (Kozbor and Roder, 1981). Dans cette expérience une seule stimulation serait effectuée car nous avons montré que l'incrémentation du nombre de stimulations conduit à l'augmentation de la stimulation non spécifique des lymphocytes B. L'augmentation du pourcentage en lymphocytes B différenciés par la stimulation devrait nous permettre d'accroître nos chances d'obtenir des hybridomes producteurs d'anticorps dirigés contre notre cible.

Une première expérience a été réalisée afin de commuter les plasmocytes producteurs d'IgMs spécifiques en plasmocytes producteurs IgGs spécifiques mais sans succès. Cependant d'autres pistes basées sur l'utilisation des UV et/ou de cytokines particulières (IL-21) ou molécules de costimulation (CD40) restent à exploiter.

DEUXIEME MODELE
D'ETUDE

La protéine transactivatrice Tat
du virus de l'immunodéficience
humaine type 1 (VIH-1)

INTRODUCTION

Compte tenu des difficultés, cette étude a été recentré sur une nouvelle cible pour réaliser nos expériences d'immunisations *in vitro*. Nous avons utilisé comme modèle, la protéine transactivatrice Tat du virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1). Dans une première partie, la protéine Tat101, ses caractéristiques et propriétés, ainsi que les raisons qui nous ont conduit à utiliser la protéine Tat101 dans notre système d'immunisation *in vitro* seront présentés. Dans une seconde partie, les résultats obtenus avec la protéine de fusion ZZTat101 et ses dérivés dans le système d'immunisation *in vitro* précédemment mis en place seront présentés. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article soumis pour publication.

1 La protéine transactivatrice Tat101 du virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1)

1.1 Rôle de Tat101 dans l'infection au VIH-1

Tat est le transactivateur transcriptionnel du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Tat est une protéine d'une masse moléculaire d'environ 11,5 kDa constituée de 86 à 101 acides aminés. Tat permet de réguler la transcription des gènes viraux durant les étapes précoces du cycle viral et joue donc un rôle essentiel dans la multiplication et la réplication du virus VIH-1 (Dayton et al., 1986). Tat est synthétisé lors de l'infection par le VIH-1 de ses cellules cibles, les lymphocytes T CD4+. Tat apparaît précocement lors de l'infection puisque c'est une des premières molécules exprimées par le virus et son génome viral (un génome ARN). Tat permet de diriger les éléments de la machinerie de transcription de la cellule infectée vers l'ARN viral en cours de synthèse. Elle permet donc d'activer la transcription du génome viral. C'est pour cela qu'elle est appelée transactivateur transcriptionnel. L'expression de Tat a pour résultat la production d'ARN viraux fonctionnels entiers et polyadénylés dans la cellule infectée. Par ailleurs, Tat exerce de nombreux effets lors de l'infection par le VIH-1. Par exemple, Tat semble impliqué dans la régulation de la transcription inverse qui précède l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire grâce à la transcriptase inverse. Tat jouerait également un rôle dans le remodelage de la chromatine et dans le « capping » des ARNm viraux. Lors de l'infection par le VIH-1, Tat interfère avec 775 protéines différentes de manière directe (dérégulation faisant intervenir une interaction physique) ou de manière indirecte (dérégulations via l'activation de voies de signalisation) (Fu et al., 2009; Ptak et al., 2008).

1.2 Structure et organisation de Tat101

Des études ont montré que Tat ne possède pas de structure secondaire et tertiaire bien définis (Campbell and Loret, 2009). Son repliement dépendrait des conditions environnementales.

Tat est codé par deux exons. Chaque exon code pour une partie de la protéine avec des fonctions spécifiques. Le premier exon code pour une séquence de 72 acides aminés contenant le domaine nécessaire à l'activité de transactivation de Tat. Le second exon code pour une séquence C-terminale de 14 acides aminés non nécessaire à la propriété de transactivation *in vitro* de Tat mais nécessaire à la transactivation *in vivo* (Campbell and Loret, 2009). La protéine Tat est organisée en six régions schématisées dans la Figure 49. Chaque région possède une composition en acides aminés particulière et un rôle spécifique.

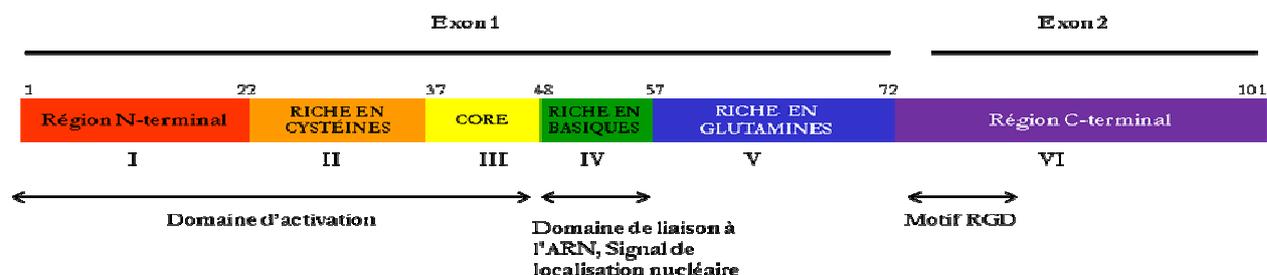


Figure 48. Structure et organisation de Tat101.

- **La région I (résidus 1 à 21)** est une région riche en proline. Cette région N-terminale intervient dans la libération de Tat par les cellules infectées et sa translocation dans le cytosol des cellules avoisinantes (Johri et al., 2011). Cette caractéristique est basée sur la présence d'un résidu tryptophane en position 11.
- **La région II (résidus 22 à 37)** est une région riche en cystéines. Elle possède sept cystéines bien conservées en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37. La région II porte l'activité de transactivation de Tat. La mutation de chacune de ces cystéines à l'exception de la cystéine 31 a pour conséquence une perte de la capacité de transactivation de Tat (Kittiworakarn et al., 2006).
- **La région III (résidus 38 à 48)** ou région core est une région riche en résidus hydrophobes. Elle présente une phénylalanine en position 38 et une séquence conservée $^{41}\text{KGLGISYG}^{48}$ entre les résidus 41 à 48 (Johri et al., 2011).

- **La région IV (résidus 49 à 57)** est riche en acides aminés basiques. Ce domaine basique est nécessaire pour la liaison et l'internalisation de Tat dans les cellules (Johri et al., 2011). Cette région contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) permettant la translocation de Tat vers le noyau.
- **La région V (résidus 58 à 72)** est riche en résidus glutamine et est impliquée dans la polymérisation des microtubules et l'apoptose des cellules T médiée par Tat.
- **La région VI (résidus 73 à 101)** contient un motif RGD impliqué dans la liaison aux intégrines. Cette région C-terminale ne joue pas de rôle dans la transactivation *in vitro* mais dans la transactivation *in vivo* (Campbell and Loret, 2009). Cette région est variable et certains isolats présentent une mutation ponctuelle qui crée un codon stop donnant lieu à une protéine tronquée de 86 résidus. La protéine Tat de 86 acides aminés est la forme la plus utilisée en recherche (Campbell and Loret, 2009). Cette région est impliquée dans les modifications de structure du cytosquelette ainsi que dans la signalisation et l'activation des cellules T (Johri et al., 2011).

1.3 Propriété autoadjuvante de Tat101

Des publications indiquent que Tat101 présente des activités pro-inflammatoires. En effet, Tat est capable d'induire la sécrétion de chimioattractants (Izmailova et al., 2003) et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α (Buonaguro et al., 1992). Tat est également capable de favoriser la maturation des monocytes en cellules dendritiques (Fanales-Belasio et al., 2002). Ces caractéristiques sont celles que possèdent un adjuvant, substance ou molécule déclenchant et favorisant la réponse immunitaire. Récemment, le groupe de Michel Léonetti au CEA de Saclay a soulevé la question de savoir si la protéine Tat pourrait être dotée d'une propriété adjuvante intrinsèque. Pour répondre à cette question, la protéine Tat de 101 acides aminés a été injectée chez la souris en absence d'adjuvant. Le déclenchement des réponses immunitaires anticorps et T ont été examinées (Kittiworakarn et al., 2006). Cette étude a permis de montrer que la protéine Tat est capable de déclencher des réponses anticorps de type IgG et des réponses T en absence d'adjuvant de manière spécifique et dose dépendante (Kittiworakarn et al., 2006). D'autre part, dans la même étude les auteurs ont voulu déterminer la ou les régions de Tat impliquées dans ce phénomène. Pour cela

différentes constructions de Tat comportant chacune des différentes régions ou incluant plusieurs régions ont été construites et injectées à des souris. Ce travail a montré que l'effet autoadjuvant de Tat est indépendant de la capacité transactivatrice de Tat et que les régions II avec ses cystéines et la région III sont responsables de la propriété adjuvante intrinsèque de Tat. Par ailleurs, cette étude a permis de montrer que l'oligomérisation de Tat par des ponts disulfures est requise pour l'effet autoadjuvant. En effet, la substitution des résidus cystéines par des résidus sérines a conduit à des formes non oligomériques incapables de déclencher des réponses anticorps (Kittiworakarn et al., 2006).

Dans un second temps, Michel Léonetti et son groupe ont montré que la capacité de Tat101 à déclencher une réponse anticorps dépend de sa capacité à lier les héparanes sulfate sur la région basique (Gadzinski et al., 2012; Léonetti et al., 2010). Les héparanes sulfates sont des protéoglycanes exprimés de manière ubiquitaire à la surface des cellules qui possèdent plusieurs rôles notamment dans la présentation antigénique et l'activation des cellules dendritique.

La propriété autoadjuvante de Tat101 à induire des IgGs chez la souris nous a particulièrement intéressés. En effet, le système d'immunisation *in vitro* que nous avons mis en place permet seulement la production d'anticorps de type IgM. Nous avons voulu savoir si Tat dans notre système d'immunisation *in vitro* pourrait induire des IgMs et/ou des IgGs.

En outre, il a été montré que le domaine ZZ, domaine de 14 kDa de la protéine A de *Staphylococcus aureus* capable de lier les fragments Fc des immunoglobulines de surface, augmente l'immunogénicité des molécules auxquelles il est fusionné (Léonetti et al., 1998). Nous avons donc produit une protéine de fusion entre le domaine ZZ et la protéine Tat (ZZTat101) et avons observé les effets de cette protéine dans notre système d'immunisation *in vitro*.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons voulu évaluer la capacité de la protéine de fusion, ZZTat101 (25 kDa) à déclencher une réponse anticorps IgM et/ou IgG dans le modèle d'immunisation *in vitro* que nous avons précédemment mis en place (paragraphe 2,3 Premier modèle d'étude Peptide N-terminal de la BoNT/A). Par ailleurs, différentes formes ou constructions mutantes de ZZTat101 ont été testées pour examiner le mécanisme d'action de ZZTat101 sur la production des anticorps.

1 Vérification de l'absence d'anticorps anti-Tat101 dans le plasma des pools de donneurs utilisé

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'absence d'anticorps anti-Tat101 dans le pool de plasma des donneurs utilisé pour être sûr que les signaux potentiellement observés suite à l'immunisation *in vitro* seraient bien dûs à notre stimulation et pas à des lymphocytes B mémoires déjà présents. Pour cela, le plasma d'un pool de cinq donneurs, dilué en série de 1/10 au 1/10⁶, a été incubé une nuit sur une plaque revêtue de Tat101 (1 µg/ml) ou de BSA (1 µg/ml) (rôle de contrôle négatif pour doser les signaux non spécifiques) en présence ou non de la protéine Tat101 en compétition (2 µg/ml). Des traceurs spécifiques des IgMs humaines et des IgGs humaines totales sont ajoutés pour détecter la présence d'IgMs et d'IgGs anti-Tat101 (paragraphe 8.4 Les dosages immunologiques des anticorps anti-Tat101, Matériels et Méthodes). Chaque dilution de plasma est testée en duplicat. Les signaux observés dans les graphes suivants sont les signaux obtenus en absence ou en présence du compétiteur Tat101.

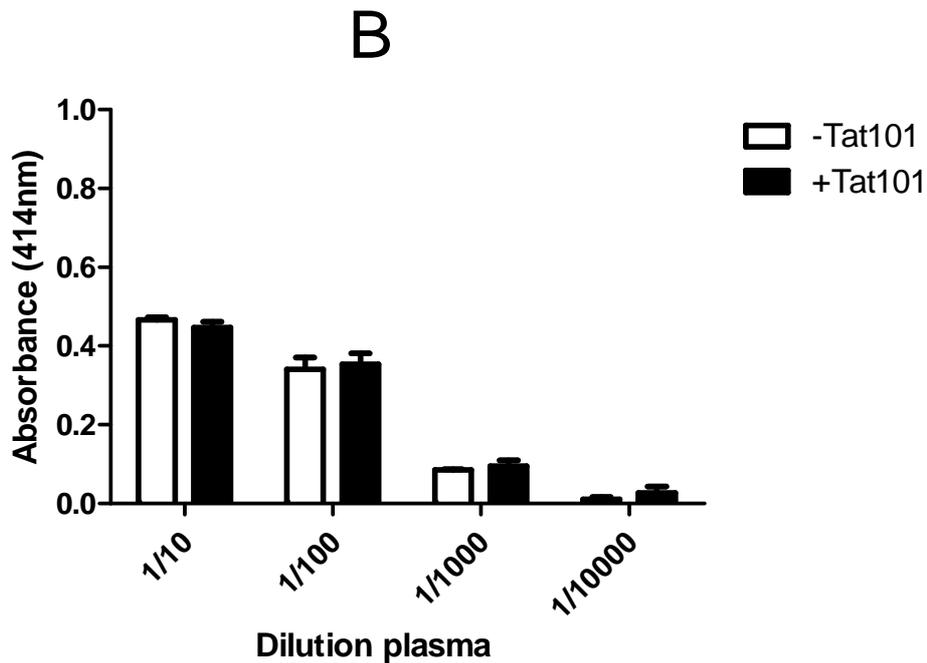
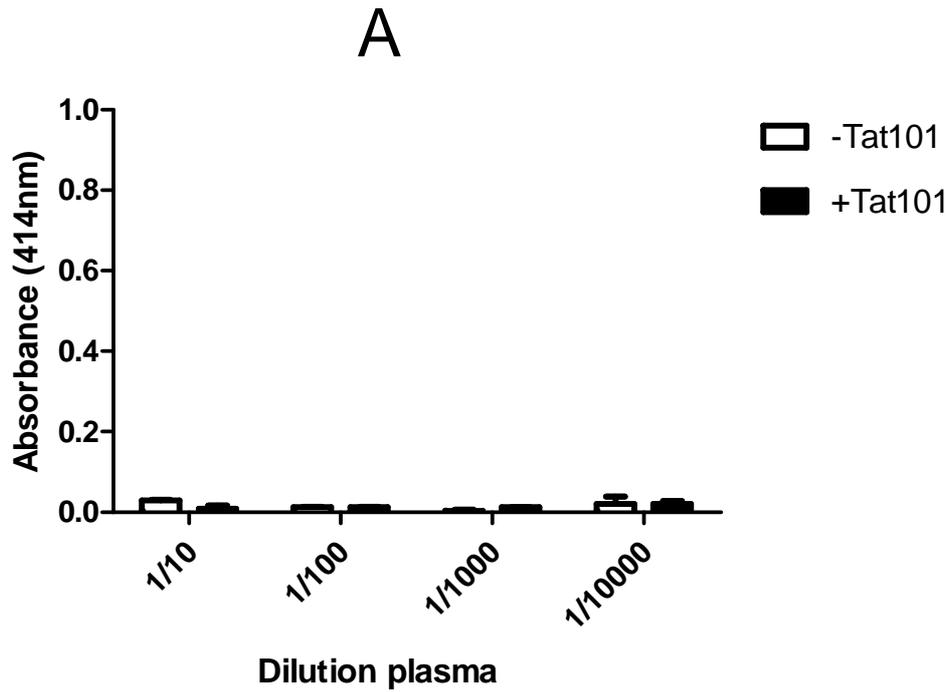


Figure 49. Dosage des IgGs (A) et IgMs (B) anti-Tat101 dans le plasma d'un pool de donneurs.

50 μ l de plasma dilué du 1/10 au 1/10⁶ d'un pool de cinq donneurs sont incubés une nuit à 4 C sur des plaques revêtues de la protéine Tat101 ou de BSA (plaque témoin). On ajoute dans les puits soit 50 μ l de tampon EIA soit 50 μ l de Tat à 2 μ g/ml diluée en tampon EIA. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs) et IgGh-G4 (détection IgGs) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm. Les signaux issus de la plaque témoin revêtue BSA ont été préalablement soustraits à ceux obtenus sur la plaque revêtue de Tat.

Nous pouvons constater sur la Figure 49 que quelque soit la dilution de plasma, il n'y a pas de différence significative entre les signaux obtenus en présence et en absence de compétiteur Tat101 à la fois pour les IgMs et pour les IgGs. Aux plus faibles dilutions (1/10 et 1/100) du plasma, des IgMs sont détectées mais qui ne sont pas spécifiques de Tat101 (pas d'effet de compétition avec Tat101). Comme les signaux résultants de liaisons non spécifiques à la BSA ont été soustraits, on peut penser que ces signaux proviennent de liaisons non spécifiques des IgMs avec Tat101. Nous obtenons les mêmes résultats en utilisant des plaques recouvertes avec les cinq peptides immunodominants de Tat (Turbant et al., 2009; Tähtinen et al., 1997): P1, P10, P15, P16 et P18 (résultats non présentés). Ces résultats illustrent l'absence de lymphocyte B sécréteurs d'anticorps dirigés contre Tat chez les donneurs utilisés. L'immunisation *in vitro* contre Tat et sa protéine de fusion ZZTat101 peut donc être entreprise.

2 Vérification de l'élimination des lymphocytes NK et de la pureté des lymphocytes B utilisés pour l'immunisation *in vitro*

Pour cette étude nous souhaitons évaluer la capacité de Tat et de la protéine de fusion ZZTat101 à déclencher une réponse anticorps sur trois populations cellulaires différentes: les PBMCs, les PBMCs sans NK et les lymphocytes B purifiés. En effet, la comparaison des résultats entre les PBMCs et PBMCs NK⁻ doit nous permettre d'évaluer l'effet réel des cellules NK qui sont décrites comme étant non favorables à l'immunisation *in vitro* (Borrebaeck et al., 1987, 1988; Thiele et al., 1983). Les lymphocytes B purifiés ont été utilisés pour évaluer la capacité de Tat à induire une réponse anticorps en absence de lymphocytes T et de cellules dendritiques.

L'élimination des NK par des billes magnétiques à partir de 1×10^8 PBMCs est effectuée comme précédemment. Après passage sur colonne, la fraction sans NK représente $8,5 \times 10^7$ cellules, soit 85 % des cellules de départ. La purification des lymphocytes B à partir de 5×10^8 PBMCs est effectuée à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD20 (paragraphe 4 Préparation des cellules Matériels et Méthodes). Après passage sur colonne et élution, la fraction contenant les lymphocytes B (fraction CD20+) est constituée d'environ $8,5 \times 10^6$ cellules. Si on considère que les lymphocytes B représentent 10 à 15 % des PBMCs, le taux de récupération des lymphocytes B est donc d'environ 20%.

Pour évaluer la pureté des trois types cellulaires, des marquages de cytométrie en flux utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre chaque type cellulaire ont été réalisés.

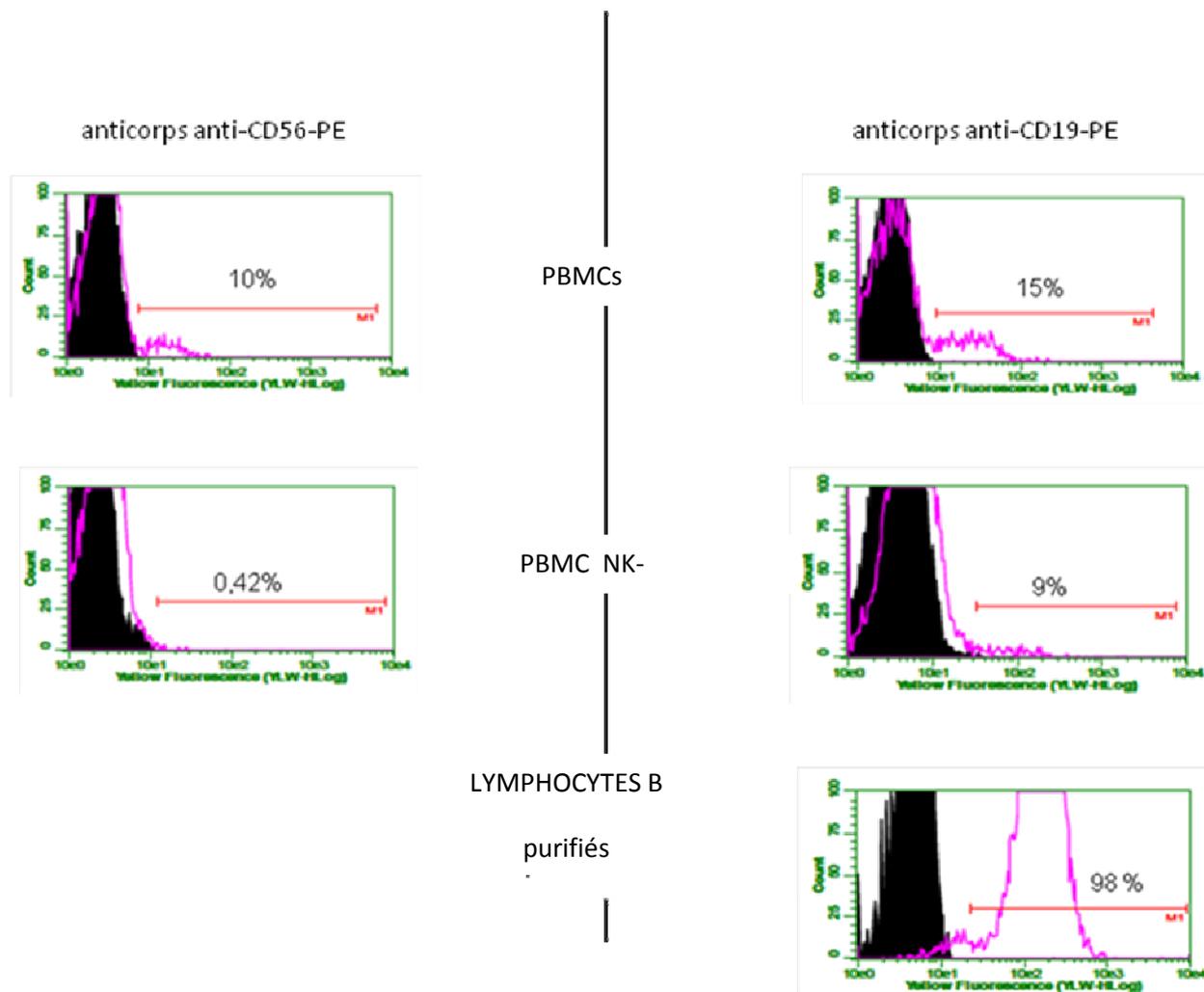


Figure 50. Graphes de cytométrie. Vérification de l'élimination des NK et de la pureté des lymphocytes B utilisés pour l'immunisation *in vitro*.

100 000 cellules sont incubées pendant 35 min à 4°C avec des anticorps spécifiques des marqueurs des cellules NK (CD56) et des lymphocytes B (CD19) et couplés avec des fluorophores.

Les PBMCs obtenus à partir d'un pool de plasma de 5 donneurs contiennent 10% de cellules NK et 15 % de lymphocytes B (Figure 50). Les résultats obtenus avec la fraction PBMCs NK⁻ montrent que le protocole utilisé pour éliminer les cellules NK est efficace. En effet, les cellules NK (CD56⁺) représentent environ 0,42% de la fraction cellulaire récupérée, donc 95% de ces cellules ont été éliminées. Après purification des lymphocytes B, 98% des cellules récupérées sont CD20⁺. L'enrichissement des lymphocytes B a donc été efficace, puisque le taux de lymphocyte B est passé de 15% à 98%. D'autre part, dans les PBMCs NK⁻, 9% des cellules sont des lymphocytes B, cellules indispensables pour l'immunisation *in vitro*.

3 Expérience préliminaire : vérification du système d'immunisation *in vitro* sur ZZTat101.

Cette étude préliminaire consiste à vérifier que les effets cumulés des deux composants de ZZTat101, à savoir, l'effet adjuvant (Tat) et l'augmentation de l'immunogénicité (ZZ) permettent l'obtention d'anticorps spécifiques de Tat101 sans autre stimulation.

Dans la première partie consacrée à la mise en place d'un protocole d'immunisation *in vitro*, le protocole « élimination des NK et activation par des cytokines » s'est révélé le plus efficace. Nous avons donc utilisé ce protocole avec ZZTat101 à différentes concentrations et des cellules PBMCs NK⁻. A J0, des PBMCs NK⁻ (1×10^6 dans 1 ml) sont déposés dans les puits d'une plaque 24 puits auquel on ajoute 10 µg, 1 µg ou 0.1 µg de l'antigène ZZTat101 (50 µl d'une solution à 200, 20 ou 2 µg/ml). En parallèle, des puits contrôles contenant des cellules sans antigène sont réalisés. A J3, une seconde stimulation est effectuée dans les mêmes conditions que la première.

A J7, les surnageants de culture des puits sont testés purs pour la présence d'IgMs et/ou d'IgGs anti-Tat selon un test immunométrique ELISA utilisant des plaques recouvertes avec les peptides immunodominants de Tat (Turbant et al., 2009; Tähtinen et al., 1997): P1, P10, P15, P16 et P18 (1 µg/ml) et des plaques recouvertes avec de la BSA (1 µg/ml). Des traceurs spécifiques des IgMs humaines et des IgGs humaines totales sont ajoutés pour détecter la présence d'IgMs et d'IgGs anti-Tat (paragraphe 8.4 Les dosages immunologiques des anticorps anti-Tat101, Matériels et Méthodes). Des puits témoins EIA (tampon de dilution des échantillons) sont utilisés pour évaluer le signal dû aux liaisons non spécifiques des traceurs.

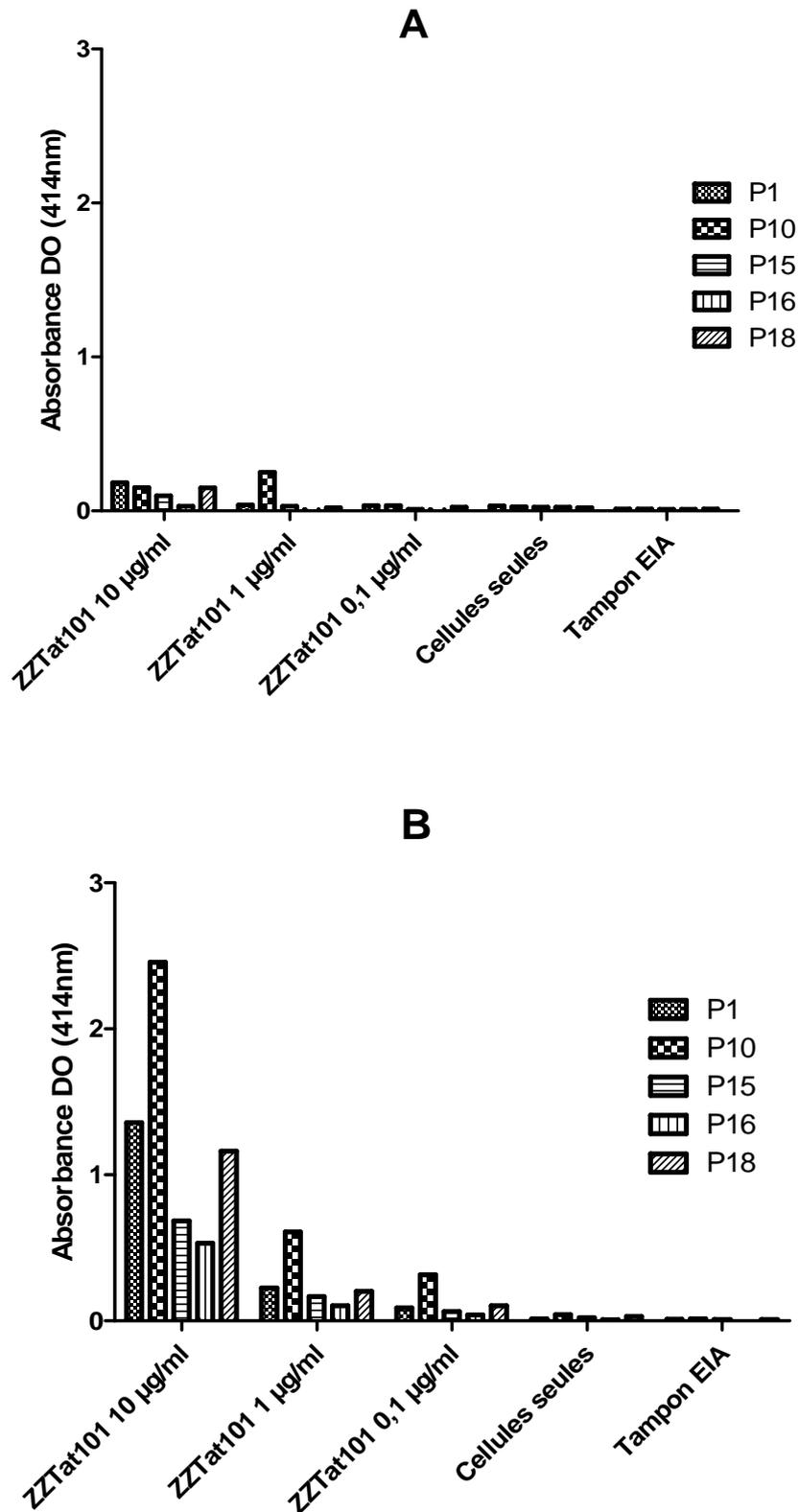


Figure 51. Dosage des IgGs (A) et des IgMs (B) anti-peptides de Tat dans les surnageants de culture à J7. 50µl de surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant à la fois des plaques de microtitration revêtues de peptides Tat (P1 à P18, peptides recouvrant la séquence complète de Tat101 :P1 (1-15), P10 (46-60), P15 (66-80), P16 (71-85), P18 (86-101)) ou de BSA (plaque témoin). Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs) et IgGh-G4 (détection IgGs) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm. Les signaux issus de la plaque témoin ont été préalablement soustraits à ceux obtenus sur la plaque revêtue des peptides Tat.

Après sept jours d'immunisation *in vitro*, nous détectons la présence d'IgMs anti-Tat101 dans les surnageants de culture correspondant aux différentes concentrations de ZZTat101 (Figure 51). Malgré l'hétérogénéité des résultats obtenus pour les différents peptides de Tat, on observe que les signaux correspondant aux IgMs augmentent avec la concentration de ZZTat utilisée pour l'immunisation *in vitro*. Par contre lors du dosage des IgGs nous n'obtenons des signaux que pour les deux concentrations les plus élevées en ZZTat101 et ces signaux sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus pour les IgMs. D'autres expériences devront être effectuées afin de confirmer la production d'IgGs spécifiques. Comme attendu aucun signal n'est obtenu pour les cellules seules.

Ces résultats démontrent que ZZTat101 seul possède tous les signaux nécessaires pour activer une réponse anticorps. Pour les expériences suivantes, nous utiliserons ZZTat à une concentration de 10 µg/ml. Compte-tenu de l'hétérogénéité des résultats obtenus avec les peptides de Tat, les prochains dosages en IgGs et IgMs seront effectués à l'aide de plaques revêtues de Tat101. La spécificité des signaux sera évaluée en réalisant ou non une compétition avec de la protéine Tat101.

4 Immunisation *in vitro* avec ZZTat, ZZ, Tat101 ou un mélange ZZ+Tat101

Pour comparer les effets de ZZTat101 avec les effets issus de chacun de ces composants (Tat ou ZZ) et de leur mélange (ZZ + Tat), ZZTat101 et chacun de ses composants ZZ et Tat ou un mélange ZZ + Tat ont été ajoutés sur trois types cellulaires : PBMCs, PBMCs NK⁺ et lymphocytes B purifiés en absence de cytokines. En parallèle, des puits contrôles contenant des cellules sans antigène sont réalisés. A J3, une restimulation est effectuée avec chacun des antigènes. A J7, les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés purs pour la présence d'IgMs et/ou d'IgGs anti-Tat selon un test immunométrique ELISA utilisant des plaques revêtues de Tat101 (1µg/ml) ou de BSA (1µg/ml) en employant ou non de la protéine Tat101 comme compétiteur. Des traceurs spécifiques des IgMs humaines et des IgGs humaines totales sont ajoutés pour détecter la présence d'IgMs et d'IgGs anti-Tat (paragraphe 8.4 Les dosages immunologiques des anticorps anti-Tat101 Matériels et Méthodes). Des puits témoins EIA (tampon de dilution des échantillons) sont utilisés pour évaluer le signal dû aux liaisons non spécifiques des traceurs.

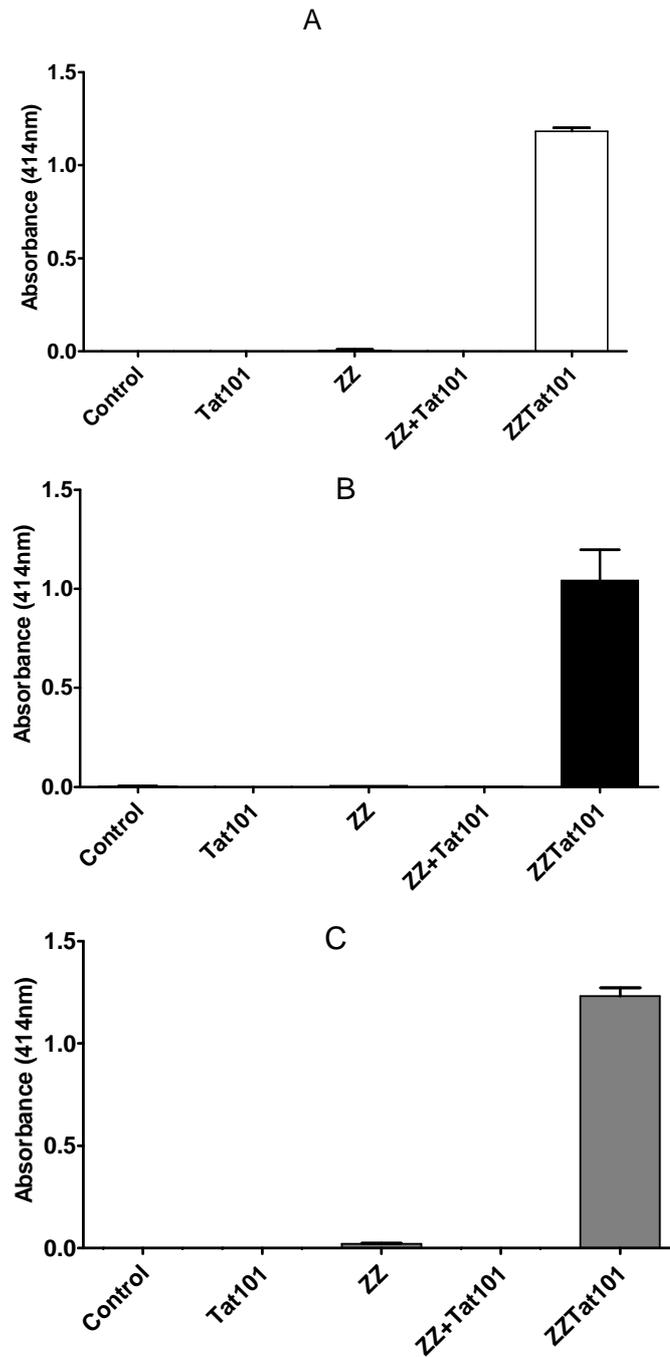


Figure 52. Dosage des IgMs spécifiques de Tat après stimulation par ZZTat, de chacun de ces composants ZZ et Tat.

(A) PBMCs NK ; (B) PBMCs ; (C) Lymphocytes B purifiés. 50µl de surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques revêtues de Tat ou de BSA (plaque témoin). La protéine Tat est utilisée à 2 µg/ml (50 µl) dans la moitié des puits pour chaque condition de stimulation. Les traceurs, IgMh puis SAL-G4 (détection IgMs) et IgGh-G4 (détection IgGs) sont ajoutés. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm. Les signaux reportés sur les graphes correspondent aux signaux spécifiques (signaux avec Tat comme compétiteur soustraits des signaux sans Tat).

N'ayant pas obtenu de signaux lors du test de détection des IgGs spécifiques, la Figure 52 ne présente que les résultats concernant le dosage des IgMs spécifiques. On constate qu'après sept jours d'immunisation, la stimulation par ZZTat101 induit la production d'IgMs spécifiques quel que soit le type cellulaire utilisé. On remarque également que seule la protéine de fusion ZZTat101 est capable de déclencher la production d'IgMs spécifiques de Tat. Ceci démontre que l'induction de la réponse immunitaire spécifique n'est possible qu'en présence des deux partenaires liés de façon covalente.

D'autre part, il est surprenant que les signaux IgMs obtenus avec ZZTat101 soient équivalents pour les trois types cellulaires (PBMCs, PBMCs NK⁻ et lymphocytes B purifiés). En effet dans la littérature, il est décrit que la présence de cellules cytotoxiques NK n'est pas favorable à l'immunisation *in vitro* (Borrebaeck et al., 1987, 1988; Thiele et al., 1983). Cela semble également indiquer que ZZTat101 permet d'apporter les signaux nécessaires pour activer les lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps en absence de cellules dendritiques et de lymphocytes T. Ce résultat nous laisse penser que ZZTat pourrait être un antigène T-indépendant.

Des publications du groupe de Michel Léonetti montrent que chez la souris ZZTat101 est un antigène T-dépendant ((Gadzinski et al., 2012; Léonetti et al., 2010). On pourrait imaginer que ZZTat101 via son interaction avec les Igs de surface (rôle de ZZ) et son interaction avec les héparanes sulfates (rôle de Tat) est capable d'agrèger les BCR déclenchant le « capping » des BCR et l'activation des lymphocytes B comme le font les antigènes T-indépendant. D'autre part, Tat déclenchant l'effet autoadjuvant par sa capacité à oligomériser (Kittiworakarn et al. 2006), on pourrait imaginer plusieurs molécules de ZZTat101 s'oligomériser et activer les lymphocytes B.

5 Détermination de la région de ZZTat impliqué dans la réponse humorale *in vitro*

5.1 Rôle de la liaison avec les héparanes sulfates

Tat est un ligand des héparanes sulfates (Albini et al., 1996a) et cette liaison est impliquée dans le déclenchement de la réponse anticorps et T chez la souris (Gadzinski et al., 2012; Léonetti et al., 2010).

Afin d'observer si cette capacité de liaison intervient également dans le déclenchement de la réponse humorale *in vitro*, nous avons comparé l'effet de ZZTat101 et de ZZTat101Ø, dérivé acétylé de ZZTat qui a perdu la capacité de lier les héparanes sulfates. ZZTat101 et ZZTat101Ø ont été ajoutés sur des PBMCs NK⁻ et des lymphocytes B purifiés. A J3, une deuxième stimulation est effectuée avec chacun des antigènes et à J7, les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés purs pour rechercher la présence d'IgMs et/ou d'IgGs anti-Tat. Cette expérience a été répétée deux fois consécutivement avec deux lots de sang différents.

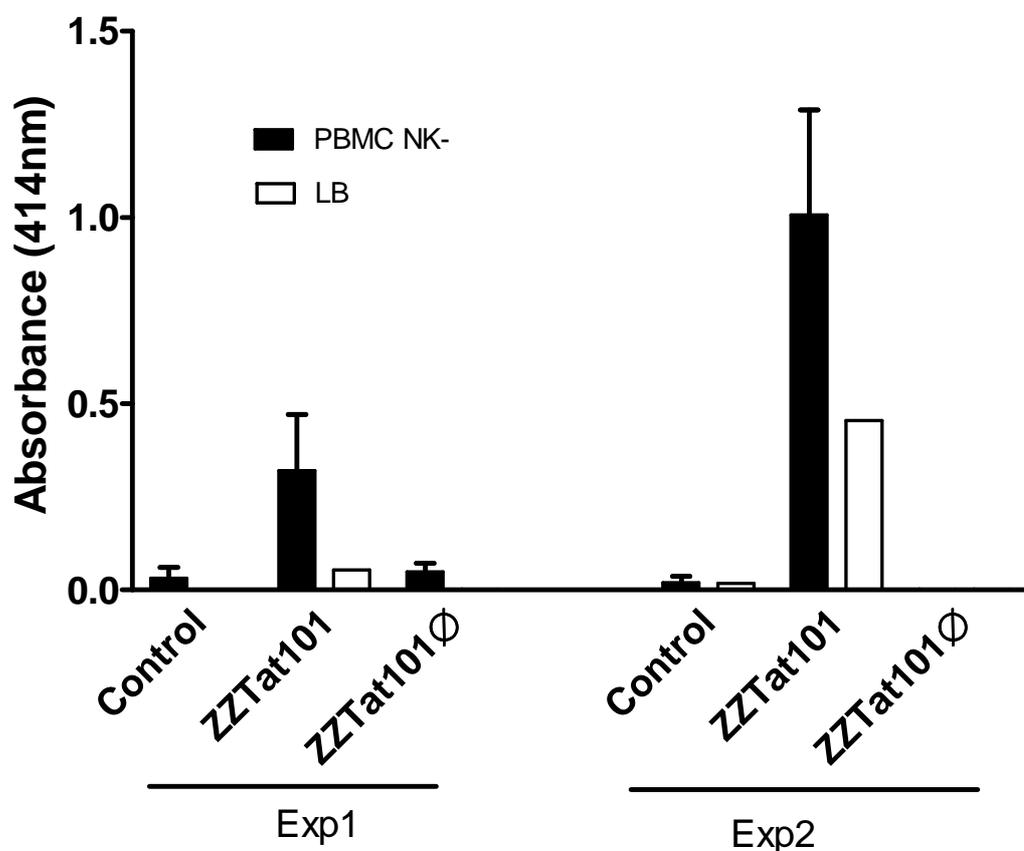


Figure 53. Dosage des IgMs après stimulation par ZZTat101 et ZZTat101Ø sur deux expériences indépendantes.

50µl de surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques revêtues de Tat ou de BSA (plaque témoin). La protéine Tat est utilisée à 2 µg/ml (50 µl) dans la moitié des puits pour chaque condition de stimulation. Le traceur, IgMh puis SAL-G4 est ajouté. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm. Les signaux reportés sur les graphes correspondent aux signaux spécifiques (signaux avec Tat comme compétiteur soustraits des signaux sans Tat).

Comme précédemment aucun signal n'a été obtenu lors du dosage des IgGs. On observe sur la Figure 53 que les PBMCs NK⁺ et les lymphocytes B purifiés incubés avec ZZTat101Ø perdent leur capacité à induire des IgMs. Ce résultat montre que la capacité de Tat à lier les héparanes sulfates est requise pour induire la réponse anticorps.

On note également que contrairement à l'expérience précédente les signaux obtenus avec une stimulation par ZZTat101 sont plus élevés avec les PBMCs NK⁺ qu'avec les lymphocytes B purifiés. On observe également une variation entre les résultats obtenus avec les deux lots de sang. Cette variabilité dans nos résultats semble montrer que l'efficacité de la stimulation dépend des donneurs de sang.

5.2 Rôle des cystéines

Il a été décrit que la région II de Tat contenant les 7 cystéines conservées était responsable de l'oligomérisation et de la propriété autoadjuvante de Tat chez la souris (Kittiworakarn et al., 2006). Afin de déterminer si cette région joue le même rôle lors de l'immunisation *in vitro*, nous avons comparé l'effet de ZZTat101, de ZZTat22-57, et de ZZTat22-57_{C(22-37)S}. ZZTat22-57 correspond aux régions II (riche en cystéines) III et IV. ZZTat22-57_{C(22-37)S} correspond à ZZTat22-57 dont les 7 cystéines ont été remplacées par des sérines.

ZZTat101, ZZTat22-57 et ZZTat22-57_{C(22-37)S} ont été ajoutés sur des PBMCs NK⁺. A J3, une deuxième stimulation est effectuée avec chacun des antigènes et à J7, les surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés purs pour évaluer la présence d'IgMs et/ou d'IgGs anti-Tat.

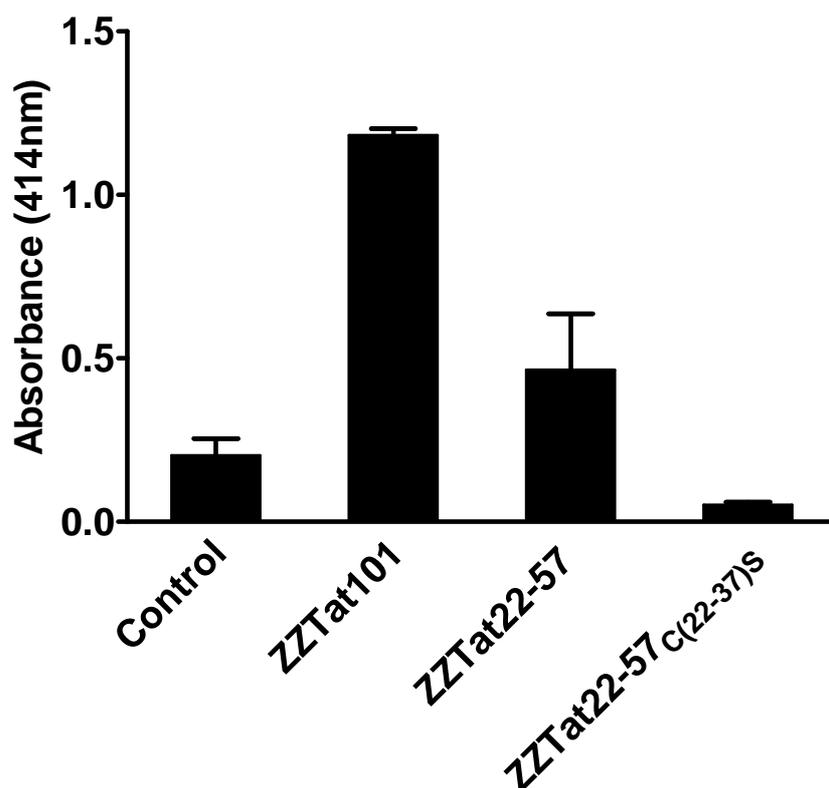


Figure 54. Dosage des IgMs après stimulation par ZZTat101 et des formes ZZTat22-57, ZZTat22-57_{C22-37}S.
 50µl de surnageants de culture des puits d'immunisation *in vitro* sont testés à l'aide d'un immunodosage utilisant des plaques revêtues de Tat ou de BSA (plaque témoin). La protéine Tat est utilisée à 2 µg/ml (50 µl) dans la moitié des puits pour chaque condition de stimulation. Le traceur, IgMh puis SAL-G4 est ajouté. L'activité enzymatique est ensuite révélée par addition du réactif d'Ellman puis mesure de la densité optique à 414 nm. Les signaux reportés sur les graphes correspondent aux signaux spécifiques (signaux avec Tat comme compétiteur soustraits des signaux sans Tat).

Comme précédemment, nous n'avons pas mesuré de signaux pour les IgGs donc seuls les résultats obtenus avec le dosage des IgMs sont représentés (Figure 54). Tat 22-57 induit une réponse humorale qui aboutit à la production d'IgMs anti-Tat ce qui signifie que ce domaine de Tat101 contient l'ensemble des éléments permettant une immunisation *in vitro*. On note également que les signaux obtenus avec Tat 22-57 sont plus faibles que ceux obtenus avec Tat 101. Cela pourrait s'expliquer au moins en partie par le format du dosage. En effet dans un cas l'immunisation conduit à la production d'anticorps dirigés contre Tat101 et dans l'autre contre le domaine 22-57 de Tat101. Ainsi sur la plaque recouverte de Tat101 la quantité d'anticorps pouvant se fixer simultanément pourrait être plus importante pour les surnageants de culture issus de l'immunisation avec Tat101 ce qui conduirait à un signal plus élevé.

La mutation des cystéines en sérines au niveau de Tat22-57 conduit à une baisse très importante des signaux qui apparaissent même inférieurs à ceux obtenus avec les cellules

seules (contrôle). Les 7 cystéines jouent donc un rôle majeur dans l'induction de la production des IgMs spécifiques par les lymphocytes B. Il faut d'ailleurs observer que les signaux obtenus avec les cellules seules sont particulièrement élevés pour un contrôle expérimental négatif.

6 Production d'anticorps anti-Tat101 par immortalisation avec un partenaire cellulaire HM

Notre but premier était d'obtenir des anticorps anti-Tat101 et donc d'immortaliser les lymphocytes B producteurs des ces anticorps. Nos résultats obtenus avec l'immortalisation via l'EBV ont montré l'instabilité des clones et l'impossibilité d'aboutir à une production d'anticorps pérenne. Nous avons donc décidé de fusionner les lymphocytes B, stimulés *in vitro*, directement avec l'hétéromylome murin/humain (HM). La fusion est réalisée avec les cellules d'une plaque de 24 puits après immunisation *in vitro* (tous positifs pour la production d'IgMs spécifiques) et l'hétéromyélome HM. Nous avons obtenus trois hybridomes. Le faible nombre d'hybridomes obtenu résulte probablement du faible nombre de cellules présentes et aussi de leur état. En effet, seulement environ $3,5 \times 10^6$ cellules ont été récupérées après immunisation *in vitro* alors que 24×10^6 cellules avaient déposées à l'origine. Cette évolution du nombre de cellule reflète une forte mortalité cellulaire (plus de 85%) en 7 jours. Afin de disposer d'un nombre plus important de cellules, il faudrait procéder à l'immunisation de plusieurs plaques simultanément. Malheureusement, la faible quantité de protéine ZZTat101 disponible n'a pas permis d'effectuer une expérience plus large permettant l'obtention d'un nombre plus élevé d'hybridomes.

Sur les trois hybridomes obtenus, après de nombreux tests de criblage, aucun ne s'est révélé capable de sécréter des anticorps IgMs dirigés contre Tat101.

CONCLUSIONS ET **PERSPECTIVES**

Au cours de cette étude nous nous sommes intéressés à une protéine de fusion, constituée de Tat qui est le transactivateur transcriptionnel du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et du domaine ZZ capable de lier les fragments Fc des immunoglobulines de surface. Le choix de ces deux protéines découle des propriétés intéressantes qu'elles semblent présenter pour l'immunisation *in vitro* :

- Tat est capable de déclencher des réponses anticorps de type IgG et des réponses T en absence d'adjuvant de manière spécifique et dose-dépendante
- le domaine ZZ de la protéine A de *Staphylococcus aureus* augmente l'immunogénicité des molécules auxquelles il est fusionné.

Dans un premier temps, le dosage sous un format immunoenzymatique spécifique de la protéine Tat, nous a permis de détecter l'absence d'IgMs et d'IgGs spécifiques de Tat dans le plasma des donneurs de sang utilisé. L'absence d'anticorps spécifiquement dirigés contre Tat est le reflet de l'absence de lymphocytes B sécréteurs d'anticorps contre Tat. Différents marquages réalisés en cytométrie de flux nous ont permis de vérifier la qualité des trois fractions cellulaires utilisés pour l'immunisation *in vitro*, PBMCs, PBMCs NK⁻ et lymphocytes B purifiés. Une première expérience utilisant la nouvelle molécule cible, ZZTat101 dans le protocole d'immunisation *in vitro* avec des PBMCs NK⁻ a permis de montrer que ZZTat est capable d'apporter les signaux nécessaires pour déclencher une réponse anticorps IgMs spécifique de Tat101. Malheureusement aucune production d'IgGs n'a été détectée dans cette expérience. Il faut cependant noter que cette expérience a été réalisée plusieurs fois a permis d'observer parfois des faibles signaux pour les IgGs (environ 5% des expériences). Ces résultats aléatoires montrent que le système d'immunisation *in vitro* pourrait une fois optimisé permettre la sécrétion d'IgGs. Des molécules de costimulation CD40 et des cytokines IL-21 responsables de la commutation isotypique pourraient par exemple être ajoutées dans les expériences (Aversa et al., 1994; Avery et al., 2008; Pène et al., 2004). D'autres expériences ont permis de montrer que ZZTat101 est capable d'initier une réponse anticorps IgMs spécifiques de Tat de manière équivalente sur des PBMCs totaux, des PBMCs NK⁻ et des lymphocytes B purifiés. Les résultats obtenus avec les lymphocytes B purifiés montrent que l'utilisation de ZZTat101 permet une induction de la réponse humorale en absence de cellules dendritiques et de cytokines requises dans les autres modèles d'immunisations *in vitro*. Cela suggère un mécanisme d'action de ZZTat101 de type antigène T-indépendant.

Dans un second temps, le mécanisme d'action de ZZTat101 sur la réponse humorale a été étudié. Nous avons montré que la réponse humorale ne peut être initiée que lorsque ZZ est lié covalamment à Tat101. En effet la protéine ZZ seule, la protéine Tat101 seule ou le mélange ZZ+Tat101 ne permettent pas d'induire la production d'anticorps spécifiques. Différentes constructions synthétisées au laboratoire ont permis de mieux cerner le domaine de Tat impliqué dans déclenchement de la réponse humorale. En effet le domaine 22-57 comportant la région II riche en cystéines, la région III core et la région IV, riche en acides aminés basiques, permet à lui seul le déclenchement de la réponse en IgMs spécifiques. D'autres expériences utilisant ZZTat22-57_{C(22-37)S}, mutant de ZZTat22-57 incluant la substitution des cystéines par des sérines, ont permis de confirmer que les 7 cystéines jouent un rôle primordial dans le déclenchement de la réponse humorale dans la région 22-57. Enfin nous avons également montré que la capacité de liaison de Tat aux héparanes sulfates de Tat est nécessaire pour déclencher une réponse humorale. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà décrits par l'équipe de Michel Léonetti dans la littérature dans des études réalisées *in vivo* chez la souris.

Des expériences de fusion entre les cellules présentes dans les puits d'immunisation *in vitro* sécréteurs d'IgMs anti-Tat et l'hétéromyélome murin/humain HM ont été réalisées. Malheureusement, aucun des trois hybridomes obtenus n'a conservé la capacité à sécréter des IgMs anti-Tat101.

Afin de vérifier que la protéine de fusion ZZTat101 est un outil présentant des qualités plus larges pour induire la production d'anticorps *in vitro* contre d'autres antigènes, il faudra réaliser des immunisations avec de nouvelles protéines de fusion du type ZZTat101-antigène ou ZZTat22-57-antigène.

ARTICLE

**Production of human antibodies by
"in vitro" immunization using a fusion protein containing
the transcriptional transactivator of HIV-1.**

Soumis le 30 Octobre 2012

dans

Journal of Immunological Methods

Production of human antibodies by "in vitro" immunization using a fusion protein containing the transcriptional transactivator of HIV-1.

Ait Mebarek M., Wijkhuisen, A., Adel-Patient K., Lamourette P., Léonetti M., Volland H.,

Abstract

Antigen-specific activation of human B cells represents a key step for the production of monoclonal antibodies. Since thirty years, several approaches were developed in order to improve the process of lymphocyte activation "in vitro". In the present study, we investigated whether the transcriptional transactivator (Tat) of the Human Immunodeficiency Virus, which possesses numerous biological activities, is able to trigger antibody secretion when incubated with human PBMCs. In fact no such effect was observed when using Tat as a free protein. However, we found a significant IgM antibody production when Tat is previously fused to a double domain, called ZZ, derived from protein A of *Staphylococcus aureus*. The effect is also observed when the fusion protein, called ZZTat101, is incubated with purified B cells indicating that the phenomenon does not require T-cell help. Antibody secretion is observed in absence of cytokines that are usually used during the *in vitro* immunization experiments indicating that ZZTat101 provides the signals required for the initiation of the immune response. Antibody secretion is observed using a ZZTat mutant, containing only the Tat residues 22 to 57, called ZZTat22-57, indicating that this region is sufficient to initiate the immune response. In contrast, the effect is not found with a ZZTat22-57 mutant devoid of the seven Tat cysteins located between residues 22 to 37, demonstrating that these residues play a crucial role in the phenomenon., Our results pave the way to the development of a new *in vitro* immunization method based on antigens associated with ZZTat.

Introduction

Initially used for detection and diagnosis purposes, monoclonal antibodies have rapidly become important therapeutic tools and are involved in numerous medical fields such as cancerology, organs transplantation, auto-immune diseases. Among therapeutic proteins, monoclonal antibodies due to their affinity and specificity characteristics take the leadership with more than 30 monoclonal antibodies currently approved for clinical applications. The first generation of therapeutic antibodies appears in the late 1990s. Starting from murine antibodies, chimeric or humanized antibodies were prepared in order to overcome limitations induced by xenogenic antibodies: lack of effector functions, short serum half-life and immunogenic reactions which sometimes could cause anaphylactic reactions. Nowadays a new generation of full human monoclonal antibodies appeared thanks to several approaches (Steinitz, 2009), mainly the phage display method (Marks et al., 1991; McCafferty et al., 1990) or transgenic mice with human immunoglobulin genes (Jakobovits et al., 1993). On the other hand, “in vitro” strategies were described involving human B lymphocytes further immortalized either by fusion with either human or heteromyeloma (Kozbor et al., 1983), (Adekar et al., 2008a; Dessain et al., 2004) or using the Epstein Barr (EBV) virus (Kozbor et al., 1982b; Traggiai et al., 2004). Human B lymphocytes could be obtained from transgenic mice or human donors (infected or vaccinated). However, transgenic mice technology is quite expensive and time consuming, thus affordable by only few research groups. It is also worth noting that, for many antigens, specific human B lymphocytes from sensitized donors are not available, thus limiting the number of human monoclonal antibody produced by this strategy. To overcome this problem, *in vitro* immunization was used by different groups to produce human monoclonal antibodies against several targets: proteins, bacteria, cells (Chin et al., 1994; Ichikawa et al., 1999; Shim et al., 2001). *In vitro* stimulation of naïve lymphocytes by an antigen in presence of cytokines triggers an immune response (Borrebaeck et al., 1988). Nevertheless, some authors argued against this technique because of its poor yield and reproducibility (Brams et al., 1993a, b; Uthoff and Böldicke, 1993). We thus decided to check if “in vitro” immunization process involving Tat protein, the transcriptional transactivator of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) could lead to improved yield.

The Tat protein was selected due to several biological effects linked to immune response (Albini et al., 1998), (Buonaguro et al., 1992), (Fanales-Belasio et al., 2002), (Izmailova et al., 2003), further suggesting that Tat may contribute to the triggering of the immune response. Indeed Tat was shown to raise an immune response in the absence of adjuvant (Gadzinski et al., 2012; Kittiworakarn et al., 2006) in mouse and this property could be used for human vaccination protocol (Ensoli et al., 2009; Ferrantelli et al., 2011). Tat can also bind heparan sulfate proteoglycans, thus increasing the ability of an antigen to stimulate T cells (Léonetti et al., 2010).

Aiming to transfer the ability of Tat to raise a humoral immune response to other antigens, a recombinant protein named ZZTat101 (26 kDa) and involving Tat and the Ig-binding double domain ZZ (11 kDa) of the protein A from *Staphylococcus aureus* was designed. It has been shown that antigens fused to protein A or to the double Ig-binding domain of this protein increase immunogenicity under *in vivo* conditions (Léonetti et al., 1998).

The present study investigated whether Tat or the ZZTat101 fusion protein can trigger an *in vitro* immune response in human cells and also tried to better characterize the features of the protein required for this induction.

Materials and methods

PBMC purification

Blood (about 250 ml) from healthy donors (negative for HIV-1/2, HTLV-I/II, HCV, HBsAg) were obtained from EFS Rungis (Rungis, France). Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by two successive density-gradient centrifugations at 1200 g for 30 min (Histopaque 1077, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Plasma from the donors were isolated and stored at -80°C for serological analysis. The cells were washed in PBS (PBS: Phosphate Buffer Saline: 10 mM potassium phosphate pH 7.4 and 150 mM sodium chloride) supplemented with 2mM EDTA .

Cell separation

Isolation of B lymphocytes

B lymphocytes were isolated from PBMC using MACS microbeads according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly, 5×10^8 PBMC were washed in MACS buffer (PBS supplemented with 2 mM EDTA and 0,5% BSA) at 4°C. 150 μ l anti-CD20 microbeads were added (5 μ l anti-CD20 microbeads per 10^7 cells) and the cells were incubated for 15 min at 4°C. Then, the cells were rinsed, centrifuged, and passed through magnetic columns. Enrichment was assessed by flow cytometry analysis (Guava, Millipore, Billerica, MA) using an anti-human CD19-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Depletion of Natural Killer cells

Natural killer (NK) were depleted from PBMC using MACS microbeads according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly, 1×10^8 PBMC were washed in MACS buffer (PBS supplemented with 2 mM EDTA and 0,5% BSA) at 4°C. 800 μ l anti-CD56 microbeads were added (80 μ l anti-CD20 microbeads per 10^7 cells) and the cells were incubated for 15 min at 4°C. Then, the cells were rinsed, centrifuged, and passed through magnetic columns. Depletion was assessed by flow cytometry analysis (Guava, Millipore, Billerica, MA) using an anti-human CD56-PE (BD Biosciences, United States).

The PBMC, purified B lymphocytes and NK-depleted PBMCs were cultured at a 1×10^6 cells/ml density of in RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (50 UI/ml), streptomycin (50 μ g/ml), 50 μ M β -mercapthoéthanol and 10% heat-inactivated fetal bovine serum.

Antigen preparation

Chemical synthesis of Tat101

Synthesis of Tat101 was performed using the Fmoc/*tert*-butyl strategy on an Applied Biosystems 433A synthesizer. The chemical procedure used 0.1 mmol of Fmoc-Asp(OtBu)-PAL-PEG-PS resin, a 10-fold excess of each amino acid, dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole, and diisopropylethylamine/*N*-methyl pyrrolidone. Incorporation of Gln54 was performed twice manually. Cleavage and deprotection were achieved using a mixture of trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/water (9.5/0.25/0.25, v/v/v). The crude material was precipitated twice with cold *tert*-butyl methyl ether and subsequently dissolved in 15% aqueous acid. The crude protein was then purified by HPLC on a Jupiter C4 column. The S(tBu) moieties were then removed from the cysteines using degassed 0.1 M phosphate buffer, pH 8.5, containing 6 M urea and dithiothreitol (50 eq/Cys). After completion of the Cys deprotection, the mixture was acidified to pH 2.2 and purified by HPLC on a C4 column, and the fully reduced Tat proteins were kept freeze-dried at -20 °C.

The synthesized protein was characterized by mass spectrometry and amino acid analysis.

Genetic construction of ZZ fusion proteins.

ZZ

The pCP vector (Drevet et al., Protein Expression Purif. 1997, 10, 293-300) is coding for the ZZ protein.

ZZTat101

ZZTat101 was designed using a synthetic sequence encoding Tat101 (consensus sequence as determined in Kittiworakarn et al., J.B.C. 2006, 281 3105-3115):

GGTACCCATGGAGCCAGTAGATCCGAAACTGGAGCCCTGGAAGCATCCAG

GTAGCCAGCCTAAGACTGCTTGTAACAACCTGCTATTGTAAAAAGTGTTGC

TTTCACTGCCAGGTTTGTTCACCAAAAAAGGCCTGGGCATCTCCTATGG

CCGCAAGAAGCGCCGTCAGCGCCGCGTGCTCCGCAGGACAGCCAGACTC

ACCAGGTTTCTCTGTCCAAGCAGCCGGCATCCCAGCCCCGCGGTGACCCG

ACTGGCCCCGAAGGAATCCAAGAAGAAGGTGGAGCGCGAGACCGAGACTGA

TCCGGTGGATTAGGATCC (*KpnI* and *BamHI* sequences are in italics) and ligated in a *KpnI/BamHI*-opened pCP vector (Drevet et al., Protein Expression Purif. 1997, 10, 293-300) coding for ZZ protein.

ZZTat variants

ZZTat22-57 represents the 22-57 region of Tat101 fused to ZZ.

GGTACCCAGCAATAATTCCTATAGCAAAAAAAGCAGCTTTCATAGCCAGG

TGAGCTTTACCAAAAAAGGCCTGGGCATTAGCTATGGCCGTAAAAAACGT

CGTCAGCGTCGTCGTTAAGGATCC (*KpnI* and *BamHI* sequences are in italics) ligated in a *KpnI/BamHI*-opened pCP vector (Drevet et al., Protein Expression Purif. 1997, 10, 293-300) coding for ZZ protein.

For both ZZTat101 and ZZTat22-57, a variant including a mutation of the 7 cysteine residues into serine, named ZZTat101_{C(22-37)S} ZZTat22-57_{C(22-37)S} was designed.

ZZTat101Ø

ZZTat101Ø corresponds to an acetylated ZZTat101 molecule.

Briefly, ZZTat101 was acetylated with an 81 times excess of acetic anhydride as compared to the lysine content of the fusion protein. 0,525 mg of ZZTat101 was resuspended in 0,4 ml of Phosphate buffer pH 7,5. 4 µL of acetic anhydride were added. After an incubation of 1 h at room temperature under stirring the reaction was stopped by adding 0,1mL Glycine 0,1M in Phosphate buffer pH 7,5. Then the mixture was desalted using a PD10 column and acetic acid 0,5M pH 3,4 as eluent. The fusion protein was kept lyophilized at -20°C.

Fusion protein production and purification

All ZZ fused protein used in this study were produced in BL21(DE3)plysS and purified on IgG sepharose column (column IgG sepharose 6Fast flow #17-0969-02 Amersham).

Flow cytometry analysis

On day 0 and 7 flow cytometry analysis was achieved to analyze different cell membrane markers and to evaluate the cells purity (day 0) and differentiation (day 7). All flow cytometry staining procedures were performed at 4°C in PBS supplemented with 1% BSA. 10^5 of each subcell population (PBMC, purified B lymphocytes and NK-depleted PBMC on day 0 and only purified B lymphocytes and NK-depleted PBMC on day 7) were stained 35 min with anti-human CD19-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and with anti-human CD56, anti-human CD40-FITC, anti-human CD80-FITC, anti-human CD86-FITC and anti-human HLA-DR-FITC (all from BD Biosciences, United States) before washing. Then cells were fixed at room temperature with 4 % paraformaldehyde for 10 min and washed before FACS analysis using a Guava three colors flow cytometer.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)/Plate preparation

Coating was performed onto 96-well microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) with Tat peptides P1 (1-15), P10 (46-60), P15 (66-80), P16 (71-85), P18 (86-101), Tat101 and BSA at 0,1 µg/well in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7,4) at room temperature over night. Plates were washed once with washing buffer (0.01 M potassium phosphate pH 7.4 containing 0.05% Tween 20) and saturated with enzyme immunoassay buffer (EIA) (0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing 0.15 M NaCl, 0.1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide) and stored at 4°C. Before use the plates were washed three times with washing buffer.

Conjugate antibody preparation

The monoclonal antibodies (mAbs) were linked to Acetylcholine Esterase (AChE) using a protocol previously described. Briefly, F(ab')₂ fragments were obtained from purified antibodies by treatment with pepsin in acidic medium. Fab' fragments were obtained from F(ab')₂ by reduction in the presence of 0.02 M 2-mercaptoethylamine and subsequently coupled to AChE using the heterobifunctional reagent N-Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexane-1-Carboxylate (SMCC) as previously described (Grassi et al., 1989).

Measurement of acetylcholinesterase activity

Acetylcholinesterase (AChE) activity was measured by the method of Ellman (Ellman et al., 1961). Ellman's medium comprises a mixture of $7.5 \cdot 10^{-4}$ M acetylthiocholine iodide (enzyme substrate) and $2.5 \cdot 10^{-4}$ M 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (reagent for thiol colorimetric measurement) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Enzymatic activity was expressed in Ellman Units (EU). One EU is defined as the amount of enzyme producing an absorbance increase of one unit during 1 min in 1 ml of medium, for an optical path length of 1 cm and corresponds to about 8 ng of enzyme.

Anti-Tat antibodies detection

The presence of anti-Tat antibodies was analysed in plasma of blood donors and in cell culture supernatants of *in vitro* immunization. 50 µL of serial dilutions of plasma or supernatant of *in vitro* immunization wells were transferred into microtiter plates coated with Tat, Tat peptides and BSA with 50µl of EIA buffer or 50 µl of Tat101 (2µg/ml in EIA buffer) to assess the specificity of signals. After an overnight incubation at 4°C, plates were washed three times with washing buffer before revealing the presence of anti-Tat antibodies.

To detect anti-Tat IgMs, 50 µl of rabbit anti-human IgM (1µg/ml, Jackson Immunoresearch Laboratories) were added to the plates and incubated over night at 4°C. After washing, 50 µl at 2,5 UE/ml of a AChE-labeled mouse anti-rabbit Immunoglobulins was added during 4h at room temperature.

To detect anti-Tat IgGs, 50 µl of AChE-labeled mouse anti-human IgG (monoclonal antibody from Meridian Life Science, Cincinnati, United States) (2,5 UE/ml) were added and incubated over night at 4°C. After three washing cycles, 200 ml of Ellman's reagent was added and the absorbance was measured at 414 nm after 1 h and 2h.

In vitro immunization

The *in vitro* immunization of PBMC, NK-depleted PBMC and purified B lymphocytes was performed in 24-well plates at 1.10^6 cells per well in a final volume of 1 ml medium (RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (50 UI/ml), streptomycin (50 µg/ml), 50 µM β-mercapthoéthanol and 10% heat-inactivated fetal bovine serum). The different cell populations were incubated *in vitro* in the presence or absence of ZZTat101, ZZ, Tat101, and a mixture containing ZZ+Tat101, respectively. 50µl of a 200 µg/ml solution of each Ag was incubated by well. At day 3, 50µl of each Ag was added to the wells, except for the control wells. On day 7, the supernatants of the wells were tested by the ELISA test to detect the specific antibodies produced by the cells. In a second series of experiments, cells were incubated *in vitro* with 10 µg/well of different fusion proteins related to ZZTat101, i.e.

ZZTat101Ø, ZZTat22-57_{C(22-37)S} and ZZTat22-57. The experiments then proceeded as for the previous experiments.

Results

Production of Tat101 in a free form or fused to an Ig binding domain and investigation of the transactivating activity.

To investigate Tat ability to trigger the immune response “in vitro” we selected, a 101 residues Tat protein, called Tat101, issued from a viral isolate described previously (Groenink and al., J Virol., 1991). This Tat101 protein was produced as a free protein by peptide synthesis as previously described (Kittiworakarn et al., 2006). The Tat protein was also prepared using molecular biology. For this purpose, the sequence coding for Tat was fused to the sequence coding for a double Ig-binding domain of protein A from *Staphylococcus aureus*, called ZZ. The resulting fusion protein, called ZZTat101, was then expressed in *E. coli*.

Next, we compared the transactivating potency of Tat101 and ZZTat101, since it is known that this activity can deregulate many genes, and thus induce activating or inhibiting effects. To investigate this aspect we incubated HeLa cells transfected with a plasmid encoding for both HIV-1 LTR and EGFP (Kittiworakarn et al., 2006) with the free and fused proteins, respectively. Then, we examined cellular fluorescence by FACS and observed that free Tat101 is capable to trigger EGFP expression (figure 1). In contrast, ZZTat101 does not increase the expression of the GFP even for high protein concentration. Therefore, these results demonstrate that transactivating activity is lost when Tat101 is fused to ZZ.

Selection of blood devoid of anti-Tat antibodies

Since the present study aims at evaluating Tat101 ability to trigger an *in vitro* immune response for B lymphocytes naïve for this antigen, we selected blood samples using as a criteria the absence of antibodies directed against Tat101 in their plasma. To evaluate the presence of anti-Tat101 antibodies, serial dilutions of different plasmas were incubated on microtiter plates coated with either Tat101 or

BSA, in the presence or absence of a solution containing an excess of Tat101. The interaction between antibodies and the protein coated into the plate was revealed using anti-IgGs and anti-IgM antibodies labeled with AChE.

After subtracting the signal observed on control BSA-coated plates to that measured on Tat101 coated plates, no difference was observed between the signals obtained in absence or presence of Tat101 as competitor, whatever the plasma dilution used (figure 2). These results demonstrate the absence of anti-Tat101 IgM (figure 2A) or IgG (figure 2B) in the plasma and suggest that the corresponding blood contains B cells naïve for Tat.

Preparation of the different cell subpopulations for *in vitro* immunization

The capacity of Tat101 to induce antibody production was examined using three different cellular populations. We used full PBMCs as they include all the mononuclear cells found “in vivo”. We selected NK-depleted PBMCs because previous works have shown that immune response is more effective when PBMCs are beforehand depleted of these cells (Borrebaeck et al., 1987, 1988; Thiele et al., 1983). Last, we used purified B-lymphocytes in order to evaluate the potential of Tat101 to trigger antibody production in absence of dendritic cells and T-helper lymphocytes.

NK-depleted PBMCs were recovered from PBMCs as not retained cells after affinity purification of the NK cells using anti-CD56 antibodies coated on magnetic beads. The further flow cytometry analysis (figure 3A) showed that NK cells represent about 10% of the PBMCs before fractionation while at most 0.42% of NK cells remained after affinity chromatography, demonstrating a yield of more than 95% yield for this depletion step. The same kind of process was performed to isolate the B lymphocytes. The affinity chromatography step involved anti-CD19 antibodies coated on magnetic beads that allow to retain and purify specifically B-lymphocytes. The flow cytometry analysis (figure 3B) showed that B-lymphocytes represent about 15% of PBMCs while the percentage of B-lymphocytes reaches 98% after the magnetic beads purification.

In vitro immunization experiments using Tat101 and ZZTat101

To compare the capacity of Tat101 free or fused with ZZ to trigger the production of specific antibodies *in vitro*, Tat101, ZZ, ZZTat101 and a mixture of ZZ and Tat101 were compared in *in vitro* immunization experiments. Preliminary studies were carried out in presence or absence of IL-2, IL-4 and CpG ODN 2006 (5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT- 3') because several publications showed positive effect of these two cytokines and of the TLR ligand during *in vitro* experiments (Danielsson et al., 1987) (Brams et al., 1993a) (Ichikawa et al., 1999). However, our results showed that the cytokine cocktail and CpG did not provide any benefit on immune response against Tat101 (not shown). Therefore all the following experiments were carried without cytokines and CpG. Starting from NK-depleted PBMCs, the supernatants collected after 7 days of incubation at 37°C were analyzed using ELISA to detect IgM and IgG specific of Tat101. As shown in the figure 3A for anti-Tat101 IgM detection, no signal different from control was observed using the free Tat protein. The same results were observed when analyzing the IgG response (data not shown). These results demonstrated that the Tat101 protein failed to initiate any *in vitro* antibody response. This behavior changes when Tat101 is fused with ZZ since a specific IgM signal is observed for the supernatants resulting from the incubation with ZZTat101. This specific signal was not observed using either Tat101 mixed with ZZ or ZZ alone, showing that neither ZZ alone, nor the mixture of the two free proteins were able to trigger a specific IgM antibody response. Altogether these results show that only the covalent association of Tat101 and ZZ may lead to an “*in vitro*” humoral specific response. On the other hand, whereas anti-Tat IgMs were systematically observed in our experiments, the presence of specific IgGs was found in only, one out of 6 experiments (not shown). This suggests that ZZTat101 is able to initiate the signals required to trigger a primary immune response but fails to induce the isotypic switch.

Similar results were found when the total PBMC fraction was used (figure 3B), indicating that NK cells do not modify the *in vitro* stimulation provided by ZZTat101. The same behaviour was also observed using purified B lymphocytes B (figure 3C) suggesting that the *in vitro* stimulation induced by ZZTat101 does not requires the presence of dendritic cells and helper T-lymphocytes.

Determination of the molecular determinant of the fusion protein involved in the induction of the *in vitro* humoral immune response.

To determine the molecular determinant of the fusion protein involved in the induction of the *in vitro* humoral immune response, we prepared a series of ZZTat101 derivatives. As Tat101 contains many lysines which may play a role in numerous biological activities of the protein, we first attempt to investigate their role in the "in vitro" immune response using a ZZTat101 fusion protein in which we previously modified its lysines using an excess of anhydride acetic. We incubated ZZTat101phi and ZZTat101 in the presence of PBMCs to compare their ability to trigger the immune response "in vitro". After 7 days of incubation, we collected the supernatants and added them to microtiter wells previously coated with Tat101. As shown in Figure 5, the optical density observed with supernatants from incubation with ZZTat101phi does not differ from that observed with supernatants from PBMC incubated in the absence of Ag. In contrast, a clear difference is found between the supernatants from incubation with ZZTat101 and those from incubation without Ag. Therefore, these results indicate that acetylation of ZZTat101 abrogates the ability to trigger the immune response "in vitro" and indicate that some lysine residues of the fusion protein contribute to the phenomenon.

To further delineate the molecular determinant involved in the humoral immune response "in vitro", we prepare to ZZ-Tat mutants. The first, called ZZTat22-57, was selected since we recently showed that a peptide derived from the 22-57 sequence of Tat is capable to raise an antibody response in the absence of adjuvant in mice indicating that it can initiate the immune response. The second corresponds to a ZZTat22-57 mutant in which the 7 cysteine residues were replaced by serines. This mutant, called ZZTat101_{C(22-37)S}, was selected since the Tat22-57 region contains a cys-rich region (residues 22 to 37) which is involved in several of its biological activities, including the capacity to trigger an *in vivo* immune response in absence of adjuvant (Kittiworakarn et al., 2006). We incubated ZZ-Tat101, ZZTat22-57 and ZZTat101_{C(22-37)S} in the presence of NK-depleted PBMCs to compare their ability to trigger the immune response "in vitro". After 7 days of incubation, we collected the supernatants and added them to microtiter wells previously coated with Tat101. When compared to supernatants from ZZTat101 incubation, the supernatant from ZZTat22-57 incubation exhibited a

reduced IgM production. However this production was significantly higher than that found for the control supernatants (Figure 6), indicating that the region 22-57 of Tat triggers a significant *in vitro* immune response. In contrast, no IgM response was observed with supernatants from ZZTat101_{C(22-37)S} incubation indicating that the cysteine-rich region of Tat101 controls the mechanism of *in vitro* immune response.

Discussion

The human peripheral blood cells represent an easily accessible B lymphocytes source which was used to develop strategies aiming at the specific activation of human B cells (James and Bell, 1987; Lagacé and Brodeur, 1985; Olsson et al., 1983). The approaches currently described led to variable results (Brams et al., 1993a, b; Uthoff and Böldicke, 1993) and in this context, the aim of the present study was to evaluate whether Tat, which exerts several biological activities (Albini et al., 1996a; Albini et al., 1996b; Ensoli et al., 1994), (Albini et al., 1998), (Buonaguro et al., 1992), (Fanales-Belasio et al., 2002), (Izmailova et al., 2003), might be an appropriate protein in the field of *in vitro* immunization. The first experiments demonstrate that the free and biologically active Tat101 molecule is unable to initiate antibody secretion by PBMCs. This behavior completely changes when Tat101 is covalently linked with ZZ, the double Ig-binding domain of protein A from *Staphylococcus aureus*. Indeed, the fusion protein, ZZTat101, is able to trigger the production of antibody against Tat101 when incubated with PBMCs. Furthermore, the effect is not observed when free Tat101 is incubated in the presence of ZZ indicating that it is not related to bystander effects that might be provided by the IgG binding domain. These data therefore demonstrate that Tat101 can *in vitro* stimulate the immune response when covalently coupled to ZZ. Moreover, the phenomenon is not related to the main biological activity of Tat, i.e. its transactivating activity, since we observed that ZZTat101 lacks this activity. Our results show that, in the fusion protein, the Tat moiety plays a crucial role in the induction of the "in vitro" humoral immune response. Indeed, the ZZTat22-57_{C(22-37)S} mutant, which has a preserved ZZ domain but is devoid of the seven Tat cysteines, is unable to trigger the Ab response. These results

further indicate that one or more of the Tat cysteines contribute to the phenomenon. Interestingly, the cysteine-rich region located between residues 22 to 37 is itself located inside the molecular determinant controlling the effect. Indeed, the ability of the mutant ZZTat22-57 to trigger the immune response "in vitro" strongly indicate that this determinant is mainly located in the region of Tat 22-57. During our experiments, we detected the presence of specific anti-Tat101 IgMs whereas specific anti-Tat101 IgGs were hardly ever detected. Furthermore, we also observed an IgM secretion using purified B lymphocytes. These two observations strongly suggest that the fusion protein activates B cells according to a T-independent mechanism. This mechanism may be related both to the interaction with the immunoglobulins expressed at the B lymphocytes surface and to the oligomerization properties of Tat mediated by its cysteine residues (Kittiworakarn, JBC) since we found that the ZZTat22-57_{C(22-37)S}, which is devoid of Tat cysteines, is not capable to raise an immune response "in vitro". Thus, binding to immunoglobulins and the process of Tat oligomerization would lead to Ig capping, B-cell activation and Ab secretion. As ZZ can bind to monomorphic sites of Abs (Léonetti, JI, 1998) while the Tat B-cell epitopes can be recognized by specific Abs we postulate a scenario in which two populations of B lymphocytes might be activated. The first population expresses Ig that can be bound to ZZ, thus leading to a non-specific polyclonal antibody secretion. The second corresponds to B lymphocytes recognizing Tat and thus producing a specific anti-Tat Ab polyclonal response. This population might also contains cell expressing Ig specific of Tat and capable to be bound by ZZ. Our results support such a scenario since among the IgM detected, a high proportion appears not directed against Tat.

The fusion protein ZZTat triggers the immune response using PBMCs without adding cytokines and without depleting cellular populations able to reduce the immune response (Borrebaeck, 1988) such as NK cells (Thiele et al., 1983),(Borrebaeck et al., 1987). All these results using ZZTat101 leads to a simplification of the *in vitro* immunization procedures. Moreover since the genetic system developed for producing ZZTat101 allows producing one or several antigens in tandem (Kjerrulf M, Löwenadler B, Svanholm C, Lycke N. Mol Immunol. 1997 Jun;34(8-9):599-608), it could thus appear as an useful tool for expressing other proteins linked to ZZTat in order to provide to these newly incorporated antigens an *in vitro* stimulating capacity. The future experiments will evaluate this aspect.

Furthermore, they will be focused on the possibility to trigger an isotypic switch leading to the production of specific IgGs.

Acknowledgements

The authors are greatly indebted to Alexandra Savatier and Dr Jean-Claude Boulain for the production and purification of the fusion proteins.

This work was supported by grants from the Commissariat à l'Énergie Atomique (France).

FIGURES

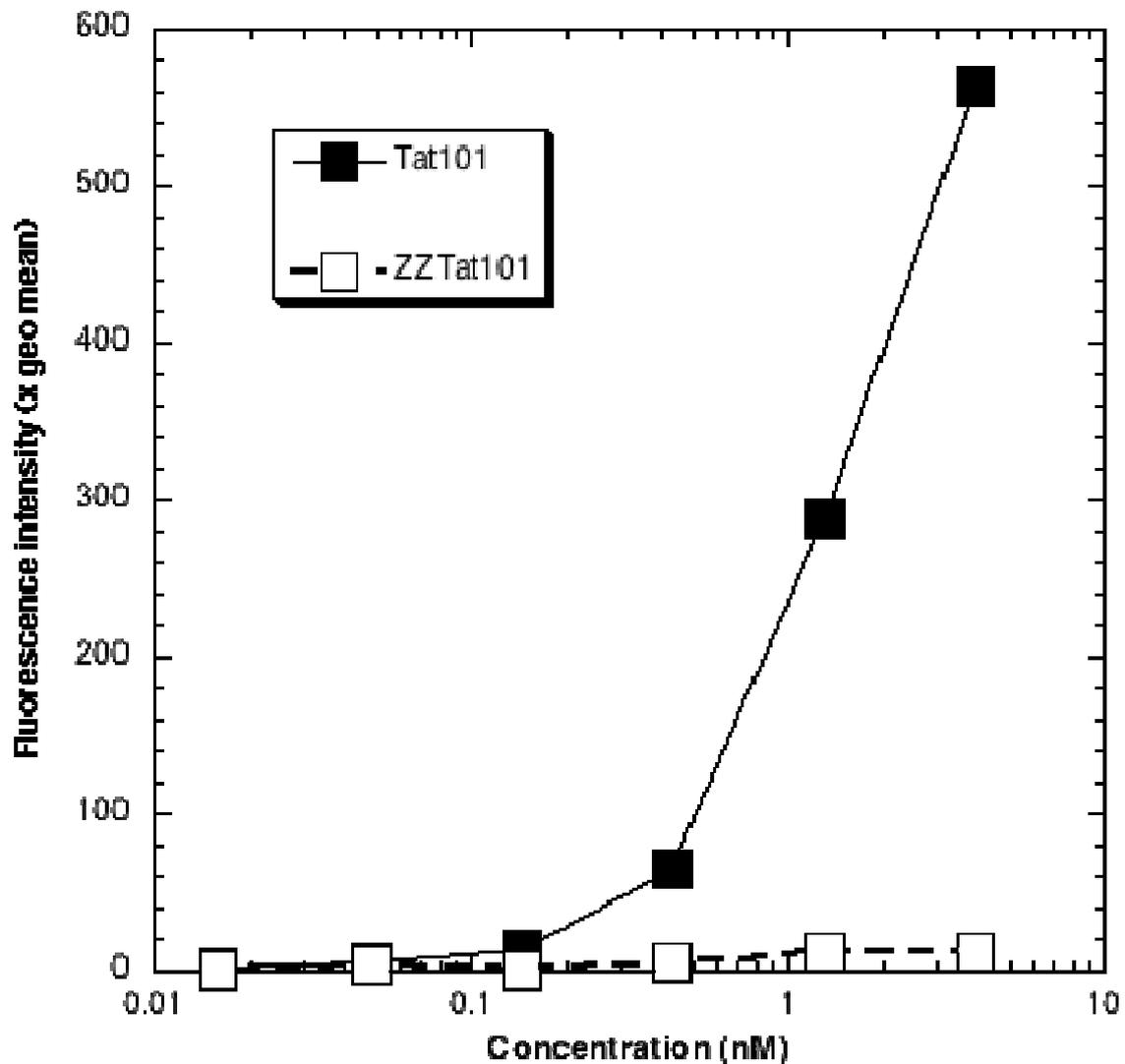


FIGURE 1: The transactivating activity is abolished when Tat is coupled to ZZ. A: A HeLa cell line stably transfected with a plasmid coding for the LTR sequence of HIV-1 and for the sequence of EGFP was incubated with either Tat101, or ZZTat101. After a 45-h incubation period, EGFP expression was examined using FACS analysis

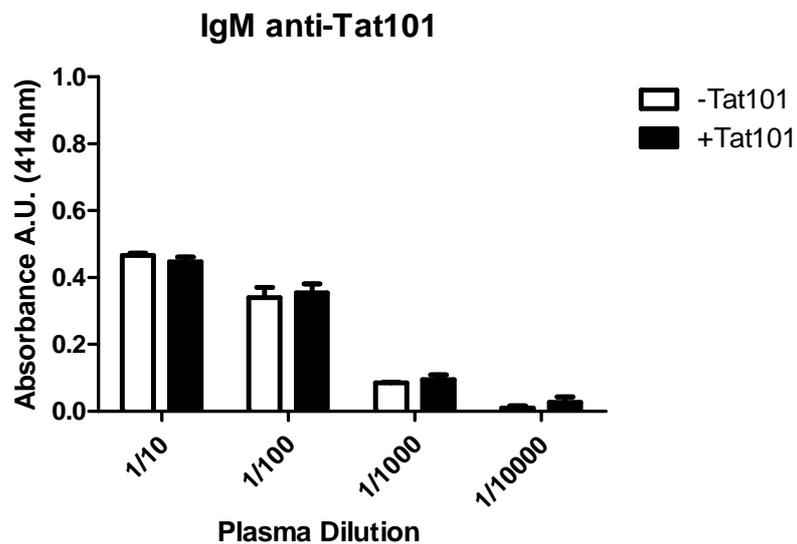
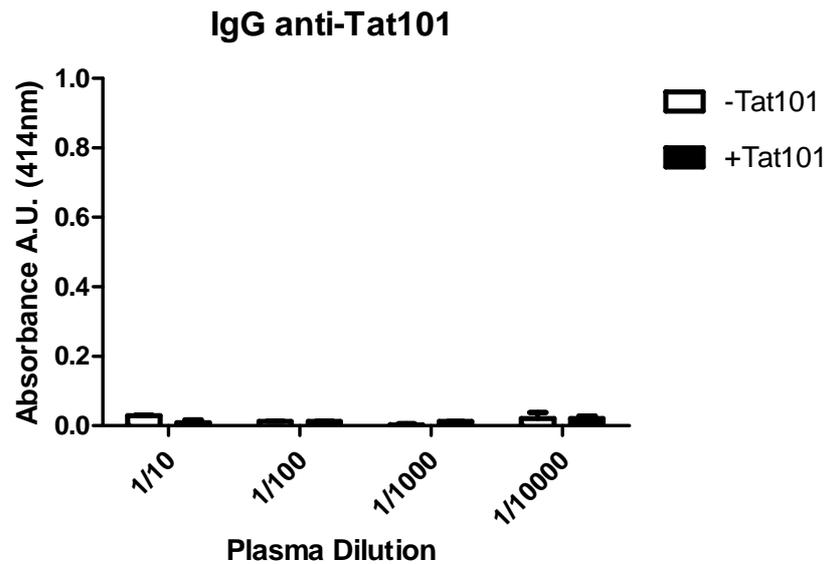


Figure2: Measurement of specific Ab anti-Tat101 before *in vitro* immunization of human PBMCs.

A : IgM anti-Tat101 Ab response in individual plasma of blood donors (EFS Rungis, France). Anti-IgM response was assessed by enzyme immunoassay. Serial dilutions of the plasma were incubated on plates coated with Tat101 in presence or not of Tat101 as a competitor (2 $\mu\text{g/ml}$ final concentration) for 1 night at 4°C.

B : IgG anti-Tat101 Ab response in individual plasma of blood donors (EFS Rungis, France). Anti-IgG response was assessed by enzyme immunoassay. Serial dilutions of the plasma were incubated on plates coated with Tat101 in presence or not of Tat101 as a competitor (2 $\mu\text{g/ml}$ final concentration)

for 1 night at 4°C. After three washing cycles, 200 ml of Ellman's reagent was added and the absorbance was measured at 414 nm after 1h.

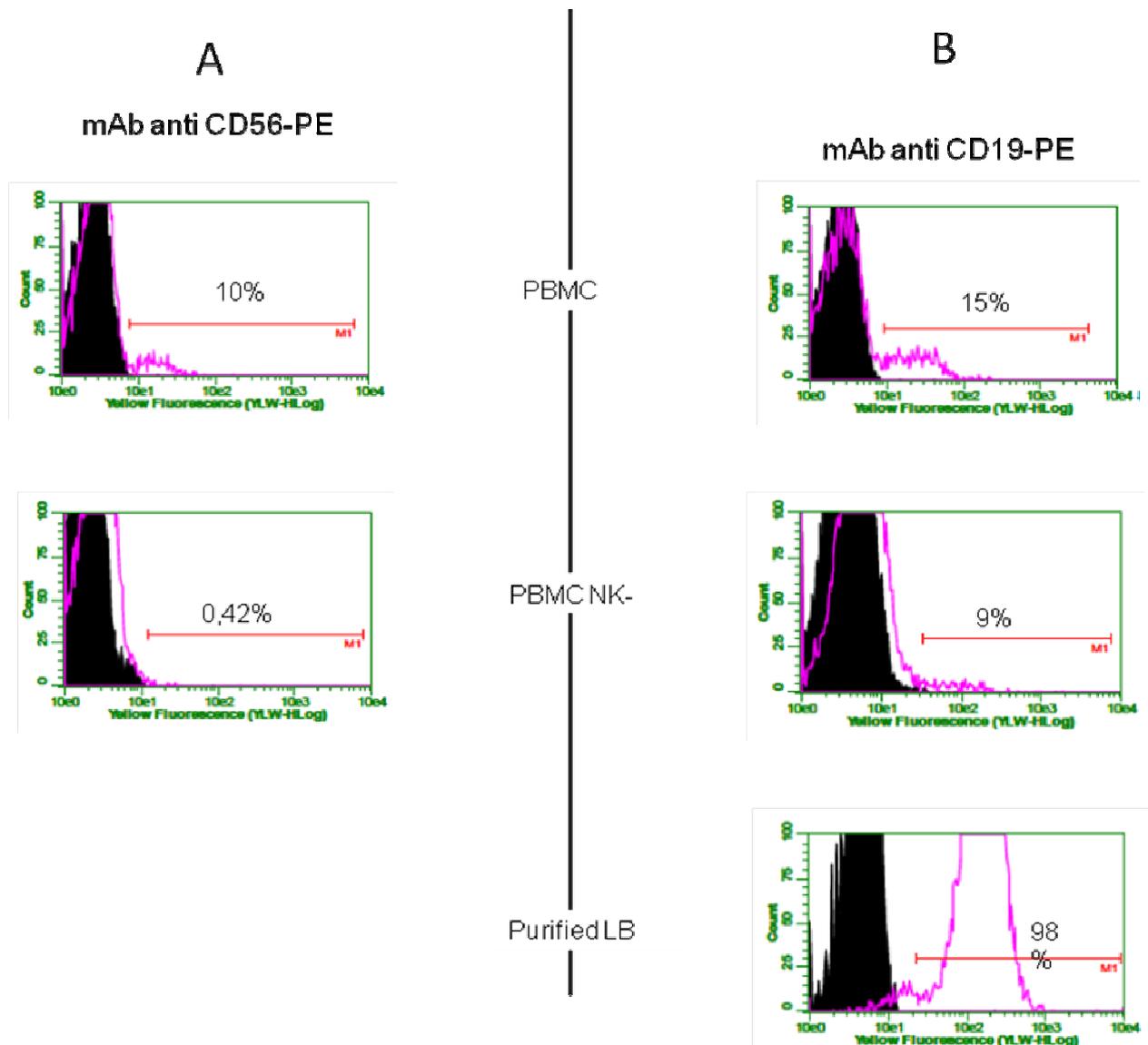


Figure 3: Cell population purity revealed by flow cytometry.

A : PBMCs and the fraction of PBMCs depleted of Natural Killer were incubated with an anti-human CD56 labelling with Phycoerythrin PE (pink histogram). As control PBMCs and the fraction of PBMCs depleted of Natural Killer alone received no anti-human CD56 labelling with Phycoerythrin PE (black histogram).

B : PBMCs, the fraction of PBMCs depleted of Natural Killer and the B purified lymphocytes were incubated with an anti-human CD19 labelling with Phycoerythrin PE (pink histogram). As control

PBMCs, the fraction of PBMCs depleted of Natural Killer and the B purified lymphocytes alone received no anti-human CD19 labelling with Phycoerythrin PE (black histogram).

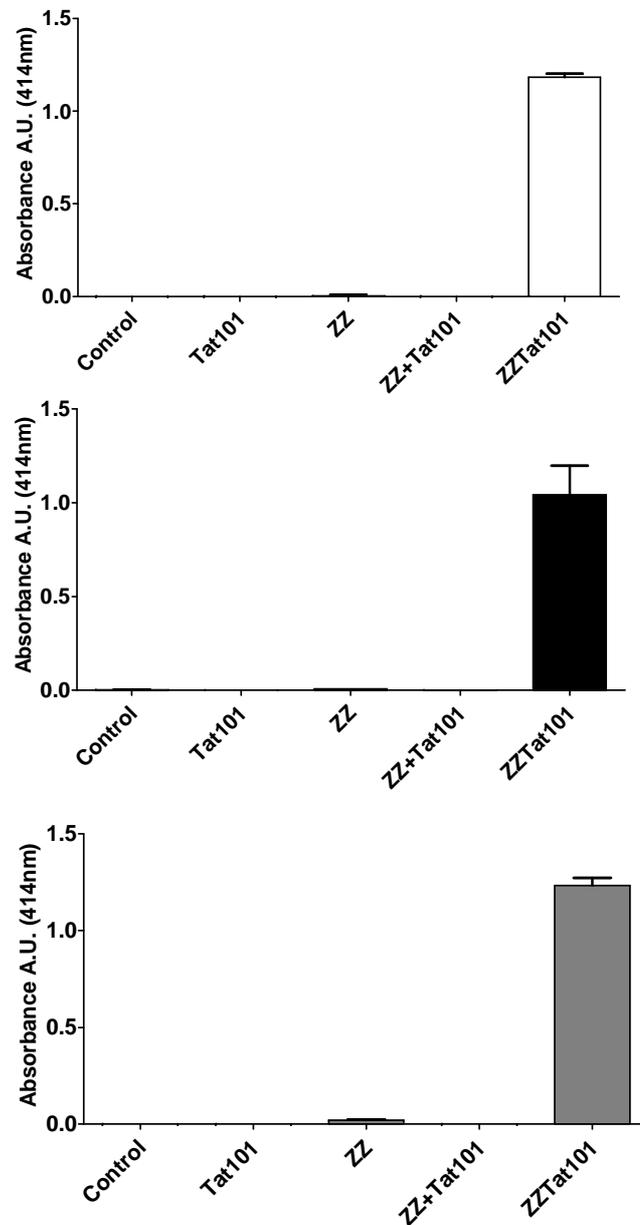


Figure 4: Effect of ZZTat101 on IgM antibody response.

Anti-Tat101 Ab response of PBMCs NK- (1×10^6 cells per well) (B), PBMCs (1×10^6 cells per well) (B) and B purified lymphocytes (1×10^6 cells per well) (C) after immunization by the fusion protein ZZTat101 ($10 \mu\text{g/ml}$ final concentration) or its components : ZZ, Tat101, or a mixture of ZZ and

Tat101 (10 $\mu\text{g/ml}$ final concentration). After a boost at day three and seven days of immunization, the presence of specific IgM anti-Tat101 Abs in pure cell supernatant culture was assessed by enzyme immunoassay in presence or not of Tat101 as a competitor (2 $\mu\text{g/ml}$). After three washing cycles, 200 ml of Ellman's reagent was added and the absorbance was measured at 414 nm after 2h. Specific signal corresponds to the signal in presence of Tat101 subtracted from the signal in absence of Tat101.

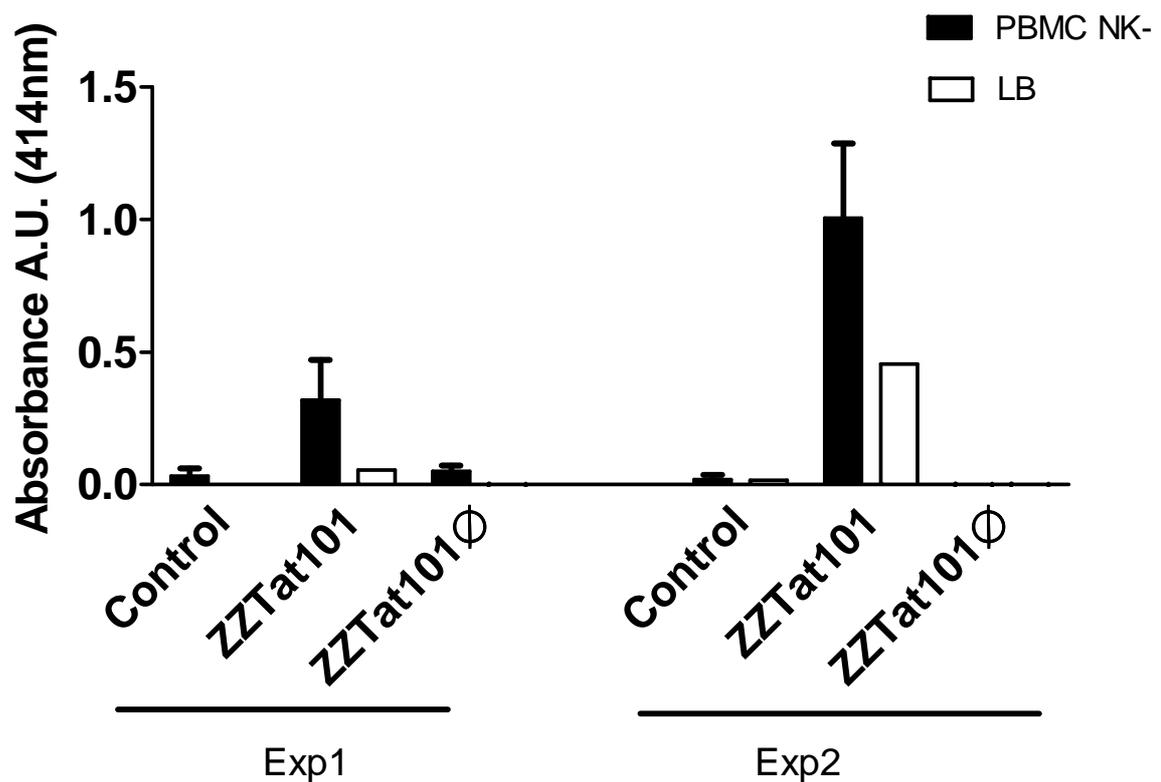


Figure 5: The role of the ability of Tat101 to bind heparan sulfate on IgM response.

After a boost at day three and seven days of immunization by the complete fusion protein ZZTat101 or ZZTat101Ø corresponding to ZZTat101 without the ability to bind heparan sulfate on PBMCs NK and B purified lymphocytes, the presence of specific IgM anti-Tat101 Abs in pure cell supernatant culture was assessed by enzyme immunoassay in presence or not of Tat101 as a competitor (2 $\mu\text{g/ml}$). After three washing cycles, 200 ml of Ellman's reagent was added and the absorbance was measured at 414 nm after 2h. Specific signal corresponds to the signal in presence of Tat101 subtracted from the signal in absence of Tat101 of two different experiments are shown.

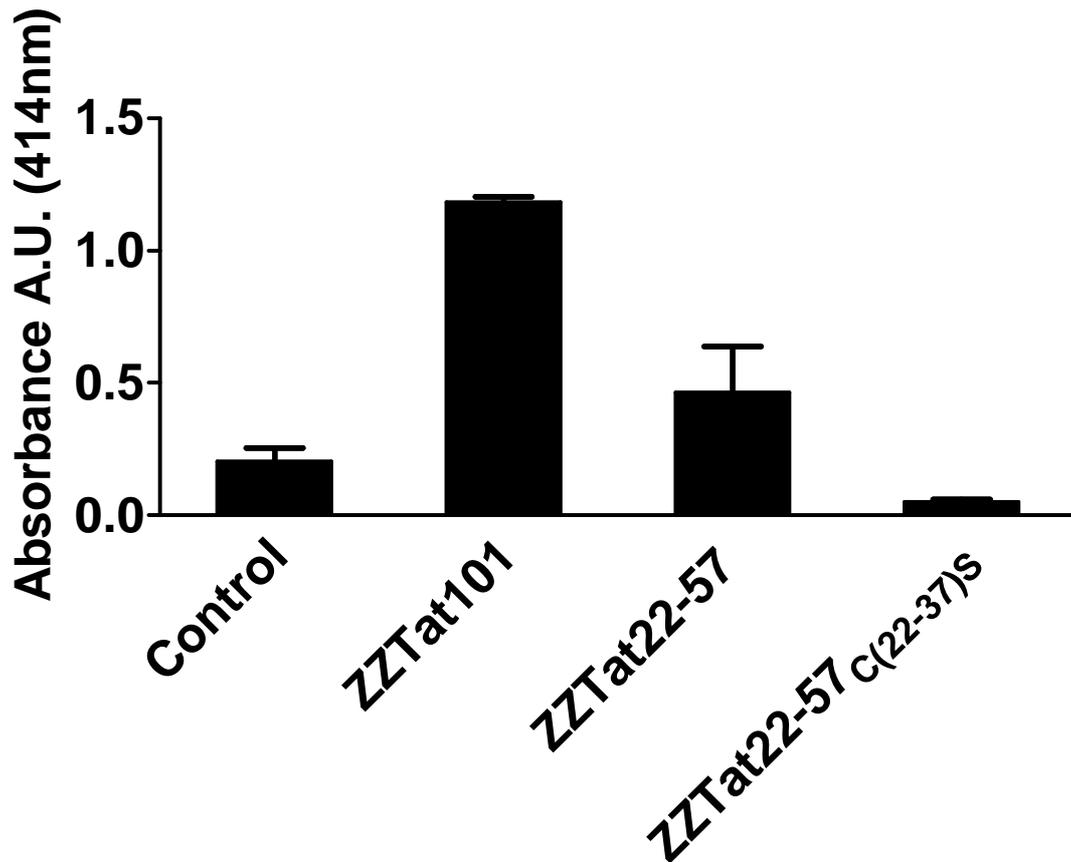


Figure 6: The region 22 to 57 of Tat101 suffices to initiate the IgM immune response through its seven cysteines.

After a boost at day three and seven days of immunization on PBMCs NK⁺ by the fusion protein ZZTat101, or its different form : ZZTat22-57 included the core and the cysteine region , ZZTat22-57_{C(22-37)S} corresponding to ZZTat22-57 with 7 cysteines mutated in serines, the presence of specific IgM anti-Tat101 Abs in pure cell supernatant culture was assessed by enzyme immunoassay in presence or not of Tat101 as a competitor (2 µg/ml). After three washing cycles, 200 µl of Ellman's reagent was added and the absorbance was measured at 414 nm after 2h. Specific signal corresponds to the signal in presence of Tat101 subtracted from the signal in absence of Tat101.

REFERENCES

- Adekar, S. P., R. M. Jones, M. D. Elias, F. H. Al-Saleem, M. J. Root, L. L. Simpson & S. K. Dessain (2008) A human monoclonal antibody that binds serotype A botulinum neurotoxin. *Hybridoma (Larchmt)*, 27, 11-7.
- Albini, A., R. Benelli, D. Giunciuglio, T. Cai, G. Mariani, S. Ferrini & D. M. Noonan (1998) Identification of a novel domain of HIV tat involved in monocyte chemotaxis. *J Biol Chem*, 273, 15895-900.
- Albini, A., R. Benelli, M. Presta, M. Rusnati, M. Ziche, A. Rubartelli, G. Paglialunga, F. Bussolino & D. Noonan (1996a) HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor. *Oncogene*, 12, 289-97.
- Albini, A., R. Soldi, D. Giunciuglio, E. Giraudo, R. Benelli, L. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rockl & F. Bussolino (1996b) The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med*, 2, 1371-5.
- Borrebaeck, C. A. (1988) Human mAbs produced by primary in-vitro immunization. *Immunol Today*, 9, 355-9.
- Borrebaeck, C. A., L. Danielsson & S. A. Möller (1987) Human monoclonal antibodies produced from L-leucine methyl ester-treated and in vitro immunized peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 148, 941-6.
- Borrebaeck, C. A., L. Danielsson & S. A. Möller (1988) Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 3995-9.
- Brams, P., I. Royston & P. Boerner (1993a) In vitro priming of human lymphocytes. I. IL-2 and IL-4 requirements. *Hum Antibodies Hybridomas*, 4, 47-56.
- Brams, P., I. Royston & P. Boerner (1993b) In vitro priming of human lymphocytes. II. Induction of antigen-specific IgG responses by repeated antigen stimulation. *Hum Antibodies Hybridomas*, 4, 57-65.
- Buonaguro, L., G. Barillari, H. K. Chang, C. A. Bohan, V. Kao, R. Morgan, R. C. Gallo & B. Ensoli (1992) Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol*, 66, 7159-67.
- Chin, L. T., J. Hinkula, M. Levi, M. Ohlin, B. Wahren & C. A. Borrebaeck (1994) Site-directed primary in vitro immunization: production of HIV-1 neutralizing human monoclonal antibodies from lymphocytes obtained from seronegative donors. *Immunology*, 81, 428-34.
- Danielsson, L., S. A. Möller & C. A. Borrebaeck (1987) Effect of cytokines on specific in vitro immunization of human peripheral B lymphocytes against T-cell dependent antigens. *Immunology*, 61, 51-5.
- Dessain, S. K., S. P. Adekar, J. B. Stevens, K. A. Carpenter, M. L. Skorski, B. L. Barnoski, R. A. Goldsby & R. A. Weinberg (2004) High efficiency creation of human monoclonal antibody-producing hybridomas. *J Immunol Methods*, 291, 109-22.
- Ensoli, B., V. Fiorelli, F. Ensoli, A. Lazzarin, R. Visintini, P. Narciso, A. Di Carlo, A. Tripiciano, O. Longo, S. Bellino, V. Francavilla, G. Paniccia, A. Arancio, A. Scoglio, B. Collacchi, M. J. Ruiz Alvarez, G. Tambussi, C. Tassan Din, G. Palamara, A. Latini, A. Antinori, G. D'Offizi, M. Giuliani, M. Giulianelli, M. Carta, P. Monini, M. Magnani & E. Garaci (2009) The preventive phase I trial with the HIV-1 Tat-based vaccine. *Vaccine*, 28, 371-8.
- Ensoli, B., R. Gendelman, P. Markham, V. Fiorelli, S. Colombini, M. Raffeld, A. Cafaro, H. K. Chang, J. N. Brady & R. C. Gallo (1994) Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature*, 371, 674-80.
- Fanales-Belasio, E., S. Moretti, F. Nappi, G. Barillari, F. Micheletti, A. Cafaro & B. Ensoli (2002) Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J Immunol*, 168, 197-206.
- Ferrantelli, F., M. T. Maggiorella, I. Schiavoni, L. Sernicola, E. Olivieri, S. Farcomeni, M. R. Pavone-Cossut, S. Moretti, R. Belli, B. Collacchi, I. K. Srivastava, F. Titti, A. Cafaro, S. W. Barnett & B. Ensoli (2011) A combination HIV vaccine based on Tat and Env proteins was

- immunogenic and protected macaques from mucosal SHIV challenge in a pilot study. *Vaccine*, 29, 2918-32.
- Gadzinski, A., D. Matz, E. Favre & M. Léonetti (2012) Transfer of the ability of HIV-1 Tat to raise an adjuvant-free humoral immune response to unrelated antigens. *Vaccine*, 30, 2859-68.
- Ichikawa, A., Y. Katakura, K. Teruya, S. Hashizume & S. Shirahata (1999) In vitro immunization of human peripheral blood lymphocytes: establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. *Cytotechnology*, 31, 133-141.
- Izmailova, E., F. M. Bertley, Q. Huang, N. Makori, C. J. Miller, R. A. Young & A. Aldovini (2003) HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med*, 9, 191-7.
- Jakobovits, A., G. J. Vergara, J. L. Kennedy, J. F. Hales, R. P. McGuinness, D. E. Casentini-Borocz, D. G. Brenner & G. R. Otten (1993) Analysis of homozygous mutant chimeric mice: deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2551-5.
- James, K. & G. T. Bell (1987) Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. *J Immunol Methods*, 100, 5-40.
- Kittiworakarn, J., A. Lecoq, G. Moine, R. Thai, E. Lajeunesse, P. Drevet, C. Vidaud, A. Ménez & M. Léonetti (2006) HIV-1 Tat raises an adjuvant-free humoral immune response controlled by its core region and its ability to form cysteine-mediated oligomers. *J Biol Chem*, 281, 3105-15.
- Kozbor, D., D. Dexter & J. C. Roder (1983) A comparative analysis of the phenotypic characteristics of available fusion partners for the construction of human hybridomas. *Hybridoma*, 2, 7-16.
- Kozbor, D., J. C. Roder, T. H. Chang, Z. Steplewski & H. Koprowski (1982) Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma. *Hybridoma*, 1, 323-8.
- Lagacé, J. & B. R. Brodeur (1985) Parameters affecting in vitro immunization of human lymphocytes. *J Immunol Methods*, 85, 127-36.
- Léonetti, M., A. Gadzinski & G. Moine (2010) Cell surface heparan sulfate proteoglycans influence MHC class II-restricted antigen presentation. *J Immunol*, 185, 3847-56.
- Léonetti, M., R. Thai, J. Cotton, S. Leroy, P. Drevet, F. Ducancel, J. C. Boulain & A. Ménez (1998) Increasing immunogenicity of antigens fused to Ig-binding proteins by cell surface targeting. *J Immunol*, 160, 3820-7.
- Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths & G. Winter (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*, 222, 581-97.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter & D. J. Chiswell (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 552-4.
- Olsson, L., H. Kronstrøm, A. Cambon-De Mouzon, C. Honsik, T. Brodin & B. Jakobsen (1983) Antibody producing human-human hybridomas. I. Technical aspects. *J Immunol Methods*, 61, 17-32.
- Shim, S. Y., Y. Katakura, A. Ichikawa, K. Teruya, T. Matsuda & S. Shirahata (2001) Epitope analysis of human monoclonal antibody specific for rice allergenic protein generated by in vitro immunization. *Cytotechnology*, 36, 109-15.
- Steinitz, M. (2009) Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments. *Hum Antibodies*, 18, 1-10.
- Thiele, D. L., M. Kurosaka & P. E. Lipsky (1983) Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J Immunol*, 131, 2282-90.
- Traggiai, E., S. Becker, K. Subbarao, L. Kolesnikova, Y. Uematsu, M. R. Gismondo, B. R. Murphy, R. Rappuoli & A. Lanzavecchia (2004) An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*, 10, 871-5.
- Uthoff, S. & T. Böldicke (1993) In vitro immunization of mouse spleen cells for the production of monoclonal IgG1 antibodies using an antigen-specific T helper cell clone (D.10.G4.1). *J Immunol Methods*, 166, 165-75.

CONCLUSION GENERALE

Les anticorps, produits en réponse à la présence d'un agent du non-soi dans l'organisme, se sont révélés être des outils remarquables en médecine, pour traiter différentes maladies. En effet, des années de recherche ont permis de modifier et d'améliorer ces molécules en faisant d'elles d'excellentes candidates thérapeutiques. Leur grande spécificité et affinité en font des outils bien adaptés pour la cancérologie et la neutralisation des toxines. Aujourd'hui, plusieurs formes d'anticorps thérapeutiques sont disponibles : les anticorps murins, les anticorps chimériques, les anticorps humanisés et les anticorps totalement humains. En raison de l'absence d'effets secondaires provoqués à leur administration à l'Homme, les anticorps totalement humains semblent être le meilleur candidat pour cette application.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés à produire des anticorps humains suivant deux approches basées sur la technique d'immortalisation virale par le virus Epstein-Barr (EBV) couplée ou non à une immortalisation cellulaire avec un partenaire de type myélome. La première approche utilisait des lymphocytes B mémoires du sang périphérique isolés à partir d'un donneur qui a été en contact avec l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB). La seconde stratégie impliquait l'immunisation *in vitro* des lymphocytes naïfs de sang périphérique contre la toxine botulique A et contre la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1. L'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB) et la toxine botulique A font partie des agents de la menace bioterroriste classés par le CDC respectivement en catégorie B et A.

L'utilisation des lymphocytes B mémoires et l'immortalisation virale par le virus Epstein-Barr a permis l'obtention de 6 puits contenant des lymphocytes B immortalisés sécréteurs d'IgGs anti-SEB. Afin de stabiliser la production d'IgGs anti-SEB par les lymphocytes B mémoires, nous avons choisi d'ajouter une étape d'immortalisation cellulaire à l'immortalisation virale. De nombreux partenaires cellulaires, dans différentes conditions de culture furent testés. Malgré les difficultés, le partenaire de fusion cellulaire le plus adapté, l'hétéromyélome HM, fut sélectionné et un hybridome sécréteur d'IgGs anti-SEB a été obtenu. Malheureusement, cet hybridome a perdu sa capacité à sécréter des IgGs anti-SEB au cours du temps.

L'utilisation de lymphocytes naïfs extraits de sang périphérique pour produire des anticorps a été possible grâce à l'immunisation *in vitro*. Nous avons réussi à mettre au point deux protocoles d'immunisation *in vitro*:

- Élimination des Natural Killer des PBMCs (PBMCs NK⁻) et stimulation par des cytokines et l'antigène
- Coculture de monocytes maturés en cellules dendritiques et de cellules lymphocytaires en présence de l'antigène.

Ces deux protocoles ont permis la production d'IgMs anti-toxine botulique A. Le protocole élimination des Natural Killer des PBMCs et stimulation par des cytokines s'est révélé le plus efficace et le plus rapide. L'immortalisation par le virus Epstein-Barr a permis d'isoler 7 puits comportant des lymphocytes immortalisés sécrétant des anticorps IgMs dirigés contre la toxine botulique A. Afin d'obtenir des IgGs, des expériences de restimulation ou de boosts à différents temps et des expériences de mutation par un agent mutagène, l'acridine orange, ont été menées. Malheureusement ces expériences n'ont pas permis le passage d'IgMs vers des IgGs. D'autre part, l'immortalisation cellulaire avec l'hétéromyéelome HM n'a pas donné d'hybridomes stables sécrétant des anticorps anti-toxine botulique A.

Nous avons également utilisé le protocole d'immunisation *in vitro* PBMCs NK⁻ comportant une stimulation par des cytokines pour la protéine de fusion ZZTat101. Ce choix d'antigène fut motivé par le fait que Tat et ZZ présentent des propriétés intéressantes pour l'immunisation *in vitro* :

- Tat est capable de déclencher des réponses anticorps de type Th1 IgG et des réponses T en absence d'adjuvant de manière spécifique et dose dépendante
- le domaine ZZ de la protéine A de *Staphylococcus aureus* augmente l'immunogénicité des molécules auxquelles il est fusionné.

A partir de cette protéine de fusion, nous avons obtenu des anticorps IgMs anti-Tat après 7 jours d'immunisations *in vitro* en utilisant différentes populations de cellules : PBMCs, PBMCs NK⁻ et lymphocytes B purifiés. Ces résultats montrent que ZZTat101 est capable d'induire une réponse humorale en l'absence de cellules dendritiques et de lymphocytes T. Par contre aucune des expériences menées au cours de cette étude ne nous a permis de mettre en évidence la production d'IgGs anti-Tat significative. La suite du travail a consisté à étudier le mécanisme d'action de la protéine Tat dans la stimulation « *in vitro* » de PBMCs, de PBMCs sans Natural Killer et de lymphocytes B purifiés. Dans une première étude, nous avons comparé l'effet de la protéine complète ZZTat101 et de ses deux composants, ZZ et

Tat, pris individuellement ou mélangés sur la production d'immunoglobulines. Cette étude a montré que pour obtenir des anticorps, ZZ doit être nécessairement lié de façon covalente à Tat. Par la suite, nous avons montré que les 7 cystéines du domaine 22-57 de Tat ainsi que la capacité à lier les héparanes sulfates de Tat étaient indispensables et suffisantes pour déclencher la production d'anticorps.

A travers cette étude, nous avons produit des anticorps totalement humains et montré comme largement débattu dans la littérature scientifique, que la production et la stabilisation de telles molécules étaient très difficiles. Cependant, l'intérêt de l'immunisation *in vitro* pour obtenir des anticorps contre des cibles pour lesquelles il n'existe pas de donneurs infectés ou immunisés demeure et une approche impliquant ZZTat101 comme outil semble dans ce cadre très prometteuse pour l'avenir. Il conviendrait en particulier d'évaluer rapidement si une protéine de fusion tripartite dérivée de ZZTat101 et comportant une cible protéique supplémentaire fournit des résultats similaires et en particulier des anticorps (IgM et IgG) dirigés contre la cible.

BIBLIOGRAPHIE

<http://knol.google.com/k/krishnan-maggon/tp-ten-monoclonal-antibodies-2010/3fy5eowy8suq3/143>.
<http://www.pipilinereview.com/index.php/2011030440628/FREE-Reports/-TOP-30-Biologics-2010.html>.

www.noraxx.ca/images/Clostridium_botulinum.jpg.

- 1994, Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. The EPIC Investigation.: *N Engl J Med*, v. 330, p. 956-61.
- A.Tissent, N. H., F.Sadiq, N.El Amrani, N. Benchemsi, 2007, Production of anti-B human monoclonal reagent for the detection of the blood groups ABO.
- Abès, R., C. A. Dutertre, and J. L. Teillaud, 2009, [Antibodies: better knowledge for a better use]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1011-9.
- Adams, G. P., R. Schier, A. M. McCall, H. H. Simmons, E. M. Horak, R. K. Alpaugh, J. D. Marks, and L. M. Weiner, 2001, High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules.: *Cancer Res*, v. 61, p. 4750-5.
- Adekar, S. P., R. M. Jones, M. D. Elias, F. H. Al-Saleem, M. J. Root, L. L. Simpson, and S. K. Dessain, 2008a, A human monoclonal antibody that binds serotype A botulinum neurotoxin.: *Hybridoma (Larchmt)*, v. 27, p. 11-7.
- Adekar, S. P., T. Takahashi, R. M. Jones, F. H. Al-Saleem, D. M. Ancharski, M. J. Root, B. P. Kapadnis, L. L. Simpson, and S. K. Dessain, 2008b, Neutralization of botulinum neurotoxin by a human monoclonal antibody specific for the catalytic light chain.: *PLoS One*, v. 3, p. e3023.
- Albini, A., R. Benelli, D. Giunciuglio, T. Cai, G. Mariani, S. Ferrini, and D. M. Noonan, 1998, Identification of a novel domain of HIV tat involved in monocyte chemotaxis.: *J Biol Chem*, v. 273, p. 15895-900.
- Albini, A., R. Benelli, M. Presta, M. Rusnati, M. Ziche, A. Rubartelli, G. Paglialunga, F. Bussolino, and D. Noonan, 1996a, HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor.: *Oncogene*, v. 12, p. 289-97.
- Albini, A., R. Soldi, D. Giunciuglio, E. Giraudo, R. Benelli, L. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rockl, and F. Bussolino, 1996b, The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells.: *Nat Med*, v. 2, p. 1371-5.
- Amersdorfer, P., C. Wong, S. Chen, T. Smith, S. Deshpande, R. Sheridan, R. Finnern, and J. D. Marks, 1997, Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries.: *Infect Immun*, v. 65, p. 3743-52.
- Anthony, R. M., F. Wermeling, M. C. Karlsson, and J. V. Ravetch, 2008, Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 19571-8.
- Arbabi-Ghahroudi, M., J. Tanha, and R. MacKenzie, 2005, Prokaryotic expression of antibodies.: *Cancer Metastasis Rev*, v. 24, p. 501-19.
- Arbuthnott, J. P., D. C. Coleman, and J. S. de Azavedo, 1990, Staphylococcal toxins in human disease.: *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, v. 19, p. 101S-107S.
- Arndt, J. W., M. J. Jacobson, E. E. Abola, C. M. Forsyth, W. H. Tepp, J. D. Marks, E. A. Johnson, and R. C. Stevens, 2006, A structural perspective of the sequence variability within botulinum neurotoxin subtypes A1-A4.: *J Mol Biol*, v. 362, p. 733-42.
- Arnold, J. N., M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd, and R. A. Dwek, 2007, The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins.: *Annu Rev Immunol*, v. 25, p. 21-50.
- Arnon, S. S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat, and W. G. o. C. Biodefense, 2001, Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management.: *JAMA*, v. 285, p. 1059-70.
- Aversa, G., J. Punnonen, J. M. Carballido, B. G. Cocks, and J. E. de Vries, 1994, CD40 ligand-CD40 interaction in Ig isotype switching in mature and immature human B cells: *Semin Immunol*, v. 6, p. 295-301.

- Avery, D. T., V. L. Bryant, C. S. Ma, R. de Waal Malefyt, and S. G. Tangye, 2008, IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4: *J Immunol*, v. 181, p. 1767-79.
- Baker, K. P., B. M. Edwards, S. H. Main, G. H. Choi, R. E. Wager, W. G. Halpern, P. B. Lappin, T. Riccobene, D. Abramian, L. Sekut, B. Sturm, C. Poortman, R. R. Minter, C. L. Dobson, E. Williams, S. Carmen, R. Smith, V. Roschke, D. M. Hilbert, T. J. Vaughan, and V. R. Albert, 2003, Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator.: *Arthritis Rheum*, v. 48, p. 3253-65.
- Balaban, N., and A. Rasooly, 2000, Staphylococcal enterotoxins.: *Int J Food Microbiol*, v. 61, p. 1-10.
- Barbas, C. F., A. S. Kang, R. A. Lerner, and S. J. Benkovic, 1991, Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, p. 7978-82.
- Barbet, J., J. F. Chatal, and F. Kraeber-Bodéré, 2009, [Radiolabeled antibodies for cancer treatment]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1039-45.
- Beck, A., E. Wagner-Rousset, T. Wurch, and N. Corvaia, 2009, [Therapeutic antibodies and related products: choosing the right structure for success]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1024-32.
- Beck, A., T. Wurch, C. Bailly, and N. Corvaia, 2010, Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies.: *Nat Rev Immunol*, v. 10, p. 345-52.
- Behar, G., P. Chames, I. Teulon, A. Cornillon, F. Alshoukr, F. Roquet, M. Pugnère, J. L. Teillaud, A. Gruaz-Guyon, A. Pèlerin, and D. Baty, 2009, Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from nonspecific cross-reacting antigen.: *FEBS J*, v. 276, p. 3881-93.
- Bell, J. A., T. H. Pennington, and D. T. Petrie, 1987, Western blot analysis of staphylococcal antibodies present in human sera during health and disease.: *J Med Microbiol*, v. 23, p. 95-9.
- Bender, N. K., C. E. Heilig, B. Dröll, J. Wohlgemuth, F. P. Armbruster, and B. Heilig, 2007, Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients.: *Rheumatol Int*, v. 27, p. 269-74.
- Benedict, C. L., S. Gilfillan, T. H. Thai, and J. F. Kearney, 2000, Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development.: *Immunol Rev*, v. 175, p. 150-7.
- Bengtén, E., M. Wilson, N. Miller, L. W. Clem, L. Pilström, and G. W. Warr, 2000, Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics.: *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 248, p. 189-219.
- Bergdoll, M. S., B. A. Crass, R. F. Reiser, R. N. Robbins, and J. P. Davis, 1981, A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates.: *Lancet*, v. 1, p. 1017-21.
- Bernasconi, N. L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia, 2002, Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.: *Science*, v. 298, p. 2199-202.
- Bohach, G. A., D. J. Fast, R. D. Nelson, and P. M. Schlievert, 1990, Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses.: *Crit Rev Microbiol*, v. 17, p. 251-72.
- Boles, J. W., M. L. Pitt, R. D. LeClaire, P. H. Gibbs, E. Torres, B. Dyas, R. G. Ulrich, and S. Bavari, 2003, Generation of protective immunity by inactivated recombinant staphylococcal enterotoxin B vaccine in nonhuman primates and identification of correlates of immunity.: *Clin Immunol*, v. 108, p. 51-9.
- Borrebaeck, C. A., 1983, In vitro immunization for the production of antigen-specific lymphocyte hybridomas.: *Scand J Immunol*, v. 18, p. 9-12.
- Borrebaeck, C. A., 1988, Human mAbs produced by primary in-vitro immunization.: *Immunol Today*, v. 9, p. 355-9.
- Borrebaeck, C. A., L. Danielsson, and S. A. Möller, 1987, Human monoclonal antibodies produced from L-leucine methyl ester-treated and in vitro immunized peripheral blood lymphocytes.: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 148, p. 941-6.
- Borrebaeck, C. A., L. Danielsson, and S. A. Möller, 1988, Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 3995-9.
- Brams, P., I. Royston, and P. Boerner, 1993a, In vitro priming of human lymphocytes. I. IL-2 and IL-4 requirements.: *Hum Antibodies Hybridomas*, v. 4, p. 47-56.

- Brams, P., I. Royston, and P. Boerner, 1993b, In vitro priming of human lymphocytes. II. Induction of antigen-specific IgG responses by repeated antigen stimulation.: *Hum Antibodies Hybridomas*, v. 4, p. 57-65.
- Buchacher, A., R. Predl, K. Strutzenberger, W. Steinfellner, A. Trkola, M. Purtscher, G. Gruber, C. Tauer, F. Steindl, and A. Jungbauer, 1994, Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization.: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 10, p. 359-69.
- Buonaguro, L., G. Barillari, H. K. Chang, C. A. Bohan, V. Kao, R. Morgan, R. C. Gallo, and B. Ensoli, 1992, Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines.: *J Virol*, v. 66, p. 7159-67.
- Campbell, G. R., and E. P. Loret, 2009, What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine?: *Retrovirology*, v. 6, p. 50.
- Capon, D. J., S. M. Chamow, J. Mordenti, S. A. Marsters, T. Gregory, H. Mitsuya, R. A. Byrn, C. Lucas, F. M. Wurm, and J. E. Gropman, 1989, Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy.: *Nature*, v. 337, p. 525-31.
- Carter, A. T., C. J. Paul, D. R. Mason, S. M. Twine, M. J. Alston, S. M. Logan, J. W. Austin, and M. W. Peck, 2009, Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*: *BMC Genomics*, v. 10, p. 115.
- Carter, P. J., 2006, Potent antibody therapeutics by design.: *Nat Rev Immunol*, v. 6, p. 343-57.
- Casadevall, A., E. Dadachova, and L. A. Pirofski, 2004, Passive antibody therapy for infectious diseases.: *Nat Rev Microbiol*, v. 2, p. 695-703.
- Casman, E. P., M. S. Bergdoll & J. Robinson, 1963a, DESIGNATION OF STAPHYLOCOCCAL EXTEROTOXINS., *J Bacteriol*, p. 715-6.
- Chames, P., and D. Baty, 2009a, Bispecific antibodies for cancer therapy.: *Curr Opin Drug Discov Devel*, v. 12, p. 276-83.
- Chames, P., and D. Baty, 2009b, [The future of antibody fragments, made of a single immunoglobulin domain]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1159-62.
- Chames, P., M. Van Regenmortel, E. Weiss, and D. Baty, 2009, Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.: *Br J Pharmacol*, v. 157, p. 220-33.
- Chen, K., and A. Cerutti, 2011, The function and regulation of immunoglobulin D.: *Curr Opin Immunol*, v. 23, p. 345-52.
- Cheuk, W., K. O. Wong, C. S. Wong, and J. K. Chan, 2004, Consistent immunostaining for cyclin D1 can be achieved on a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody.: *Am J Surg Pathol*, v. 28, p. 801-7.
- Chin, L. T., J. Hinkula, M. Levi, M. Ohlin, B. Wahren, and C. A. Borrebaeck, 1994, Site-directed primary in vitro immunization: production of HIV-1 neutralizing human monoclonal antibodies from lymphocytes obtained from seronegative donors.: *Immunology*, v. 81, p. 428-34.
- Choy, E. H., B. Hazleman, M. Smith, K. Moss, L. Lisi, D. G. Scott, J. Patel, M. Sopwith, and D. A. Isenberg, 2002, Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial.: *Rheumatology (Oxford)*, v. 41, p. 1133-7.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, and G. Winter, 1991, Making antibody fragments using phage display libraries: *Nature*, v. 352, p. 624-8.
- Clackson, T. P., 1991, Genetically engineered monoclonal antibodies: *Br J Rheumatol*, v. 30 Suppl 2, p. 36-9.
- Cochet, O., and M. Chartrain, 2009, [Producing several hundred of kilograms of monoclonal antibodies for therapy: a constant challenge]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1078-84.
- Coffman, R. L., D. A. Leberman, and P. Rothman, 1993, Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching: *Adv Immunol*, v. 54, p. 229-70.
- Colque-Navarro, P., G. Jacobsson, R. Andersson, J. I. Flock, and R. Möllby, 2010, Levels of antibody against 11 *Staphylococcus aureus* antigens in a healthy population.: *Clin Vaccine Immunol*, v. 17, p. 1117-23.
- Cosimi, A. B., R. C. Burton, R. B. Colvin, G. Goldstein, F. L. Delmonico, M. P. LaQuaglia, N. Tolkoff-Rubin, R. H. Rubin, J. T. Herrin, and P. S. Russell, 1981, Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody.: *Transplantation*, v. 32, p. 535-9.

- Cowell, N. A., M. T. Hansen, A. J. Langley, T. M. Graham, and J. R. Bates, 2002, Outbreak of staphylococcal enterotoxin food poisoning.: *Commun Dis Intell*, v. 26, p. 574-5.
- Danielsson, L., S. A. Möller, and C. A. Borrebaeck, 1987, Effect of cytokines on specific in vitro immunization of human peripheral B lymphocytes against T-cell dependent antigens.: *Immunology*, v. 61, p. 51-5.
- Datta-Mannan, A., D. R. Witcher, Y. Tang, J. Watkins, and V. J. Wroblewski, 2007, Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor.: *J Biol Chem*, v. 282, p. 1709-17.
- Davis, M. M., and P. J. Bjorkman, 1988, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.: *Nature*, v. 334, p. 395-402.
- Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, and W. A. Haseltine, 1986, The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication: *Cell*, v. 44, p. 941-7.
- Deenick, E. K., J. Hasbold, and P. D. Hodgkin, 2005, Decision criteria for resolving isotype switching conflicts by B cells: *Eur J Immunol*, v. 35, p. 2949-55.
- Dessain, S. K., S. P. Adegan, J. B. Stevens, K. A. Carpenter, M. L. Skorski, B. L. Barnoski, R. A. Goldsby, and R. A. Weinberg, 2004, High efficiency creation of human monoclonal antibody-producing hybridomas.: *J Immunol Methods*, v. 291, p. 109-22.
- Dinges, M. M., P. M. Orwin, and P. M. Schlievert, 2000, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.: *Clin Microbiol Rev*, v. 13, p. 16-34, table of contents.
- Drevet, P., C. Lemaire, S. Gasparini, S. Zinn-Justin, E. Lajeunesse, F. Ducancel, S. Pinkasfeld, M. Courçon, O. Tremeau, J. C. Boulain, and A. Ménez, 1997, High-level production and isotope labeling of snake neurotoxins, disulfide-rich proteins: *Protein Expr Purif*, v. 10, p. 293-300.
- Drozdowski, B., Y. Zhou, B. Kline, J. Spidel, Y. Y. Chan, E. Albone, H. Turchin, Q. Chao, M. Henry, J. Balogach, E. Routhier, S. Bavari, N. C. Nicolaides, P. M. Sass, and L. Grasso, 2010, Generation and characterization of high affinity human monoclonal antibodies that neutralize staphylococcal enterotoxin B.: *J Immune Based Ther Vaccines*, v. 8, p. 9.
- Dryla, A., S. Prustomersky, D. Gelbmann, M. Hanner, E. Bettinger, B. Kocsis, T. Kustos, T. Henics, A. Meinke, and E. Nagy, 2005, Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients.: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 12, p. 387-98.
- Dubreuil, O., B. Muller, M. Bossus, A. Savatier, and F. Ducancel, 2006, [Directed molecular evolution of antibodies]. *J Soc Biol*, v. 200, p. 355-63.
- Dudley, D. D., J. Chaudhuri, C. H. Bassing, and F. W. Alt, 2005, Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences.: *Adv Immunol*, v. 86, p. 43-112.
- Dueñas, M., L. T. Chin, A. C. Malmborg, R. Casavilla, M. Ohlin, and C. A. Borrebaeck, 1996, In vitro immunization of naive human B cells yields high affinity immunoglobulin G antibodies as illustrated by phage display.: *Immunology*, v. 89, p. 1-7.
- Dutertre, C. A., and J. L. Teillaud, 2006, [Monoclonal antibodies, act two: new molecules for new challenges]. *J Soc Biol*, v. 200, p. 377-86.
- Edelman, L., C. Margaritte, H. Chaabihi, E. Monchâtre, D. Blanchard, A. Cardona, F. Morin, G. Dumas, S. Petres, and M. Kaczorek, 1997, Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system.: *Immunology*, v. 91, p. 13-9.
- Eibl, M. M., 2008, History of immunoglobulin replacement.: *Immunol Allergy Clin North Am*, v. 28, p. 737-64, viii.
- Emanuel, D., J. Gold, J. Colacino, C. Lopez, and U. Hammerling, 1984, A human monoclonal antibody to cytomegalovirus (CMV). *J Immunol*, v. 133, p. 2202-5.
- Ensoli, B., V. Fiorelli, F. Ensoli, A. Lazzarin, R. Visintini, P. Narciso, A. Di Carlo, A. Tripiciano, O. Longo, S. Bellino, V. Francavilla, G. Paniccia, A. Arancio, A. Scoglio, B. Collacchi, M. J. Ruiz Alvarez, G. Tambussi, C. Tassan Din, G. Palamara, A. Latini, A. Antinori, G. D'Offizi, M. Giuliani, M. Giulianelli, M. Carta, P. Monini, M. Magnani, and E. Garaci, 2009, The preventive phase I trial with the HIV-1 Tat-based vaccine.: *Vaccine*, v. 28, p. 371-8.
- Ensoli, B., R. Gendelman, P. Markham, V. Fiorelli, S. Colombini, M. Raffeld, A. Cafaro, H. K. Chang, J. N. Brady, and R. C. Gallo, 1994, Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma.: *Nature*, v. 371, p. 674-80.

- Erb, D. A., and H. A. Nabi, 2000, Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium-99m-labeled antiCEA Fab' fragment.: *J Nucl Med Technol*, v. 28, p. 12-8; quiz 21.
- Evenson, M. L., M. W. Hinds, R. S. Bernstein, and M. S. Bergdoll, 1988, Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk.: *Int J Food Microbiol*, v. 7, p. 311-6.
- Fanales-Belasio, E., S. Moretti, F. Nappi, G. Barillari, F. Micheletti, A. Cafaro, and B. Ensoli, 2002, Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses.: *J Immunol*, v. 168, p. 197-206.
- Ferrantelli, F., M. T. Maggiorella, I. Schiavoni, L. Sernicola, E. Olivieri, S. Farcomeni, M. R. Pavone-Cossut, S. Moretti, R. Belli, B. Collacchi, I. K. Srivastava, F. Titti, A. Cafaro, S. W. Barnett, and B. Ensoli, 2011, A combination HIV vaccine based on Tat and Env proteins was immunogenic and protected macaques from mucosal SHIV challenge in a pilot study.: *Vaccine*, v. 29, p. 2918-32.
- Fromen-Romano, C., P. Drevet, A. Robert, A. Ménez, and M. Léonetti, 1999, Recombinant *Staphylococcus* strains as live vectors for the induction of neutralizing anti-diphtheria toxin antisera.: *Infect Immun*, v. 67, p. 5007-11.
- Fu, W., B. E. Sanders-Beer, K. S. Katz, D. R. Maglott, K. D. Pruitt, and R. G. Ptak, 2009, Human immunodeficiency virus type 1, human protein interaction database at NCBI: *Nucleic Acids Res*, v. 37, p. D417-22.
- Gadzinski, A., D. Matz, E. Favre, and M. Léonetti, 2012, Transfer of the ability of HIV-1 Tat to raise an adjuvant-free humoral immune response to unrelated antigens.: *Vaccine*, v. 30, p. 2859-68.
- Gelderman, K. A., S. Tomlinson, G. D. Ross, and A. Gorter, 2004, Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy.: *Trends Immunol*, v. 25, p. 158-64.
- Getts, D. R., M. T. Getts, D. P. McCarthy, E. M. Chastain, and S. D. Miller, 2010, Have we overestimated the benefit of human(ized) antibodies?: *MAbs*, v. 2, p. 682-94.
- Gill, D. M., 1982, Bacterial toxins: a table of lethal amounts.: *Microbiol Rev*, v. 46, p. 86-94.
- Goodnow, C. C., 1997, Balancing immunity, autoimmunity, and self-tolerance: *Ann N Y Acad Sci*, v. 815, p. 55-66.
- Goodnow, C. C., and J. G. Cyster, 1997, Lymphocyte homing: the scent of a follicle: *Curr Biol*, v. 7, p. R219-22.
- Gram, H., L. A. Marconi, C. F. Barbas, T. A. Collet, R. A. Lerner, and A. S. Kang, 1992, In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, p. 3576-80.
- Grassi, J., Y. Frobert, P. Pradelles, F. Chercuitte, D. Gruaz, J. M. Dayer, and P. E. Poubelle, 1989, Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunoassays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media.: *J Immunol Methods*, v. 123, p. 193-210.
- Grunow, R., S. Jahn, T. Porstmann, S. S. Kiessig, H. Steinkellner, F. Steindl, D. Mattanovich, L. Gürtler, F. Deinhardt, and H. Katinger, 1988, The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7. Production of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus.: *J Immunol Methods*, v. 106, p. 257-65.
- Haeuw, J. F., V. Caussanel, and A. Beck, 2009, [Immunoconjugates, drug-armed antibodies to fight against cancer]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1046-52.
- Hamad, A. R., P. Marrack, and J. W. Kappler, 1997, Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins.: *J Exp Med*, v. 185, p. 1447-54.
- Harlow Ed, L. D., 1988, *Antibodies.*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harmsen, M. M., and H. J. De Haard, 2007, Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments.: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 77, p. 13-22.
- Hawkins, R. E., S. J. Russell, and G. Winter, 1992, Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation: *J Mol Biol*, v. 226, p. 889-96.
- Hinton, P. R., M. G. Johlfs, J. M. Xiong, K. Hanestad, K. C. Ong, C. Bullock, S. Keller, M. T. Tang, J. Y. Tso, M. Vásquez, and N. Tsurushita, 2004, Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates.: *J Biol Chem*, v. 279, p. 6213-6.

- Hogrefe, H. H., J. R. Amberg, B. N. Hay, J. A. Sorge, and B. Shopes, 1993a, Cloning in a bacteriophage lambda vector for the display of binding proteins on filamentous phage: *Gene*, v. 137, p. 85-91.
- Hogrefe, H. H., R. L. Mullinax, A. E. Lovejoy, B. N. Hay, and J. A. Sorge, 1993b, A bacteriophage lambda vector for the cloning and expression of immunoglobulin Fab fragments on the surface of filamentous phage: *Gene*, v. 128, p. 119-26.
- Holdeman, L. V., 1970, The ecology and natural history of *Clostridium botulinum*.: *J Wildl Dis*, v. 6, p. 205-10.
- Hoogenboom, H. R., 2005, Selecting and screening recombinant antibody libraries.: *Nat Biotechnol*, v. 23, p. 1105-16.
- Hornick, C. L., and F. Karuch, 1972, Antibody affinity. 3. The role of multivalence: *Immunochemistry*, v. 9, p. 325-40.
- Hovde, C. J., J. C. Marr, M. L. Hoffmann, S. P. Hackett, Y. I. Chi, K. K. Crum, D. L. Stevens, C. V. Stauffacher, and G. A. Bohach, 1994, Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1.: *Mol Microbiol*, v. 13, p. 897-909.
- Huang, Z., W. Zhu, G. Szekeres, and H. Xia, 2005, Development of new rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor: immunohistochemical assessment on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.: *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v. 13, p. 91-5.
- Hwang, W. Y., and J. Foote, 2005, Immunogenicity of engineered antibodies.: *Methods*, v. 36, p. 3-10.
- Ichikawa, A., Y. Katakura, K. Teruya, S. Hashizume, and S. Shirahata, 1999, In vitro immunization of human peripheral blood lymphocytes: establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4.: *Cytotechnology*, v. 31, p. 133-141.
- Izmailova, E., F. M. Bertley, Q. Huang, N. Makori, C. J. Miller, R. A. Young, and A. Aldovini, 2003, HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages.: *Nat Med*, v. 9, p. 191-7.
- Jakobovits, A., G. J. Vergara, J. L. Kennedy, J. F. Hales, R. P. McGuinness, D. E. Casentini-Borocz, D. G. Brenner, and G. R. Otten, 1993, Analysis of homozygous mutant chimeric mice: deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, p. 2551-5.
- James, K., and G. T. Bell, 1987, Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects.: *J Immunol Methods*, v. 100, p. 5-40.
- Jarraud, S., M. A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville, and G. Lina, 2001, egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*.: *J Immunol*, v. 166, p. 669-77.
- Jefferis, R., 2007, Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection.: *Expert Opin Biol Ther*, v. 7, p. 1401-13.
- Jiang, X. R., A. Song, S. Bergelson, T. Arroll, B. Parekh, K. May, S. Chung, R. Strouse, A. Mire-Sluis, and M. Schenerman, 2011, Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies.: *Nat Rev Drug Discov*, v. 10, p. 101-11.
- Johnson, E. A., and M. Bradshaw, 2001, *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective.: *Toxicon*, v. 39, p. 1703-22.
- Johnson, H. M., J. K. Russell, and C. H. Pontzer, 1991, Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens.: *FASEB J*, v. 5, p. 2706-12.
- Johri, M. K., R. Mishra, C. Chhatbar, S. K. Unni, and S. K. Singh, 2011, Tits and bits of HIV Tat protein: *Expert Opin Biol Ther*, v. 11, p. 269-83.
- Jones, P. T., P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, and G. Winter, 1986, Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse.: *Nature*, v. 321, p. 522-5.
- Jung, Y. S., S. E. Matsumoto, Y. Katakura, M. Yamashita, K. Tomimatsu, S. Kabayama, K. Teruya, and S. Shirahata, 2008, Generation of human monoclonal antibodies against *Propionibacterium acnes* by applying the phage display method to human peripheral blood mononuclear cells immunized in vitro.: *Cytotechnology*, v. 57, p. 169-75.
- Kanda, Y., N. Yamane-Ohnuki, N. Sakai, K. Yamano, R. Nakano, M. Inoue, H. Misaka, S. Iida, M. Wakitani, Y. Konno, K. Yano, K. Shitara, S. Hosoi, and M. Satoh, 2006, Comparison of cell

- lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC.: *Biotechnol Bioeng*, v. 94, p. 680-8.
- Kappler, J., J. White, H. Kozono, J. Clements, and P. Marrack, 1994, Binding of a soluble alpha beta T-cell receptor to superantigen/major histocompatibility complex ligands.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 8462-6.
- Kappler, J. W., A. Herman, J. Clements, and P. Marrack, 1992, Mutations defining functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B.: *J Exp Med*, v. 175, p. 387-96.
- Karauzum, H., G. Chen, L. Abaandou, M. Mahmoudieh, A. R. Boroun, S. Shulenin, V. S. Devi, E. Stavale, K. L. Warfield, L. Zeitlin, C. J. Roy, S. S. Sidhu, and M. J. Aman, 2012, Synthetic human monoclonal antibodies towards staphylococcal enterotoxin B (SEB) protective against toxic shock syndrome.: *J Biol Chem*.
- Keller, M. A., and E. R. Stiehm, 2000, Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases.: *Clin Microbiol Rev*, v. 13, p. 602-14.
- Kittiworakarn, J., A. Lecoq, G. Moine, R. Thai, E. Lajeunesse, P. Drevet, C. Vidaud, A. Ménez, and M. Léonetti, 2006, HIV-1 Tat raises an adjuvant-free humoral immune response controlled by its core region and its ability to form cysteine-mediated oligomers.: *J Biol Chem*, v. 281, p. 3105-15.
- Kozbor, D., D. Dexter, and J. C. Roder, 1983, A comparative analysis of the phenotypic characteristics of available fusion partners for the construction of human hybridomas.: *Hybridoma*, v. 2, p. 7-16.
- Kozbor, D., A. E. Lagarde, and J. C. Roder, 1982a, Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 79, p. 6651-5.
- Kozbor, D., and J. C. Roder, 1981, Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique.: *J Immunol*, v. 127, p. 1275-80.
- Kozbor, D., J. C. Roder, T. H. Chang, Z. Steplewski, and H. Koprowski, 1982b, Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma.: *Hybridoma*, v. 1, p. 323-8.
- Kreitman, R. J., 2009, Recombinant immunotoxins for the treatment of chemoresistant hematologic malignancies.: *Curr Pharm Des*, v. 15, p. 2652-64.
- Krieg, A. M., 2002, CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.: *Annu Rev Immunol*, v. 20, p. 709-60.
- Kudo, T., A. Asao, and T. Tachibana, 1988, Highly efficient procedure for production of human monoclonal antibodies: establishment of hybrids between Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes and heteromyeloma cells by use of GIT culture medium.: *Tohoku J Exp Med*, v. 154, p. 345-55.
- Köhler, G., and C. Milstein, 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.: *Nature*, v. 256, p. 495-7.
- Lachmann, P. J., 1971, The purification of specific antibody as F(ab')₂ by the pepsin digestion of antigen-antibody precipitates, and its application to immunoglobulin and complement antigens.: *Immunochemistry*, v. 8, p. 81-8.
- Lagacé, J., and B. R. Brodeur, 1985, Parameters affecting in vitro immunization of human lymphocytes.: *J Immunol Methods*, v. 85, p. 127-36.
- Lai, H., M. Engle, A. Fuchs, T. Keller, S. Johnson, S. Gorlatov, M. S. Diamond, and Q. Chen, 2010, Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 2419-24.
- Larkin, E. A., B. G. Stiles, and R. G. Ulrich, 2010, Inhibition of toxic shock by human monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B: *PLoS One*, v. 5, p. e13253.
- Lazar, G. A., W. Dang, S. Karki, O. Vafa, J. S. Peng, L. Hyun, C. Chan, H. S. Chung, A. Eivazi, S. C. Yoder, J. Vielmetter, D. F. Carmichael, R. J. Hayes, and B. I. Dahiyat, 2006, Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 4005-10.
- Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier, 2003, *Staphylococcus aureus* and food poisoning.: *Genet Mol Res*, v. 2, p. 63-76.

- Ler, S. G., F. K. Lee, and P. Gopalakrishnakone, 2006, Trends in detection of warfare agents. Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin.: *J Chromatogr A*, v. 1133, p. 1-12.
- Lina, G., G. A. Bohach, S. P. Nair, K. Hiramatsu, E. Jouvin-Marche, R. Mariuzza, and I. N. C. f. S. Superantigens, 2004, Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*.: *J Infect Dis*, v. 189, p. 2334-6.
- Line, B. R., R. J. Breyer, K. D. McElvany, D. C. Earle, and M. B. Khazaeli, 2004, Evaluation of human anti-mouse antibody response in normal volunteers following repeated injections of fanolesomab (NeuroSpec), a murine anti-CD15 IgM monoclonal antibody for imaging infection.: *Nucl Med Commun*, v. 25, p. 807-11.
- Littlefield, J. W., 1964, SELECTION OF HYBRIDS FROM MATINGS OF FIBROBLASTS IN VITRO AND THEIR PRESUMED RECOMBINANTS, *Science*, p. 709-10.
- Lonberg, N., 2005, Human antibodies from transgenic animals.: *Nat Biotechnol*, v. 23, p. 1117-25.
- Lowy, F. D., 1998, *Staphylococcus aureus* infections.: *N Engl J Med*, v. 339, p. 520-32.
- Lucas, A. H., and D. C. Reason, 1999, Polysaccharide vaccines as probes of antibody repertoires in man: *Immunol Rev*, v. 171, p. 89-104.
- Léonetti, M., A. Gadzinski, and G. Moine, 2010, Cell surface heparan sulfate proteoglycans influence MHC class II-restricted antigen presentation.: *J Immunol*, v. 185, p. 3847-56.
- Léonetti, M., R. Thai, J. Cotton, S. Leroy, P. Drevet, F. Ducancel, J. C. Boulain, and A. Ménez, 1998, Increasing immunogenicity of antigens fused to Ig-binding proteins by cell surface targeting.: *J Immunol*, v. 160, p. 3820-7.
- Mach, J. P., S. Carrel, C. Merenda, B. Sordat, and J. C. Cerottini, 1974, In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice.: *Nature*, v. 248, p. 704-6.
- Mach, J. P., J. F. Chatal, J. D. Lumbroso, F. Buchegger, M. Forni, J. Ritschard, C. Berche, J. Y. Douillard, S. Carrel, and M. Herlyn, 1983, Tumor localization in patients by radiolabeled monoclonal antibodies against colon carcinoma.: *Cancer Res*, v. 43, p. 5593-600.
- Mahant, N., P. D. Clouston, and I. T. Lorentz, 2000, The current use of botulinum toxin.: *J Clin Neurosci*, v. 7, p. 389-94.
- Marasco, W. A., and J. Sui, 2007, The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics.: *Nat Biotechnol*, v. 25, p. 1421-34.
- Mariuzza, R. A., S. E. Phillips, and R. J. Poljak, 1987, The structural basis of antigen-antibody recognition.: *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, v. 16, p. 139-59.
- Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths, and G. Winter, 1991, By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.: *J Mol Biol*, v. 222, p. 581-97.
- Marrack, P., M. Blackman, E. Kushnir, and J. Kappler, 1990, The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells.: *J Exp Med*, v. 171, p. 455-64.
- Matsumoto, S. E., M. Yamashita, Y. Katakura, E. Noguchi, Y. Aiba, A. Ichikawa, K. Teruya, and S. Shirahata, 2006, In vitro immunization can elicit the expansion of diverse repertoire of B cells from peripheral blood mononuclear cells: *Cytotechnology*, v. 52, p. 227-33.
- Mattix, M. E., R. E. Hunt, C. L. Wilhelmsen, A. J. Johnson, and W. B. Baze, 1995, Aerosolized staphylococcal enterotoxin B-induced pulmonary lesions in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Toxicol Pathol*, v. 23, p. 262-8.
- Maynard, J. A., C. B. Maassen, S. H. Leppla, K. Brasky, J. L. Patterson, B. L. Iverson, and G. Georgiou, 2002, Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity.: *Nat Biotechnol*, v. 20, p. 597-601.
- Mazuet, C., J. Dano, M. R. Popoff, C. Créminon, and H. Volland, 2010, Characterization of botulinum neurotoxin type A neutralizing monoclonal antibodies and influence of their half-lives on therapeutic activity: *PLoS One*, v. 5, p. e12416.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter, and D. J. Chiswell, 1990, Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains.: *Nature*, v. 348, p. 552-4.
- Mian, I. S., A. R. Bradwell, and A. J. Olson, 1991, Structure, function and properties of antibody binding sites.: *J Mol Biol*, v. 217, p. 133-51.
- Monday, S. R., and G. A. Bohach, 1999, Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates.: *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 3411-4.

- Moore, G. L., H. Chen, S. Karki, and G. A. Lazar, 2010, Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions.: *MAbs*, v. 2, p. 181-9.
- Morrison, S. L., M. J. Johnson, L. A. Herzenberg, and V. T. Oi, 1984, Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 81, p. 6851-5.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo, 2000, Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme.: *Cell*, v. 102, p. 553-63.
- Murphy, G. P., P. B. Snow, J. Brandt, A. Elgamal, and M. K. Brawer, 2000, Evaluation of prostate cancer patients receiving multiple staging tests, including ProstaScint scintiscans.: *Prostate*, v. 42, p. 145-9.
- Nechansky, A., 2010, HAHA--nothing to laugh about. Measuring the immunogenicity (human anti-human antibody response) induced by humanized monoclonal antibodies applying ELISA and SPR technology.: *J Pharm Biomed Anal*, v. 51, p. 252-4.
- Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch, 2008, Fcγ receptors as regulators of immune responses.: *Nat Rev Immunol*, v. 8, p. 34-47.
- Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch, 2010, Antibody-mediated modulation of immune responses.: *Immunol Rev*, v. 236, p. 265-75.
- Nowakowski, A., C. Wang, D. B. Powers, P. Amersdorfer, T. J. Smith, V. A. Montgomery, R. Sheridan, R. Blake, L. A. Smith, and J. D. Marks, 2002, Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 11346-50.
- O'Brien, S. M., H. Kantarjian, D. A. Thomas, F. J. Giles, E. J. Freireich, J. Cortes, S. Lerner, and M. J. Keating, 2001, Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia.: *J Clin Oncol*, v. 19, p. 2165-70.
- Okada, Y., 1962, Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation, *Exp Cell Res*, p. 98-107.
- Olivier, S., M. Jacoby, C. Brillon, S. Bouletreau, T. Mollet, O. Nerriere, A. Angel, S. Danet, B. Souttou, F. Guehenneux, L. Gauthier, M. Berthomé, H. Vié, N. Beltraminelli, and M. Mehtali, 2010, EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity.: *MAbs*, v. 2.
- Olivier, S., and M. Mehtali, 2009, [Alternative production systems for therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1163-8.
- Olsson, L., H. Kronstrøm, A. Cambon-De Mouzon, C. Honsik, T. Brodin, and B. Jakobsen, 1983, Antibody producing human-human hybridomas. I. Technical aspects.: *J Immunol Methods*, v. 61, p. 17-32.
- Paizi, M., D. Zivion, and G. Spira, 1995, Use of mutagens to increase rate of immunoglobulin isotype switching of hybridoma cells: *Hybridoma*, v. 14, p. 85-90.
- Pallardy, M., 2009, [Toxic effects and use of therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1130-4.
- Papageorgiou, A. C., and K. R. Acharya, 2000, Microbial superantigens: from structure to function.: *Trends Microbiol*, v. 8, p. 369-75.
- Papageorgiou, A. C., H. S. Tranter, and K. R. Acharya, 1998, Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors.: *J Mol Biol*, v. 277, p. 61-79.
- Pape, K. A., D. M. Catron, A. A. Itano, and M. K. Jenkins, 2007, The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles: *Immunity*, v. 26, p. 491-502.
- Pinkas, L., P. D. Robins, L. A. Forstrom, D. W. Mahoney, and B. P. Mullan, 1999, Clinical experience with radiolabelled monoclonal antibodies in the detection of colorectal and ovarian carcinoma recurrence and review of the literature.: *Nucl Med Commun*, v. 20, p. 689-96.
- Plotkin, S. A., 2008, Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity: *Clin Infect Dis*, v. 47, p. 401-9.

- Pocsfalvi, G., G. Cacace, M. Cuccurullo, G. Serluca, A. Sorrentino, G. Schlosser, G. Blaiotta, and A. Malorni, 2008, Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains.: *Proteomics*, v. 8, p. 2462-76.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler, 1998, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene.: *Science*, v. 282, p. 2085-8.
- Poras, H., T. Ouimet, S. V. Orng, M. C. Fournié-Zaluski, M. R. Popoff, and B. P. Roques, 2009, Detection and quantification of botulinum neurotoxin type a by a novel rapid in vitro fluorimetric assay.: *Appl Environ Microbiol*, v. 75, p. 4382-90.
- Porter, R. R., 1950a, A chemical study of rabbit antiovalbumin, *Biochem J*, p. 473-8.
- Porter, R. R., 1950b, The formation of a specific inhibitor by hydrolysis of rabbit antiovalbumin, *Biochem J*, p. 479-84.
- Potter, M. C. R. B., 1962, Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants, *Nature*, p. 1086-7.
- Poulain, B., and Y. Humeau, 2003, [Mode of action of botulinum neurotoxin: pathological, cellular and molecular aspect]. *Ann Readapt Med Phys*, v. 46, p. 265-75.
- Primus, F. J., R. H. Wang, D. M. Goldenberg, and H. J. Hansen, 1973, Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen.: *Cancer Res*, v. 33, p. 2977-82.
- Ptak, R. G., W. Fu, B. E. Sanders-Bear, J. E. Dickerson, J. W. Pinney, D. L. Robertson, M. N. Rozanov, K. S. Katz, D. R. Maglott, K. D. Pruitt, and C. W. Dieffenbach, 2008, Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 24, p. 1497-502.
- Pène, J., J. F. Gauchat, S. Lécart, E. Drouet, P. Guglielmi, V. Boulay, A. Delwail, D. Foster, J. C. Lecron, and H. Yssel, 2004, Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells: *J Immunol*, v. 172, p. 5154-7.
- Reichert, J. M., 2011, Antibody-based therapeutics to watch in 2011.: *MAbs*, v. 3, p. 76-99.
- Reichert, J. M., A. Beck, and H. Iyer, 2009, European Medicines Agency workshop on biosimilar monoclonal antibodies: July 2, 2009, London, UK.: *MAbs*, v. 1, p. 394-416.
- Reichert, J. M., C. J. Rosensweig, L. B. Faden, and M. C. Dewitz, 2005, Monoclonal antibody successes in the clinic.: *Nat Biotechnol*, v. 23, p. 1073-8.
- Roder, J. C., S. P. Cole, and D. Kozbor, 1986, The EBV-hybridoma technique: *Methods Enzymol*, v. 121, p. 140-67.
- Roguska, M. A., J. T. Pedersen, C. A. Keddy, A. H. Henry, S. J. Searle, J. M. Lambert, V. S. Goldmacher, W. A. Blättler, A. R. Rees, and B. C. Guild, 1994, Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 969-73.
- Rossi, S., L. Laurino, A. Furlanetto, S. Chinellato, E. Orvieto, F. Canal, F. Facchetti, and A. P. Dei Tos, 2005, Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies.: *Am J Clin Pathol*, v. 124, p. 295-302.
- Rosén, A., and G. Klein, 1983, UV light-induced immunoglobulin heavy-chain class switch in a human lymphoblastoid cell line: *Nature*, v. 306, p. 189-90.
- Rousseaux, J., R. Rousseaux-Prevost, and H. Bazin, 1986, Optimal conditions for the preparation of proteolytic fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses.: *Methods Enzymol*, v. 121, p. 663-9.
- Rusnak, J. M., M. Kortepeter, R. Ulrich, M. Poli, and E. Boudreau, 2004, Laboratory exposures to staphylococcal enterotoxin B.: *Emerg Infect Dis*, v. 10, p. 1544-9.
- Sarda, L., P. Colin, F. Boccara, D. Daou, R. Lebtahi, M. Faraggi, C. Nguyen, A. Cohen, M. S. Slama, P. G. Steg, and D. Le Guludec, 2001, Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms.: *J Am Coll Cardiol*, v. 37, p. 786-92.
- Sarnovsky, R., T. Tendler, M. Makowski, M. Kiley, A. Antignani, R. Traini, J. Zhang, R. Hassan, and D. J. FitzGerald, 2010, Initial characterization of an immunotoxin constructed from domains II and III of cholera exotoxin.: *Cancer Immunol Immunother*, v. 59, p. 737-46.

- Schaaper, R. M., 1988, Mechanisms of mutagenesis in the *Escherichia coli* mutator mutD5: role of DNA mismatch repair: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 8126-30.
- Schroeder, H. W., and L. Cavacini, 2010, Structure and function of immunoglobulins.: *J Allergy Clin Immunol*, v. 125, p. S41-52.
- Schroff, R. W., K. A. Foon, S. M. Beatty, R. K. Oldham, and A. C. Morgan, 1985, Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy.: *Cancer Res*, v. 45, p. 879-85.
- Schwaber, J., and E. P. Cohen, 1973, Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types.: *Nature*, v. 244, p. 444-7.
- Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox, and L. G. Presta, 2001, High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R.: *J Biol Chem*, v. 276, p. 6591-604.
- Shim, S. Y., Y. Katakura, A. Ichikawa, K. Teruya, T. Matsuda, and S. Shirahata, 2001, Epitope analysis of human monoclonal antibody specific for rice allergenic protein generated by in vitro immunization.: *Cytotechnology*, v. 36, p. 109-15.
- Shinkawa, T., K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, and K. Shitara, 2003, The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity.: *J Biol Chem*, v. 278, p. 3466-73.
- Siberil, S., C. A. Dutertre, C. Boix, and J. L. Teillaud, 2005, [Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes]. *Transfus Clin Biol*, v. 12, p. 114-22.
- Simmons, C. P., N. L. Bernasconi, A. L. Suguitan, K. Mills, J. M. Ward, N. V. Chau, T. T. Hien, F. Sallusto, d. Q. Ha, J. Farrar, M. D. de Jong, A. Lanzavecchia, and K. Subbarao, 2007, Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza.: *PLoS Med*, v. 4, p. e178.
- Smolens, J., A. B. Vogt, M. N. Crawford & J. Stokes, 1961, The persistence in the human circulation of horse and human tetanus antitoxins, *J Pediatr*, p. 899-902.
- Spieker-Polet, H., P. Sethupathi, P. C. Yam, and K. L. Knight, 1995, Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 9348-52.
- Spira, G., M. Paizi, S. Mazar, G. Nussbaum, S. Mukherjee, and A. Casadevall, 1996, Generation of biologically active anti-*Cryptococcus neoformans* IgG, IgE and IgA isotype switch variant antibodies by acridine orange mutagenesis: *Clin Exp Immunol*, v. 105, p. 436-42.
- Steinitz, M., 2009, Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments.: *Hum Antibodies*, v. 18, p. 1-10.
- Steinitz, M., S. Koskimies, G. Klein, and O. Mäkelä, 1979, Establishment of specific antibody producing human lines by antigen preselection and Epstein-Barr virus (EBV)-transformation.: *J Clin Lab Immunol*, v. 2, p. 1-7.
- Stiles, B. G., A. R. Garza, R. G. Ulrich, and J. W. Boles, 2001, Mucosal vaccination with recombinantly attenuated staphylococcal enterotoxin B and protection in a murine model.: *Infect Immun*, v. 69, p. 2031-6.
- Stone, K. D., C. Prussin, and D. D. Metcalfe, 2010, IgE, mast cells, basophils, and eosinophils.: *J Allergy Clin Immunol*, v. 125, p. S73-80.
- Straka, M. R., J. M. Joyce, and D. T. Myers, 2000, Tc-99m nofetumomab merpentan complements an equivocal bone scan for detecting skeletal metastatic disease from lung cancer.: *Clin Nucl Med*, v. 25, p. 54-5.
- Strohl, W. R., 2009, Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies.: *Curr Opin Biotechnol*, v. 20, p. 685-91.
- Sugiyama, H., 1980, Clostridium botulinum neurotoxin.: *Microbiol Rev*, v. 44, p. 419-48.
- Tacket, C. O., W. X. Shandera, J. M. Mann, N. T. Hargrett, and P. A. Blake, 1984, Equine antitoxin use and other factors that predict outcome in type A foodborne botulism.: *Am J Med*, v. 76, p. 794-8.

- Tang, B., S. Yu, M. Zheng, F. Ding, R. Zhao, J. Zhao, Y. Dai, and N. Li, 2008, High level expression of a functional human/mouse chimeric anti-CD20 monoclonal antibody in milk of transgenic mice.: *Transgenic Res*, v. 17, p. 727-32.
- Teeling, J. L., R. R. French, M. S. Cragg, J. van den Brakel, M. Pluyter, H. Huang, C. Chan, P. W. Parren, C. E. Hack, M. Dechant, T. Valerius, J. G. van de Winkel, and M. J. Glennie, 2004, Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas.: *Blood*, v. 104, p. 1793-800.
- Thiele, D. L., M. Kurosaka, and P. E. Lipsky, 1983, Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester.: *J Immunol*, v. 131, p. 2282-90.
- Tilahun, M. E., A. Kwan, K. Natarajan, M. Quinn, A. Y. Tilahun, C. Xie, D. H. Margulies, B. A. Osborne, R. A. Goldsby, and G. Rajagopalan, 2011, Chimeric anti-staphylococcal enterotoxin B antibodies and lovastatin act synergistically to provide in vivo protection against lethal doses of SEB.: *PLoS One*, v. 6, p. e27203.
- Tomimatsu, K., S. E. Matsumoto, M. Yamashita, K. Teruya, Y. Katakura, S. Kabayama, and S. Shirahata, 2009, Production of human monoclonal antibodies against Fc(epsilon)RI(alpha) by a method combining in vitro immunization with phage display: *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 73, p. 1465-9.
- Torres, M., R. May, M. D. Scharff, and A. Casadevall, 2005, Variable-region-identical antibodies differing in isotype demonstrate differences in fine specificity and idiotype.: *J Immunol*, v. 174, p. 2132-42.
- Traggiai, E., S. Becker, K. Subbarao, L. Kolesnikova, Y. Uematsu, M. R. Gismondo, B. R. Murphy, R. Rappuoli, and A. Lanzavecchia, 2004, An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus.: *Nat Med*, v. 10, p. 871-5.
- Turbant, S., F. Martinon, G. Moine, R. Le Grand, and M. Léonetti, 2009, Cynomolgus macaques immunized with two HIV-1 Tat stabilized proteins raise strong and long-lasting immune responses with a pattern of Th1/Th2 response differing from that in mice: *Vaccine*, v. 27, p. 5349-56.
- Tähtinen, M., A. Ranki, S. L. Valle, V. Ovod, and K. Krohn, 1997, B-cell epitopes in HIV-1 Tat and Rev proteins colocalize with T-cell epitopes and with functional domains: *Biomed Pharmacother*, v. 51, p. 480-7.
- Ulrich, R. G., S. Bavari, and M. A. Olson, 1995, Bacterial superantigens in human disease: structure, function and diversity.: *Trends Microbiol*, v. 3, p. 463-8.
- Ulrich, R. G., M. A. Olson, and S. Bavari, 1998, Development of engineered vaccines effective against structurally related bacterial superantigens.: *Vaccine*, v. 16, p. 1857-64.
- Uthoff, S., and T. Böldicke, 1993, In vitro immunization of mouse spleen cells for the production of monoclonal IgG1 antibodies using an antigen-specific T helper cell clone (D.10.G4.1). *J Immunol Methods*, v. 166, p. 165-75.
- van Berkel, P. H., J. Gerritsen, E. van Voskuilen, G. Perdok, T. Vink, J. G. van de Winkel, and P. W. Parren, 2010, Rapid production of recombinant human IgG With improved ADCC effector function in a transient expression system.: *Biotechnol Bioeng*, v. 105, p. 350-7.
- Van den Bussche, R. A., J. D. Lyon, and G. A. Bohach, 1993, Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family.: *Mol Phylogenet Evol*, v. 2, p. 281-92.
- van Loghem, E., and S. D. Litwin, 1972, Antigenic determinants on immunoglobulins of nonhuman primates.: *Transplant Proc*, v. 4, p. 129-35.
- Volkman, D. J., S. P. Allyn, and A. S. Fauci, 1982, Antigen-induced in vitro antibody production in humans: tetanus toxoid-specific antibody synthesis.: *J Immunol*, v. 129, p. 107-12.
- Ward, E. S., and V. Ghetie, 1995, The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy.: *Ther Immunol*, v. 2, p. 77-94.
- Ward, E. S., J. Zhou, V. Ghetie, and R. J. Ober, 2003, Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans.: *Int Immunol*, v. 15, p. 187-95.
- Ward, M., C. Lin, D. C. Victoria, B. P. Fox, J. A. Fox, D. L. Wong, H. J. Meerman, J. P. Pucci, R. B. Fong, M. H. Heng, N. Tsurushita, C. Gieswein, M. Park, and H. Wang, 2004, Characterization

- of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*.: *Appl Environ Microbiol*, v. 70, p. 2567-76.
- Waterhouse, P., A. D. Griffiths, K. S. Johnson, and G. Winter, 1993, Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires: *Nucleic Acids Res*, v. 21, p. 2265-6.
- Wohlfarth, K., K. Kampe, and H. Bigalke, 2004, Pharmacokinetic properties of different formulations of botulinum neurotoxin type A.: *Mov Disord*, v. 19 Suppl 8, p. S65-7.
- Wohlleben, G., D. Gray, and A. Schimpl, 1996, In vitro immunization of naive mouse B cells: establishment of IgM secreting hybridomas specific for soluble protein or hapten from B cells cultured on CD40 ligand transfected mouse fibroblasts.: *Int Immunol*, v. 8, p. 343-9.
- Woodruff, B. A., P. M. Griffin, L. M. McCroskey, J. F. Smart, R. B. Wainwright, R. G. Bryant, L. C. Hutwagner, and C. L. Hatheway, 1992, Clinical and laboratory comparison of botulism from toxin types A, B, and E in the United States, 1975-1988.: *J Infect Dis*, v. 166, p. 1281-6.
- Wurch, T., P. Lowe, A. Beck, and N. Corvaia, 2009, [Protein scaffolds as alternatives to whole antibodies: from discovery research to clinical development]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1169-72.
- Yamashita, M., Y. Katakura, S. Y. Shim, S. E. Matsumoto, T. Tamura, K. Morihara, Y. Aiba, K. Teruya, T. Tsuchiya, and S. Shirahata, 2002, Different individual immune responses elicited by in vitro immunization: *Cytotechnology*, v. 40, p. 161-5.
- Yguerabide, J., H. F. Epstein, and L. Stryer, 1970, Segmental flexibility in an antibody molecule.: *J Mol Biol*, v. 51, p. 573-90.
- Yu, X., T. Tsibane, P. A. McGraw, F. S. House, C. J. Keefer, M. D. Hicar, T. M. Tumpey, C. Pappas, L. A. Perrone, O. Martinez, J. Stevens, I. A. Wilson, P. V. Aguilar, E. L. Altschuler, C. F. Basler, and J. E. Crowe, 2008, Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors.: *Nature*, v. 455, p. 532-6.
- Zafiroopoulos, A., E. Andersson, E. Krambovitis, and C. A. Borrebaeck, 1997, Induction of antigen-specific isotype switching by in vitro immunization of human naive B lymphocytes: *J Immunol Methods*, v. 200, p. 181-90.
- Zafiroopoulos, A., M. Kandilogiannaki, C. Dahlenborg, C. A. Borrebaeck, and E. Krambovitis, 2000, In vitro induction of somatic mutations in human peripheral B lymphocytes: *Int J Mol Med*, v. 6, p. 475-84.
- Zhou, J., K. R. Lottenbach, S. J. Barenkamp, and D. C. Reason, 2004, Somatic hypermutation and diverse immunoglobulin gene usage in the human antibody response to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 6B: *Infect Immun*, v. 72, p. 3505-14.

NOUVELLES APPROCHES METHODOLOGIQUES POUR L'OBTENTION D'ANTICORPS HUMAINS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux représentent aujourd'hui un outil de choix en thérapeutique et en diagnostic. Les anticorps thérapeutiques sont des biomédicaments en plein essor depuis les années 1970 et représentent 10% du marché des produits pharmaceutiques. Les anticorps monoclonaux sont utilisés dans divers domaines : en cancérologie, pour lutter contre les maladies auto-immunes ou en infectiologie. Le nombre des anticorps monoclonaux en développement ne cesse d'augmenter. Les premiers anticorps monoclonaux utilisés en thérapie étaient d'origine murine et leur administration à l'Homme est susceptible de déclencher des effets secondaires. De nouveaux anticorps visant à limiter voir faire disparaître ces effets indésirables tels que d'abord les anticorps chimériques, puis les anticorps humanisés et enfin les anticorps totalement humains ont été développés. Parmi ces anticorps, les anticorps totalement humains sont théoriquement « transparents » pour le système immunitaire. 9 anticorps totalement humains sont actuellement sur le marché et d'autres sont en cours de développement. Le phage display, les souris transgéniques et l'utilisation de lymphocytes B humains sont les trois stratégies mises en œuvre pour produire des anticorps totalement humains. La majorité des anticorps humains existant sur le marché sont issus du phage display et des souris transgéniques. L'utilisation des lymphocytes B humains, peu étudiée à cause d'un faible rendement et de problèmes de stabilité, a connu ces dernières années un regain d'intérêt grâce à l'immortalisation virale par le virus Epstein-Barr et à la découverte de myélomes humains. Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse a été la production d'anticorps monoclonaux humains à partir de lymphocytes B humains.

Pour ce faire, deux approches basées sur l'immortalisation virale par le virus Epstein-Barr couplée ou non à une immortalisation cellulaire par des myélomes ont été mises en œuvre. La première approche utilise des lymphocytes B mémoires isolés de sang périphérique de donneurs infectés ou vaccinés. L'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB) a été utilisée comme modèle. La transformation des lymphocytes B mémoires par le virus Epstein-Barr a permis la génération de 6 lignées de lymphocytes B immortalisés produisant des IgGs anti-SEB. Après différentes tentatives d'immortalisation cellulaire avec des myélomes murins, l'immortalisation avec un hétéromyélome humain-murineur HM a permis d'obtenir un hybridome, qui malheureusement perdu sa capacité de production d'IgGs anti-SEB.

La deuxième approche implique une immunisation *in vitro* de lymphocytes B naïfs extraits de sang périphérique. Cette stratégie pourrait permettre la production d'anticorps humains contre des antigènes pour lesquels il n'existe pas de donneurs infectés ou vaccinés. Deux modèles, le peptide N-terminal de la neurotoxine A de *Clostridium Botulinum* A (BoNT/A) et la protéine de fusion ZZTat101, comportant le domaine ZZ de *Staphylococcus aureus* lié covalamment à la protéine transactivatrice Tat du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1, ont été employés. Les monocytes, les lymphocytes B et lymphocytes T CD4 ont été isolés après déplétion des Natural Killer NK et utilisés pour mettre en place deux systèmes d'immunisation *in vitro* efficaces. Nous avons réussi à obtenir des IgMs dirigés contre la neurotoxine *Clostridium Botulinum* A, ainsi que des IgMs (et peut-être des IgGs) dirigés contre la protéine Tat. L'immortalisation par Epstein-Barr, nous a permis d'isoler 7 lignées de lymphocytes immortalisés sécrétant des anticorps IgMs anti-TBA-Nter humains. Malheureusement après l'immortalisation avec l'hétéromyélome humain-murineur HM, aucun hybridome sécrétant d'anticorps dirigés contre *Clostridium Botulinum* A ou Tat n'a pu être obtenu. Ces résultats confirment les problèmes de rendement faible et de perte de capacité de sécrétion en anticorps rapportés par la littérature. L'immunisation *in vitro* produisant essentiellement des IgMs, la possible production d'IgGs après stimulation par la protéine ZZTat101 se révèle un résultat très intéressant. Nous avons montré que la production d'anticorps par ZZTat101 impliquait les 7 cystéines, la région 22-57 et la liaison aux héparanes sulfates de Tat. Les résultats obtenus avec ZZTat101 nécessitent d'être confirmés et approfondis. Il faudra évaluer la capacité de transfert de la production en anticorps de ZZTat101 à d'autres antigènes ce qui ferait de ZZTat101 un outil très intéressant pour l'immunisation *in vitro* et pour la vaccinologie.

NEW METHODS TO PRODUCE HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES

The number of monoclonal antibodies used as drug or under clinical investigation increases rapidly. The first murine monoclonal antibodies (mAbs) used in therapy induces human anti-mouse antibodies (HAMAs) when administered to patients. Such HAMAs hamper the therapeutic efficacy of mAbs and induce side effects. To limit these effects, new antibodies were developed during the, last 30 years. Chimeric, humanized and fully human antibodies were engineered. The use of human monoclonal antibodies (hAbs) appears ideal to solve the problem of HAMAs. Nowadays 9 fully human antibodies are available and others are evaluated in clinical trials or currently investigated in research labs. Three methods exist to produce fully human antibodies: the phage display, the transgenic mice and the use of human B lymphocytes. The majority of fully human antibodies resulted from the phage display and the transgenic mice methods. The use of human B lymphocytes is less investigated due to a poor yield and stability problems. These last years, the immortalization process, thanks to the involvement of the Epstein-Barr virus and human myeloma, induced a rise of interest for human B lymphocytes. In this context we decided to develop fully human monoclonal antibodies using human B lymphocytes through immortalization using the Epstein-Barr virus followed or not by an immortalization with a human/mouse heteromyeloma HM. The first approach is based on hAbs production from peripheral blood memory B lymphocytes isolated from infected or vaccinated donors. The *Staphylococcus aureus* enterotoxine B (SEB) was used as a model. Memory B lymphocytes were purified and cultured in the presence of Epstein-Barr virus (EBV). The transformation of memory B lymphocytes by EBV allowed the generation of immortalized B lymphocytes lines producing IgGs antibodies directed against SEB. We succeeded in isolating 6 EBV-immortalized memory B lymphocytes lines secreting anti-SEB IgGs antibodies. After many attempts to immortalize EBV immortalized memory B lymphocytes lines secreting anti-SEB antibodies with myeloma, the fusion of a EBV immortalized memory B lymphocytes with the human/mouse heteromyeloma HM led to an hybridoma. Unfortunately this hybridoma has rapidly lost its capacity to secrete d'IgGs anti-SEB. In the second approach the hAbs production implies the *in vitro* immunization of peripheral blood naïve lymphocytes. This strategy could allow the hAbs production against antigens for which no infected or vaccinated donors may be available. The *Clostridium Botulinum* neurotoxin A (BoNT/A), the most powerful toxin, and its N-terminal peptide (TBA-Nter) or the fusion protein ZZTat101 were used as models. ZZTat101 is a fusion between the ZZ domain of *Staphylococcus aureus* and the Tat protein of the human immunodeficiency virus HIV-1. Monocytes, B lymphocytes and T lymphocytes were isolated from human PBMC depleted of Natural killer. These cells were tools to develop efficient *in vitro* immunization protocols. IgMs directed against TBA-Nter and also IgMs (and possibly IgGs) directed against Tat were obtained. The use of the Epstein-Barr virus induced 7 EBV immortalized lines secreting anti-TBA-Nter IgMs antibodies. Unfortunately, after fusion with the heteromyeloma HM no hybridoma was isolated against TBA-Nter and Tat. The ZZTat101 mechanism involved on humoral response was studied, showing that the 7 cysteines, the region 22-57 and the ability of Tat to bind heparane sulfate are necessary to trigger the humoral response.

Laboratoire de rattachement

CEA Saclay, DSV/iBiTec-S/SPI
Laboratoire d'études et de Recherche en Immunoanalyse (LERI)
91191 GIF-SUR-YVETTE Cédex

Ecole Doctorale : Innovation thérapeutique

POLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES
UNIVERSITÉ PARIS-SUD
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE
CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex