

N° d'ordre : 982

50376
1982
253

Université des Sciences et
Techniques de Lille

50376
1982
253

THESE

présentée à l'Université de Lille I pour obtenir le titre de
Docteur de 3ème Cycle en Biochimie

par

Jean Marie GRZYCH

PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX CONTRE SCHISTOSOMA MANSONI
ÉTUDE DE LEURS ACTIVITÉS BIOLOGIQUES.



Présenté le 30 juin 1982 devant la commission d'examen.

Membres du Jury : Président : M. J. MONTREUIL
Rapporteur : M. A. CAPRON
Examineurs : Melle G. SPIK
M. H. BAZIN
M. J.P. DESSAINT

030 040008

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires du
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Lille (Institut
Pasteur, INSERM U 167, CNRS ERA 422) sous la direction du Professeur
André CAPRON.

Ce travail a contribué aux communications et publications suivantes :

- VERWAERDE, C., GRZYCH, J.M., BAZIN, H., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1979) Production d'anticorps monoclonaux anti Schistosoma mansoni. Etude préliminaire de leurs activités biologiques. C.R. Acad. Sci. Paris, 289, 7250.
- VERWAERDE, C., GRZYCH, J.M., BAZIN, H., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1979) Production of monoclonal antibodies against Schistosoma mansoni. Preliminary studies on their biological activities. WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Lausanne, Switzerland, October 1979, p. 139-145.
- BAZIN, H., GRZYCH, J.M., VERWAERDE, C. & CAPRON, A. (1980) A LOU rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas Ann. Immunol., 131D, 359.
- GRZYCH, J.M., CAPRON, M., VERWAERDE, C., NOGUEIRA-QUEIROZ, A.J., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1981) Monoclonal anti-S. mansoni antibodies. A summary of recent progresses. WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Singapur, October 1981, sous presse.
- GRZYCH, J.M., CAPRON, M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1982) In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. J. Immunol., soumis pour publication.
- DISSOUS, C., GRZYCH, J.M. & CAPRON, A. (1982) Schistosoma mansoni surface antigene defined by a rat protective monoclonal IgG2a. J. Immunol., soumis pour publication.

RESUME

Notre travail avait pour but la production d'anticorps monoclonaux anti-S. mansoni et l'étude de leurs activités biologiques tant in vitro qu'in vivo. Nous avons pour cela envisagé successivement deux systèmes de fusion cellulaire, l'un hétérologue utilisant des cellules myélomateuses de souris Balb/C et des cellules spléniques de rat Fischer infecté par S. mansoni, l'autre homologue conduisant à la formation d'hybrides issues de la fusion de cellules myélomateuses de rat LOU et de cellules spléniques de rat LOU infecté par S. mansoni ou immunisé par une fraction semi-purifiée de glycoprotéine isolée du parasite adulte.

Le système d'hybridation hétérologue nous a permis d'isoler 91 populations cellulaires hybrides productrices d'anticorps anti-S. mansoni décelables par la technique d'immunofluorescence indirecte. L'étude des surnageants de culture de ces hybrides hétérologues dans les systèmes de cytotoxicité en présence de complément ou d'éosinophiles a conduit à l'identification de 17 surnageants induisant vis-à-vis du schistosomule une cytotoxicité dépendante de l'éosinophile comparable à celle décrite pour les sérums d'animaux infectés par S. mansoni et de 8 surnageants manifestant une activité létale significative en présence de complément. L'étude plus particulière d'un clone cellulaire producteur d'anticorps anti-S. mansoni a permis la mise en évidence d'un mécanisme particulier de cytotoxicité faisant intervenir le complément et un anticorps de classe IgM doté d'autre part d'une activité protectrice vis-à-vis de l'infection par S. mansoni.

Dans le système d'hybridation homologuée, deux clones cellulaires hybrides ont été particulièrement étudiés. Il s'agit d'un clone cellulaire sécrétant un anticorps monoclonal de classe IgG2a et d'un clone cellulaire hybride synthétisant un anticorps monoclonal de classe IgG2c. L'étude des propriétés biologiques de l'anticorps monoclonal de classe IgG2a a révélé une activité cytotoxique dépendante d'éosinophiles similaire à celle décrite pour les anticorps présents dans le sérum des rats infectés depuis 4 semaines par S. mansoni. Cet anticorps monoclonal de classe IgG2a permet, d'autre part, l'induction d'un degré de résistance significatif vis-à-vis de l'infection expérimentale du rat par S. mansoni. L'anticorps de classe IgG2c exprime une activité inhibitrice à l'encontre de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles portée par l'anticorps monoclonal de classe IgG2a.

L'abondance du matériel monoclonal produit et son extrême spécificité vis-à-vis de S. mansoni a permis une approche de la réelle signification biologique des mécanismes effecteurs décrits in vitro dans l'établissement de l'immunité vis-à-vis de la schistosomiase expérimentale du rat.

MOTS-CLEFS

anticorps monoclonaux ; cellules myélomateuses, (souris Balb/c, rat LOU), cytotoxicité, éosinophile, hybridation cellulaire, immunité, lymphocytes B, Schistosoma mansoni, transfert passif d'anticorps.

TABLE DES MATIERES

	Page
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I : L'IMMUNITE DANS LA SCHISTOSOMIASE</u>	4
I - Mise en évidence	4
A - L'immunité naturelle	4
B - L'immunité acquise	4
II - Les mécanismes	5
A - <u>In vitro</u>	5
1 - L'immunité à médiation cellulaire	5
2 - L'immunité à médiation humorale	6
3 - Rôle des anticorps anaphylactiques	8
B - Approche <u>in vitro</u> de l'immunité	10
1 - Mécanisme de sérotoxicité : anticorps léthal	10
2 - Mécanisme de cytotoxicité dépendant du neutrophile	13
3 - Mécanisme de cytotoxicité dépendant de l'éosinophile	14
4 - Mécanisme de cytotoxicité dépendant du macrophage	18
a) Cytotoxicité liée aux immunoglobulines G	18
b) Cytotoxicité liée aux immunoglobulines E	18
5 - Rôle <u>in vivo</u> des mécanismes effecteurs	20
<u>CONCLUSION</u>	22

	Page
<u>CHAPITRE II : LA TECHNIQUE DE FUSION CELLULAIRE</u>	24
I - Définition	24
II - Découverte et évolution de la technique d'hybridation cellulaire	24
A- Découverte de l'hybridation cellulaire	24
B- Généralités sur le phénomène de fusion cellulaire	25
C- La sélection des hybrides	26
1. Système de sélection thermique	26
2. Système sélectif de LITTLEFIELD	26
D- Les agents fusogènes	27
1. Le virus Sendai inactivé	27
2. Les agents fusogènes chimiques	29
III - La stabilité des hybrides	30
IV - Le mécanisme de la fusion cellulaire	30
V - La fusion cellulaire et l'anticorps monoclonal	34
A- Introduction	34
B- Qu'est-ce qu'un anticorps monoclonal ?	34
C- Production d'anticorps monoclonaux.	35
1ère étape : fusion de deux cellules myéломateuses	35
2ème étape : immortalisation du génome B lymphocytaire	36
D- La fusion cellulaire	41
E- La sélection des hybrides	41
F- Le clonage	41
G- Production massive	42
1. La culture massive <u>in vitro</u>	42
2. Induction d'ascites <u>in vivo</u>	42

	Page
VI - Applications des anticorps monoclonaux	43
A- Les marqueurs de populations cellulaires	45
B- Les antigènes de différenciation cellulaire	45
C- Les antigènes ubiquitaires	45
D- Les antigènes tumoraux	45
E- Etude des antigènes parasitaires	46
F- Application pharmacologique	46
G- Application au diagnostic	47
<u>CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES</u>	48
I - Condition de culture	48
A- Les milieux de culture cellulaire	48
B- Utilisation des cellules nourricières	48
1. Nature des cellules nourricières	50
2. Préparation des cellules nourricières	50
II - Les lignées cellulaires myélomateuses	51
III - Les cellules immunes	51
A- Système d'infection expérimentale du rat	51
1. Entretien du cycle expérimental de <u>S. mansoni</u> dans le laboratoire	51
2. Infestation du rat	52
B- Le système d'immunisation	52
1. Préparation de l'antigène	52
2. Protocole d'immunisation	53
C- Préparation des cellules immunes	53
IV - La fusion cellulaire	54
A- Agent de fusion	54
B- Protocole	54
V - Sélection des hybrides	56
A- Principe	56
B - Protocole	56

	Page
VI - Le clonage	57
A- Principe	57
B- Protocole	57
VII - Production massive d'anticorps monoclonaux	58
A- Production <u>in vitro</u>	58
B- Production <u>in vivo</u>	58
VIII - Caractérisation de la production d'immunoglobulines	59
IX - Mise en évidence de la spécificité anti- <u>S. mansoni</u> des immunoglobulines produites	60
A- Principe de la réaction	60
B- Protocole	60
1. Préparation des coupes de schistosomules	60
2. Préparation des coupes de schistosomes adultes	61
3. La réaction d'immunofluorescence	63
4. Expression des résultats	64
X - Investigation de l'activité biologique des anticorps présentant une spécificité anti- <u>S. mansoni</u>	64
A- Etude de la sérotoxicité	64
1. Principe	64
2. Milieu de culture	65
3. Préparation des schistosomules	65
4. Source de complément	65
5. Réaction de sérotoxicité	65
6. Expression des résultats	67
B- Etude de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles	67
1. Milieu de culture	67
2. Préparation des cellules effectrices	68
3. Réaction de cytotoxicité	68
4. Expression des résultats	69

	Page
XI - Etude de l'activité protectrice des anticorps monoclonaux	69
A- Expériences de transfert passif de l'immunité	69
1. La perfusion de poumon	70
2. La perfusion de foie	70
B- Expression du pourcentage de protection	72
XIII - Purification des anticorps monoclonaux	72
A- Les anticorps de classe IgM	72
B- Les anticorps de classe IgG2a	72
C- Les anticorps de classe IgG2c	73
 <u>CHAPITRE IV : RESULTATS et DISCUSSION</u>	
I - Production d'anticorps anti- <u>Schistosoma mansoni</u>	75
A- Le système d'hybridation hétérologue : souris/rat	75
1. Cinétique de multiplication des populations cellulaires hybrides	75
2. Rendement et hybridation cellulaire	75
3. Etude de l'activité anti- <u>S. mansoni</u> , nature des isotypes exprimés	76
B- Le système d'hybridation homologue	76
1. La cinétique de multiplication cellulaire	82
2. Le rendement de fusion	82
3. Etude de l'activité anti- <u>S. mansoni</u> , nature des isotypes exprimés	83
C- Discussion	83
II - Première approche des activités biologiques des anticorps anti- <u>S. mansoni</u> produits par hybridation	85
A- Investigation de l'activité cytotoxique dépendante du complément	85
B- Etude de l'activité cytotoxique dépendante de l'éosinophile	88
C- Conclusion	89

	Page
III - Etude des activités biologiques de l'IgM monoclonale synthétisée par le clone A12-148	92
A- Aspect de la cytotoxicité dépendante du complément	93
B- Etude de l'activité protectrice <u>in vivo</u>	98
C- Discussion	100
IV - Etude de l'activité biologique <u>in vitro</u> et <u>in vivo</u> des anticorps monoclonaux de classe IgG2a	101
A- Etude de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile	101
B- Production massive d'IgG2a anti- <u>S. mansoni</u>	102
C- Etude de l'activité biologique de l'IgG2a monoclonale purifiée	103
D- Etude de la coopération cellulaire entre l'éosinophile et le mastocyte	103
E- Etude de l'activité protectrice de l'IgG2a monoclonale vis-à-vis de l'infection par <u>S. mansoni</u>	106
F- Discussion	112
V - Etude de l'activité biologique de l'IgG2c produite par le clone B32-9	114
A- Approche de l'activité "modulatrice" de l'IgG2c	115
B- Discussion	118
1. Au niveau du schistosomule	118
2. Au niveau de l'éosinophile	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

INTRODUCTION

La schistosomiase humaine essentiellement induite par trois espèces de vers trématodes du groupe des schistosomes : Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium et Schistosoma japonicum, pose au niveau mondial un grave problème de santé. 200 à 300 millions d'hommes sont infectés par ce parasite. Cette infection, comme toutes les maladies parasitaires, prend une connotation sociale et économique dans les pays où elle sévit car elle constitue une entrave au développement. La schistosomiase est connue en Egypte depuis près de 4000 ans mais paradoxalement au XXème siècle, les bouleversements écologiques imposés par la société industrielle (barrages, irrigation) favorisent la dissémination des vecteurs de ces maladies. Aussi, récemment, l'O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé) a mis l'accent sur la nécessité du développement des méthodes de prophylaxie et d'immunothérapie. La mise en oeuvre d'un tel programme nécessite dans un premier temps le développement des connaissances des mécanismes de l'infection parasitaire, comme celle des paramètres immunologiques conduisant à l'établissement de l'immunité. Outre l'aspect immunoprophylactique, l'étude immunologique des infections parasitaires se justifie d'un point de vue beaucoup plus fondamental.

Les vers adultes de S. mansoni vivent dans les veines mésentériques de l'hôte définitif (homme ou animaux de laboratoire). Les femelles pondent des oeufs qui traversent la barrière intestinale et sont éliminés par les selles. Au contact de l'eau, les oeufs libèrent une larve ciliée, le miracidium, qui infecte l'hôte intermédiaire, le planorbe. Le miracidium se développe dans l'hôte intermédiaire et donne naissance aux sporocystes qui par multiplications asexuées, conduisent à l'émission dans le milieu aquatique de furcocercaires, formes infestantes pour l'homme. L'infection cercarienne se fait par pénétration active, transcutanée. A ce stade, la cercaire se transforme en schistosome qui, par le courant sanguin, migre dans le poumon puis dans les veines mésentériques de l'hôte définitif. Les phases de migration s'accompagnent de la maturation des parasites. 30 jours après la pénétration cercarienne, la ponte

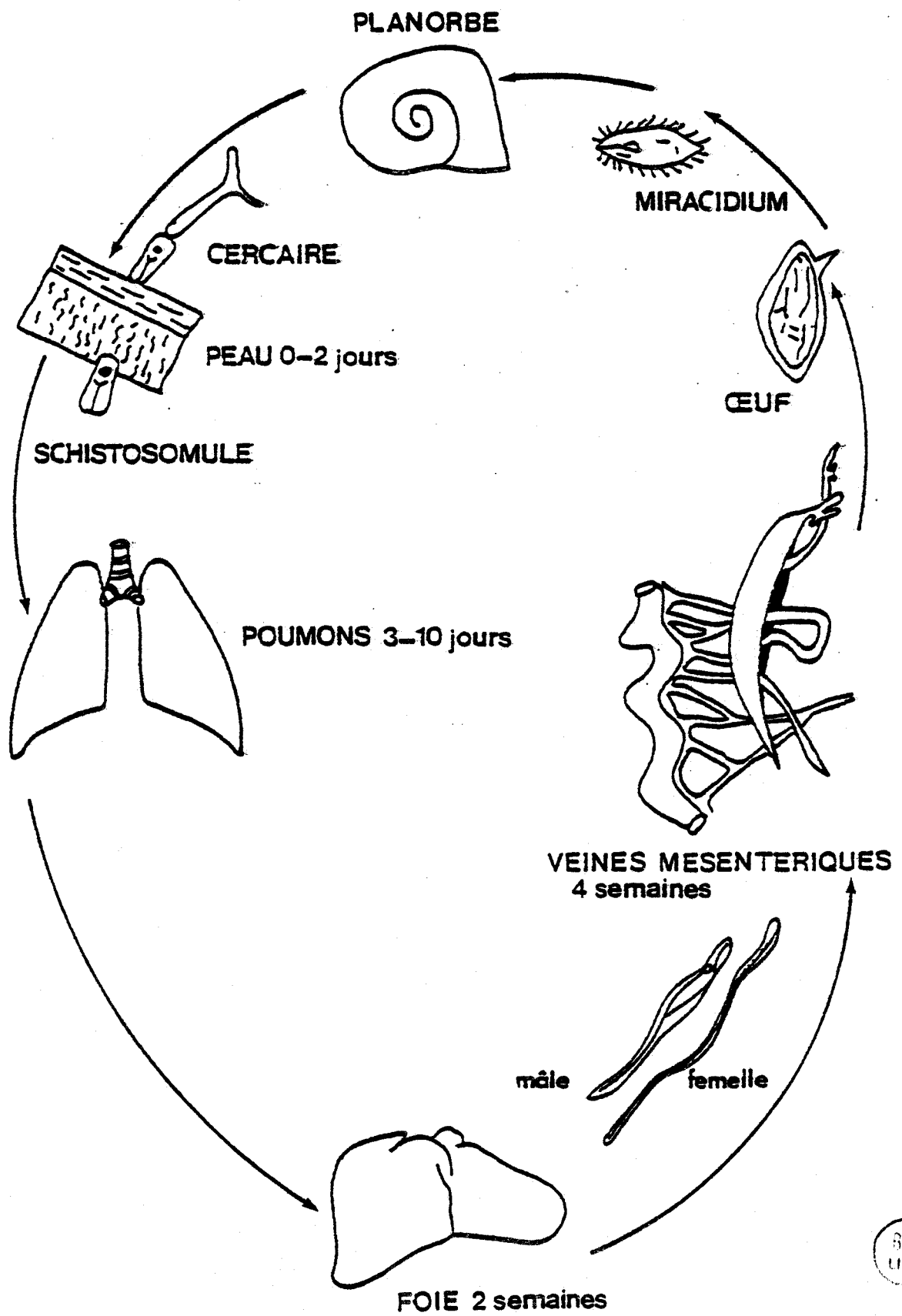
des oeufs débute, refermant ainsi le cycle parasitaire (Figure 1).

Contrairement aux observations effectuées dans l'infection virale ou bactérienne, l'immunité à la schistosomiase est longue à s'instaurer et n'induit pas une élimination totale de la population parasitaire de primo-infection. Cette immunité s'exerce par contre au niveau des stades larvaires, introduits chez l'hôte lors d'une infection ultérieure. Ce "statu quo" entre le parasite adulte et l'hôte qui permet une longue survie du parasite paraît paradoxal aux données de l'immunologie. Il pose le problème de la tolérance par l'organisme d'une quantité considérable d'antigènes bien que l'hôte exprime une puissante immunité dirigée contre le stade larvaire. L'étude de la survie parasitaire a permis l'explication du mécanisme par lequel le schistosome adulte élude la réponse immune. Le parasite acquiert très vite dans les quatre premiers jours suivant l'infection, des structures moléculaires voisines, voire même identiques à celles de l'hôte parasité ce qui le protège de l'action des mécanismes immuns. L'immunité à la schistosomiase se traduit donc en termes d'immunité à la réinfection dont la cible privilégiée est le schistosomule.

L'hôte élabore au cours de l'infection parasitaire divers mécanismes de défense faisant intervenir des facteurs humoraux et cellulaires agissant seuls ou en coopération et dont le rôle a été clairement établi in vitro mais reste hypothétique quant à son expression in vivo dans le cadre de la réponse immune. La compréhension de tels mécanismes comme la définition de leur contribution réelle à l'établissement d'une immunité acquise nécessite des sondes d'investigation de plus en plus fines et de plus en plus sélectives. Les travaux initiaux de KÖHLER et MILSTEIN (1975-1976) nous ont fourni l'opportunité d'élaborer grâce à la technique de fusion cellulaire un outil spécifique à l'étude des fonctions immunes de certaines populations d'anticorps et à leur relation directe avec l'immunité acquise.

Nous avons donc dans un premier temps par la technique de fusion cellulaire produit des anticorps de spécificité restreinte vis-à-vis de Schistosoma mansoni, puis étudié dans les systèmes biologiques définis in vitro et in vivo leur contribution à l'expression de l'immunité anti-parasitaire.

FIGURE 1 : LE CYCLE PARASITAIRE DE SCHISTOSOMA MANSONI.



CHAPITRE.I.

L'IMMUNITÉ DANS LA SCHISTOSOMIASE

I. LA MISE EN EVIDENCE

L'immunité à la schistosomiase se présente sous deux aspects :

A. L'immunité naturelle

Elle traduit la résistance de l'hôte à une primo-infection parasitaire et s'exerce au niveau de la pénétration cercarienne, du développement et de la maturation du parasite (Revu par SMITHERS et TERRY, 1969a, 1976).

B. L'immunité acquise

Elle conduit à l'élaboration de populations cellulaires sensibilisées et d'anticorps dirigés contre le parasite. Cette immunité à l'encontre de l'immunité anti-virale ou anti-bactérienne, ne conduit pas à l'élimination totale de la population parasitaire de primo-infection, elle s'exerce au niveau des formes larvaires de réinfection. Ce phénomène immunitaire très particulier a été appelé par SMITHERS et TERRY (1969b) : Immunité concomitante.

L'immunité se traduit donc de fait en termes d'immunité à la réinfection, par exemple chez le singe Rhésus (NAIMARK et coll., 1960 ; RITCHIE et coll., 1966 ; SMITHERS et TERRY, 1965a ; SMITHERS, 1967), chez le rat (SMITHERS et TERRY, 1965b ; MADISSON et Coll., 1970) et chez la souris (SHER et coll., 1974 b).

Parmi ces différents systèmes expérimentaux, il faut souligner l'aspect particulier de la schistosomiase du rat qui rejette spontanément la population parasitaire qu'il héberge entre la 3ème et la 4ème semaine d'infection. Ce rejet est suivie d'une phase d'immunité à la réinfection (CAPRON-DUPONT, 1974), tandis qu'au niveau sérique s'expriment différents mécanismes effecteurs dirigés contre les formes larvaires du parasite.

II. LES MECANISMES

A. In vivo

Les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis de S. mansoni font intervenir soit des populations cellulaires sensibilisées (immunité à médiation cellulaire), soit des anticorps spécifiques (immunité à médiation humorale).

I. L'Immunité à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire s'exprime différemment en fonction de l'hôte considéré. De nombreuses réactions témoignent de la participation cellulaire dans la défense de l'hôte vis-à-vis de l'infection parasitaire. Au niveau de l'épiderme, la pénétration cercarienne induit un afflux de leucocytes polynucléaires et de macrophages ; au niveau pulmonaire chez l'animal immun, une intense réaction inflammatoire se développe autour du schistosomule (VON LICHTENBERG et RITCHIE 1961).

Dans le cas particulier des hôtes permissifs (hôtes qui permettent la maturation parasitaire et la ponte des oeufs de schistosome), l'immunité à médiation cellulaire se traduit par la formation d'un granulome périovulaire (constitué essentiellement de leucocytes polynucléaires et de macrophages) causé par la libération dans les tissus d'antigène d'oeuf. La réaction de type granulome a été assimilée par WARREN et coll. (1967) à une manifestation d'hypersensibilité retardée transférable à un hôte sain par l'injection de cellules spléniques ou ganglionnaires d'un animal infecté. La formation du granulome est d'autre part inhibée par la thymectomie ou le traitement

par les sérums anti-lymphocytaires (DOMINGO et coll., 1967 ; DOMINGO et WARREN, 1968).

D'autres arguments en faveur de la participation des mécanismes cellulaires dans l'immunité vis-à-vis de la schistosomiase ont été apportés par les expériences de transfert de lymphocytes thymodépendants chez le rat (PHILLIPS et coll., 1975) ainsi que par les expériences d'infection de rats thymectomisés (CIOLI et coll., 1976).

Il semble donc que l'on puisse impliquer les populations cellulaires thymodépendantes, dans les mécanismes de défense de l'hôte, bien que les lymphocytes T d'animaux sensibilisés n'induisent in vitro aucune cytotoxicité significative de type CTL vis-à-vis du stade larvaire du schistosome (BUTTERWORTH et coll., 1979). Il paraît donc encore difficile de définir précisément l'incidence réelle de la composante cellulaire de l'immunité du fait de l'extrême complexité des paramètres mis en jeu. La participation thymique peut en effet faire intervenir directement les diverses sous-populations de lymphocytes T ainsi que d'autres éléments effecteurs de la réponse immune tels que les anticorps thymodépendants de classe IgE ou IgG2a.

2. L'immunité à médiation humorale

Les nombreuses méthodes de détection des anticorps spécifiques décrites depuis 1958 ont permis la mise en évidence des paramètres de la réaction humorale (KAGAN, 1958 ; CAPRON et coll., 1965, 1966, 1969, 1972 ; SMITHERS et TERRY, 1969a). Pourtant aucune corrélation n'a pu être établie entre le taux d'anticorps sériques et le statut immunologique de l'hôte infecté (NAIMARK, 1957 ; CAPRON et coll., 1967).

Par exemple le rat Sherman est immun dès la 2^{ème} semaine suivant l'infection alors que le maximum d'anticorps spécifiques est détecté à la 12^{ème} semaine (MADDISON et coll., 1970).

Les expériences de transferts passifs de l'immunité ont établi de façon indiscutable le rôle prépondérant des anticorps dans l'immunité vis-à-vis de S. mansoni. PEREZ (1974) démontre que l'activité protectrice du sérum de rat infecté est portée par la fraction G des immunoglobulines, SHER et coll. (1975; 1977) établissent la même corrélation chez la souris. PHILLIPS et coll. (1977) confirment ces observations chez le rat par l'injection de sérum de rat infecté depuis 49 jours. CAPRON et coll. (1980) en transférant du sérum de rat Fischer infesté, préalablement déplété sélectivement en anticorps de classe IgE ou IgG2a suggèrent le rôle prépondérant de ces deux isotypes dans l'élaboration de l'immunité vis-à-vis de S. mansoni.

Ces observations sont confortées par l'effondrement des paramètres de l'immunité à la réinfection induit chez le rat Fischer déplété sélectivement en cellules B productrices d'anticorps par l'injection néonatale de sérum anti-chaine lourde des immunoglobulines M (BAZIN et coll., 1980).

Les expériences de transfert passif de sérums immuns ou de fractions immunoglobuliniques purifiées soulignent certes la participation des facteurs humoraux dans l'immunité acquise, mais ne permettent pas l'identification de leurs mécanismes d'action. Il est possible en effet d'envisager l'hypothèse d'une coopération entre les anticorps injectés et les populations cellulaires immunocompétantes de l'animal receveur.

3. Rôle des anticorps anaphylactiques

L'étude plus précise de la participation des anticorps dans l'immunité à la réinfection chez le rat a permis de souligner le rôle prépondérant joué par les anticorps anaphylactiques. En effet, ces anticorps habituellement associés à une fonction néfaste dans le cadre de l'anaphylaxie se sont révélés doués d'une fonction effectrice vis-à-vis de S. mansoni.

Bien que l'élévation du taux d'IgE sérique au cours de la schistosomiase ait été un paramètre connu depuis les travaux de SADUN et GORE (1970), CAPRON et coll. (1975b) CAPRON et Coll. (1975a) sont les premiers à définir l'aspect positif de cette réponse humorale par la découverte du rôle cytotoxique qu'exercent in vitro des macrophages sensibilisés par l'IgE de rat présente dans le sérum d'animaux infectés vis-à-vis de schistosomules de S. mansoni. Cette observation est à l'origine de nombreuses études. ROUSSEAU-PREVOST et coll. (1977, 1978) dans le modèle de l'infection expérimentale du rat par S. mansoni démontrent que la phase de rejet du parasite survenant entre la 3ème et la 4ème semaine d'infection s'accompagne d'une élévation importante du taux d'IgE totales et spécifiques de S. mansoni décelable au niveau sérique. Dans ce même modèle, ROUSSEAU-PREVOST et coll. (1978) révèle un étroit parallélisme entre le taux d'IgE spécifique présent dans le sérum et la cinétique d'apparition de l'immunité à la réinfection. Ces observations reliées à la chute du taux d'immunité transférable par le sérum immun déplété en IgE apporte un faisceau d'arguments en faveur du rôle positif de l'IgE dans l'immunité de protection vis-à-vis de S. mansoni.

La participation d'une seconde classe d'anticorps anaphylactique dans les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis de S. mansoni a été révélée par les travaux de CAPRON et coll. (1978a). Ces auteurs établissent le rôle essentiel des anticorps de classe IgG2a dans l'induction de la destruction in vitro des schistosomules de S. mansoni par les éosinophiles de rats sains. L'IgG2a (IgGa) représente la classe majeure des immunoglobulines chez le rat (BAZIN et coll., 1974). Elle a été définie par BLOCH (1968) comme la seconde classe d'anticorps anaphylactique chez le rat. L'IgG2a se fixe au mastocyte et induit la libération des médiateurs de l'anaphylaxie comme la SRS-A (Slow reacting substance of anaphylaxis) (MORSE et coll., 1968) et l'histamine (MORSE et coll., 1969 ; BACH et coll., 1971a, 1971b). L'IgG2a inhibe la fixation de l'IgE au niveau des mastocytes du rat et des cellules de basophiles leucémiques de rat (BACH et coll., 1971b) HALPER et METZGER, 1976). Il faut cependant noter que la fixation de l'IgG2a au niveau des récepteurs mastocytaires est beaucoup plus labile que la liaison existant entre le mastocyte et l'IgE (BACH et coll., 1971b).

L'étroit parallélisme existant entre la cinétique d'apparition de l'immunité à la réinfection et la manifestation au niveau sérique de l'animal infecté d'une cytotoxicité dépendante de l'éosinophile prend toute sa valeur dans le contexte des expériences de transferts passifs de sérum immun déplété sélectivement en anticorps de classe IgG2a (CAPRON et coll., 1980).

Il apparait donc que les anticorps anaphylactiques présents au niveau des sérums de rats infectés par S. mansoni représentent le support essentiel de l'immunité à médiation humorale.

Pourtant les mécanismes d'action de ces anticorps restent à définir in vivo dans le contexte de l'infection parasitaire.

B. Approche in vitro de l'immunité

Si l'expérimentation in vivo reste l'argument majeur en faveur d'une réelle activité biologique, la multiplicité des facteurs qu'elle fait intervenir suscite de nombreuses interrogations quant au déroulement des événements conduisant à la destruction du parasite. C'est pourquoi depuis 1972 de nombreux modèles d'étude in vitro ont été développés afin d'établir une analyse fine dans un "système-contrôlé", des mécanismes immunitaires, la seconde étape consistant à la transposition de ces mécanismes in vivo dans le contexte dynamique de la réponse immune. Ces travaux ont permis la définition des systèmes effecteurs qui font intervenir différents facteurs de l'immunité, des anticorps, des cellules immunocompétentes et le complément. Le Tableau 1 résume les principaux modèles décrits.

1. Mécanisme de sérotoxicité : anticorps léthal

CLEGG et SMITHERS (1972) démontrent que 95 à 100 % d'une population de schistosomules de S. mansoni est tuée in vitro lorsqu'elle est cultivée 4 jours en présence de sérum frais de singe Rhésus infecté par S. mansoni. CAPRON et coll. (1972, 1973, 1974) établissent la même relation pour les sérums de rat, de lapin et d'homme, infectés par S. mansoni. CLEGG et SMITHERS (1972), CAPRON et coll. (1972, 1973, 1974, 1977) dans le cas du rat, du lapin et de l'homme, identifient ce facteur léthal comme étant une immunoglobuline de classe IgG, dont la toxicité vis-à-vis du schistosomule

Principaux mécanismes effecteurs in vitro

Mécanisme	Isotype	Complément	Hôtes	Références
<u>Sérototoxicité</u>				
Anticorps cytotoxique	IgG	C ⁺	Singe Rhésus rat, lapin, homme	CLEGG et SMITHERS, 1972 CAPRON et coll., 1972, 1973, 1974, 1977)
<u>Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps</u>				
Anticorps + neutrophiles	IgG	C ⁺	Rat	DEAN et coll. (1974)
Anticorps + neutrophiles	IgG ₂	C ⁺	Cobaye	DEAN et coll. (1975)
Anticorps + eosinophiles	IgG	C ⁻	Homme	BUTTERWORTH et coll. (1974)
Anticorps + eosinophiles	IgG _{2a}	C ⁻	Rat	M. CAPRON et coll., 1978a
Anticorps + eosinophiles	IgG	C ⁻	Souris	RAMALHO-PINTO et coll. (1979)
Anticorps + eosinophiles	IgE	C ⁻	Rat	M. CAPRON et coll., 1981a
Anticorps + macrophages	IgE	C ⁻	Rat	A. CAPRON et coll., 1975
Anticorps + macrophages	IgG ₁	C ⁻	Rat	PEREZ, 1975
Anticorps + monocytes	IgE	C ⁻	Homme, babouin	JOSEPH, 1978

ne s'exprime qu'en présence de complément. Cet anticorps semble spécifique puisqu'il n'est décelable que dans les sérums humains infectés par S. mansoni, et non chez les patients infectés par S. haematobium (CAPRON et coll., 1974). Cet anticorps est de plus spécifique de stade, aucune activité létale n'étant observée vis-à-vis du stade pulmonaire de S. mansoni prélevé 7 jours après l'infection chez le hamster ou la souris (CAPRON et coll., 1974). DAMIAN (1964, 1967) et CAPRON et coll. (1965, 1968) expliquent cette insensibilité par l'apparition chez le ver d'un certain nombre d'antigènes identiques à ceux de l'hôte vertébré qu'ils infectent.

L'étude de la cinétique d'apparition de l'anticorps létal montre que les taux lytiques maximaux corrélaient avec une période d'immunité à la réinfection, qui est la période 80 à 90 jours après l'infestation. Des expériences de transfert passif de sérum de rat infesté à des rats receveurs sains ont donné une protection maximum de 80 % avec des sérums de rats infestés depuis 100 jours (CAPRON-DUPONT, 1974). Des résultats positifs de transfert d'immunité ont aussi été rapportés par PHILIPPS et coll. (1975) chez des rats recevant une injection intraveineuse de 2 ml de sérum de rat infesté depuis 40 à 45 jours. Les immunoglobulines porteuses de l'activité protectrice ont été localisées dans la fraction contenant les IgG.

La synthèse d'anticorps létal a pu être induite chez le lapin par l'injection de fractions membranaires du schistosome adulte (CAPRON et coll., 1974) et par un antigène isolé de la fraction membranaire (SHER et coll., 1974a). Pourtant, les animaux immunisés selon ces méthodes ne développent aucune immunité à la réinfection. D'autre part, des taux élevés d'anticorps létal persistent chez l'animal ayant perdu toute immunité à la réinfection (PEREZ et coll., 1974). SHER explique ce phénomène de la façon suivante :

- 1) In vivo : les schistosomules sont moins fragiles qu'in vitro car ils acquièrent rapidement des antigènes d'hôte qui les protègent de l'action de cet anticorps ;
- 2) La protection in vivo est médiée par un anticorps de même spécificité antigénique que l'anticorps léthal mais de classe différente. Cet anticorps agirait dans les tissus à un niveau inaccessible à l'anticorps léthal détecté dans le sérum ;
- 3) L'anticorps léthal n'agit pas seul et pourrait coopérer avec différents constituants humoraux ou cellulaires.

L'action de l'anticorps léthal nécessite la présence de complément mais d'autres mécanismes de cytotoxicité s'expriment en présence de différentes populations cellulaires comme les neutrophiles, les éosinophiles ou les macrophages.

2. Mécanisme de cytotoxicité dépendante du neutrophile

DEAN et coll. (1974) montrent que les schistosomules incubés en présence de sérum de rat infesté et de neutrophiles de rats sains, sont détruits après 24 à 48 heures de contact. Les IgG sont impliquées dans cette réaction qui nécessite la présence de complément.

DEAN et coll. (1975) décrivent un second mécanisme de cytotoxicité chez le cobaye infecté par S. mansoni. Les IgG2 de cobaye en présence de neutrophiles d'animaux sains et de complément induisent une forte mortalité des schistosomules. Dans une première étape, les neutrophiles entrent en contact avec le schistosomule par l'intermédiaire d'un pontage réalisé par les anticorps spécifiques : c'est la phase d'opsonisation, puis on observe un relargage d'enzymes lysosomiales qui induisent la destruction du schistosomule.

3. Mécanisme de cytotoxicité dépendant de l'éosinophile

La première description du rôle cytotoxique de l'éosinophile a été rapportée par BUTTERWORTH et coll. (1974). Des éosinophiles humains normaux deviennent cytotoxiques pour le schistosomule quand celui-ci est incubé en présence de sérum de sujets parasités. Ce mécanisme indépendant du complément fait intervenir une IgG et ne nécessite pas une présensibilisation des cellules effectrices (BUTTERWORTH et coll., 1975, 1977a et b).

Trois étapes successives conduisent à la destruction du stade larvaire du schistosome par l'éosinophile. La première étape se traduit par un contact étroit entre la cible et la cellule. L'adhérence de l'éosinophile au schistosomule est induite par un anticorps spécifique qui se fixe par son fragment (Fab')₂ à la surface du schistosomule et réalise le pontage avec l'éosinophile qui se fixe à l'anticorps par l'intermédiaire d'un récepteur pour le fragment Fc de l'immunoglobuline. La seconde étape est alors déclenchée, on observe une dégranulation intense de l'éosinophile qui libère à la surface du schistosomule son contenu granulaire. Les granules de l'éosinophile renferment une peroxydase (EPO), une protéine basique majeure (MBP) ainsi que d'autres protéines cationiques (ECP). L'étape finale correspond à la lyse de la cible, par ces différentes substances qui entraînent une désorganisation du tégument parasitaire. (Mc LAREN et Coll., 1977 ; BUTTERWORTH et Coll., 1979a ; OLSSON et Coll., 1977).

Le rôle de l'éosinophile a été étudié dans différents systèmes d'infection expérimentale à S. mansoni, ces résultats sont présentés dans le tableau 2. Les travaux de CAPRON et coll. (1978a et b) révèlent un aspect très particulier de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile chez le rat, celui de l'activation de l'éosinophile par le mastocyte.

TABLEAU 2

Mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles
dans l'infection à *Schistosoma mansoni*.

Facteur de reconnaissance	Modèle	Première description
IgG	Homme	Butterworth (1974)
IgG	Rat	Mackenzie (1977)
IgG2a	Rat	M. Capron (1978a)
IgG1	Souris	Ramalho-Pinto (1979)
IgG	Souris	Kassis (1979)
IgE	Rat	M. Capron (1981a)
Complement	Rat	Ramalho-Pinto (1978)
Complement	Homme	Anwar (1979)



Ces auteurs rappellent qu'en plus des éosinophiles, des mastocytes adhèrent à la surface du schistosomule opsonisé. Ils démontrent que le mastocyte seul n'induit aucune cytotoxicité mais que la déplétion en mastocytes entraîne une chute considérable de l'activité cytotoxique. L'activité cytotoxique peut être restaurée par des produits de dégranulation mastocytaires et tout particulièrement par l'ECF.A "Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis". L'ECF.A agit au niveau de l'expression des récepteurs par le fragment Fc des immunoglobulines G de l'éosinophile (CAPRON et coll., 1981b). Par son action directe sur l'expression des récepteurs Fc des IgG, le mastocyte stimule l'activité cytotoxique de l'éosinophile. Récemment, CAPRON et coll. (1981b) décrivent un mécanisme similaire d'activation de l'éosinophile humain.

Chez le rat Fischer, l'opsonisation du schistosomule par IgG2a se manifeste dans les sérums de rats infectés pendant les 6 premières semaines de l'infection (CAPRON et Coll., 1978a). Pendant cette période, les éosinophiles de l'animal immun détruisent le stade larvaire du parasite en absence de sérum immun, les éosinophiles portant des anticorps cytophiles spécifiques. Puis l'activité cytotoxique décroît et s'accompagne d'un blocage des récepteurs Fc de l'éosinophile, parallèlement une diminution marquée de la production d'anticorps spécifiques de classe IgG2a est observée (CAPRON et Coll., 1979). Ces arguments plaident en faveur d'une réelle activité in vivo du mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophile.

L'investigation cinétique de la cytotoxicité dépendant d'éosinophiles chez le rat permet la découverte par CAPRON et Coll. (1981a) d'un mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles liés à l'IgE, 8 semaines après l'infection parasitaire.

Comme le mécanisme de cytotoxicité dépendant de l'IgG2a, la présence de mastocytes ou de facteurs mastocytaires est nécessaire. L'éosinophile possède en plus d'un récepteur pour le fragment Fc des IgG un récepteur spécifique pour l'IgE dont l'expression est modulée par l'ECF.A (CAPRON et Coll., 1981b). Aucune réaction croisée n'a été mise en évidence entre le site de fixation de l'IgE et celui de l'IgG (CAPRON et Coll., 1981b).

Les mécanismes que nous venons de décrire nécessitent une phase de liaison étroite entre l'éosinophile et la cible parasitaire, cette liaison est assurée par un anticorps spécifique de classe IgG ou IgE, mais il faut cependant citer le rôle du complément dans les phénomènes d'adhérence de l'éosinophile au schistosomule.

RAMALHO-PINTO et coll. (1978) décrivent en effet un système de cytotoxicité nécessitant une coopération entre l'éosinophile et le complément. Le composé C3b du complément permet la fixation de l'éosinophile à la surface parasitaire par le récepteur C3b de l'éosinophile. Le complément peut agir seul ou en synergie avec des anticorps spécifiques (Mc LAREN et RAMALHO-PINTO, 1979 ; ANWAR et coll., 1979).

Cet aspect fascinant du rôle de l'éosinophile doit être abordé avec prudence quant à sa transposition dans l'expression réelle de l'immunité in vivo, du fait de l'extrême diversité des facteurs humoraux et cellulaires impliqués dans la réponse immune. Il faut cependant noter que les expériences de déplétion sélective en éosinophiles, pratiquées chez la souris par MAHMOUD et coll. (1975) déclenchent une diminution sensible de l'immunité à la réinfection, soulignant de fait la participation possible de l'éosinophile dans le mécanisme immunitaire.

4. Mécanismes de cytotoxicité dépendant du macrophage

Les macrophages sont impliqués dans deux mécanismes de cytotoxicité :

a) Cytotoxicité liée aux immunoglobulines G : Des cellules d'exudat péritonéal de rat incubées 4 heures à 4°C en présence de sérum de rat immun inactivé par chauffage, présentent une forte adhérence aux schistosomules. Après 24 heures de contact, les schistosomules sont fortement endommagés, les immunoglobulines en cause sont des anticorps cytophiles de classe IgG1 (PEREZ, 1975).

b) Cytotoxicité liée aux immunoglobulines E : Des macrophages péritonéaux de rat sains préincubés dans un sérum de rat immun vis-à-vis de S. mansoni adhèrent fortement aux schistosomules de S. mansoni après 3 à 4 heures de contact. L'enrobage conduit après 20 heures d'incubation à la destruction de 70 à 90 % des schistosomules (CAPRON et coll., 1975a - 1975b).

L'étude ultrastructurale révèle d'une part d'importantes lésions des structures membranaires des schistosomules agressés et que d'autre part ces lésions sont uniquement induites par le macrophage. Le sérum de rat immun contient donc un facteur qui se fixe sur les macrophages normaux les rendant spécifiquement cytotoxiques du stade larvaire du schistosome. Le facteur responsable de ce phénomène est l'IgE (CAPRON et coll., 1975a, 1975b), il est détruit par chauffage 3 heures à 56°C, par le mercaptoéthanol et l'immunoabsorption des sérums immuns par des anticorps spécifiques de la chaîne lourde epsilon des IgE abolit l'activité cytotoxique. La présence de l'IgE à la surface du macrophage incubé dans un sérum présentant une activité cytotoxique a été visualisée par la technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps anti-IgE marqués à la fluorescéine et par la technique de formation de rosettes, dans laquelle les hématies sont couplées aux immunoglobulines de classe E:

Les immunocomplexes à IgE présents dans les sérums de rat infectés sont aussi impliqués dans l'activation du macrophage, l'absorption des sérums immuns par des quantités croissantes de sérum de lapin anti-S. mansoni, inhibent sensiblement l'enrobage des schistosomules (CAPRON et coll., 1975c).

L'interaction IgE-macrophages nécessite une étape de fixation de l'IgE à la membrane cellulaire. Les expériences de JOSEPH et coll. (1977) et DESSAINT et coll. (1979) démontrent l'existence d'un site de fixation spécifique et saturable pour l'IgE. En effet, la cytotoxicité dépendante du macrophage peut être inhibée de façon compétitive par des IgE agrégées chimiquement alors que l'IgE monomérique n'a aucune action ; d'autre part aucune inhibition n'a été décrite par les IgG monomériques ou agrégées. La fixation de l'IgE entraîne une activation du macrophage qui se traduit par une augmentation du taux de GMP cyclique et par un relargage d'enzymes lysosomales et d'anion superoxyde (DESSAINT et coll., 1980 ; JOSEPH et coll., 1980). Seules, les formes polymériques de l'IgE suscitent l'activation du macrophage, les formes dimères étant le seuil minimal de polymérisation permettant l'induction de la cytotoxicité.

Parallèlement au système établi chez le rat, les travaux de JOSEPH et coll. (1978) décrivent un mécanisme similaire chez l'homme où l'IgE active les monocytes humains normaux, les rendant cytotoxiques pour des schistosomules de S. mansoni.

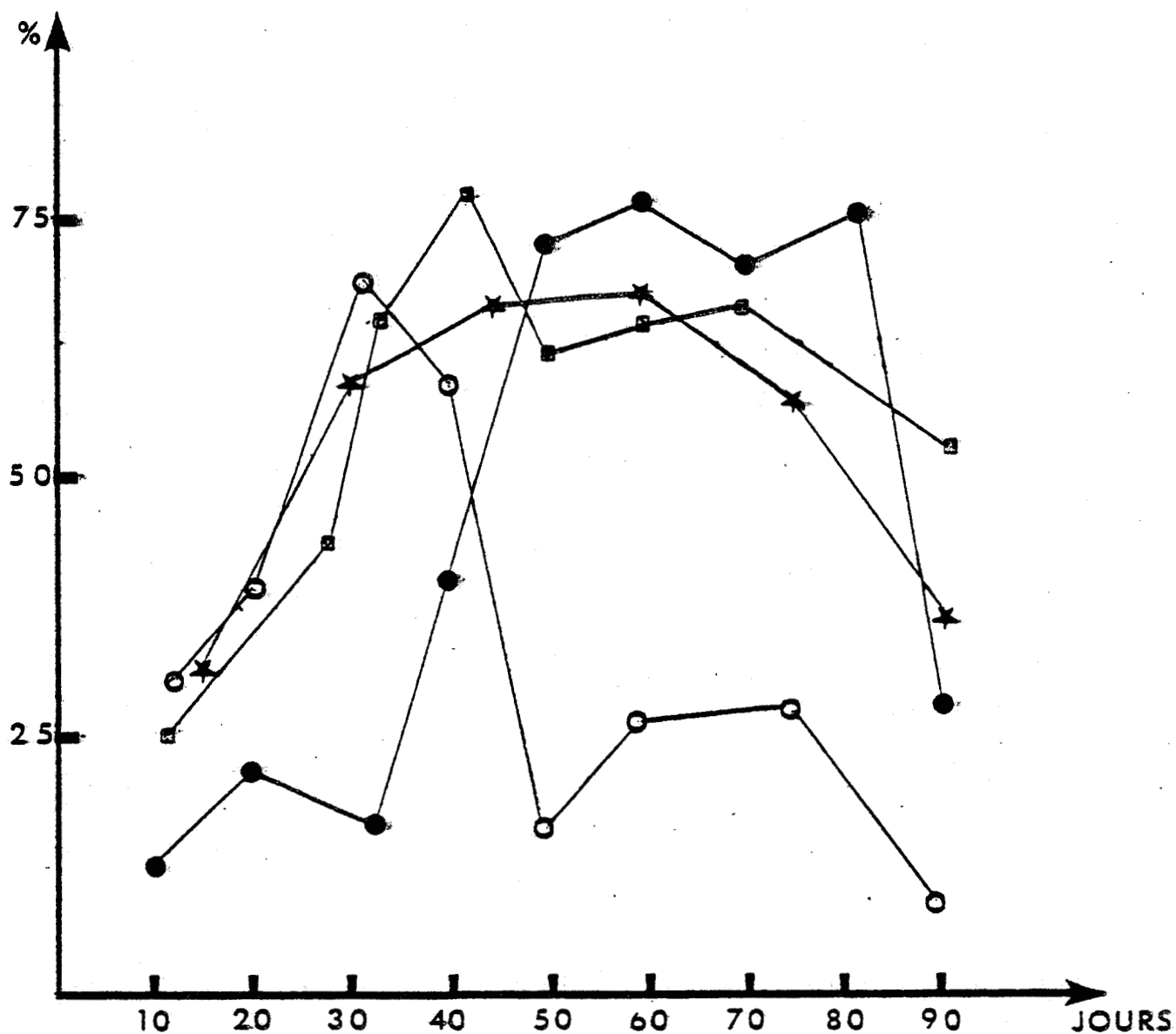
Si le mécanisme de cytotoxicité dépendant du macrophage n'est pas encore prouvé in vivo, le parallélisme étroit entre l'établissement chez le rat de l'immunité à la réinfection, de l'évolution du taux d'IgE sériques et de l'activité cytotoxique du macrophage est néanmoins à signaler.

5. Rôle in vivo des mécanismes effecteurs

La description in vitro des mécanismes de sérotoxicité dépendante du complément et de la cytotoxicité dépendante de populations cellulaires souligne une fois de plus le rôle prépondérant de la réponse à médiation humorale, dans l'expression de l'immunité vis-à-vis du schistosomule.

In vivo, la participation de ces mécanismes effecteurs reste à démontrer mais elle est fortement suggérée par la corrélation étroite observée entre le développement de l'immunité à la réinfection et la cinétique d'apparition de ces mécanismes (Figure 2) d'une part, et d'autre part par les expériences de transfert passif de l'immunité par les sérums immuns déplétés spécifiquement en anticorps de classes IgG2a et IgE (CAPRON et coll., 1980).

FIGURE 2 : CORRELATION ENTRE LA CYTOTOXICITE INDUITE PAR L'IgE ET L'IgG2a EN PRESENCE D'EOSINOPHILES OU DE MACROPHAGES, ET L'IMMUNITE A LA REINFECTION (CAPRON et Coll., 1982)



★—★ % de protection

●—● % de cytotoxicité dépendante du macrophage (IgE)

○—○ % de cytotoxicité dépendante de l'éosinophile (IgG2a)

□—□ % de cytotoxicité dépendante de l'éosinophile (IgE)

CONCLUSION

En fait, l'immunité dans la schistosomiase s'exprime essentiellement en terme d'immunité à la réinfection. Les mécanismes immuns déclenchés chez l'hôte s'exercent surtout au niveau des stades larvaires du parasite, alors que les vers adultes ayant acquis des antigènes d'hôte y sont insensibles.

L'étude de la réponse immune révèle deux aspects : la réponse à médiation cellulaire dont les données restent encore imprécises, et la réponse à médiation humorale dont les paramètres sont beaucoup mieux cernés.

Les anticorps interviennent dans l'expression des différents mécanismes de cytotoxicité et de sérotoxicité et transfèrent passivement un degré significatif d'immunité.

A ce stade, une interrogation se pose : les anticorps participant aux mécanismes de cytotoxicité définis in vitro sont-ils réellement le support de l'immunité acquise ? En effet, les expériences de transfert passif de sérums immuns déplétés sélectivement en isotypes immunoglobuliniques particuliers ne sont que des arguments indirects pour cette démonstration. Ces sérums contiennent de nombreux facteurs sériques (immuns complexes et antigènes circulants) pouvant conduire à une mauvaise interprétation des résultats obtenus. De même que les préparations purifiées de fractions immunoglobuliniques se définissent en termes d'anticorps polyclonaux d'affinité variable par la cible parasitaire et pouvant exprimer des activités effectrices multiples.

Afin d'établir une relation directe entre les phénomènes biologiques observés in vitro et la participation des mécanismes effecteurs dans l'élaboration d'une immunité à la réinfection, nous nous sommes intéressés à la production d'anticorps monoclonaux possédant une activité biologique précise. Pour ce faire, nous avons utilisé les techniques de fusion cellulaire.

Cette approche fut motivée par les difficultés rencontrées dans la préparation à partir de sérums immuns de populations homogènes d'anticorps spécifiques. L'anticorps monoclonal apparaissait d'autre part comme un matériel de choix pour la caractérisation des antigènes cibles parasitaires potentiellement protecteurs.

CHAPITRE.II.

LA TECHNIQUE DE FUSION CELLULAIRE

I - DEFINITION

La technique de fusion cellulaire ou d'hybridation cellulaire permet la "création" à partir de deux cellules différentes d'une entité cellulaire possédant tout ou partie du matériel génétique des cellules impliquées dans la fusion. La cellule hybride obtenue ou hybridome exprime simultanément les propriétés biologiques des deux cellules "parentales".

La technique d'hybridation cellulaire a pris un essor considérable depuis les six dernières années dans le domaine de l'immunologie. Il nous semble important de souligner les différentes étapes scientifiques qui ont conduit à son utilisation.

II - DECOUVERTE ET EVOLUTION DE LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION CELLULAIRE

Ce n'est qu'en 1975 avec les travaux de KÖHLER et MILSTEIN que la technique de fusion cellulaire trouve un champ d'application immunologique, mais la découverte de l'hybride cellulaire remonte à 1960 avec les travaux de Georges BARSKI.

A) Découverte de l'hybridation cellulaire

BARSKI et coll. (1960 - 1961 - 1962) étudient une culture mixte de deux souches cellulaires de fibroblastes isolées par SANFORD et coll. en 1954. Ces deux souches cellulaires présentent des caractéristiques morphologiques et caryotypiques particulières. Après 3 mois de culture mixte in vitro de ces 2

espèces cellulaires, BARSKI et coll. (1960) isolent dans cette culture un nouveau type cellulaire qui présente un nombre de chromosomes sensiblement égal à la somme des chromosomes des deux souches fibroblastiques, ainsi que les marqueurs chromosomiques particuliers aux deux cellules initiales. BARSKI et coll. postulèrent que ce troisième type cellulaire était un hybride cellulaire issue de la fusion des deux lignées fibroblastiques.

Les travaux de BARSKI furent accueillis avec beaucoup de scepticisme, néanmoins SORIEUL et EPHRUSSI (1961) reproduisent les mêmes observations.

B) Généralités sur le phénomène de fusion cellulaire

C'est surtout d'un point de vue génétique que fut explorée l'hybridation cellulaire, et trois questions fondamentales furent très vite posées :

- Est-il possible de produire des hybrides cellulaires entre 2 cellules exprimant des potentiels génétiques différents ?
- Les hybrides cellulaires obtenus peuvent-ils être sélectionnés ?
- Les cellules hybrides qui au cours des différentes mitoses peuvent subir une perte chromosomique, sont-elles un bon modèle à l'étude de la ségrégation chromosomique ?

La première interrogation trouve très vite une réponse. EPHRUSSI (1965), EPHRUSSI et coll. (1964), GERSHON et SAGHS (1963) par des études caryotypiques identifient de nombreuses cellules hybrides qui expriment de plus d'une façon codominante les gènes des cellules parentales. Par exemple, un hybride issu de la fusion de deux cellules possédant des antigènes d'histocompatibilité différent exprime les deux antigènes parentaux (GERSHON et SACHS, 1963), de même qu'en fusionnant deux types cellulaires synthétisant des β glucuronidases de stabilité thermique différente, on obtient un hybride producteur des deux formes alléliques (GANSHOW, 1966). Ces travaux démontrent que dans la cellule hybride les génomes des deux cellules utilisées pour la fusion sont actifs et s'expriment

C) La sélection des hybrides

Les facteurs limitants au développement de la technique d'hybridation se résument à deux problèmes :

- la rareté de l'évènement de fusion cellulaire
- l'absence de méthode efficace de sélection des hybrides.

1 - Système de sélection thermique

Ce n'est que par pur hasard, et pour des raisons encore inconnues, que l'on s'aperçut que la croissance de certains hybrides cellulaires était favorisée à 29°, alors que les cellules parentales se développaient mieux à 37°. Plusieurs hybrides furent isolés de cette façon par EPHRUSSI (1965), YOSHIDA et EPHRUSSI (1967) et pour la première fois par cette technique SCALETTA et EPHRUSSI (1965) isolent un hybride issu de la fusion d'une cellule maintenue en culture continue et de cellules prélevées chez un animal nouveau-né. Cette dernière expérience apporte deux informations essentielles, il est possible dans certaines conditions de favoriser le développement de cellules hybrides par rapport aux cellules parentales et d'"immortaliser" l'expression du génome d'une cellule "quelconque". Malheureusement, le système de thermo-sélection des hybrides n'est pas généralisable à l'ensemble des systèmes d'hybridation cellulaire envisagés.

2 - Système sélectif de LITTLEFIELD

LITTLEFIELD (1964) sélectionne deux sous-lignées cellulaires à partir d'une souche hétéropløide de souris, l'une est résistante à la 8-Azaguanine, l'autre à la 5-bromodésoxyuridine. Le facteur de résistance à ces différentes drogues corrèle respectivement avec la déficience en hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) et en Thymidine kinase (TK). Ces deux enzymes interviennent dans la synthèse des nucléotides.

Le système de LITTLEFIELD repose sur le fait que les cellules de mammifères possèdent deux voies de synthèse des nucléotides (cf. Figure 3) : la synthèse de novo, où les nucléotides sont synthétisés à partir des sucres et des acides aminés ; la voie de synthèse qui utilise des nucléotides préformés, l'hypoxanthine et la thymidine.

L'aminoptérine bloque la synthèse de novo, l'autre voie de synthèse nécessite la présence de la Thymidine kinase et de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase. Si l'on fusionne ces deux sous-lignées cellulaires, seuls les hybrides qui posséderont par complémentarité des deux génomes parentaux, la TK et HGPRT se développeront dans un milieu sélectif HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine).

D) Les agents fusogènes

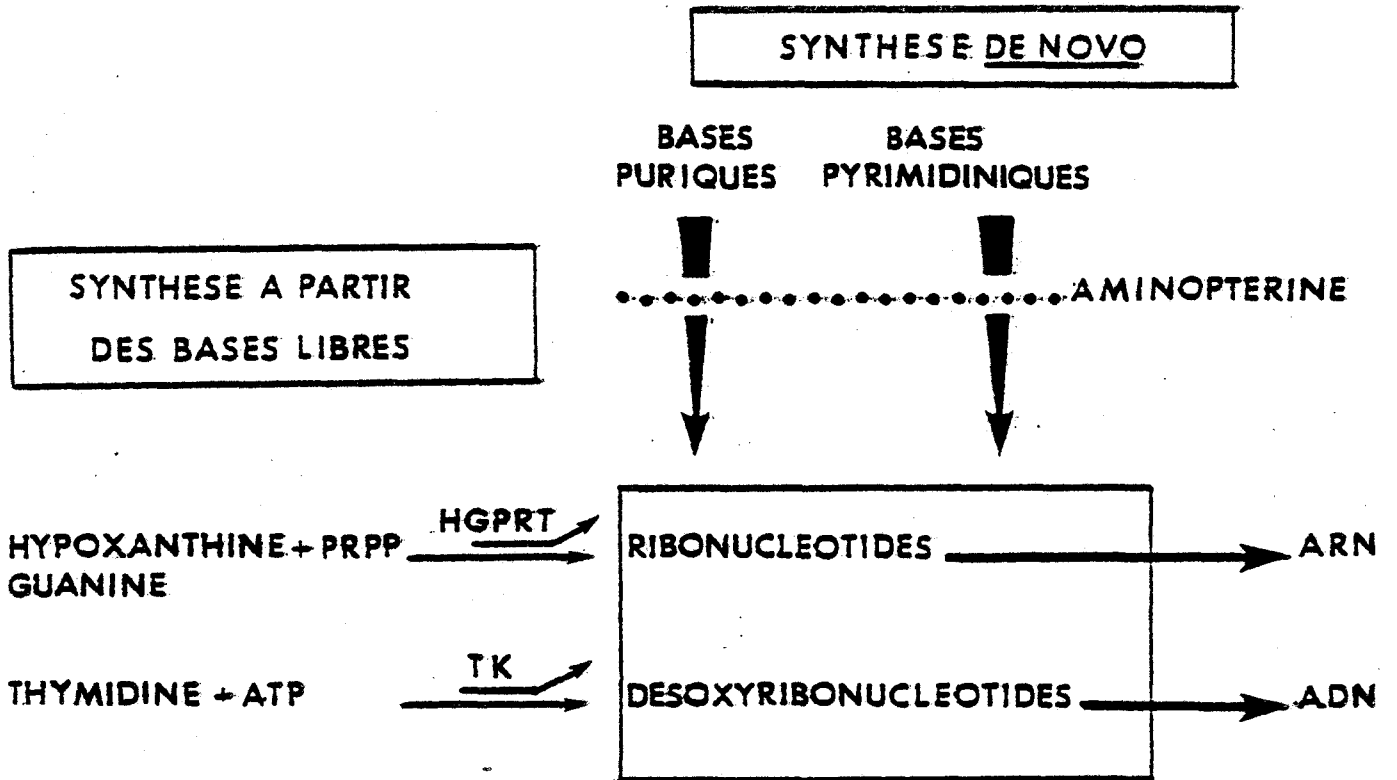
Le problème majeur qui restait posé était le faible pourcentage d'hybrides cellulaires obtenus au cours des expériences de fusion. Les travaux de HARRIS et WATKINS (1965) vont permettre de franchir une étape décisive dans la maîtrise de ce modèle.

1 - Le virus Sendai inactivé

HARRIS et WATKINS (1965) décrivent la formation d'hétérocaryons (masse cytoplasmique renfermant plusieurs noyaux) dans des cultures mixtes de cellules humaines Hela et de cellules d'ascites d'ERLICH en présence du virus hémagglutinant Sendai inactivé par les rayons UV. Les hétérocaryons ainsi obtenus manifestent une activité biosynthétique puis involuent après quelques jours de culture.

Cet échec dans l'établissement de cellules hybrides viables s'explique uniquement par le choix des cellules. JOHNSON et HARRIS (1969) démontrent que

FIGURE 3 : BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES, ROLE DE L'AMINOPTERINE
(LITTLEFIELD, 1964)



les cellules d'ascite d'ERLICH suppriment totalement la synthèse de l'ADN des cellules Hela. Les travaux de HARRIS et WATKINS démontrent néanmoins le rôle fusogène du virus Sendai inactivé.

Les premiers hybrides viables induits par le virus Sendai inactivé sont décrits par VERGANIAN et NELL (1966), COON et WEISS (1969a et b) qui définissent les conditions optimales à l'obtention d'un rendement de fusion élevé. Dans leurs expériences, le taux d'hybridation est multiplié par un facteur de 100 par rapport au taux de fusion spontanée.

2 - Agents fusogènes chimiques

La fusion induite par le virus Sendai inactivé présente quelques inconvénients :

- la préparation et le maintien de la souche virale sont délicats
- l'activité des différentes préparations virales est très variable
- le traitement par le virus est infectant pour certains types cellulaires
- l'introduction d'une information virale dans le génome cellulaire n'est pas exclue.

Pour toutes ces raisons, les recherches pour l'obtention d'un agent fusogène chimique se sont multipliées. PONTECORVO (1975) obtient de nombreux hybrides cellulaires en utilisant comme agent de la fusion cellulaire le polyéthylène glycol (PEG). DAVIDSON et coll. (1976) définissent les paramètres de la fusion cellulaire par le PEG.

III - LA STABILITE DES HYBRIDES

La stabilité des hybrides est très variable, elle dépend essentiellement du système d'hybridation utilisé. Dans les hybrides souris x souris la perte chromosomique est très lente, après 100 générations on constate généralement une perte de 10 à 20 % des chromosomes initiaux, puis le caryotype cellulaire se stabilise (EPHRUSSI, 1964 ; EPHRUSSI et coll. 1964a à 1964b) (EPHRUSSI et SORIEUL, 1962).

Dans les hybrides interspécifiques, on observe une perte préférentielle des chromosomes d'une des deux espèces, des chromosomes de rat dans les hybrides rat x souris (WEISS et EPHRUSSI, 1966), des chromosomes de souris dans les hybrides souris x hamster (SCALETTA et EPHRUSSI, 1965). Cette perte chromosomique se limite à 10-20 % des chromosomes totaux. Les hybrides homme x souris sont particulièrement instables, WEISS et GREEN (1967) signalent qu'après 20 générations il ne reste que 2 à 15 chromosomes humains, cette phase d'élimination rapide est suivie d'une phase plus lente qui conduit après 100 générations à une stabilisation pour des hybrides contenant 1 à 3 chromosomes humains. Le mécanisme de déstabilisation des hybrides est encore mal connu, il doit résulter d'un manque de coordination dans la transmission des deux génomes parentaux aux cellules filles lors de la mitose.

IV - LE MECANISME DE LA FUSION CELLULAIRE

Le mécanisme de fusion cellulaire est encore mal connu. Il semble néanmoins que l'étape essentielle se déroule au niveau membranaire. AKONG et coll. (1975) proposent le schéma suivant pour expliquer l'action fusogène de substances chimiques telles que le polyéthylène-glycol, le glycérol ou le

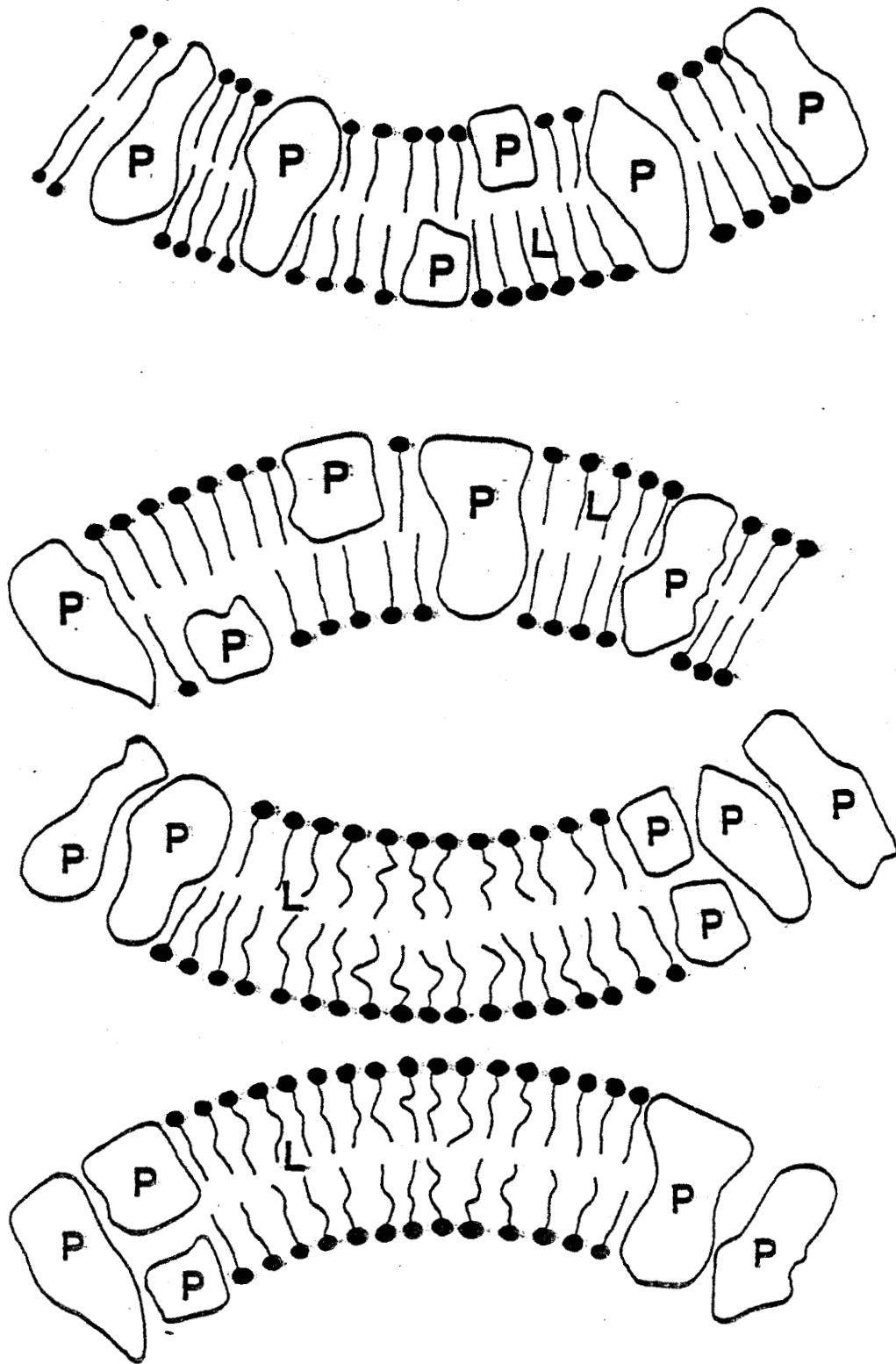
diméthylsulfoxyde (Figure 4).

Dans un premier temps, les agents de fusion chimique entraînent une fluidification des deux couches lipidiques membranaires qui permettent l'agglutination des protéines de membrane. Lorsque deux cellules adjacentes présentent le même phénomène, la fusion membranaire s'amorce par un réarrangement des feuillettes lipidiques des deux cellules "voisines" qui conduit à la fusion localisée.

La seconde étape fait intervenir le gradient osmotique intracellulaire qui permet la généralisation de la fusion. Les observations de microscopie électronique de TOISTER et LOYTER (1973) avaient déjà visualisé l'existence de fusions localisées induites par le virus Sendai. SEKIGUSHI et coll. (1981) résument les différentes étapes de ce mécanisme. L'activité du virus est associée à 2 glycoprotéines virales : l'une, la glycoprotéine HANA portant une activité neuraminidase permet l'agglutination cellulaire, l'autre la glycoprotéine F est responsable de la lyse et de la fusion cellulaire localisée. Une phase de généralisation de la fusion dépendant essentiellement du gradient osmotique intracellulaire s'établit alors, cette réaction est inhibée par des concentrations élevées en sérumalbumine du milieu extracellulaire. Ce schéma de fusion est résumé dans la Figure 5.

Les hétérocaryons ainsi obtenus n'évoluent pas obligatoirement vers la forme d'hybride cellulaire ; EPHRUSSI (1972) rapporte qu'environ 10 % des hétérocaryons évoluent et conduisent à la formation d'hybrides stables.

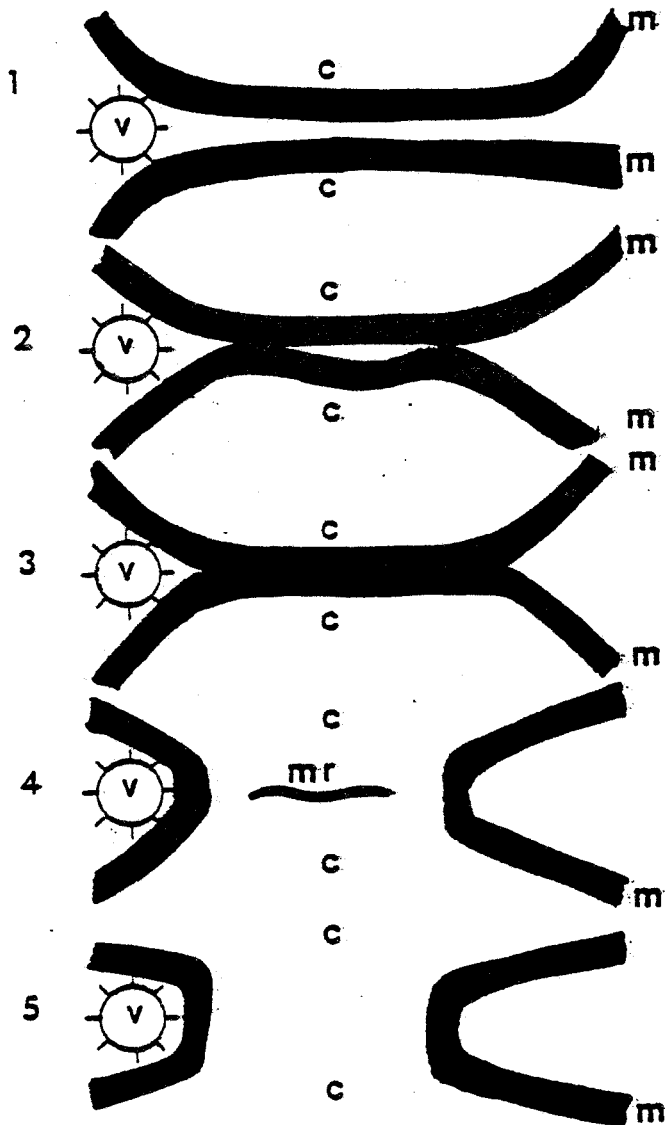
(AKONG et coll., 1975)



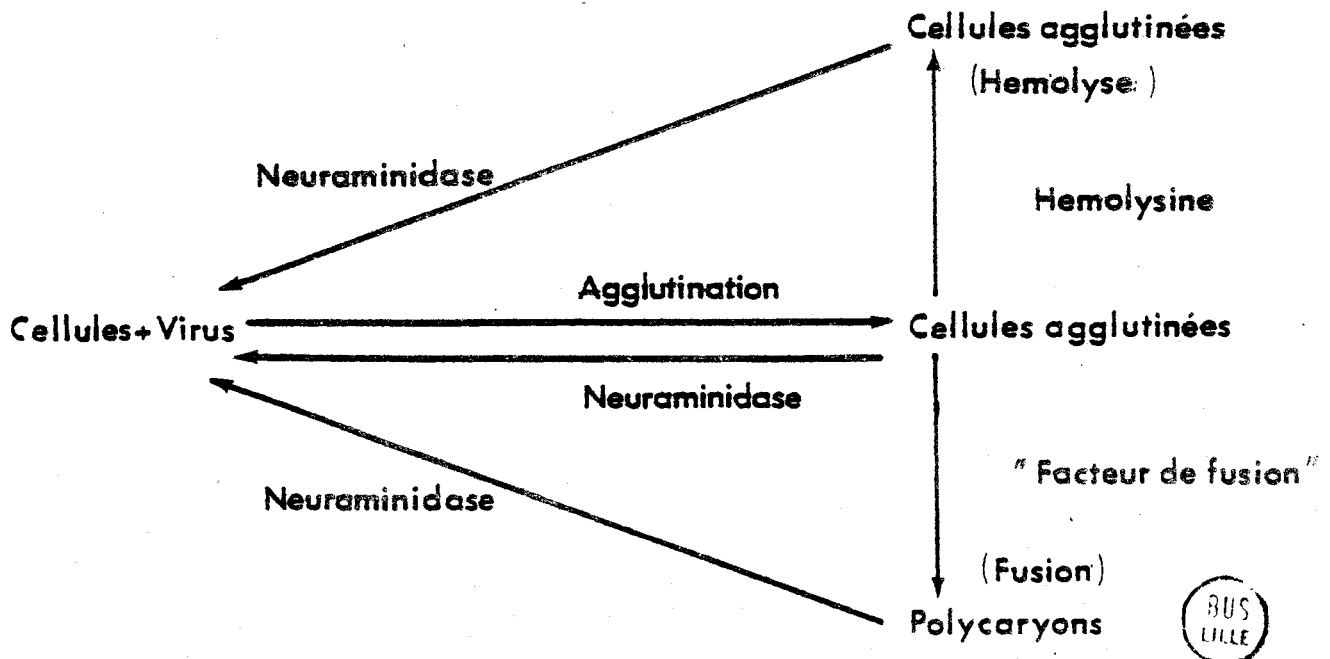
Les agents fusogènes chimiques entraînent une désorganisation des feuillets lipidiques membranaires (L) qui favorise l'agglutination des protéines de membrane (P).

Les membranes ainsi désorganisées deviennent plus fluides et permettent une fusion locale des deux cellules voisines par réarrangement intermembranaire des feuillets lipidiques perturbées.

FIGURE 5 : FUSION CELLULAIRE INDUITE PAR LE VIRUS SENDAI INACTIVE
(SEKIGUSHI et coll., 1981)



1. Agglutination cellulaire induite par le virus. (V)
2. Adhérence des membranes cellulaires (m) des 2 cellules agglutin es par le virus
3. Fusion cellulaire des feuilletts lipidiques externes de deux cellules
4. Désorganisation des membranes cellulaires et formation d'un pontage cytoplasmique entre les 2 cellules
5. La membrane résiduelle (mr) disparaît, la fusion cellulaire est achev e



V - LA FUSION CELLULAIRE ET L'ANTICORPS MONOCLONAL

A) Introduction

Une rate de souris ou d'homme contient environ 1 million de lignées B lymphocytaires, précurseurs des plasmocytes qui synthétisent les immunoglobulines. Lorsqu'on injecte un agent immunogène à un animal, celui-ci répond en fabriquant différents anticorps, dirigés contre les différentes molécules antigéniques de la substance injectée. Il arrive même que plusieurs anticorps soient produits contre un même déterminant antigénique et soient plus ou moins bien adaptés à sa spécificité. Par exemple, si l'on injecte une quantité limitée de cellules spléniques d'une souris immunisée par la β galactosidase à une souris irradiée, on observe au niveau du sérum de la souris restaurée, environ 43 anticorps dirigés contre un déterminant antigénique de la β galactosidase, le répertoire potentiel total d'une souris peut donc être estimé à la production de 1200 anticorps anti- β galactosidase (KÖHLER, 1976). Si l'on analyse le sérum de cet animal, on ne détecte que 5 à 10 spécificités antigéniques différentes. Il est donc quasiment impossible de séparer ces différents anticorps, de sorte que les antisérums conventionnels contiennent un mélange d'anticorps variant d'un animal à l'autre.

L'hétérogénéité moléculaire des immunoglobulines produites par les techniques conventionnelles fut longtemps l'obstacle à l'étude de leur structure, ce n'est qu'en 1960 qu'une étape décisive était franchie grâce à l'utilisation des immunoglobulines monoclonales.

B) Qu'est-ce qu'un anticorps monoclonal ?

Les anticorps monoclonaux sont des populations immunoglobuliniques homogènes synthétisées par un seul clone cellulaire.

Dans l'organisme, chaque anticorps est synthétisé par une lignée cellulaire unique, les lymphocytes et les plasmocytes qui en dérivent. Supposons que l'on puisse isoler un de ces B lymphocytes et que l'on puisse le mettre en culture, le clone cellulaire qui en dériverait synthétiserait des anticorps tous identiques dirigés contre le même déterminant antigénique. Malheureusement, le lymphocyte B ne se développe pas en culture in vitro d'où l'idée de KOLHER et MILSTEIN (1975) d'immortaliser le génome lymphocytaire grâce à l'hybridation cellulaire.

C) Production d'anticorps monoclonaux

1ère étape : fusion de deux cellules myéломateuses

COTTON et MILSTEIN (1973) étudient le contrôle génétique de la synthèse des immunoglobulines. Deux séries de gènes dirigent cette synthèse, l'une codant pour la partie variable et la partie constante de la chaîne lourde, l'autre pour la région variable et la région constante de la chaîne légère. Ainsi, l'anticorps que synthétise le lymphocyte est codé par un couple unique de gènes, un gène V par la partie variable de l'immunoglobuline, et un gène C par la partie constante. Lorsque chacun des deux chromosomes de la cellule porte un allèle d'un gène V ou d'un gène C, seul l'allèle situé sur l'un des chromosomes est actif, l'autre est exclu.

COTTON et MILSTEIN (1973) fusionnent une cellule myéломateuse de rat et une cellule myéломateuse de souris, pour savoir si l'exclusion chromosomique allélique est rompue et pour connaître les conséquences moléculaires d'un tel phénomène. L'étude des sécrétions immunoglobuliniques de ces hybrides montre une combinaison variée des chaînes synthétisées par les cellules parentales mais jamais d'association dans une même chaîne de

fragment V et C des deux myélomes utilisés pour la fusion. Cette expérience prouve que les régions V et C des immunoglobulines sont codées par le même chromosome. On sait maintenant que les séquences d'ADN codant pour les régions V et C des immunoglobulines sont séparées par une séquence intercalaire appelée intron. Lors de la maturation de l'ARN, l'intron est excisé et les séquences codant pour les régions V et C sont mises bout à bout pour donner l'ARN messager qui sera ensuite traduit en protéine. Les données de cette expérience sont traduites schématiquement dans la Figure 6. Cette expérience prouve qu'il n'y a pas d'exclusion des allèles parentaux dans la cellule hybride et que l'information génétique propre aux cellules parentales est exprimée de façon codominante dans la cellule hybride obtenue.

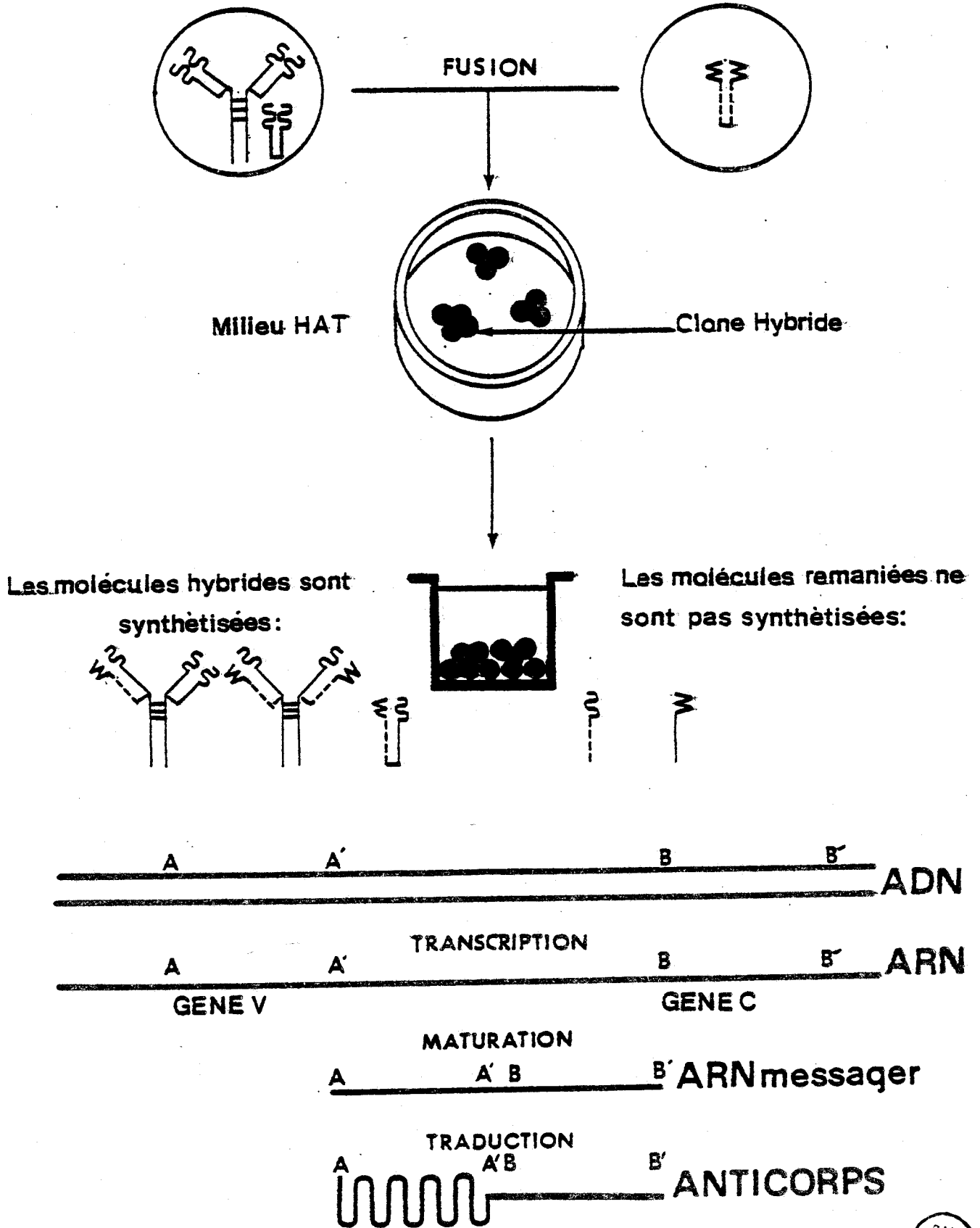
2ème étape : immortalisation du génome B lymphocytaire

De ces résultats encourageants naquit l'idée de fusionner une cellule myélomateuse et un lymphocyte B (KÖLHER et MILSTEIN, 1975). Ces auteurs hybrident des B lymphocytes de souris immunisées par une suspension de globules rouges de mouton et des cellules de la lignée myélomateuse P3 X 63 Ag8 déficiente en HGPRT dérivé du myélome Balb/c MOPC 21. Ils obtiennent après sélection par l'aminoptérine, des cellules hybrides dont certaines synthétisent des anticorps spécifiques du globule rouge de mouton.

Par cette technique, les auteurs démontrent l'immortalisation du génome B lymphocytaire et l'obtention d'une source abondante d'anticorps monoclonaux. Les cellules myélomateuses apportent la capacité de multiplication in vitro, le génome lymphocytaire s'exprime dans les cellules hybrides néoformées et permet la production d'immunoglobulines.

FIGURE 6 : FUSION DE DEUX CELLULES MYELOMATEUSES : EXPERIENCE DE COTTON ET MILSTEIN (1973)

Cellules de Myélome de Souris (TK⁻) X Cellules de Myélome de Rat (HGPRT⁻)



Du fait de l'expression codominante des gènes parentaux dans les cellules hybrides, les hybrides cellulaires obtenus par fusion de cellules spléniques et de la cellule myélomateuse P3X63 Ag8 sécrétrice d'une IgG1 de souris sécrètent des hybrides moléculaires. Ils produisent simultanément les chaînes lourdes et les chaînes légères du myélome et du B lymphocyte, qui s'associent dans un second temps. De tels hybrides sont appelés HLGK (H pour "Heavy", chaîne lourde, L pour "Light", chaîne légère, G pour la chaîne lourde du myélome, K pour la chaîne légère du myélome).

Au premier stade de leur prolifération, les cellules hybrides perdent une partie de leurs chromosomes. La perte des chromosomes ne semble pas se faire au hasard. Habituellement, les cellules éliminent d'abord les chaînes lourdes H ou G, puis l'une ou l'autre des chaînes légères. L'hybride HLGK devient donc HLK ou GKL qui, à leur tour, par le même mécanisme, donnent les variants HL, HK, GK, GL et LK (Figure 7). Les variants HL sont sélectionnés car ils expriment le génome des B lymphocytes. L'utilisation de lignée cellulaire n'exprimant aucune immunoglobuline, simplifie le système de sélection grâce à l'obtention directe d'un hybride HL (Figure 7).

* Lignées cellulaires myélomateuses :

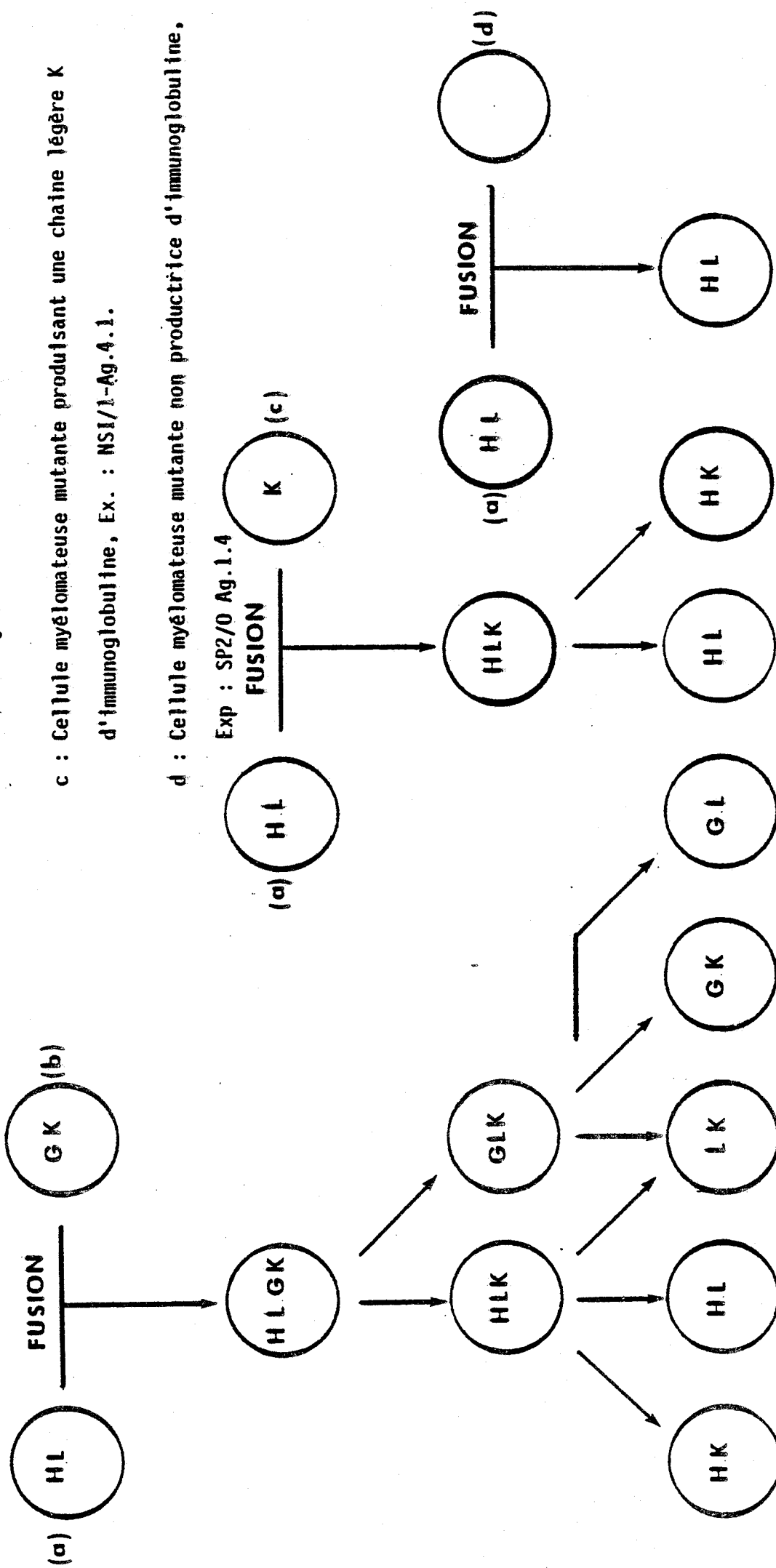
Depuis les travaux de KÖHLER et MILSTEIN (1975), de nombreuses souches myélomateuses ont été exploitées pour leur capacité de fusion. L'origine et les caractéristiques de ces cellules sont résumées dans le Tableau 3.

* Les cellules immunes :

De nombreux critères, comme le modèle expérimental, la localisation particulière de certaines populations lymphocytaires ou la facilité d'obtention

FIGURE 7 : SCHEMA D'EVOLUTION DES HYBRIDES HLGK : UTILISATION DE SOUCHES MYELOMATEUSES MUTANTES

- a : Cellule splénique
- b : Cellule myélomateuse sécrétrice, Ex. : P3x63 Ag8
- c : Cellule myélomateuse mutante produisant une chaîne légère K d'immunoglobuline, Ex. : NSI/1-Ag.4.1.
- d : Cellule myélomateuse mutante non productrice d'immunoglobuline.



HLGK
1975

TABLEAU 3

Principales souches myéломateuses utilisées par la fusion

Lignée cellulaire	Origine	Production immunoglobulinique		Référence
		chaîne lourde	chaîne légère	
P3-X63-Ag 8	Souris	+	+	KOHLER et coll. (1975)
MSI/1-Ag. 4.1	Souris	-	+	KOHLER et coll. (1976)
SP2/O-Ag. 1-4	Souris	-	-	SHULMAN et coll. (1978)
Y3 Ag. 1.2.3	Rat	-	+	GALFRE et coll. (1979)
IR 983 F	Rat	-	-	BAZIN et coll. (1980a)
U 266 AR ₁	Homme	+	+	OLSSON et coll. (1980)

(*) Produite mais non sécrétée.



Le clonage des cellules hybrides permet l'établissement d'un véritable clone d'hybride. En effet, les populations cellulaires hybrides obtenues après sélection par le milieu HAT résultent généralement de la multiplication de plusieurs hybrides initiaux porteurs de potentialités synthétiques diverses.

F) Le clonage

Les cellules myéломateuses présentant une déficience en HGPRT, la sélection s'opère en milieu HAT. Aucune sélection n'est à envisager vis-à-vis des cellules spléniques du fait de leur inaptitude à proliférer in vitro.

E) La sélection des hybrides

Comme nous l'avons décrit précédemment, la formation d'hybrides cellulaires est induite par l'action du virus Sendai inactivé ou le PEG. Pour des raisons de standardisation des conditions de fusion, le virus Sendai inactivé est maintenant abandonné au profit du PEG.

D) La fusion cellulaire

Un état favorable à la fusion cellulaire a été défini par ANDERSSON et MELCHER (1978) qui indiquent que des lymphocytes stimulés par le lipopolysaccharide (LPS) expriment une aptitude à la fusion cellulaire supérieure à celle des lymphocytes non stimulés. Les populations lymphocytaires stimulées par le LPS sont riches en cellules blastiques. ANDERSSON et MELCHER (1978) démontrent que les cellules blastiques sont plus sensibles à la fusion que les petits lymphocytes (cellules au terme de leur évolution).

lymphocytaire (rate, ganglions, sang).

d'une grande quantité de cellules immunes, déterminent le choix de la source

Par clonage, on obtient une population cellulaire homogène issue d'une seule cellule sécrétant donc une seule immunoglobuline.

G) Production massive d'anticorps monoclonaux

La production massive d'anticorps monoclonaux peut être envisagée sous deux aspects :

- La culture massive in vitro
- La production d'ascite in vivo

1 - La culture massive in vitro

Les clones cellulaires hybrides peuvent être développés en culture massive. Les anticorps monoclonaux synthétisés par les cellules hybrides sont excrétés dans le milieu de culture. Des concentrations de l'ordre du µg/ml de protéine monoclonale sont couramment observées dans ces conditions, mais varient largement en fonction du clone cellulaire envisagé. Le surnageant de telles cultures est un matériel abondant pour l'isolement des anticorps monoclonaux. Cette méthode s'applique surtout aux hybrides hétérologues qui ne peuvent être injectés à l'animal.

2 - Induction d'ascites in vivo

Par la fusion, l'hybride cellulaire acquiert la propriété tumorigénique des cellules myélomateuses. Les hybrides cellulaires homologues, inoculés par voie intrapéritonéale chez un animal receveur histocompatible conduit rapidement au développement d'une tumeur intrapéritonéale d'ascite sécrétante qui accompagne la production d'un liquide d'ascite riche en protéine monoclonale. Les concentrations d'anticorps monoclonaux sont 10 à 1000 fois supérieures à celles observées dans les surnageants de culture cellulaire.

Avant d'aborder les multiples domaines d'application des anticorps monoclonaux, nous concluerons ce paragraphe par un résumé schématique des différentes étapes présidant à la production d'un clone cellulaire hybride producteur d'anticorps : Figure 8.

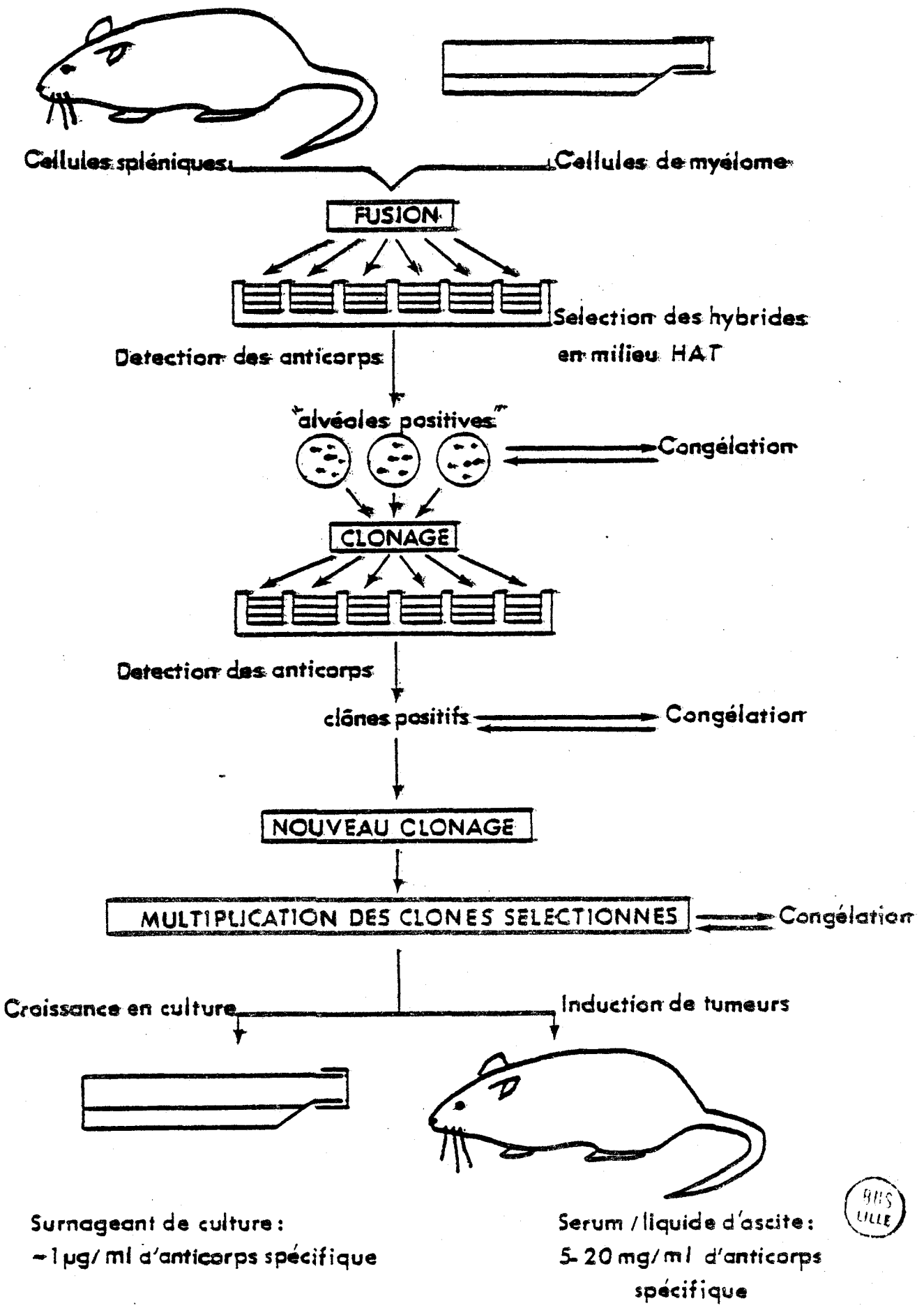
VI. APPLICATIONS DES ANTICORPS MONOCLONAUX

KÖHLER et MILSTEIN n'avaient pas mesuré l'immense portée de leurs travaux, pourtant il suffit de parcourir la volumineuse bibliographie relative aux anticorps monoclonaux pour comprendre pourquoi cette découverte a représenté une "révolution en immunologie".

L'obtention de ces anticorps purifiés en quantité "illimitée" a ouvert la voie à de nombreuses études qui jusqu'alors étaient impossibles à envisager. L'outil monoclonal a très vite débordé le cadre de la recherche fondamentale pour s'inscrire dans une phase d'exploitation industrielle. Il suscite aujourd'hui par le biais des industries pharmaceutiques des enjeux financiers considérables, en 1980, 25 millions de dollars étaient investis dans cette technologie. On estime qu'en 1987 le marché mondial des anticorps monoclonaux atteindra 500 millions de dollars (LIPINSKI et HERZENBERG, 1980).

Etablir un catalogue systématique de l'utilisation de l'anticorps monoclonal serait presque impossible en égard à l'extrême densité des travaux effectués, aussi, dans les paragraphes suivants envisagerons-nous, à l'aide de quelques exemples, les différents champs d'application de cette méthodologie.

FIGURE 8 : PROTOCOLE DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX



BHS LILLE

A) Les marqueurs de populations cellulaires

L'étude des sous-populations lymphocytaires est l'un des exemples les plus marquants du pouvoir de discrimination antigénique apporté par l'anticorps monoclonal. Il était jusqu'alors difficile de relier l'expression d'un marqueur T lymphocytaire à une fonction biologique précise, depuis 1979 des anticorps monoclonaux spécifiques des thymocytes (Mc MICHAEL et coll., 1979) des lymphocytes T périphériques (REINHERZ et coll., 1979a), des lymphocytes inducteurs (REINHERZ et coll., 1979b), des lymphocytes T suppresseurs (REINHERZ et coll., 1980a) ont permis d'établir cette corrélation.

B) Les antigènes de différenciation tissulaire

Les anticorps produits contre ce type d'antigène sont de précieux outils à l'étude de l'évolution des différents organes au cours de leur formation. DALCHAU et coll. (1980), EISENBARTH et coll. (1979) décrivent des anticorps monoclonaux spécifiques du neurone.

C) Les antigènes ubiquitaires

La fusion de cellules de souris immunisées par des cellules humaines a permis la production d'anticorps monoclonaux spécifiques des groupes sanguins A, B, O permettant de la sorte le groupage sanguin (BARNSTABLE et coll., 1978). Des réactifs spécifiques des groupes d'histocompatibilité HLA ont récemment été décrits dans la revue générale de BRODSKY et Coll. (1980).

D) Les antigènes tumoraux

La mise en évidence d'antigène spécifique, présents à la surface de cellules cancéreuses, est un autre aspect de l'anticorps monoclonal. RITZ (1980) produit un anticorps spécifique des leucémies lymphatiques.

LOCKHART et coll. (1980), UOTILA et coll. (1980) décrivent des anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène carcinoembryonnaire et de l'alpha-fœtoprotéine qui est aussi décelé au niveau des tissus embryonnaires. Cette découverte débouche sur une application directe au diagnostic de ces maladies.

E) Etude des antigènes parasitaires

L'extrême complexité de la mosaïque antigénique parasitaire freine considérablement l'investigation des potentialités vaccinales de ces antigènes. Les techniques classiques d'immunoabsorption couplées à l'utilisation des anticorps monoclonaux conduiront certainement à la caractérisation et à l'isolement des différents antigènes parasitaires comme à l'étude de leur pouvoir immunoprotecteur. Des résultats en ce sens ont été apportés par YOSHIDA et coll. (1980) dans le système Plasmodium berghei où un antigène de PM 44 000 a été isolé.

F) Application pharmacologique

Les anticorps monoclonaux ont ouvert une nouvelle perspective dans le traitement spécifique des tumeurs cancéreuses. Le couplage d'une drogue anticancéreuse, ou d'une toxine à un anticorps monoclonal spécifique de déterminant antigénique exprimé par les cellules malignes permet une focalisation sélective de l'activité toxique de ces substances sur les cellules cancéreuses.

Ces résultats prometteurs in vitro ont été obtenus par GUILLILAND et Coll. (1980) qui induisent la destruction de 100 % des cellules de carcinome colorectal humain, grâce au couplage de la chaîne, de la chaîne A de la toxine diphtérique ou de la toxine du ricin à un anticorps monoclonal

spécifique de ces cellules tumorales. Dans les mêmes conditions, aucune cytotoxicité n'est observée pour les cellules saines. La technique de couplage présente deux avantages indiscutables : L'utilisation de doses faibles de substance cytotoxique : la spécificité d'action des toxines au niveau des cellules malignes.

G) Application au diagnostic

L'anticorps monoclonal est de plus en plus utilisé comme réactif biologique spécifique dans la caractérisation de certaines leucémies (REINHERZ et coll., 1980b), mais il se révèle de plus en plus, un instrument idéal pour la localisation fine des tumeurs cancéreuses et de leurs métastases. BALLOU et coll. (1978) produisent un anticorps monoclonal spécifique d'un tératocarcinome de souris et le marquent à l' ^{125}I . L'anticorps monoclonal radiomarké injecté chez l'animal permet par la technique de scintigraphie de localiser les foyers de cancérisation. Cette technique de localisation fine des foyers de cancérisation trouvera certainement une application directe dans le traitement chirurgical de certaines tumeurs.

Ce bref résumé révèle le large éventail d'application de l'anticorps monoclonal. Cette méthodologie permet d'aborder les situations les plus diverses. De par son extrême spécificité, elle permet l'obtention de souches adaptées à la dissection des mécanismes biologiques complexes tels que la réponse immunitaire suscitée par l'infection parasitaire. C'est donc dans ce contexte très particulier que nous l'avons envisagée, afin de définir précisément le rôle de la réponse humorale dans l'établissement de l'immunité à l'infection expérimentale du rat par S. mansoni.

CHAPITRE.III.
MATERIEL ET METHODES

I - CONDITIONS DE CULTURE

La production d'anticorps monoclonaux s'appuie essentiellement sur les techniques de culture cellulaire. Celles-ci doivent permettre le maintien des différentes lignées cellulaires dans un état physiologique le plus favorable soit à l'obtention d'un rendement de fusion élevé (cellules myélomateuses), soit à la sécrétion optimum d'immunoglobulines (cellules hybrides). On comprend donc que le choix des milieux de culture cellulaire soit un facteur déterminant au succès de l'hybridation.

A) Les milieux de culture cellulaire

La nature, la composition et l'utilisation des différents milieux de culture employés dans notre travail sont résumées dans le tableau 4.

B) Utilisation des cellules nourricières

Si dans la plupart des cas, le simple renouvellement du milieu de culture suffit à l'entretien des lignées cellulaires, deux étapes essentielles dans la production des anticorps monoclonaux requièrent des conditions de cultures toutes particulières, la phase de sélection des hybrides cellulaires et la phase de clonage. Dans ces deux cas, l'utilisation d'un tapis de cellules nourricières favorise la multiplication cellulaire en apportant aux cellules hybrides isolées de nombreux facteurs de croissance et en participant au maintien d'un pH physiologique compatible au développement de ces cellules.

TABLEAU 4COMPOSITION ET UTILISATION DES MILIEUX DE CULTURE
CELLULAIRE

Nature	Composition	Utilisation
Milieu A	Milieu DMEM (a) 4 x 10 ⁻³ M NaHCO ₃ 3,5 % AANE (b) 15 % SVF (c) 100 UI/ml penicilline 50 µg/ml streptomycine pH 7,2 - 7,3	culture des cellules myélomateuses et hy- brides
Milieu B	Milieu DMEM (a) 4 x 10 ⁻³ M NaHCO ₃ 25 mM HEPES 100 UI/ml penicilline 50 µg/ml streptomycine pH 7,3	Fusion cellulaire
Milieu HAT	Milieu A contenant : 1 x 10 ⁻⁴ M hypoxanthine 4 x 10 ⁻⁴ M aminoptérine 1,6 x 10 ⁻⁵ M thymidine	Sélection des hybrides cellulaires
Milieu HT	Milieu HAT sans aminop- térine	Culture des cellules hybrides (transition entre le milieu HAT et le milieu A)

a) DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco à 4,5 g/l de glucose (GIBCO, U.S.A.)

b) AANE : acide aminé non essentiel (GIBCO, USA)

c) SVF : sérum de veau foetal décomplémenté par chauffage 1 h à 56°C

d) DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco à 1 g/l de glucose (GIBCO, USA)

9/15
1975

1 - Nature des cellules nourricières

Différentes sources de cellules nourricières peuvent être envisagées, des souches fibroblastiques irradiées, des thymocytes, nous avons pour notre part employé des cellules péritonéales adhérentes de souris Balb/C, constituées de macrophages et de cellules fibroblastiques. La présence de macrophages dans le tapis cellulaire nourricier permet l'élimination rapide des débris cellulaires issus de la nécrose des cellules myélomateuses lors de la phase de sélection.

2 - Préparation des cellules nourricières

- Les cellules nourricières sont prélevées à l'aide d'une seringue par lavage de la cavité péritonéale de souris Balb/c de 2 à 3 mois par 6 ml de milieu A
- 12 ml d'une suspension cellulaire sont réalisés en milieu A à partir de la totalité des cellules péritonéales récoltées pour chaque lavage ;
- des fractions aliquotes de 0,5 ml de la suspension de cellules péritonéales sont réparties dans les 24 alvéoles d'une plaque de culture cellulaire (Nunc 24 alvéoles). Dans le cas précis du clonage, les 12 ml de suspension de cellules péritonéales sont distribués à raison de 50 μ l dans les alvéoles de 2 plaques de culture cellulaire de type Nunc 96 (96 alvéoles)
- les plaques de culture sont incubées à 37°C, en atmosphère humide à 5 % de CO₂.
- après 48 heures d'incubation, les cellules non adhérentes sont éliminées par aspiration du surnageant cellulaire, laissant au fond des alvéoles un tapis cellulaire essentiellement constitué de cellules fibroblastiques et de macrophages

II - LES LIGNÉES CELLULAIRES MYÉLOMATEUSES

Nous avons exploité la capacité de fusion cellulaire de deux cellules myélomateuses : la souche P3X63Ag8 (KOHLER et MILSTEIN, 1975) sécrétant une IgG1, issue du myélome de souris Balb/c MOPC 21 et la souche IR983F (BAZIN et coll., 1980) non productrice et non sécrétante, isolée d'un immunocytome de rat LOU/C. Ces deux lignées myélomateuses sont résistantes à 20 µg/ml de 8 azaguanine et présentent une déficience en Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (E.C.2.4.2.8).

III - LES CELLULES IMMUNES

Elles sont isolées de la rate d'animaux infestés depuis 25 à 35 jours par 1000 à 2000 furcocercaires de *S. mansoni*, soit d'animaux immunisés par une fraction glycoprotéique semi-purifiée de vers adultes.

A) Système d'infection expérimentale du rat

1 - Entretien du cycle expérimental de *Schistosoma mansoni* dans le laboratoire

La souche de *S. mansoni* utilisée dans notre laboratoire est d'origine sud-américaine et a été isolée en Guyane Hollandaise. L'hôte intermédiaire est le mollusque *Biomphalaria glabrata*, l'hôte définitif est le hamster doré *Mesocricetus auratus*.

Chaque mollusque est infecté par 10 miracidiums obtenus après éclosion des oeufs prélevés chez le hamster infecté.

Après 21 jours d'infection, les mollusques sont exposés à la lumière, et à une température de 20°C. Ils libèrent les furcocercaires, formes infectantes pour l'hôte vertébré. Les hamsters sont infectés par baignade dans de

l'eau désionisée contenant environ 900 furcocercaires. Après pénétration transcutanée, les furcocercaires se transforment en schistosomules qui atteignent le stade adulte en 35 à 40 jours. La ponte des oeufs débute alors et les oeufs se logent dans le foie et les intestins du hamster infecté. Les vers adultes peuvent être collectés par perfusion du foie et des veines mésentériques après 45 jours d'infection.

2 - Infestation du rat

Des rats Fischer ou LOU/C femelles (180 à 200 g) sont maintenus en décubitus dorsal. Sur l'abdomen rasé, on applique un cylindre métallique de 2 cm de diamètre maintenu par une bande adhésive. Dans ce cylindre, on place une suspension aqueuse contenant 1000 à 2000 furcocercaires de *S. mansoni*. Le passage transcutané s'effectue pendant environ 30 minutes.

B) Système d'immunisation

1 - Préparation de l'antigène

Il s'agit d'une fraction semi-purifiée de glycoprotéine de vers adultes, obtenue par l'adsorption sur une colonne de Sépharose couplée à la concanaviline A (ConA) de l'antigène *S. mansoni* préparé selon CAPRON et coll. (1968).

- 100 µg d'antigène *S. mansoni* dissous dans 2 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 6 (NaCl M, CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ 0,001 M) sont déposés sur une colonne Kg115 (0,9 cm de diamètre, 15 cm de haut) (Pharmacia, Uppsala, Suède) contenant 10 ml de ConA Sépharose en tampon acétate pH 6.

- Après 80 mn de contact, la colonne est lavée pendant 2 heures par 100 ml de tampon acétate, afin d'éliminer les produits non fixés

- Les glycoprotéines sont éluées par 50 ml d'une solution 0,2 M dans l'eau déminéralisée de 2 D Manno-pyranoside (Industrie Biologique Française)
- L'éluat est dialysé 24 heures contre 5 litres d'eau déminéralisée puis concentré à 1 ml dans une cellule Amicon munie d'une membrane PM 10
- L'éluat concentré est filtré sur filtre Millipore 0,45 μm , la concentration protéique est évaluée au Spectrophotomètre UV à 280 nm (1 unité de densité optique = 0,8 mg/ml de protéines).

2 - Protocole d'immunisation

100 μl de la solution antigénique contenant 50 à 100 μg de glycoprotéine sont injectés en présence de 100 μl d'adjuvant complet de Freund (ACF) dans les coussinets plantaires d'un rat LOU/C (180 à 200 g). Un mois plus tard, une seconde injection de la même dose d'antigène est effectuée, toujours en présence d'ACF par voie sous-cutanée, au niveau du flanc. Une troisième injection de 50 à 100 μg d'antigène sans adjuvant est pratiquée par voie intraveineuse, 3 à 4 jours avant la manipulation de fusion cellulaire. Un délai de 2 à 3 mois est respecté entre la 2^{ème} et la 3^{ème} injection d'antigène.

C) Préparation des cellules immunes

La rate des animaux infectés ou immunisés est prélevée stérilement. Une suspension cellulaire est obtenue par homogénéisation de la rate en milieu B dans un homogénéiseur de verre muni d'un piston lâche. Les cellules spléniques sont ensuite lavées deux fois en milieu B. La séparation des hématies et des lymphocytes spléniques s'opère dans un tube stérile de 25 ml (STERILIN, Teddington Middlesex, England) sur un gradient de Ficoll/métrizoate de sodium préparé comme suit :

- une couche de 8 ml d'une solution à 9,6 % (p/v) de métrizoate de sodium et à 5,6 % (p/v) de Ficoll

- une couche de 2 ml d'une solution à 7,7 % (p/v) de métrizoate de sodium et à 4,5 % (p/v) de Ficoll.

Les cellules spléniques reprises dans 8 ml de milieu B sont disposées à la surface du gradient. Après 10 minutes de centrifugation à 800 G, les lymphocytes sont récupérés dans la couche intermédiaire du gradient et sont lavés deux fois par 50 ml de milieu B. Les hématies sédimentent au fond du tube. Le protocole expérimental de la préparation est résumé dans la figure 9.

IV - LA FUSION CELLULAIRE

La technique de fusion cellulaire utilisée s'inspire des travaux de HOWARD et coll. (1977), Mac KEARN et coll. (1977) et de CLEVINGER et coll. (1977).

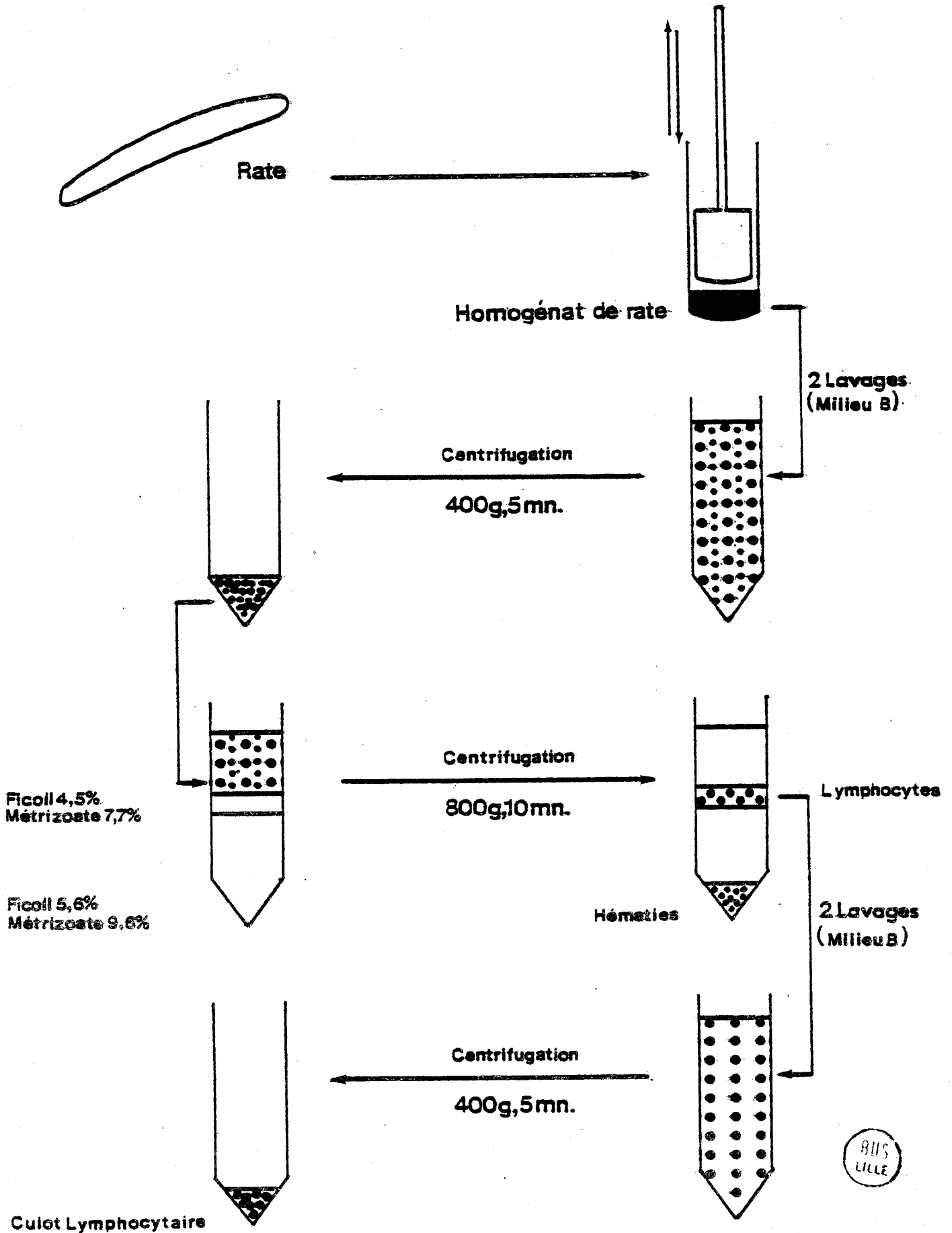
A) Agent de fusion

La fusion cellulaire est induite par le polyéthylèneglycol (PEG) diméthylsulfoxyde (DMSO), 30 g de PEG 1500 sont dissous dans 42 ml de tampon phosphate 10 mM, NaCl 15mM, pH 7,2 et 0,2 ml de DMSO. La solution est stérilisée à l'autoclave 15 mn à 121°C.

B) Protocole

La fusion est réalisée dans un tube à centrifugation conique de 50 ml (CORNING, USA).

FIGURE 9 : PREPARATION DES CELLULES IMMUNES



Les cellules myélomateuses lavées 2 fois par 50 ml de milieu B (élimination du sérum de veau foetal qui inhibe la fusion) sont ajoutées aux lymphocytes spléniques dans la proportion d'une cellule de myélome pour 10 cellules spléniques. Le culot cellulaire mixte obtenu après une centrifugation de 5 mn à 400 G est traité par 1 ml de la solution de PEG/DMSO ajoutée en 1 minute sous agitation douce, puis par 1 ml et 20 ml de milieu B ajoutés respectivement en 1 mn et 4 mn, toujours sous agitation douce (la solution de PEG/DMSO et le milieu B sont stabilisés à 37° au bain-marie). Les cellules sont ensuite lavées en milieu B pour éliminer l'excès de PEG/DMSO. Une suspension cellulaire contenant 5×10^5 cellules par ml est réalisée en milieu A à partir du culot cellulaire final. Des fractions aliquotes de 1 ou 2 ml sont réparties par alvéole de plaque de culture cellulaire (NUNCLON, 24 alvéoles) contenant un tapis de cellules nourricières. Les plaques sont incubées en atmosphère humide à 5 % de CO₂ et à 37°C.

V - SELECTION DES HYBRIDES

A) Principe

La population cellulaire obtenue après l'étape de fusion contient de nombreuses cellules myélomateuses n'ayant pas fusionné, il est donc nécessaire d'inhiber leur prolifération. La sélection s'opère par le milieu HAT (LITTLEFIELD, 1964). Le principe de sélection induit par l'aminoptérine a été précédemment décrit dans la figure 3.

B) Protocole

Après 24 heures de culture des cellules en milieu A, 1 ml de milieu est remplacé par 1 ml de milieu HAT, cette opération est répétée les 2 jours suivants puis tous les 5 jours. Les cellules sont généralement cultivées pendant 15 à 21 jours en milieu HAT puis en milieu HT.

VI - LE CLONAGE

Les populations cellulaires hybrides présentes dans les différentes alvéoles résultent en général de la multiplication de plusieurs cellules hybrides initiales dotées d'activités synthétiques très différentes. Le clonage permet l'isolement d'une population cellulaire homogène issue d'une cellule initiale.

Le clonage doit être pratiqué rapidement après la caractérisation d'une population hybride exprimant un caractère intéressant car les cellules les plus "prolifiques" supplantent rapidement les cellules à faible potentiel de multiplication.

A) Principe

Nous avons choisi pour le clonage la technique de dilution limite qui consiste à répartir une suspension cellulaire à raison de X ml par alvéole d'une plaque de culture cellulaire mais de telle façon que ces X ml ne contiennent qu'une seule cellule.

B) Protocole

Une suspension contenant 20 cellules hybrides par ml de milieu est répartie à raison de 50 μ l dans les alvéoles d'une plaque de culture cellulaire de type NUNCLON, (96 alvéoles) contenant un tapis de cellules péritonéales adhérentes de souris Balb/c. Après 24 heures de culture, 100 μ l de milieu sont ajoutés dans chaque alvéole, le milieu est renouvelé tous les 5 jours. Les plaques de culture sont observées tous les jours, les premiers clones apparaissent après 8 à 15 jours de culture. La sélection des clones

s'opère sur le surnageant des alvéoles présentant un clone unique. Les clones producteurs d'anticorps spécifiques sont sélectionnés et multipliés.

VII - PRODUCTION MASSIVE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

L'étude des activités biologiques des anticorps monoclonaux comme les techniques de caractérisation et d'isolement des antigènes-cibles nécessitent une phase de production massive de ces anticorps.

A) Production in vitro

Ne disposant pas d'une unité de culture continue, les surnageants de cellules hybrides sont récoltés au niveau de flacons de culture cellulaire. Des flacons de culture de 75 cm² de surface (FALCON) contenant 40 à 50 ml de milieu A sontensemencés par 10⁷ cellules hybrides et sont incubés à 37°C (5 % CO₂) pendant 48 heures. Les surnageants de culture sont alors récoltés, centrifugés 5 minutes à 400 G et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

B) Production in vivo

Cette voie utilise les propriétés tumorigéniques des cellules hybrides qui injectées chez un animal histocompatible, induisent rapidement la formation de tumeurs sécrétrices ; 5 x 10⁶ cellules hybrides homologues (Rat/Rat) sont injectées par voie sous-cutanée chez le rat LOU/C. Celui-ci développe en 3 à 6 semaines une tumeur sous-cutanée. L'homogénéisation des tumeurs sous-cutanées en milieu DMEM (homogénéiseur muni d'un piston lâche) permet l'obtention d'une grande quantité de cellules hybrides (5 x 10⁸ à 8 x 10⁸ cellules). Les cellules hybrides sont alors injectées dans la cavité péritonéale du rat LOU/C (5 x 10⁷ cellules par inoculum). L'injection intrapéritonéale des cellules hybrides induit la formation de tumeurs d'ascite dans les 7 à 15 jours suivants l'inoculation. 30 à 60 ml de

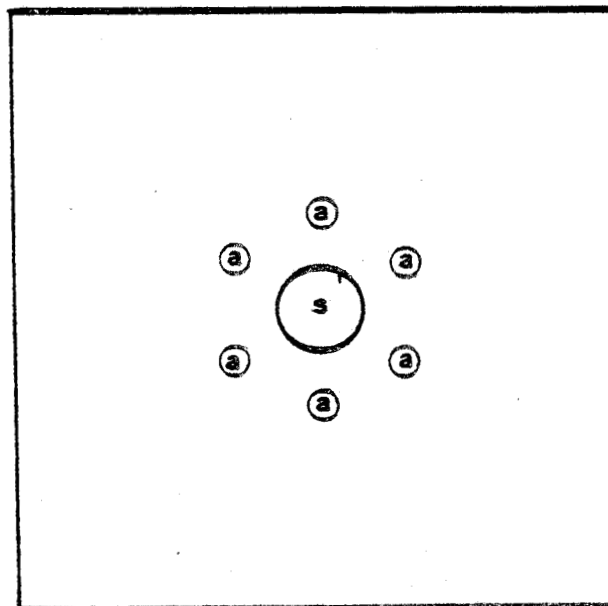
liquide d'ascite peuvent être alors ponctionnés à l'aide d'une seringue tous les 3 à 5 jours. Cette opération peut être répétée 2 à 3 fois au maximum pour le même animal.

VIII - CARACTERISATION DE LA PRODUCTION D'IMMUNOGLOBULINES

La technique de double-diffusion en gel décrite par OUCHTERLONY (1958) a permis l'identification de l'isotype des anticorps monoclonaux sécrétés par les hybrides cellulaires.

Les réactions d'immunodiffusion sont réalisées en gel d'agarose à 0,9 % (Indubiose A37, Industrie Biologique Française) de 2 mm d'épaisseur préparé en tampon barbital sodique pH 8,2.

Les puits de dépôt sont découpés à l'emporte-pièce suivant le schéma ci-dessous :



a: anti-sérums spécifiques

s: surnageant cellulaire

Le puits central reçoit 125 μ l de surnageant de culture de cellules hybrides, les puits périphériques 20 μ l d'antisérum monospécifique anti-IgG2a, anti-IgG2b, IgG2c, anti-IgM, anti-IgA ou anti-IgE de rat aimablement confiés par le Pr H. BAZIN et préparés selon BAZIN et coll. (1974).

La diffusion s'opère en chambre humide à la température du laboratoire pendant 48 heures. Les lames sont ensuite lavées 4 fois en solution de NaCl 9 g/l pendant 12 heures puis 6 heures en eau désionisée. Les lames sont recouvertes d'un papier Whatman n°1 humidifié, séchées puis colorées par le bleu de Coomassie.

IX. - MISE EN EVIDENCE DE LA SPECIFICITE ANTI-SCHISTOSOMA MANSONI DES IMMUNOGLOBULINES PRODUITES

La présence dans les surnageants de culture cellulaire d'anticorps de spécificité anti-*S. mansoni* a été décelée par la technique d'immunofluorescence indirecte sur coupe de schistosomules et de schistosomes adultes.

A) Principe de la réaction

La fixation spécifique d'anticorps sur les motifs antigéniques du parasite est révélée par un sérum anti-immunoglobuline de rat marqué à la fluorescéine :

B) Protocole

1 - Préparation des coupes de schistosomules

Nous utilisons pour cette technique des schistosomules "mécaniques" préparés selon RAMALHO-PINTO (1976) :

- 2000 à 3000 furcocercaires sont placées dans un tube de verre et sont maintenues dans la glace pendant une heure pour permettre leur immobilisation et leur sédimentation.
- Le surnageant est éliminé et les furcocercaires sont soumises à une forte agitation pendant 2 minutes. Cette étape entraîne la rupture de la queue de la furcocercaire qui induit sa transformation en schistosomules.
- La suspension obtenue est déposée sur 8 ml de milieu minimum de Eagle (MEM) tamponné à pH 7,3 contenu dans une burette de 20 ml.
- Les schistosomules sont récupérés sous forme de culot après 20 minutes de sédimentation et sont lavés 2 fois en tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7,2).
- Les schistosomules sont fixés pendant une heure par une solution de glutaraldéhyde à 0,4 %.
- Après 2 lavages en tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7,2), les schistosomules sont inclus dans le TISSUTECK (LABTECK PRODUCTS, USA) et congelés à -70°C.
- Des coupes de 8 μ m sont réalisées au microtome à congélation (-20°C) et sont placées sur des lames traitées par une solution à 0,75 % (p/v) de gélatine.
- Les coupes de schistosomules sont conservées à -20°C.
- Avant leur utilisation, les coupes de schistosomules sont fixées 20 mn à -20°C par l'acétone.

2 - Préparation des coupes de schistosomes adultes

La mise en évidence de la spécificité anti- *S. mansoni* des anticorps produits a été aussi envisagée sur des coupes de 4 μ m de schistosomes adultes inclus en paraffine. La technique de préparation des coupes de vers adultes est résumée dans le tableau 5. Chaque bloc de paraffine contient 300 à 400 schistosomes prélevés chez le hamster infecté depuis 40 à 45 jours.

Étapes	Durée	Nature du bain
Fixation	16 heures	Fixateur de BOUIN
Déshydratation	5 mn	Ethanol à 50 %
	5 mn	Ethanol à 50 %
	5 mn	Ethanol à 50 %
	10 mn	Ethanol à 70 %
	10 mn	Ethanol à 70 %
	10 mn	Ethanol à 90 %
	10 mn	Ethanol à 90 %
	10 mn	Ethanol à 90 %
	10 mn	Ethanol absolu
	10 mn	Ethanol absolu
	10 mn	Ethanol absolu
Inclusion	30 mn	Toluène
	30 mn	Toluène
	30 mn	Toluène
	1 heure	paraffine à 56°C
	1 heure	paraffine à 56°C
	1 nuit	paraffine à 56°C

Des blocs d'inclusion sont obtenus par transfert des vers dans un moule de solidification contenant de la paraffine fondue à 56°C. La solidification de la paraffine s'effectue pendant environ une heure à la température du laboratoire.

* Composition du fixateur de BOUIN :

H2O distillée	100 ml
Acétate neutre de cuivre	2,5 g
Acide picrique	4 g
Formol à 40 %	10 ml
Acide acétique	1,5 ml



Des coupes de 4 μm sont réalisées au microtome et sont fixées sur des lames de verre par une solution de gélatine à 0,75 % (p/v).

Les coupes de schistosomes adultes sont déparaffinées (3 bain de toluène, 5 mn) et réhydratées (1 bain d'éthanol absolu, 10 mn ; 1 bain d'éthanol à 80 %, 10 mn et 1 bain d'éthanol à 60 %).

3 - La réaction d'immunofluorescence

Elle se déroule en deux temps :

* Fixation de l'anticorps sur les coupes de parasite :

- 50 μl de surnageant de culture de cellules hybrides, concentrés 3 fois par lyophilisation ou 50 μl d'ascite diluée sont déposés sur les coupes de parasite (30 mn) ;
- les lames sont lavées 3 fois en tampon phosphate 10 mM pH 7,2.

* Révélation de la fixation de l'anticorps :

- 50 μl de sérum de lapin anti-immunoglobulines de rat marqué à la fluorescéine (MILES-YEDA-LTP, Israël) dilués au 1/40e sont déposés sur les coupes de parasite ;
- après 30 minutes de contact à l'obscurité, l'excès d'antisérum est éliminé par deux lavages de 10 minutes par 100 μl de tampon phosphate 10 mM pH 7,2, et par un lavage de 10 minutes par une solution au 1/10 000 de Bleu Evans en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,2 ;
- 1 goutte de glycérol à 50 % (v/v) en tampon phosphate pH 7,2 est placée sur chaque coupe
- les lames recouvertes d'une lamelle sont observées au microscope doté d'une source de lumière ultraviolette.

4 - Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en croix (0 à 4 croix) en fonction de l'intensité de la fluorescence observée.

* Remarque : Pour chaque expérience nous avons utilisé des témoins de réaction traités dans les mêmes conditions :

. témoins négatifs :

- témoin sérum de rat sain dilué au 1/10e
- témoin tampon phosphate de sodium
- témoin surnageant de culture ou liquide d'ascite de cellule myélomateuse

. témoin positif

- sérum de rat infecté par *S. mansoni* dilué au 1/10e

X - INVESTIGATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ANTICORPS PRESENTANT UNE SPECIFICITE ANTI-S. MANSONI

L'activité biologique in vitro des anticorps présentant une spécificité anti-*S. mansoni* a été explorée par les techniques de sérotoxicité et de cytotoxicité.

A) Etude de la sérotoxicité

1 - Principe

Le principe de cette méthode a été décrit précédemment dans le chapitre I.

2 - Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu HLEG : Hydrolysate de lactalbumine 0,5 % Earle, Glucose (GIBCO, Grand Island, N.Y.) auquel on ajoute 200 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine.

3 - Préparation des schistosomules

Les schistosomules sont préparés in vitro selon la méthode de CLEGG et SMITHERS (1972).

Un carré de peau de 3 cm de côté est prélevé stérilement sur l'abdomen rasé d'une souris Swiss mâle âgée de 3 mois. Ce fragment est dégraissé par grattage et tendu entre les deux cylindres d'un récolteur (Figure 10). La partie inférieure du collecteur contient du milieu HLEG maintenu à 37° dans un bain-marie, la partie supérieure est laissée à température ambiante et reçoit 2 ml d'une suspension aqueuse contenant 10 000 cercaires infectantes fraîchement émises.

Dans ces conditions, les cercaires traversent la peau en trois heures. Les schistosomules sont récupérés au fond du récolteur.

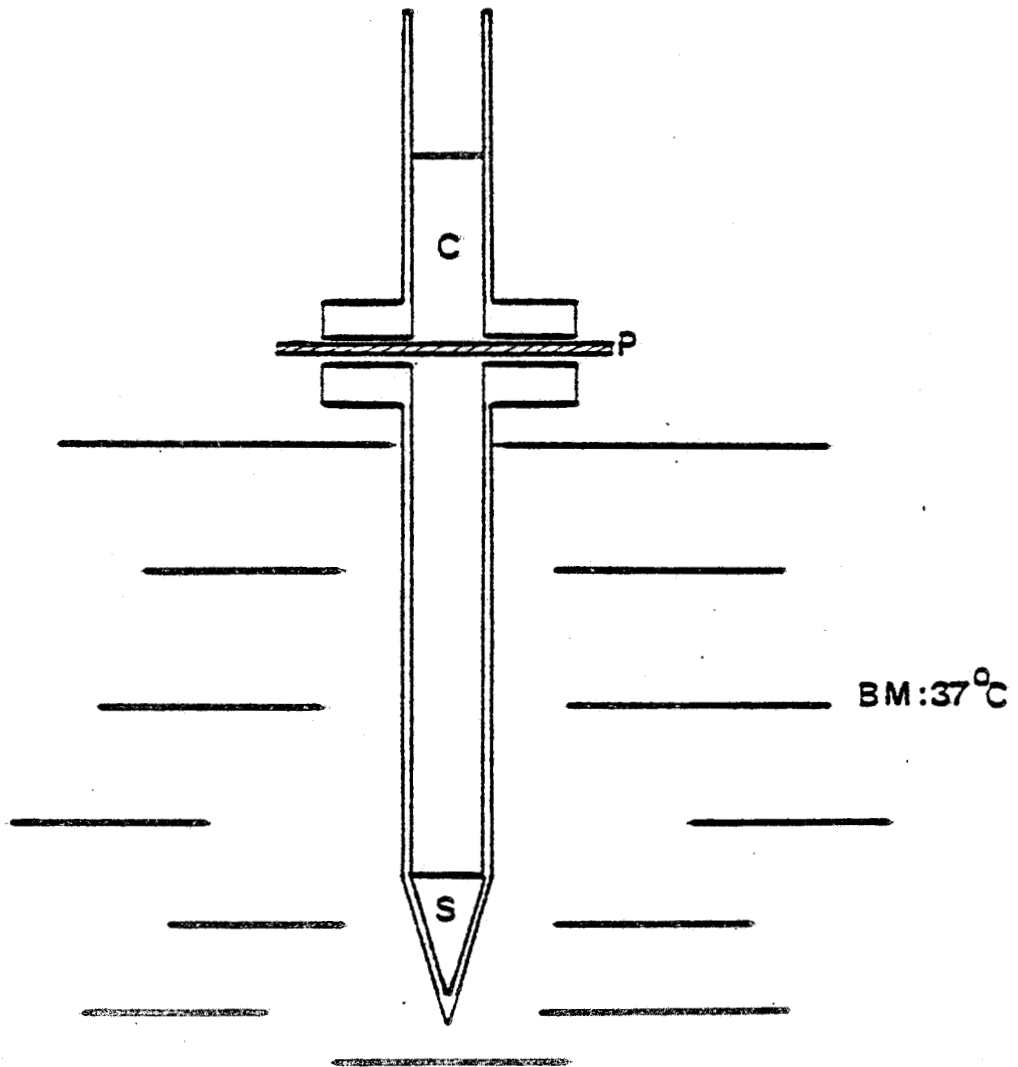
4 - Source de complément

Le sérum de cobaye obtenu à partir de sang prélevé par ponction intracardiaque constitue la source du complément.

5 - Réaction de sérotoxicité (CAPRON et coll., 1974)

100 µl de surnageant de culture cellulaire, concentré 2 fois par lyophilisation, ou 100 µl de liquide d'ascite dilué au 1/8e en milieu HLEG sont incubés dans une alvéole de plaque de culture cellulaire (type NUNCLON 96 Alvéoles) en présence de 50 schistosomules en suspension dans 60 µl de milieu HLEG, et 40 µl

FIGURE 10 : PREPARATION DES SCHISTOSOMULES : SCHEMA D'UN RECOLTEUR



C = Suspension aqueuse de cercaires

P = fragment abdominal de Peau de souris Swiss

S = les schistosomules "Peau" sont recueillis après 3 h d'incubation
(Bain-marie (BM) à 37°C)

de sérum de cobaye frais. Pour tenir compte de la sérotoxicité non spécifique du sérum de cobaye, le sérum de cobaye frais est remplacé dans certaines alvéoles témoins par 40 μ l de sérum de cobaye décomplémenté par chauffage (30 minutes à 56°C). Des témoins internes de réactions sont réalisés :

1 témoin positif : sérum de rat infecté

2 témoins négatifs : sérum de rat sain

surnageant ou liquide d'ascites de
cellules myélomateuses

Les plaques sont incubées à 37°C (5 % de CO₂). La lecture s'effectue après 4 jours d'incubation.

6 - Expression des résultats

L'activité létale est exprimée en pourcentage de schistosomules morts par rapport au nombre total de schistosomules présents dans chaque alvéole.

B) Etude de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles

Le principe de la méthode a été décrit dans le chapitre I.

1 - Milieu de culture

Le milieu de culture utilisée est le MEM : Eagle's minimum essential medium (Institut Pasteur Production, Paris) contenant 1 % de sérum de rat sain inactivé par chauffage (30 minutes, 56 °C) 20ng/ml de tripeptide synthétique Glycyl-Histidyl-Lysine (Calbiochem., San Diego, Ca.) (PICKART et coll., 1973), 100 UI/ml de pénicilline et 50 μ g/ml de streptomycine.

2 - Préparation des cellules effectrices

10 ml d'eau physiologique sont injectés dans la cavité intrapéritonéale à des rats Fischer mâles ou LOU/C mâles. 48 heures plus tard, les cellules sont prélevées par lavages de la cavité péritonéale par 20 ml de milieu de culture contenant 25 IU/ml d'héparinate de calcium (Laboratoire CHOAY, PARIS). La suspension cellulaire obtenue est enrichie en éosinophiles en laissant adhérer les cellules pendant 2 heures à 37°C dans un flacon de culture cellulaire de 25 cm² de surface (CORNING, USA). La population cellulaire non adhérente contient 40 à 90 % d'éosinophiles et 4 à 10 % de mastocytes.

3 - Réaction de cytotoxicité (CAPRON et coll., 1978a)

50 schistosomules préparés selon la méthode de CLEGG et SMITHERS (1972), en suspension dans 50 µl de milieu de culture sont incubés 24 heures à 37°C en présence de 100 µl de surnageant de culture concentré 2 fois par lyophilisation, ou de 50 µl de liquide d'ascite dans les alvéoles de plaque de culture (NUNCLON, 96 alvéoles).

100 µl de la suspension cellulaire enrichie en éosinophiles sont alors ajoutés (rapport cellule effectrice/cible : 6000/1). Le pourcentage de cytotoxicité est évalué après 48 heures d'incubation à 37°C (5 % CO₂).

Pour chaque expérience, plusieurs témoins sont réalisés :

- 1 témoin positif: sérum de rat infecté depuis 28 jours (dilué au 1/4e)
- 2 témoins négatifs : 1 sérum de rat sain dilué au 1/4e

1 surnageant ou liquide d'ascite de cellules myélomateuses

Pour tenir compte de la toxicité non spécifique des éosinophiles, des témoins sans cellules sont réalisés, la suspension cellulaire est remplacée par 100 μ l de milieu de culture.

4 - Expression des résultats

Le pourcentage de cytotoxicité correspond à la moyenne réalisée sur deux essais, du nombre de schistosomules morts par rapport au nombre total des schistosomules présents dans l'alvéole de culture.

XI - ETUDE DE L'ACTIVITE PROTECTRICE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

L'étude de l'activité protectrice des anticorps monoclonaux anti-*S. mansoni* a été envisagée grâce aux expériences de transfert passif .

A - Expériences de transfert passif de l'immunité

Deux sources d'anticorps monoclonal ont été utilisées pour nos expériences, le surnageant de culture cellulaire des hybrides cellulaires hétérologues souris x rat ou le liquide d'ascite induit par les hybrides cellulaires homologues rat x rat.

Dans le cas précis de l'IgM synthétisée par le clone cellulaire hétérologue A12-148, 2 ml de surnageant concentré 3 fois par lyophilisation sont injectés par voie intraveineuse dans la veine de la queue de rat Fischer femelle (180 à 200 g) 24 heures avant l'infection par 1000 cercaires de *S. mansoni* .

Pour l'anticorps monoclonal de classe IgG2a produit par le clone hybride homologue B42-11, 2 ml de liquide d'ascite ont été injectés dans la veine du pénis du rat LOU/C (180 à 200 g) 4 heures après une infection par 1000 à 1500 cercaires de *S. mansoni* .

L'activité protectrice des anticorps monoclonaux vis-à-vis de l'infection par *S. mansoni* a été appréciée par la comparaison de la charge parasitaire installée chez l'animal traité par l'anticorps monoclonal, par rapport aux groupes d'infection témoins ayant reçu soit 2 ml d'une solution saline physiologique (NaCl 0,9 % dans l'eau distillée), soit 2 ml de surnageant ou de liquide d'ascite des cellules myélomateuses IR983 F.

La charge parasitaire a été évaluée par la technique de perfusion de poumon 4 jours après l'infection (SHER et coll., 1974b) ou 21 jours après l'infection par la technique de perfusion de foie (SMITHERS et TERRY, 1965c).

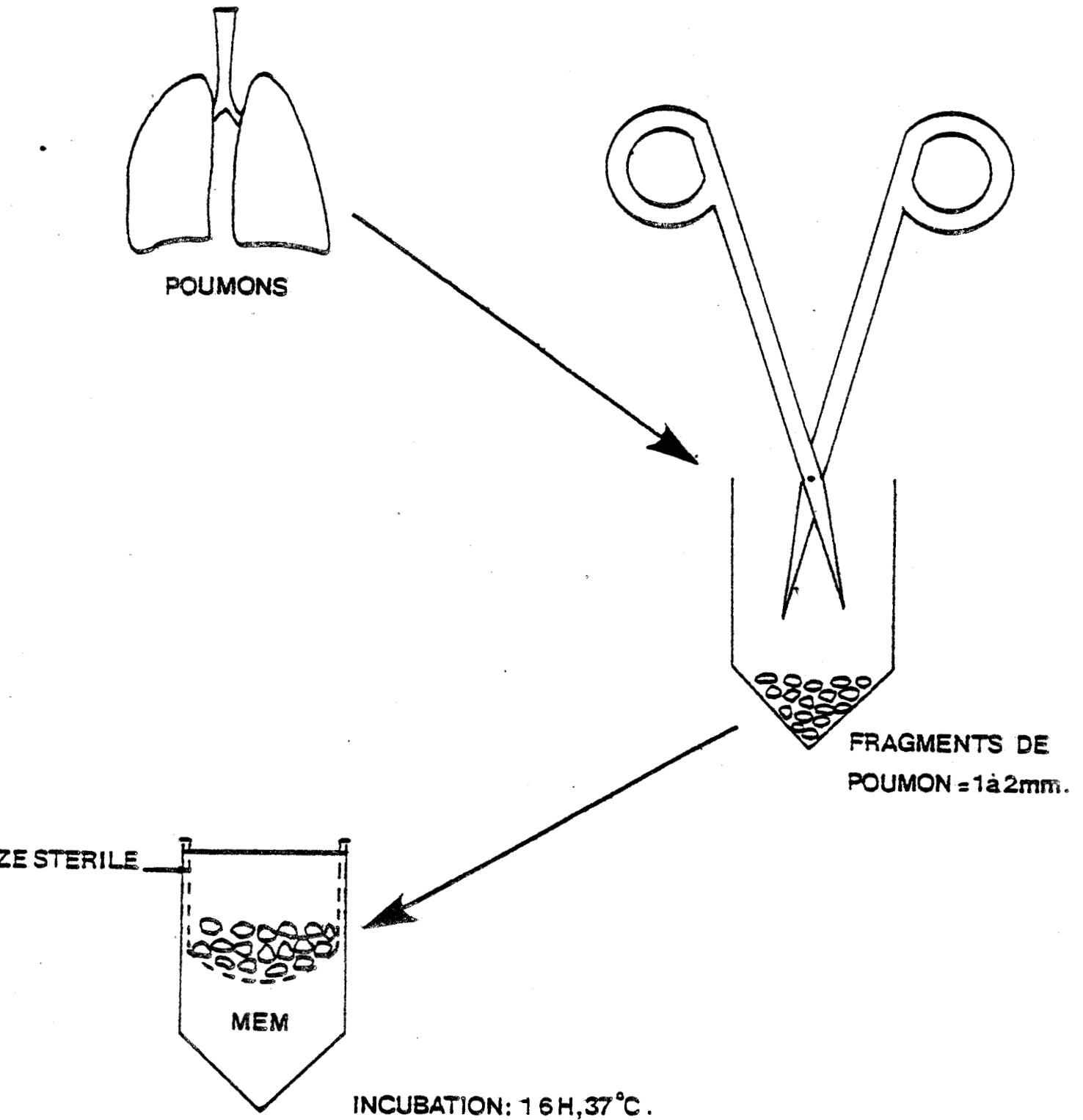
1 - La perfusion de poumon

Les animaux infestés depuis 4 jours sont sacrifiés, la cage thoracique est ouverte et les poumons sont prélevés et hachés en petits fragments à l'aide d'une paire de ciseaux. Les fragments de poumon sont incubés en milieu MEM contenant 1 % d'héparine dans un tube à centrifuger conique, muni d'un tamis de gaze stérile pendant 16 heures à 37°C (Figure 11). Les schistosomules présents dans les poumons migrent dans le milieu de culture et sédimentent au fond du tube. Un choc hypotonique de 2 minutes par 2 ml d'eau distillée permet la lyse des globules rouges contaminant le culot de sédimentation. Les schistosomules sont alors transférés en tube de Leighton et comptés sous microscope.

2 - Perfusion de foie

Le foie des animaux infectés depuis 21 jours est prélevé et perfusé par injection de 60 ml d'eau physiologique à 1 % d'héparine dans le lac veineux hépatique. Le perfusé est transféré dans un verre à pied où les parasites sédimentent en 20 minutes. Le surnageant est éliminé et les globules rouges sont lysés par addition de 30 ml d'une solution de NaCl à 4,5 g/l. Après une nouvelle sédimentation de 20 minutes, les vers transférés dans une boîte de Pétri sont comptés sous loupe binoculaire.

FIGURE 11 : PREPARATION DES SCHISTOSOMULES DE "POUMON"



BIS
LILLE

B) Expression du pourcentage de protection (PHILLIPS et Coll., 1977)

Le pourcentage de protection est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ protection} = \frac{\left(\begin{array}{l} \text{moyenne du nombre de} \\ \text{parasites chez} \\ \text{groupe témoin} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{l} \text{moyenne du nombre de} \\ \text{parasites du groupe} \\ \text{traité} \end{array} \right)}{\text{moyenne du nombre de} \\ \text{parasites du groupe témoin}} \times 100$$

XII- PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les techniques décrites par BAZIN et coll. (1974) ont été appliquées à la purification des anticorps monoclonaux produits.

A) Anticorps de classe IgM

Les anticorps de classe IgM sont précipités à 40 % de saturation finale en sulfate d'ammonium à partir des ascites diluées au 1/2 en eau physiologique, ou à partir des surnageants de culture cellulaire.

Trois étapes de précipitation successives de 30 minutes à 4°C sont réalisées sous agitation. Le précipité final est dissous en tampon Tris-HCl 0,005 M pH 8, NaCl 2 % (p/v) NaN₃ 1 % (p/v) et dialysé 48 heures contre le même tampon. 5 ml de la solution dialysée sont déposés sur une colonne de gel filtration de type ACA 34 de 26 mm de diamètre et 1000 mm de haut. Le premier pic obtenu correspond aux IgM (Figure 12).

B) Anticorps de classe IgG2a

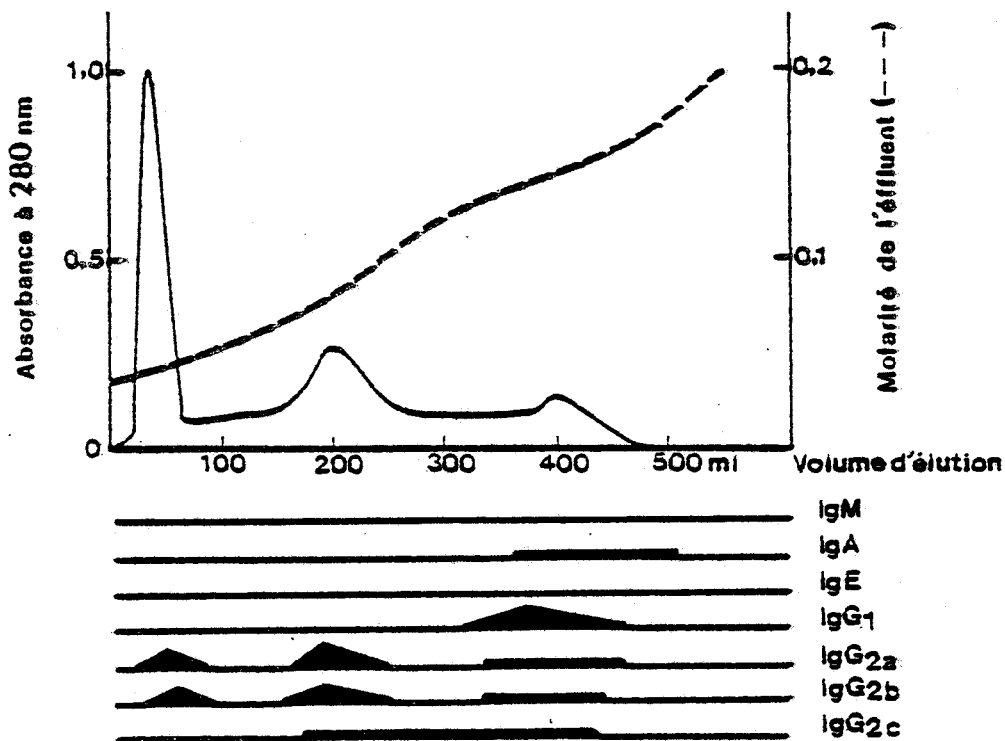
Les anticorps de classe IgG2a sont précipités à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium à partir du liquide d'ascite dilué au 1/2 en eau physiologique.

Trois cycles de précipitation successifs de 30 minutes à 20°C sont entrepris. Le précipité final est dissous en eau physiologique et dialysé 24 heures contre une solution d'eau physiologique, puis 48 heures contre un tampon Tris-HCl (0,05 M, pH 8). 5 ml de la solution dialysée sont déposés sur une colonne échangeuse d'ions de type DEAE-cellulose (Sephacryl, IBF) de 25 x 1000 mm. Les protéines sont éluées par un tampon Tris-HCl (0,05 M - 0,05 M NaCl). Le diagramme d'éluéion est décrit dans la figure 12.

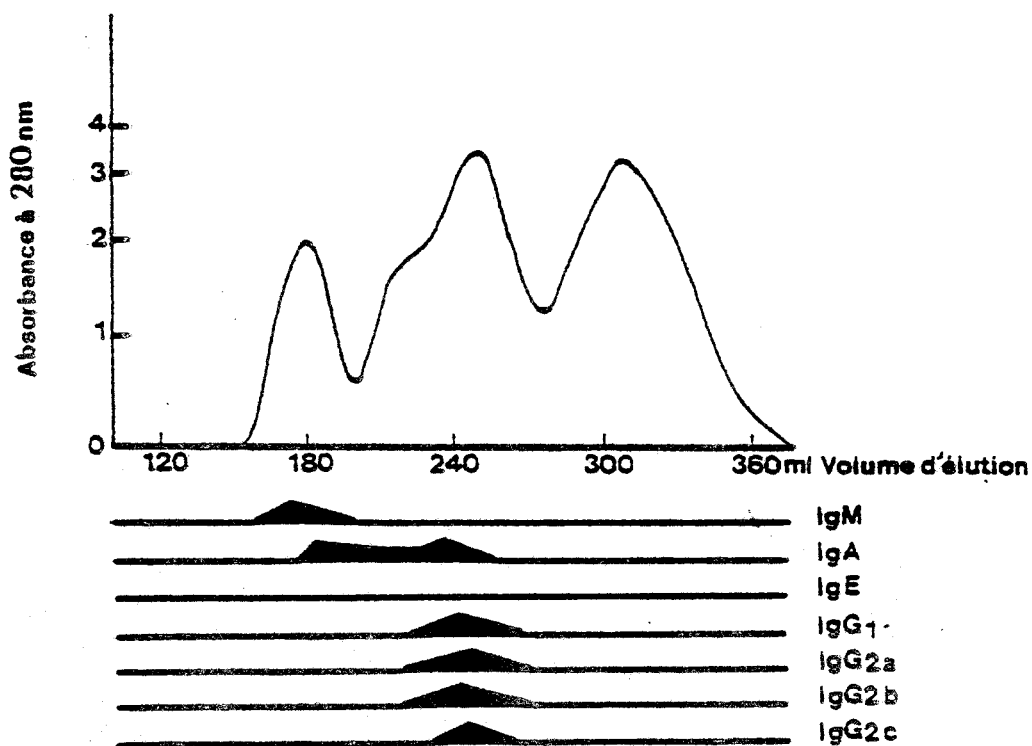
Les anticorps de classe IgG2c

Les anticorps monoclonaux de sous-classe IgG2c sont précipités à pH 6 par de l'eau distillée. 19 volumes d'eau distillée sont ajoutés à 1 volume de liquide d'ascite ou de surnageant de culture. Le précipité est dissous dans une solution de NaCl à 2 % (p/v) à pH 7, trois cycles de précipitation successifs sont effectués.

Figure 12 : PURIFICATION DES ANTICORPS (BAZIN et coll., 1974)



Distribution des différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines de rat en chromatographie sur colonne de DEAE cellulose.



Distribution des différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines de rat en chromatographie sur colonne G 200.



CHAPITRE.IV.
RESULTATS ET DISCUSSION

I - PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-SCHISTOSOMA MANSONI

Ne disposant pas dans un premier temps de cellules myélomateuses de rat exploitables dans le système de fusion cellulaire, nous avons envisagé la production d'anticorps monoclonaux de rat dans le cadre de l'hybridation hétérologue, utilisant des cellules myélomateuses de souris Balb/c et les cellules spléniques de rat Fischer infestés par S. mansoni.

L'étude quantitative et qualitative des populations cellulaires hybrides ainsi obtenues nous a permis de cerner certains paramètres de la réaction d'hybridation cellulaire.

La seconde étape de nos travaux a consisté, grâce à l'utilisation de la souche myélomateuse de rat LOU IR983F à produire différentes lignées cellulaires hybrides homologues.

A) Le système d'hybridation hétérologue : souris/rat

1 - Cinétique de multiplication des populations cellulaires hybrides

Dans ce système, les premières multiplications cellulaires sont généralement observées 4 à 8 jours après la fusion cellulaire mais des multiplications plus tardives s'opèrent jusqu'au 25ème jour.

Afin de réaliser une étude cinétique du développement cellulaire, nous avons arbitrairement défini comme critère de la multiplication cellulaire, la date de prélèvement des surnageants cellulaires hybrides, au niveau des alvéoles présentant un tapis cellulaire confluent.

Les résultats résumés dans la Figure n° 13 révèlent une variation importante dans l'apparition de ces populations cellulaires hybrides et indiquent un taux maximum de prélèvement dans la période de 12 à 17 jours correspondant à 75 % des hybrides cellulaires obtenues.

2 - Le rendement d'hybridation cellulaire

Le rendement de fusion cellulaire a été apprécié par le rapport du nombre d'alvéoles présentant un développement cellulaire sur le nombre total des alvéoles réalisées après fusion :

$$\text{Rendement de fusion} = \frac{\text{nombre d'alvéoles présentant une multiplication}}{\text{nombre total d'alvéoles de culture}}$$

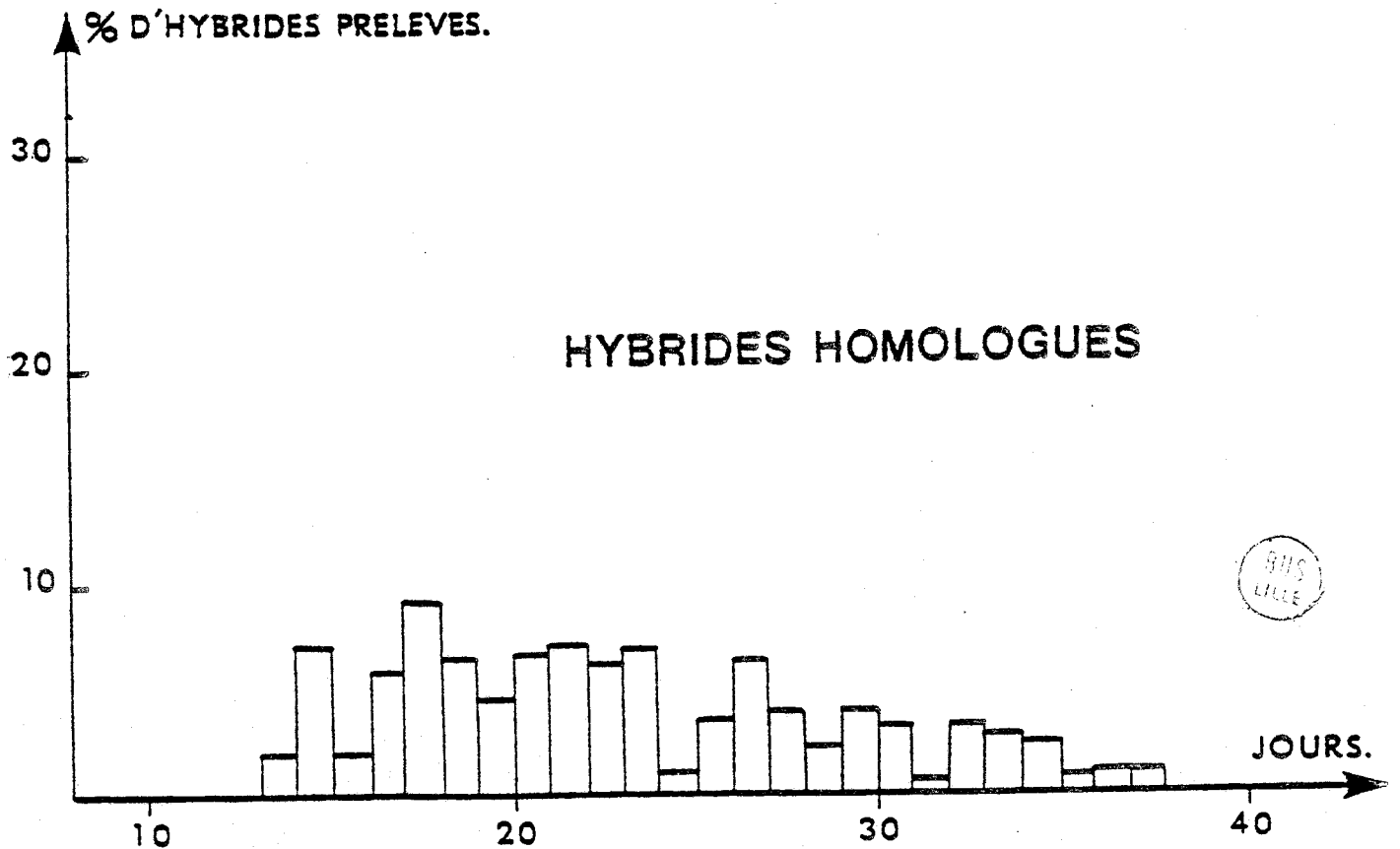
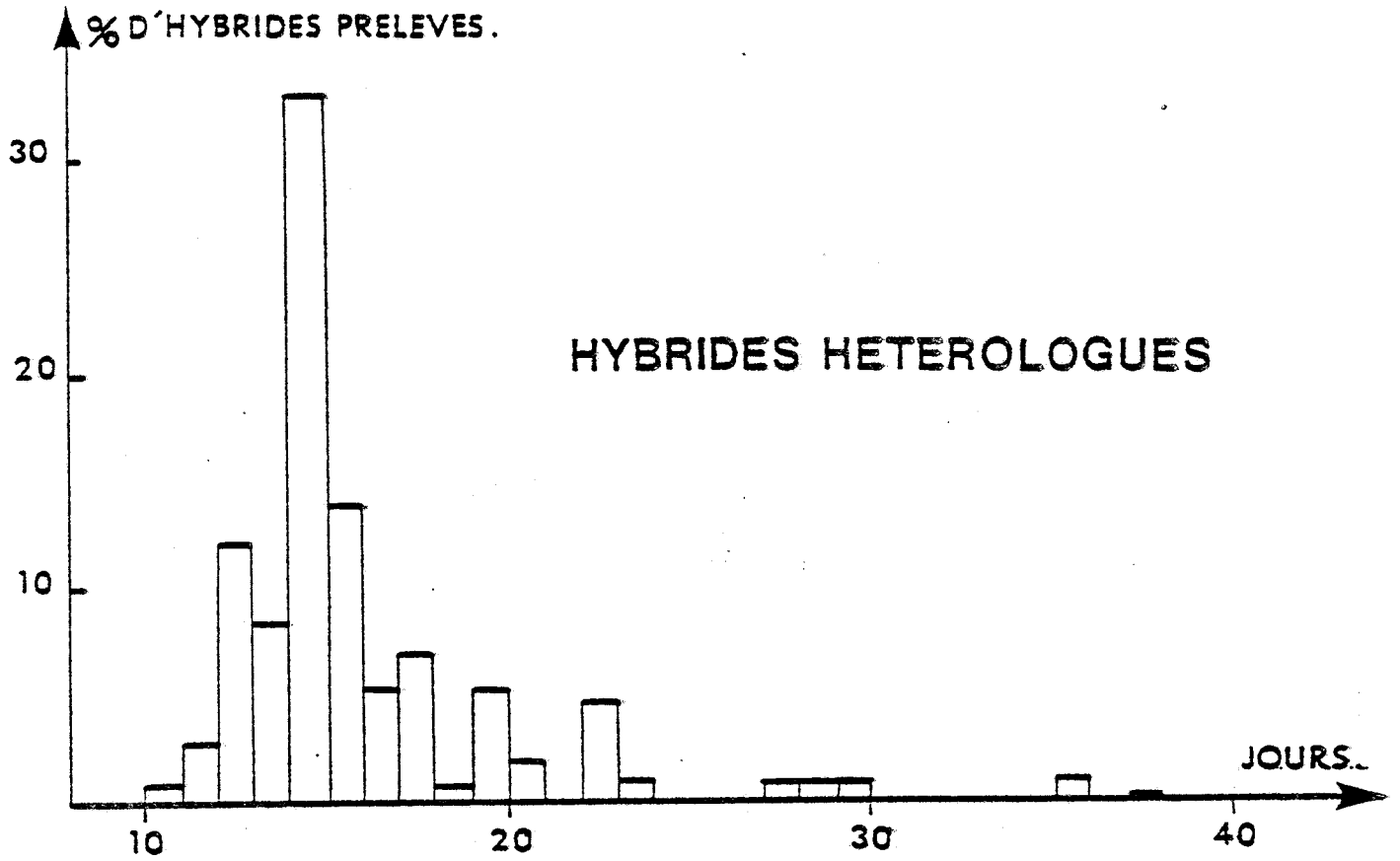
639 populations cellulaires hybrides ont été isolées à partir des 987 alvéoles issues de 11 manipulations d'hybridation successives, soit un rendement de 65 %. Cette valeur traduit la moyenne réalisée sur 11 manipulations d'hybridation mais en réalité des rendements compris entre 0 et 100 % peuvent être observés.

Ces variations considérables s'expliquent par la multitude des facteurs mis en jeu ; entre autre, l'état physiologique des cellules au moment de la fusion, le stade de maturation des lymphocytes spléniques (ANDERSON et MELCHER, 1978) les conditions de la fusion cellulaire, l'efficacité du tapis cellulaire nourricier, etc...

3 - Etude de l'activité anti-S. mansoni, nature des isotypes exprimés

La technique d'immunofluorescence indirecte sur coupe de schistosomules des 639 populations cellulaires hybrides a conduit à l'identification

Cinétique de multiplication des hybrides cellulaires



de 91 populations cellulaires sécrétant des anticorps anti-S. mansoni, ce qui correspond à 14 % des hybrides cellulaires obtenus. Dans ces différents cas, une intense fluorescence est révélée au niveau membranaire des schistosomules (Figure 14).

L'étude du contenu immunoglobulinique des surnageants manifestant une activité anti-S. mansoni a été envisagée en double diffusion en gel d'agarose (Figure 15). Le Tableau 6 regroupe ces résultats. Il nous faut souligner à ce stade que, ne disposant pas d'antisérum spécifique des IgG1 de rat, et analysant des surnageants de populations hybrides non clonés, ces informations doivent être accueillies avec prudence quant à la corrélation entre la nature des isotypes exprimés et l'activité décelable en immunofluorescence.

Deux isotypes sont particulièrement bien représentés : les IgM et les IgG2a. Le fait que 33 % des surnageants actifs en immunofluorescence sécrètent de l'IgM peut s'expliquer dans le cadre de la réponse immunitaire primaire, phase qui correspond à une élévation importante du taux d'IgM sériques.

25 % des populations cellulaires hybrides productrices d'anticorps anti-S. mansoni sécrètent de l'IgG2a. Cette participation importante des IgG2a peut s'inscrire dans la dynamique de l'infection. En effet, les lymphocytes spléniques prélevés dans la période de 25 à 35 jours de l'infection doivent contenir un taux élevé de lymphocytes B producteurs d'IgG2a si l'on se réfère au taux maximum d'IgG2a sérique observé à cette période (CAPRON et Coll., 1978a)

Il existerait donc une corrélation directe entre l'expression de cet isotype in vivo lors de l'infestation et son expression préférentielle par les

Figure 14

Immunofluorescence indirecte sur coupe de schistosomule :
Surnageant d'hybride cellulaire producteur d'anticorps anti-S. mansoni

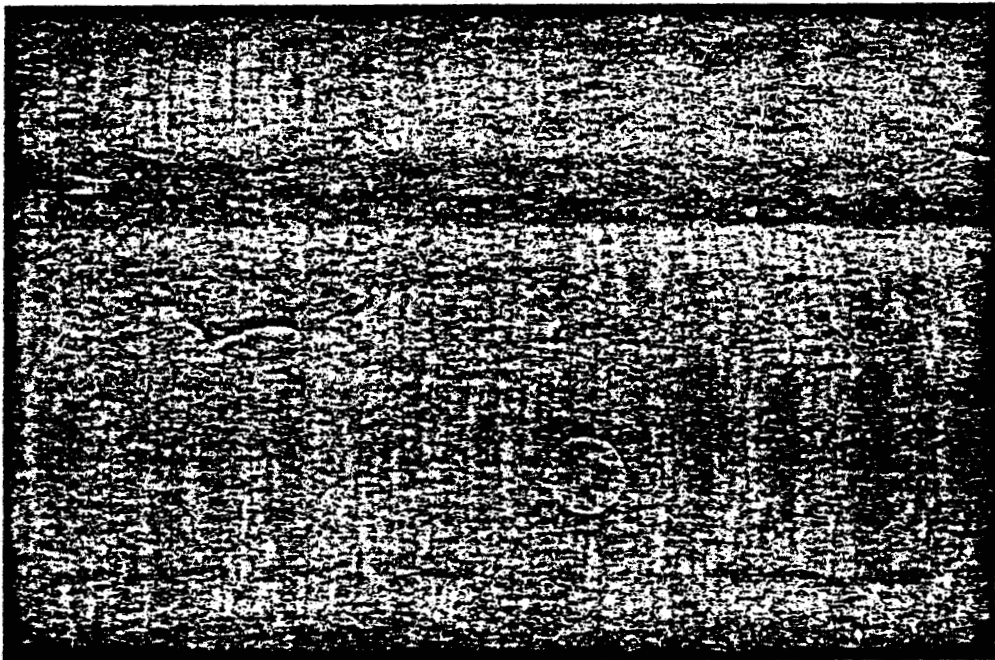
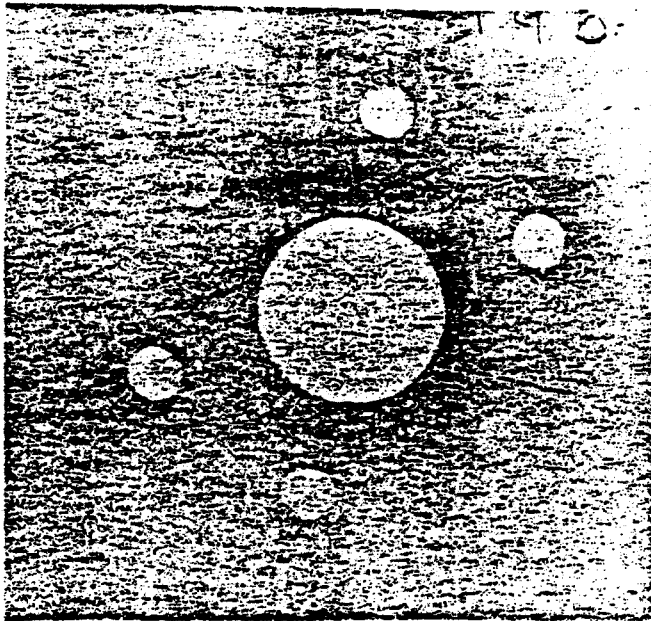


Figure 15

Double diffusion en gel d'agarose

a) Surnageant de culture de cellules myéломateuses



b) Surnageant de culture de cellules hybrides non clonées

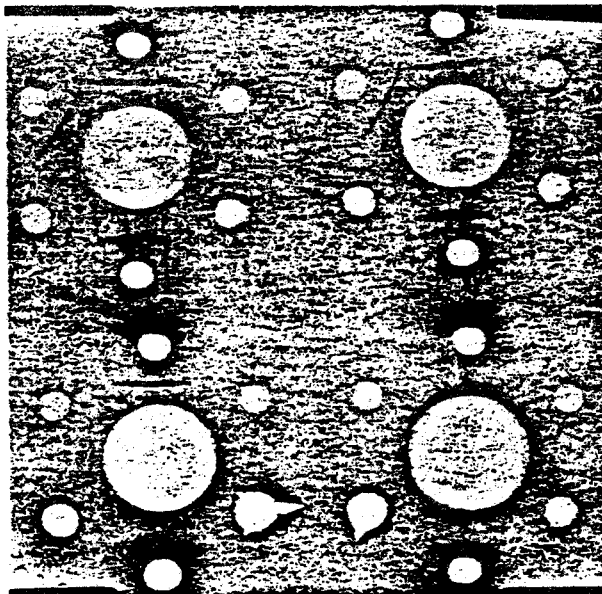


TABLEAU 6

Etude du contenu immunoglobulinique des surnageants de culture
des hybrides hétérologues producteurs d'anticorps anti-S. mansoni

Isotypes exprimés (a)	Nombre d'hybrides cellulaires exprimant ces isotypes	Pourcentage d'hybrides cellulaires exprimant ces isotypes (b)
IgG totale (c)	20	22,2
IgG2a	23	25,5
IgG2b	0	0,0
IgG2c	3	3,3
IgM	30	33,3
IgG2a, IgG2c	2	2,2
IgG2a, IgM	6	6,6
IgG2a, IgG2c, IgM	6	6,6

- (a) L'isotype est déterminé sur 150 μ l de surnageant de culture d'hybride cellulaire non cloné, par double-diffusion en gel d'agarose en présence de 25 μ l d'antisérums spécifiques de classe et sous-classe d'immunoglobulines de rat (BAZIN et coll., 1974) ;
- (b) Pourcentage déterminé sur 90 surnageants de cultures d'hybrides cellulaires sécrétant des anticorps spécifiques de S. mansoni décelables par immunofluorescence indirecte sur coupe de schistosomule ;
- (c) Surnageants d'hybrides cellulaires n'ayant donné qu'un arc de précipitation en présence d'antisérum anti-immunoglobuline G totale de rat (CAPPEL, USA)



populations cellulaires hybrides issues de la fusion de lymphocytes B spléniques prélevés à cette période.

B) Le système d'hybridation homologue

1 - La cinétique de multiplication cellulaire

L'étude du diagramme de multiplication des hybrides homologues (Figure 13) révèle un léger retard de multiplication par rapport au système hétérologue ainsi qu'une dispersion importante des délais de prélèvement.

Alors que 85,4 % des populations cellulaires hybrides hétérologues sont prélevés dans la période de 11 à 20 jours après la fusion cellulaire, 46,1 % le sont dans le système homologue.

Le retard de multiplication observé dans le système homologue s'explique certainement par une différence d'adaptation des souches à la culture in vitro. La souche myélomateuse de rat IR983F a été isolée récemment par rapport aux cellules myélomateuses de souris employées dans le système hétérologue. Des manipulations d'hybridation homologue récentes nous ont montré une diminution sensible du temps de la phase de latence précédant l'apparition des clones cellulaires.

2 - Le rendement de fusion

683 populations cellulaires hybrides ont été obtenues à partir des 1681 alvéoles de culture cellulaire issues de 9 manipulations d'hybridation, ce qui représente un rendement de fusion de 38 %. Mais comme dans le cas de l'hybridation hétérologue cette valeur varie considérablement : 0 à 90 %.

Bien qu'un rendement de fusion de 38 % paraisse modeste par rapport à celui des hybridations hétérologues, il est difficile d'effectuer une comparaison entre ces deux valeurs étant donné la différence de concentration cellulaire répartie par alvéole de culture pour les deux systèmes d'hybridation.

3 - Etude de l'activité anti-S. mansoni, nature des isotypes exprimés

Parmi les 683 surnageants de populations cellulaires hybrides étudiés par immunofluorescence indirecte sur coupe de schistosomules, 23 induisent une intense fluorescence qui traduit la présence d'anticorps dirigés contre la surface des schistosomules, soit 3,6 % des surnageants étudiés. Six d'entre eux manifestent de plus une activité positive aux niveaux de structures internes du schistosome adulte. Ces 6 surnageants proviennent de manipulations de fusions cellulaires entre la souche IR 983 F et les lymphocytes spléniques de rats immunisés par la fraction semi-purifiée sur colonne de Concanavalline A Sepharose. Cette fraction semi-purifiée de vers adultes induit chez le lapin la production d'antisérum reconnaissant la surface du schistosomule et les structures internes du schistosome adulte. (Tableau 7).

C) Discussion

L'étude comparative des deux systèmes est peu aisée du fait de la diversité des cellules spléniques et myélomateuses employées. L'hybridation hétérologue utilisant des cellules spléniques de rat Fischer et des cellules myélomateuses de souris Balb/c paraît plus efficace quant au rendement en hybrides sécrétant des anticorps anti-S. mansoni. Mais cet aspect s'explique peut-être par une différence de susceptibilité à l'infection des deux souches de rat (LOU/C et FISCHER). Pourtant, bien que nos observations indiquent une incidence plus faible d'hybrides homologues producteurs d'anticorps anti-S. mansoni, nous avons généralisé leur exploitation, car ils présentent l'avantage

TABLEAU 7
 NATURE ET SPECIFICITE DES SURNAGEANTS DE POPULATIONS CELLULAIRES
 HYBRIDES HOMOLOGUES

Source de Lymphocytes	Dénomination	Immunofluorescence		Isotypes exprimés
		Schistosomules	Vers adultes	
Rat LOU/C infectés par <u>S. mansoni</u>	832-9	+	-	IgG2c
	833-12	+	-	IgG2c
	840-55	+	-	IgG
	840-61	+	-	IgG
	840-109	+	-	IgG
	842-11	+	-	IgG2a
	842-38	+	-	IgG
	842-53	+	-	IgG
	842-63	+	-	IgG
	842-182	+	-	IgG
	842-185	+	-	IgM
	842-239	+	-	IgM
	843-55	+	-	IgG2a
	843-115	+	-	IgG2a
	843-123	+	-	IgM
	C5-98	+	-	IgM
C22-96	+	-	IgM	
Rat LOU/C immunisé par une fraction glycopro- téique semi-purifiée extraite de <u>S. mansoni</u>	844-3	+	+	IgG
	844-39	+	+	IgM
	844-138	+	+	IgM
	844-149	+	+	IgM
	C3-28	+	+	IgG2a
	C3-109	+	+	IgM



d'une grande stabilité. La majorité des hybrides cellulaires hétérologues dont nous disposons a accusé une perte totale de synthèse d'anticorps anti-S. mansoni après 15 à 20 jours de culture in vitro. Les hybrides homologues offrent de plus la possibilité d'une production massive de liquide ascitique dont la concentration en anticorps monoclonal est 100 à 1000 fois supérieure à celles escomptée dans le surnageant de culture cellulaire.

II - PREMIERE APPROCHE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES ANTICORPS ANTI-S. MANSONI PRODUITS PAR HYBRIDATION

Disposant de surnageants contenant des anticorps anti-S. mansoni d'isotypes différents, il était essentiel de réaliser une étude de leur potentielle activité biologique in vitro. Cette approche soulève un point important : les anticorps produits par la technique de fusion cellulaire sont-ils capables d'induire une cytotoxicité vis-à-vis de schistosomule comparable à celle des anticorps présents dans le sérum de rat infecté ?

Pour répondre à cette question deux systèmes d'étude ont été envisagés :

- le système de cytotoxicité dépendant du complément
- le système de cytotoxicité dépendant d'éosinophile

A) Investigation de l'activité cytotoxique dépendante du complément

L'investigation de l'activité cytotoxique dépendante du complément a été envisagée sur les différents surnageants des populations cellulaires hybrides hétérologues et homologues manifestant une activité anti-S. mansoni. Les Tableaux 8 et 9 illustrent nos observations.

TABLEAU 8

Cytotoxicité dépendante du complément : Etude des surnageants
des hybrides hétérologues

Source (a) d'anticorps	Isotypes exprimés	% de cytotoxicité (b)		
		en présence de complément	sans complément	spécifique
Surnageant (c)				
A11-3	IgG2a IgM	22,4	19,1	3,3
A11-7	IgM	100,0	18,9	81,1
A11-29	IgG2a IgM	91,9	7,1	84,8
A11-35	IgG2a IgM	90,4	9,2	81,2
A11-38	IgG2a	22,3	13,8	8,5
A11-43	IgM	25,4	12,3	11,5
A11-55	IgM	92,5	17,6	74,9
A11-71	IgG2a	14,1	11,1	2,9
A11-72	IgM	45,6	4,1	41,5
A12-17	IgM	19,1	23,2	0,0
A12-50	IgM	16,1	13,6	2,5
A12-148	IgM	87,0	13,0	74,0
A12-149	IgM	21,5	11,5	10,0
A23-20	IgG2c, IgM	66,0	7,5	38,5
A23-44	IgG2a, IgM	40,0	3,6	36,6
Surnageant de cellule de myélome (c)		16,5	19,0	0
Sérum de rat sain (d)		7,4	2,8	4,6
Sérum de rat infesté (d)		71,0	8,4	62,6

- (a) Les surnageants de culture et les sérums de rats sont inactivés par chauffage 2 h. à 56°C
- (b) Pourcentage de cytotoxicité mesuré après 4 jours d'incubation à 37°C en présence de 40 µl de sérum de cobaye frais (source de complément), soit en présence de 40 µl de sérum de cobaye chauffé 2 hr à 56°C (témoin sans complément)
- (c) 100 µl de surnageant de culture de cellules (hybrides ou myéломateuse) concentré 2 fois par lyophilisation
- (d) 100 µl de sérum de rat sain ou de sérum de rat infecté depuis 7 semaines

TABLEAU 9

Cytotoxicité dépendante du complément. Étude
des surnageants d'hybrides homologues

Sources d'anticorps (a)	Isotypes exprimés	Pourcentage de cyto- toxicité en présence de complément (b)
Surnageant (c) B32-9	IgG2a	11,0 ± 4,2
B33-12	IgG2c	6,0 ± 1,4
B42-11	IgG2c	11,0 ± 1,4
C3-28	IgG2a	9,0 ± 1,4
C3-109	IgM	91,5 ± 12,6
C5-98	IgM	0,0 ± 0,0
C22-96	IgM	0,0 ± 0,0
Surnageant contrôle (c) IR983F		6,0 ± 1,4
Sérum de rat infecté (d)		48,0 ± 1,4
Sérum de rat sain (d)		5,5 ± 2,1

(a) Les sérums et les surnageants de culture cellulaire sont inactivés 2 h à 56°C

(b) Pourcentage de cytotoxicité mesuré après 4 jours d'incubation en présence de 40 µl de sérum de cobaye frais (source de complément)

(c) 100 µl de surnageant de culture concentré 2 fois par lyophilisation

(d) 100 µl de sérum de rat sain ou de rat infecté depuis 6 semaines

L'étude systématique des surnageants cellulaires a permis l'identification de 8 surnageants d'hybrides hétérologues et d'un surnageant d'hybride homologue manifestant des activités cytotoxiques dépendantes du complément comprises entre 37 et 92 %. Les seuils de cytotoxicité obtenus sont comparables à ceux couramment induits par les sérums de rats infectés. (CAPRON et Coll., 1974).

A ce stade, il est difficile d'établir une corrélation entre l'activité cytotoxique et un isotype particulier, les surnageants étudiés provenant de populations cellulaires non clonées et exprimant parfois plusieurs isotopes. Pourtant, il semblerait que cette activité puisse être associée aux IgM, dénominateur commun aux neuf surnageants, présentant une activité cytotoxique dépendante du complément.

Cette observation s'oppose aux données de CAPRON et Coll. (1974) qui associent la cytotoxicité dépendante du complément chez le rat aux immunoglobulines G. Ces auteurs décrivent le système de cytotoxicité dans la phase tardive de l'infection, il serait donc possible que dans la phase précoce de l'infection 25 à 35 jours, un autre système dépendant d'IgM puisse intervenir.

Malgré cette restriction, il nous semble que le résultat essentiel réside dans le fait qu'un anticorps produit in vitro par la technique de fusion cellulaire manifeste une activité biologique décelable.

B) Etude de l'activité cytotoxique dépendante de l'éosinophile

Si les observations réalisées dans le cadre de la cytotoxicité dépendante du complément s'intègrent difficilement, dans l'état actuel de nos connaissances aux phénomènes décrits pour les sérums d'animaux infectés,

une corrélation franche a par contre pu être établie dans nos expériences de cytotoxicité dépendante d'éosinophile, aussi bien pour les surnageants d'hybrides homologues qu'hétérologues (Tableaux 10 et 11).

Ainsi, 17 surnageants de populations cellulaires hétérologues et 2 surnageants d'hybrides homologues ont manifesté des activités cytotoxiques comprises entre 30 et 90 % en présence d'éosinophiles de rat sain. Dans le cas de ces 19 surnageants, la présence d'IgG2a a pu être révélée par la double-diffusion en gel en présence d'anti-sérum anti-IgG2a de rat.

L'étude statistique révèle que sur 39 surnageants exprimant de l'IgG2a, 17 induisent une cytotoxicité dépendante d'éosinophile soit 43 % des hybrides cellulaires hétérologues étudiés.

Ce pourcentage élevé d'hybrides cellulaires produisant des anticorps cytotoxiques peut être relié aux conditions de fusion cellulaire. En effet, les lymphocytes spléniques impliqués dans la fusion sont prélevés à la période de 25 à 35 jours d'infection qui correspond au taux maximum des IgG2a sériques ainsi qu'aux pourcentages les plus élevés de cytotoxicité dépendante de l'éosinophile (CAPRON et coll., 1978a).

C) Conclusion

Cette première approche de l'activité biologique in vitro des anticorps produits par la fusion cellulaire, bien que préliminaire, apporte quelques réponses essentielles.

TABLEAU 10

Cytotoxicité dépendante d'éosinophiles :
Etude des surnageants d'hybrides hétérologues

Sources d'anticorps (a)	Isotypes exprimés	Pourcentage de cytotoxicité (b)
Surnageant (c) A11-38	IgG2a	26,9 ± 1,9
A11-60	IgG2a, IgM	33,9 ± 16,4
A39-40	IgG2a, IgG2c	49,3 ± 0,9
B39-2	IgG2a	12 ± 6,3
B39-59	IgG2a	81,5 ± 9,5
B39-74	IgG2a	56,5 ± 7,1
B39-87	IgG2a	63,5 ± 7,1
B39-93	IgG2a	83,5 ± 10,6
Surnageant de cellule myélomateuse (c)		14,3 ± 5,7
Sérum de rat sain (d)		2,5 ± 0,7
Sérum de rat infecté (d)		52,4 ± 13,7

(a) Les surnageants de culture et les sérums de rat sont inactivés par chauffage 2 h à 56°C

(b) Le pourcentage de cytotoxicité est mesuré après 48 h d'incubation en présence des cellules effectrices (cellules péritonéales surnageantes de rat Fischer 48 % d'éosinophiles ; 10 % de mastocytes) (moyenne ± écart type de la moyenne de 2 expériences)

(c) 100 µl de surnageant de culture cellulaire concentré 2 fois par lyophilisation

(d) 100 µl de sérum de rat sain ou infecté depuis 4 semaines (sérum dilué au 1/4 en milieu MEM)

TABLEAU 11

Cytotoxicité dépendante d'éosinophiles
Etude des surnageants d'hybrides homologues

Sources d'anticorps (a)	Isotypes exprimés	Pourcentage de cytotoxicité (b)
Surnageant (c) B 32.9	IgG2c	26 ± 5,7
B 33.12	IgG2c	19,5 ± 9,2
B 42.11	IgG2a	80 ± 4,3
B 43.115	IgG2a	4,1 ± 2,7
B 44.39	IgM	6,9 ± 1,3
C3-28	IgG2a	66,5 ± 0,7
C3-109	IgM	15 ± 1,4
C6-98	IgM	17,5 ± 0,7
Surnageant (c) de myélome IR983F		7,3 ± 1,06
Sérum de rat sain (d)		5,0 ± 4,2
Sérum de rat infecté (d)		96 ± 0,00

(a) Les surnageants de culture cellulaire et les sérums de rat sont inactivés par chauffage 2 h à 56°C

(b) Le pourcentage de cytotoxicité est mesuré après 48 h d'incubation, en présence des cellules effectrices (cellules péritonéales surnageantes de rat LOU/C 72 % d'éosinophiles, 5 % de mastocytes) (moyenne ± écart type de la moyenne de 2 expériences)

(c) 100 µl de surnageant de culture cellulaire concentré 2 fois par lyophilisation

(d) 100 µl de sérum de rat sain ou infecté depuis 4 semaines (sérum dilué au 1/4)



- Il est possible par la technique d'hybridation cellulaire de produire des anticorps dotés d'activités biologiques .
- Les anticorps produits reproduisent des effets biologiques similaires, sinon identiques aux anticorps présents chez l'animal infecté.
- L'incidence des populations cellulaires hybrides sécrétant des anticorps à activité biologique est relativement élevée.

A ce stade, la corrélation entre activité biologique et isotype est certes critiquable du fait de l'utilisation de surnageant de populations cellulaires non clonées. C'est pourquoi nous allons dans un second temps, à l'aide de surnageant ou de liquide d'ascite de clone cellulaire, tenter de confirmer nos premières observations. Pour ce faire, nous avons choisi l'exploration des fonctions biologiques de 3 hybrides cellulaires produisant respectivement une IgM, une IgG2a ainsi qu'une IgG2c, obtenus par clonages successifs de la population cellulaire hybride initiale et dont le contenu immunoglobulinique a été étudié par immunodiffusion en gel.

A12-148 ——— IgM (hybride hétérologue)

B42.11 ——— IgG2a (hybride homologue)

B32.9 ——— IgG2c (hybride homologue)

III. ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'IGM MONOCLONALE SYNTHETISEE PAR LE CLONE A12.148

Nous avons précédemment évoqué le problème de l'instabilité des hybrides hétérologues, cette instabilité a considérablement limité l'exploitation systématique du matériel préparé selon cette méthode, seul le clone

cellulaire A12-148 produisant un anticorps de classe IgM a pu être étudié.

Deux aspects ont été développés dans cette étude : l'aspect in vitro de la cytotoxicité dépendante du complément et l'étude in vivo de la potentialité protectrice de cet anticorps grâce aux expériences de transfert passif.

A) Etude de la cytotoxicité dépendante du complément in vitro

Les résultats présentés dans le Tableau 10 évoquent une participation possible des anticorps de classe IgM dans un processus de cytotoxicité dépendant du complément mais est criticable du fait de l'utilisation de surnageants issus de populations cellulaires non clonées. Aussi, était-il nécessaire de vérifier cette hypothèse grâce aux surnageants du clone A12-148 (Tableau 12).

Le pourcentage de cytotoxicité dépendante du complément de 94 % confirme donc l'hypothèse d'un mécanisme de cytotoxicité dépendant du complément induit par les anticorps de classe IgM, mais semble contradictoire aux données définies par CAPRON et Coll. (1974).

Sans opposer ces résultats, il est cependant permis de proposer dans ce cas particulier qu'au cours de l'infection expérimentale par S. mansoni il existe un tel mécanisme dans la période précoce de l'infection ou qu'il se trouve masqué par l'activité létale dépendante du complément induite par les IgG. On peut aussi évoquer un processus d'amplification favorisé par la fusion cellulaire. Au cours de l'infection à S. mansoni, une très faible proportion de lymphocytes B synthétisant des anticorps de classe IgM à activité létale serait produite et aurait donc une très faible incidence

TABLEAU 12

Cytotoxicité dépendante du complément : Etude de l'IgM monoclonale produite par le clone A12-148.

Source d'anticorps (a)	Pourcentage de cytotoxicité (b)
Surnageant du clone A12-148	93,8 ± 1,1
Surnageant de cellules myélomateuses	3,1 ± 0,4
Sérum de rat sain	4,25 ± 3,0
Sérum de rat infesté depuis 6 semaines	78,5 ± 2,1

(a) 100 µl de surnageant de culture concentrés 2 fois par lyophilisation, ou 100 µl de sérum sont incubés en présence de 50 schistosomules de S. mansoni et de 40 µl de sérum de cobaye (les surnageants et les sérums sont décomplémentés par chauffage 2 h à 56°C)

(b) Pourcentage de cytotoxicité mesuré après 4 jours d'incubation à 37°C (moyenne ± écart-type de la moyenne de 2 expériences)

quant à son expression sérique, la fusion cellulaire amplifierait donc artificiellement leur expression.

Pour vérifier l'hypothèse possible d'un masquage de l'activité létale des IgM par les IgG, nous avons entrepris l'étude d'un sérum de rat Fischer prélevé chez un animal infecté depuis 35 jours, correspondant à la période d'infection retenue pour l'hybridation cellulaire. Ce sérum présentant une activité létale de 82 % a été fractionné en chromatographie sur gel ACA 34 (Figure 16). Les différentes fractions récoltées ont été ensuite étudiées dans le système de cytotoxicité dépendant du complément. Parallèlement, un fractionnement a été entrepris à partir d'un surnageant du clone A12-148.

Les résultats rapportés dans le Tableau 13 traduisent clairement une opposition entre le sérum de rat infecté qui démontre un seul pic d'activité létale au niveau des IgG, alors que dans les mêmes conditions de fractionnement, seul le pic "IgM" isolé du surnageant du clone A12-148 exprime l'activité létale vis-à-vis du schistosomule.

Dans nos conditions expérimentales, il semble donc que l'on puisse écarter l'hypothèse du masquage de l'activité létale des anticorps de classe IgM par les anticorps de classe IgG dans le cas du sérum de rat infecté. Bien qu'il soit difficile d'intégrer actuellement l'IgM dans la dynamique d'apparition des mécanismes de cytotoxicité, son activité létale vis-à-vis du schistosomule in vitro est bien établie.

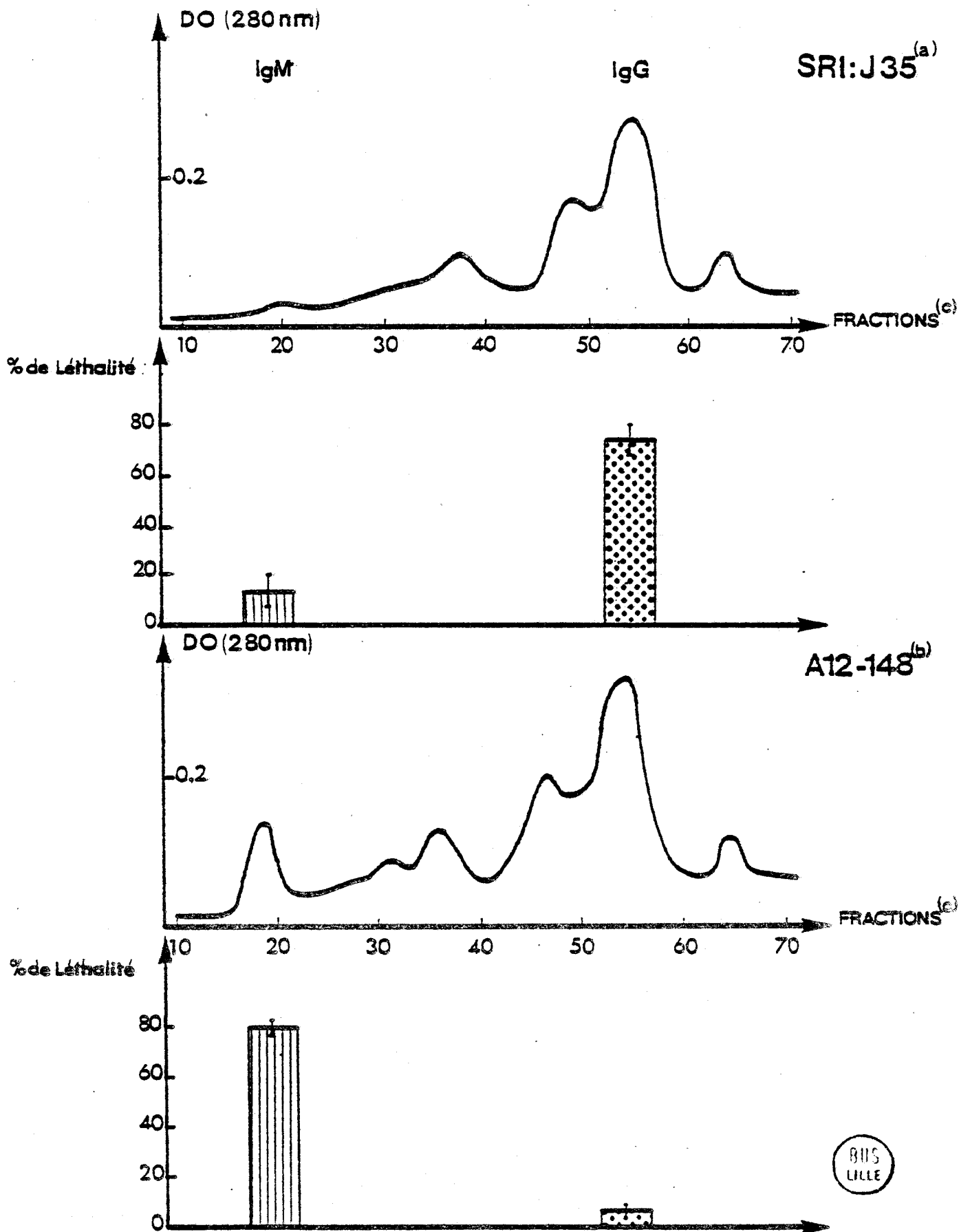
TABLEAU 13

Etude comparative de la cytotoxicité dépendante du complément induite par les différentes fractions immunoglobuliniques isolées sur gel ACA-34 du sérum de rat infecté et du surnageant de culture du clone A12-148

Sources d'anticorps (a)	Pourcentage de cytotoxicité (b)	
	Sérum de rat infecté depuis 5 semaines	Surnageant du clone A12-148
Matériel initial (c) de fractionnement	82,1 ± 0,7	87,0 ± 0,7
Fraction I IgM (d)	13,5 ± 6,3	78,6 ± 3,5
Fraction II "post IgM" (d)	26,1 ± 1,4	0,0 ± 0,0
Fraction III "pré IgG" (d)	15,4 ± 0,7	0,0 ± 0,0
Fraction IV IgG (d)	72,9 ± 6,3	6,0 ± 2,12

- a) Le sérum, le surnageant de culture et les fractions purifiées sont inactivés par chauffage, 2 h à 56°C.
- b) Le pourcentage de cytotoxicité est mesuré après 4 jours d'incubation des schistosomules en présence de 40 µl de sérum de cobaye (source de complément)
- c) 100 µl de sérum de rat infecté depuis 5 semaines, ou 100 µl de surnageant de culture cellulaire du clone A12-148 concentré 2 fois par lyophilisation
- d) 100 µl des fractions obtenues par chromatographie sur gel ACA 34 (Figure 16).

Fractionnement chromatographique sur gel ACA 34 du sérum de rat infecté par *S. mansoni* et du surnageant de culture du clone A12.148



a) Sérum de rat infecté depuis 5 semaines par *S. mansoni*

b) Surnageant du clone A12-148, concentré 2 fois par lyophilisation

c) Fractions de 6,25 ml (débit de la colonne 12,5 ml/h)



B) Etude de l'activité protectrice in vivo

Cette approche s'intègre dans le cadre de recherche d'une stratégie vaccinale basée sur l'isolement de la fraction antigénique parasitaire susceptible d'induire la production d'anticorps protecteur, l'hypothèse de travail étant d'isoler ces fractions antigéniques par le biais des anticorps monoclonaux possédant eux-mêmes une activité protectrice.

Dans le cas précis de l'IgM, les expériences de transfert passif ont été pratiquées chez le rat Fischer, la source d'anticorps monoclonal étant le surnageant de culture concentré trois fois par lyophilisation du clone A12-148.

L'étude comparative de la charge parasitaire des différents groupes d'animaux infectés, par la technique de perfusion de foie, 21 jours après l'infection indique une diminution sensible du nombre de vers présents dans le foie des animaux traités par le surnageant de culture du clone A12-148 (Tableau 14). Dans nos conditions expérimentales, l'injection du surnageant du clone A12-148 transfère passivement un niveau de protection vis-à-vis de l'infection par S. mansoni compris entre 34 et 37 %. L'étude comparative de la charge parasitaire des deux groupes témoins n'indique aucune différence significative, ce qui permet d'éliminer l'incidence de facteur non spécifique présent dans le surnageant de culture. Pourtant il nous est impossible pour l'instant d'écarter l'hypothèse d'une activité non spécifique de l'IgM anti-S. mansoni. Dans ce contexte, nous envisageons l'étude de surnageant d'hybride cellulaire producteur d'immunoglobuline M sans activité anti-parasitaire, ainsi que l'étude de préparations purifiées d'IgM produite par le clone A12-148.

TABLEAU 14

Expérience de transfert passif de l'immunité. Etude de l'activité protectrice de l'IgM monoclonale produite par le clone A12-148 : Perfusion de foie.

Surnageants (a) et contrôle d'infection	Nombre de vers (b) ± écart type	Pourcentage (c) d'immunité	Valeur de P
Exp-1			
Surnageant A12-148	58,2 ± 29,0	34	p < 0,05
Surnageant contrôle	98,5 ± 29,0	0	
Groupe témoin	87,8 ± 22,9		
Exp-2			
Surnageant A12-148	76,6 ± 23,1	37	p < 0,05
Surnageant contrôle	106,0 ± 28,7	12	non significatif
Groupe témoin	120,0 ± 34,1		

- (a) 2 ml de surnageant de culture concentré 3 fois par lyophilisation (du clone A12-148 ou des cellules myélomateuses de souris) ou 2 ml de solution saline (NaCl 0,9 %) sont injectés par voie intraveineuse à chaque rat Fischer (groupe de 12 à 15 rats par expérience)
- (b) La charge parasitaire est évaluée par perfusion de foie 21 jours après l'infection par 1000 cercaires de S. mansoni
- (c) Le pourcentage de protection est calculé par comparaison du nombre de vers obtenus chez les animaux traités par 2ml de surnageant de culture du clone A12-148 ou 2 ml de surnageant de cellules myélomateuses de souris par rapport au nombre de vers obtenu dans le foie des animaux traités par 2 ml de la solution saline.

C) Discussion

Le rôle des anticorps de classe IgM reste à définir dans le cadre des mécanismes immunitaires suscités lors de l'infection par S. mansoni. Certes, des résultats obtenus par immunisation passive traduisent une activité protectrice de l'IgM vis-à-vis de l'infection parasitaire; mais cette observation se heurte à l'absence de données quantitatives quant à la dose nécessaire à l'installation d'une telle protection. Cet aspect particulier est actuellement en cours d'investigation. La seule explication des phénomènes observés reste hypothétique et rend compte des résultats obtenus lors des expériences visant à la caractérisation d'anticorps de classe IgM à activité létale dans le sérum de rat infecté.

Au cours de l'infection une faible proportion de lymphocytes B sécrèterait des anticorps de classe IgM à activité létale, mais en trop faible quantité pour être détectés au niveau sérique. La fusion cellulaire pratiquée sur de tels lymphocytes amplifierait considérablement l'expression synthétique de ces cellules et conduirait à la sélection d'hybrides cellulaires produisant massivement des anticorps monoclonaux de classe IgM à activité létale. Cette hypothèse trouve peut-être un écho dans les récentes observations de SHEN et coll. (1981) qui rapportent l'activité synergique d'un anticorps monoclonal de classe IgM anti-globule rouge de boeuf dans un système dépendant du complément faisant intervenir des cellules K humaines. Ils proposent la participation d'un tel mécanisme in vivo dans la phase précoce de la réponse immune lorsque la quantité des IgG sériques est insuffisante à l'induction d'une cytotoxicité importante.

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE IN VITRO ET IN VIVO DES ANTICORPS MONOCLONAUX DE CLASSE IgG2a

Bien que nous ayons identifié 17 surnageants de populations cellulaires hybrides contenant entre autre de l'IgG2a et capables d'induire une activité cytotoxique en présence d'éosinophiles, il était difficile d'affirmer la participation exclusive de l'IgG2a dans ces observations. Cette démonstration ne pourrait être apportée que par l'utilisation de surnageant d'hybrides cellulaires clonés. Nous avons donc exploité dans ce but les propriétés sécrétrices du clone cellulaire hybride homologue, B42-11.

A) Etude de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile

La première étape de notre travail a consisté en l'isolement d'un clone cellulaire synthétisant une population homogène d'anticorps de classe IgG2a anti-S. mansoni à activité cytotoxique dépendant d'éosinophile. Plusieurs clonages successifs nous ont permis à partir de la population cellulaire initiale B42-11 d'obtenir un clone répondant aux conditions précédemment exposées.

L'étude du surnageant du clone obtenu, que pour plus de commodité nous nommerons clone B42.11, révèle une activité cytotoxique de 89 % en présence d'éosinophile de rat (Tableau 15). Ce résultat confirme nos premières observations concernant les surnageants d'hybrides cellulaires non clonés et s'intègre aux observations de CAPRON et coll. (1978a) qui démontrent le rôle essentiel des anticorps de classe IgG2a dans le système de cytotoxicité dépendant d'éosinophile.

TABLEAU 15

Etude comparative de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles induite par les surnageants de culture et les liquides d'ascite du clone B42.11

Sources d'anticorps (a)	Dilution finale	Activité en immunofluorescence	Pourcentage de cytotoxicité (b)
Surnageant du clone B42.11	1/1	++++	72,5 ± 0,7
	1/4	++++	89,0 ± 1,4
	1/8	+	38,1 ± 2,9
Liquide d'ascite du clone B42.11	1/8	++++	100,0 ± 0,0
	1/16	++++	89,6 ± 9,6
	1/32	++++	90,9 ± 8,3
	1/64	++++	91,8 ± 1,3
	1/128	++++	95,6 ± 0,6
	1/256	++++	88,6 ± 4,6
	1/512	++++	88,1 ± 10,5
	1/1024	++++	85,1 ± 4,4
	1/2048	++++	81,6 ± 2,6
	1/4096	+++	72,5 ± 7,6
	1/10000	+	35,2 ± 15,8
Liquide d'ascite des cellules IR983 F	1/8	-	4,0 ± 0,7
Sérum de rat infecté	1/16	+++	59,3 ± 7,8
Sérum de rat sain	1/16	-	0,0 ± 0,0

(a) Les schistosomules sont présensibilisés pendant 18 h par 50 µl des différentes sources d'anticorps chauffées 2 h à 56°C (surnageant et liquide d'ascite du clone B42.11, liquide d'ascite contrôle des cellules myélomateuses IR983 F, sérum de rat sain et sérum de rat infecté depuis 4 semaines par S. mansoni).

(b) Le pourcentage de cytotoxicité (moyenne ± écart-type de la moyenne) est mesuré après 48 h d'incubation en présence de cellules péritonéales de rat sain enrichies en éosinophiles (35 % d'éosinophiles, 8 % de mastocytes), rapport cellules effectrices/cible = 6000/1).



L'anticorps monoclonal produit par le clone B42-11 apporte donc une confirmation du rôle essentiel joué par l'IgG2a dans l'expression de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles. Il semblerait donc qu'un seul déterminant antigénique présent à la surface du schistosomule soit suffisant pour l'induction chez l'animal de la production d'anticorps cytotoxiques en présence d'éosinophiles. Cette observation n'écarte pourtant pas l'hypothèse qu'au niveau des sérums de rats infestés l'activité cytotoxique en présence d'éosinophiles résulte d'une action combinée d'anticorps dirigés contre de multiples déterminants antigéniques membranaires du schistosomule.

B) Production massive d'IgG2a anti-Schistosoma mansoni

Si le surnageant de culture d'hybride cellulaire permet la visualisation de phénomène immunologique, son exploitation est parfois difficile. La concentration des surnageants pose souvent des problèmes de cytotoxicité non spécifique. Pour cette raison, la production de liquide d'ascite dont les concentrations en anticorps monoclonal sont multipliées par 100 ou 1000 par rapport au surnageant apparaît intéressante.

Le clone B42.11 injecté par voie intrapéritonéale chez le rat LOU/C a induit la formation d'une tumeur d'ascite sécrétant une grande quantité d'anticorps monoclonal IgG2a. Le Tableau 15 illustre une étude comparative de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles, induite par les surnageants de culture du clone B42.11 et différentes dilutions du liquide d'ascite provenant du même clone. Alors qu'un pourcentage de mortalité de 70 % est encore enregistré pour une dilution de 1/4000 du liquide d'ascite, le surnageant dilué au 1/8 se situe au seuil inférieur de positivité. Cette simple comparaison traduit bien l'intérêt d'un tel matériel riche en anticorps monoclonal.

C) Etude de l'activité biologique de l'IgG2a monoclonale purifiée

L'utilisation de surnageant de culture ou de liquide d'ascite dans l'étude des activités biologiques des anticorps monoclonaux soulève le problème de l'inhibition ou bien même de l'observation de fausses réactions positives induites par la multitude des facteurs mis en jeu. En outre, se greffe le problème de la standardisation des conditions de réactions difficiles à reproduire d'une manipulation à l'autre. Pour limiter cette critique, nous avons confirmé nos résultats à l'aide de préparation purifiée d'IgG2a monoclonale du clone B42.11.

Les préparations purifiées apportent plus de rigueur à l'expérimentation, mais dans le cas particulier d'anticorps possédant une activité biologique, les différentes étapes de purification peuvent être dénaturantes et conduire à l'obtention de fractions purifiées inefficaces ou moins actives.

Dans le cas particulier de l'IgG2a du clone B42.11, les préparations purifiées expriment généralement une activité cytotoxique inférieure à celle obtenue par l'ascite non traitée (tableau 16) mais leur utilisation écarte l'hypothèse d'une cytotoxicité non spécifique induite par un facteur présent soit au niveau du surnageant de culture, soit au niveau de l'ascite.

D) Etude de la coopération cellulaire entre l'éosinophile et le mastocyte

Il nous a paru intéressant, pour affirmer que l'IgG2a monoclonale produite par l'hybridation cellulaire possède les mêmes propriétés biologiques que les anticorps polyclonaux de classe IgG2a du sérum de rat

TABLEAU 16

Cytotoxicité dépendante d'éosinophiles : étude de différentes préparations purifiées d'IgG2a monoclonale du clone B42.11.

Sources d'anticorps IgG2a monoclonal (a)	Pourcentage de cytotoxicité (b)
Liquide d'ascite A	83,5 ± 10,6
IgG2a purifiée préparation A	76,5 ± 20,5
Liquide d'ascite B	90,5 ± 0,2
IgG2a purifiée préparation B	42,1 ± 18,1
Liquide d'ascite C	64,0 ± 0,7
IgG2a purifiée préparation C	50,0 ± 29,7
Liquide d'ascite D	77,5 ± 6,3
IgG2a purifiée préparation D	65,5 ± 3,5

(a) Des schistosomules sont présensibilisées pendant 18 h par 50 µl de liquide d'ascite du clone B42.11 (1/32 dilution finale) ou 50 µl d'une fraction purifiée d'IgG2a monoclonale B42.11 (dilution finale correspondant au 1/32e de l'ascite de départ). L'ascite est purifiée selon la technique de BAZIN et coll. (1974).

(b) Le pourcentage de cytotoxicité (moyenne ± écart type de la moyenne) est mesuré après 48 h d'incubation de 50 schistosomules contenus dans 50 µl de milieu MEM en présence de cellules péritonéales de rat normales enrichies en éosinophiles (58 % de l'éosinophile, 4 % mastocytes): rapport cellules effectrices (cible = 6000/1).

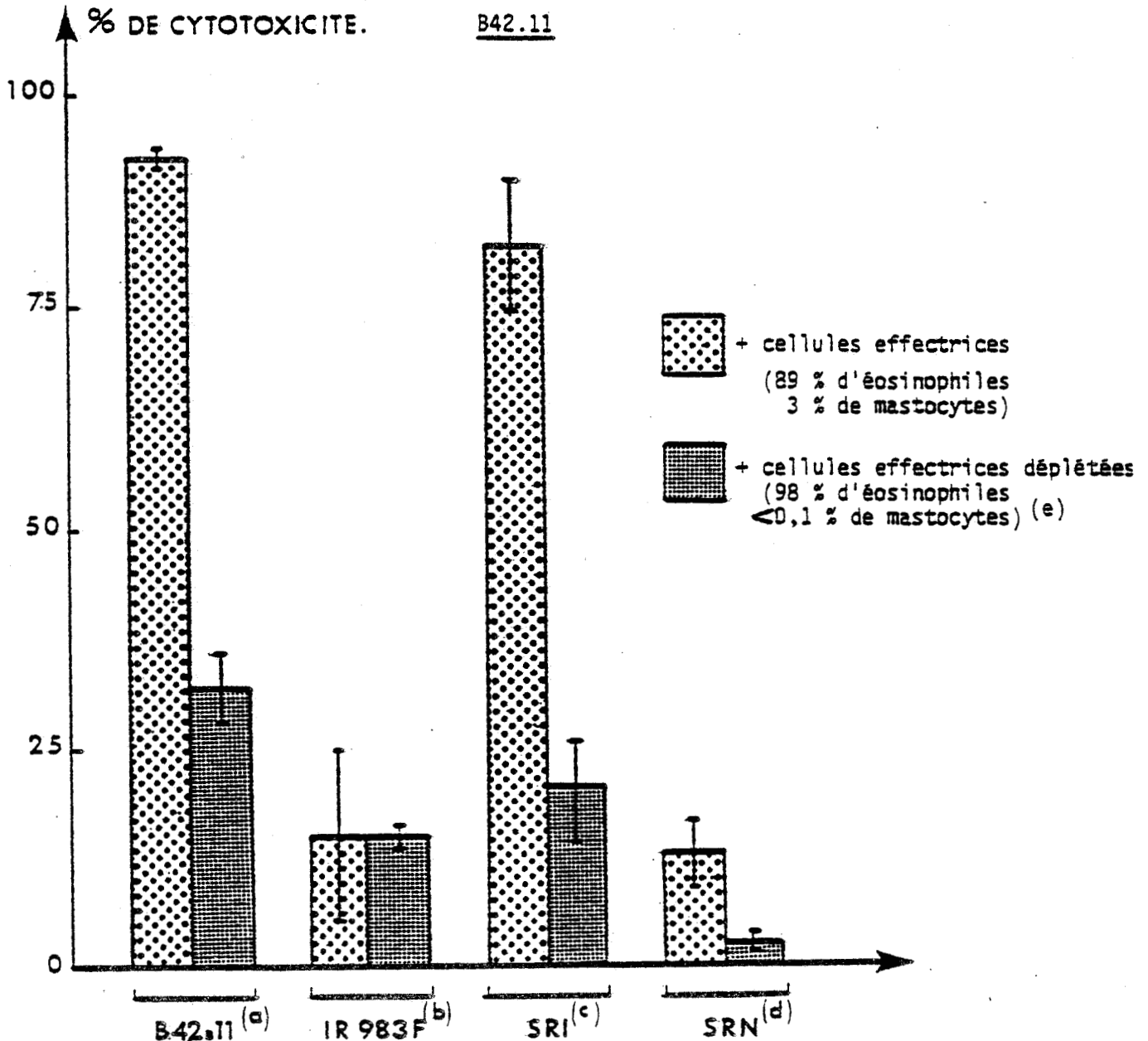
infecté, de vérifier la nécessité de la présence de mastocytes dans ce mécanisme (CAPRON et coll., 1978a). L'étude comparative de la cytotoxicité induite par l'IgG2a monoclonale du clone B42.11 a été envisagée au niveau d'une population cellulaire effectrice contenant 89 % d'éosinophiles et 3 % de mastocytes, et d'une population cellulaire effectrice déplétée sélectivement en mastocytes contenant 98 % d'éosinophiles et moins de 0,1 % de mastocytes (Figure 17).

Comme dans le cas des sérums de rats infectés, la déplétion en mastocytes se traduit par une chute importante de l'activité cytotoxique vis-à-vis du schistosomule de 60,5 % dans le cas de l'IgG2a monoclonale comparable aux 62,5 % obtenus avec le sérum de rat infecté. L'activation du mastocyte est donc bien induite par le même anticorps de classe IgG2a qui permet l'adhérence de l'éosinophile sur la cible parasitaire. On aurait pu en effet invoquer à partir des expériences pratiquées à l'aide de préparation conventionnelle polyclonale d'anticorps de classe IgG2a, que différentes sous-populations d'IgG2a induisent ces deux phénomènes. Les éléments que nous venons d'apporter indiquent que l'IgG2a monoclonale du clone B42-11 exprime des propriétés biologiques en tous points identiques à celles portées par les IgG2a présentes dans le sérum des animaux infectés et soulignent l'intérêt de l'utilisation de cet anticorps monoclonal comme sonde pour l'étude des activités biologiques in vivo des anticorps de classe IgG2a

E) Etude de l'activité protectrice de l'IgG2a monoclonale vis-à-vis de l'infection par S. mansoni

Disposant d'un anticorps doté d'une activité cytotoxique vis-à-vis du schistosomule en présence d'éosinophile de rat sain, il était essentiel d'établir les conséquences biologiques de son injection chez un

Etude de la dépendance mastocytaire de la cytotoxicité induite par l'IgG2a monoclonale produite par le clone



- a) 50 μ l de liquide d'ascite du clone B42.11 chauffé 2 h à 56°C, dilué au 1/32^{ème} (dilution finale)
- b) 50 μ l de liquide d'ascite des cellules IR 983 F chauffé 2 h à 56°C, dilué au 1/32^{ème} (dilution finale)
- c) 50 μ l de sérum de rat infecté depuis 4 semaines, chauffé 2 h à 56°C, dilué au 1/32^{ème} (dilution finale)
- d) 50 μ l de sérum de rat sain, chauffé 2 h à 56°C, dilué au 1/32^{ème} (dilution finale)
- (e) cellules effectrices déplétées en mastocytes par la méthode de LYNCH et coll., 1979

animal infecté par S. mansoni. Des expériences de transfert passif de l'immunité ont donc été envisagées par injection intraveineuse de 2 ml de liquide d'ascite du clone B42.11 chez le rat LOU/C infecté par S. mansoni. La charge parasitaire a été évaluée 5 jours après l'infection par comptage des parasites au niveau pulmonaire des animaux infectés par 1500 cercaires de S. mansoni, ou 21 jours après l'infection au niveau hépatique des rats infectés par 1000 cercaires de S. mansoni.

Les résultats d'une première série d'expériences utilisant comme critère d'évaluation de la charge parasitaire, la technique de perfusion de poumon indique que l'injection du liquide d'ascite induit par le clone B42.11 confère un degré de protection significatif vis-à-vis de l'infection par S. mansoni, compris entre 27 et 58 % (Tableau 17). La variation importante du degré de protection, trouve certainement une explication dans la concentration en IgG2a des différentes préparations ascitiques utilisées pour l'injection.

Dans la seconde série d'expériences, la technique de perfusion du système veineux hépatique pratiquée 21 jours après l'infection révèle une diminution sensible de 53 à 61 % de la charge parasitaire des animaux traités par le liquide d'ascite induit par le clone B42-11 par rapport au groupe témoin d'infection (Tableau 18 ; Figure 18).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer les variations du pourcentage d'immunité transférée par l'IgG2a monoclonale :

- la concentration en IgG2a monoclonale des différents liquides d'ascite injectés. Il existerait un rapport favorable anticorps/cible parasitaire pour l'induction de la destruction des schistosomules in vivo ;
- la reproductibilité de la technique de perfusion ;
- la qualité de la préparation de cercaires infectantes ;

TABLEAU 17

Etude du rôle protecteur de l'IgG2a monoclonale du clone B42-11 : Expérience de transfert passif de l'immunité :
Perfusion de poumon

Liquide d'ascite et contrôle d'infection (a)	Nombre de schistosomules ± écart type (b)	Pourcentage de protection (c)	Valeur de P
Exp. 1 B42-11	44,0 ± 9,6	27	p<0,05
IR 983F	69,0 ± 2,6	0	
témoin d'infection	60,3 ± 9,8		
Exp. 2 B42-11	29,0 ± 9,8	36	p<0,05
IR 983F	69,0 ± 11,2	0	
témoin d'infection	44,0 ± 14,8		
Exp. 3 B42-11	18,0 ± 8,7	58	p<0,05
IR 983F	28,7 ± 2,3	33	
témoin d'infection	43,0 ± 7,5		
Exp. 4 B42-11	74,6 ± 15,0	27	p<0,05
IR 983F	100,4 ± 22,7	2	
témoin d'infection	103,2 ± 24,0		
Exp. 5 B42-11	52,5 ± 20,6	42	p<0,05
IR 983F	96,0 ± 20	0	
témoin d'infection	89,6 ± 21,7		

a) 2 ml de liquide d'ascite (clone B42-11 ou contrôle IR 983F) ou 2 ml d'une solution saline (NaCl 0,9 %) sont injectés par voie intraveineuse à chaque rat LOU/C (groupes de 12 à 15 rats pour chaque expérience)

b) La charge parasitaire est estimée par perfusion de poumon 4 jours après une infection par 1500 cercaires de S. mansoni

c) Le pourcentage d'immunité est calculé par la comparaison du nombre de schistosomules obtenus pour les animaux traités par le liquide d'ascite (B42-11 ou contrôle IR 983F) par rapport au nombre de schistosomules obtenus dans le groupe de rats traités par la solution saline.



Etude du rôle protecteur de l'IgG2a monoclonale du clone B42-11. Expérience de transfert passif de l'immunité : Perfusion de foie

Liquide d'ascite et contrôle d'infection (a)	Nombre de vers ± écart type (b)	Pourcentage de protection (c)	Valeur de P
Exp. 1 B42-11	31,0 ± 12,2	61	p < 0,002
IR983 F	68,6 ± 15,9	15	non significatif
témoin d'infection	79,8 ± 7,1		
Exp. 2 B42-11	24,4 ± 9,8	62	p < 0,01
IR983 F	49,8 ± 18,4	23	
témoin d'infection	64,3 ± 17,4		
Exp. 3 B42-11	40,4 ± 15,8	53	p < 0,01
IR983 F	99,6 ± 16,0	0	
C 1 19 (d)	76,6 ± 19,2	11	non significatif
témoin d'infection	86,0 ± 23,6		

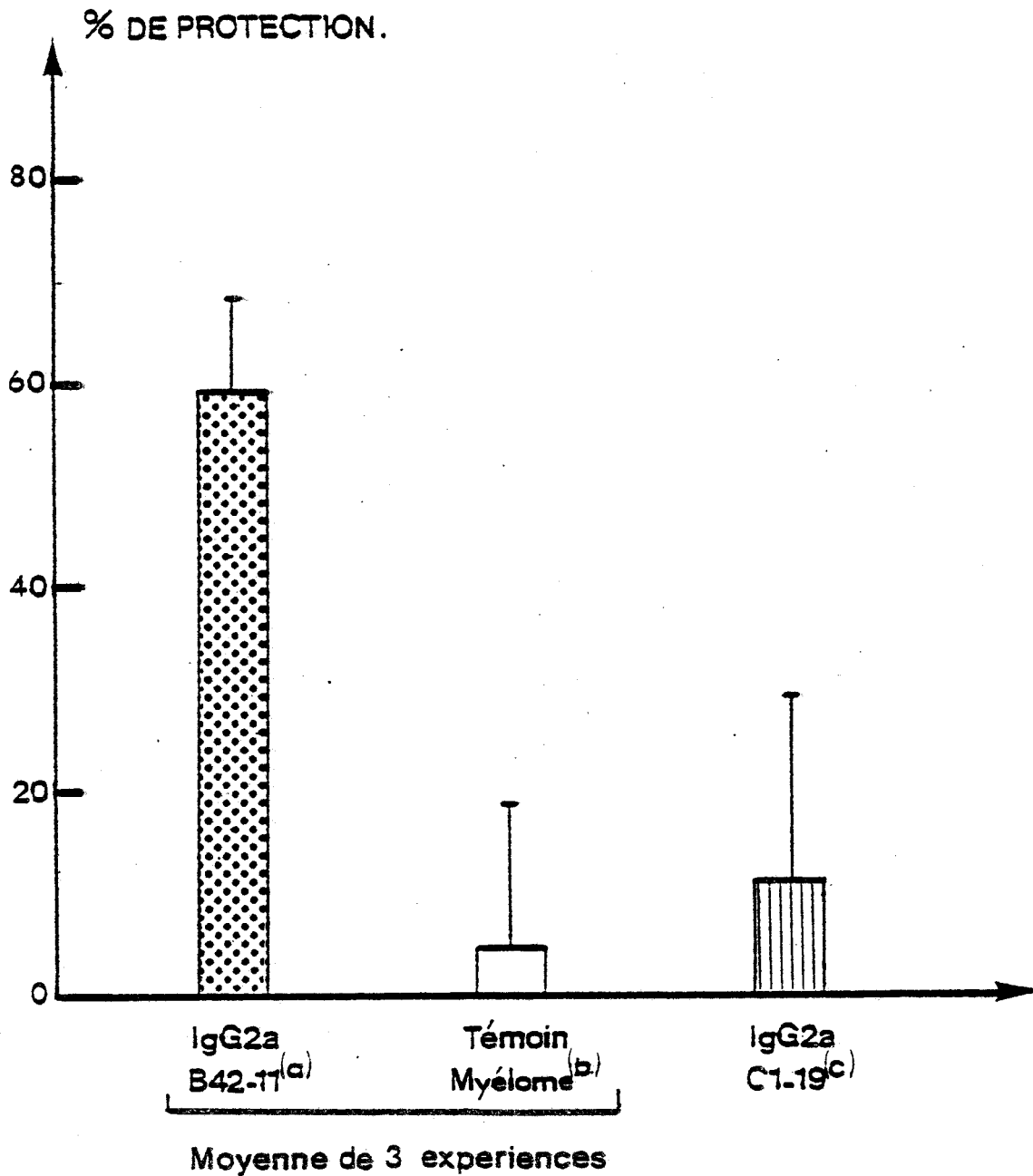
(a) 2 ml de liquide d'ascite (clone B42-11 ou ascite des cellules myéломateuses IR983F) ou 2 ml de solution saline (NaCl 0,9 %) sont injectés par voie intraveineuse à chaque rat LOU/C (groupes de 12 à 15 rats par expérience)

(b) La charge parasitaire est évaluée par perfusion de foie 21 jours après l'infection par 1000 cercaires de S. mansoni

(c) Le pourcentage de protection est calculé par la comparaison du nombre de vers récoltés chez les animaux traités par 2 ml d'ascite (B42-11 ou contrôle IR983F) par rapport au nombre de vers obtenu dans le foie des animaux traités par 2 ml de la solution saline.

(d) Liquide d'ascite induit par un clone cellulaire synthétisant une IgG2a dirigée contre l'IgE humaine (IgG2a non spécifique de S. mansoni).

Activité protectrice de l'IgG2a monoclonale produite
par le clone B 42.11 : Perfusion de foie



a) Liquide d'ascite induit par le clone B42-11

b) Liquide d'ascite induit par la souche myéломateuse IR983F

c) Liquide d'ascite induit par le clone C1 - 19 (IgG2a non spécifique de S. mansoni)

- l'existence d'une étape plus tardive de l'expression du pouvoir protecteur de l'IgG2a s'opérant au niveau du parasite dans la phase post-pulmonaire de la migration ;
- l'hypothèse d'un coup léthal induit précocement au niveau de la cible parasitaire mais conduisant à la destruction du schistosomule, après la phase de migration pulmonaire.

Pour écarter la possibilité d'une activité protectrice non spécifique liée à une surcharge du système immunitaire en immunoglobuline de classe IgG2a, des groupes d'animaux témoin infectés ont été traités par 2 ml du liquide d'ascite du clone C1.19 producteur d'une immunoglobuline de classe IgG2a sans activité anti-parasitaire. Dans ces conditions, aucune différence significative de la charge parasitaire n'a été observée par rapport aux animaux témoins d'infection (Tableau 18, expérience 3). Cet ensemble de données plaident donc en faveur d'une réelle activité protectrice de l'IgG2a monoclonale anti-S. mansoni vis-à-vis de l'infection expérimentale rat LOU/C par S. mansoni.

F) Discussion

L'étude des propriétés biologiques de l'anticorps monoclonal secrété par le clone cellulaire hybride homologue B42.11 a confirmé nos premières observations relatives à la cytotoxicité induite par les surnageants d'hybrides hétérologues. L'anticorps monoclonal de classe IgG2a synthétisé par le clone B42.11 révèle en présence d'éosinophiles de rat sain, une activité cytotoxique vis-à-vis du schistosomule de S. mansoni comparable à celle décrite au niveau des sérums de rats infectés depuis 4 semaines par

S. mansoni (CAPRON et Coll., 1978a). Les expériences de déplétion sélective des populations cellulaires effectrices ont permis de démontrer que la cytotoxicité induite par cet anticorps monoclonal procède de mécanismes similaires à ceux précédemment définis par CAPRON et Coll. (1978a) dans le cadre de l'infection expérimentale du rat par S. mansoni.

Le fait que l'IgG2a monoclonale manifeste des propriétés biologiques identiques à celles portées par les anticorps présents dans le sérum de rat infecté par S. mansoni souligne l'intérêt de l'utilisation d'un tel matériel comme une sonde d'étude des fonctions biologiques des anticorps de classe IgG2a dans l'immunité acquise à la schistosomiase. Les résultats obtenus lors des expériences de transferts passifs apportent un argument direct en faveur du rôle essentiel joué par les anticorps de classe IgG2a dans l'élaboration de l'immunité acquise à S. mansoni et confirme de fait, les observations de CAPRON et Coll. (1980) relatives à la déplétion sélective des sérums immuns en anticorps de classe IgG2a.

Le pourcentage d'immunité transférée par l'anticorps monoclonal produit par le clone B42.11 est comparable à celui induit par le transfert de sérum d'animaux immuns (CAPRON et Coll., 1980), néanmoins faut-il signaler que ces deux séries d'expérimentation ont été respectivement menées chez le rat LOU/C dans le cas de l'anticorps monoclonal, et chez le rat Fischer dans le cas de transfert de sérum de rat immun. Ces deux souches de rats peuvent différer quant à l'intensité de leur immunité à la réinfection. Il est donc nécessaire à ce stade d'étudier spécifiquement les paramètres de l'immunité à la réinfection développée par le rat LOU/C.

Certes, si nos expériences de transfert passif démontrent clairement le rôle des anticorps de classe IgG2a dans l'établissement de l'immunité acquise, elle ne permet pas toutefois d'affirmer la participation

du phénomène de coopération entre les anticorps de classe IgG2a et l'éosino-
phile in vivo. Des expériences de transfert passif de l'anticorps monoclonal
produit par le clone B42.11 chez l'animal déplété sélectivement en éosino-
philes nous permettront certainement d'apporter une réponse à cette question.

Dans ce contexte, l'anticorps monoclonal produit par le clone
B42.11 apparait dans une optique vaccinale, un candidat de choix par la
caractérisation et l'isolement d'un antigène cible potentiellement protecteur
Récemment, DISSOUS et Coll. (1982) ont caractérisé un antigène de PM 38000
à la surface du schistosomule. Cet antigène est également reconnu par des
préparations polyclonales d'anticorps isolées des sérums de différents hôtes
de S. mansoni, comme la souris, le rat, le singe et l'homme (DISSOUS et Coll.,
1981).

V - ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'IgG2c PRODUITE PAR LE CLONE B32.9

Contrairement aux deux anticorps monoclonaux que nous
venons de décrire aucune activité biologique précise n'avait pu être mise
en évidence pour l'anticorps monoclonal de classe IgG2c dans les deux systèmes
de cytotoxicité que nous avons envisagés.

Des travaux récents concernant l'identification des antigènes
de surface du schistosomule de S. mansoni à l'aide d'anticorps anti-S. mansoni
produit par hybridation cellulaire ont ouvert une voie nouvelle dans l'approche
des propriétés biologiques de certains anticorps . En effet, une observation
originale de C. DISSOUS (communication personnelle) démontre que l'anticorps
monoclonal de classe IgG2c produit par le clone cellulaire B32.9 reconnaît
une structure antigénique identique à celle révélée par l'anticorps monoclonal

de classe IgG2a produit par le clone B42.11. Ce résultat soulève le problème des conséquences biologiques d'une telle observation, et l'hypothèse d'une activité modulatrice possible des anticorps de classe IgG2c au niveau de l'expression des mécanismes immunitaires induits par les anticorps de classe IgG2a.

A) Approche de l'activité "modulatrice" de l'IgG2c

Nous avons donc envisagé pour définir l'activité modulatrice de l'IgG2c sur l'expression de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile induite par l'IgG2a produite par le clone B42.11, un protocole d'incubation des schistosomules de S. mansoni dans un mélange d'IgG2c du clone B32.9 et d'IgG2a du clone B42.11 (mélange IgG2c/IgG2a). L'activité cytotoxique du mélange IgG2c/IgG2a en présence d'éosinophile est comparée à l'action cytotoxique des deux anticorps monoclonaux incubés séparément en présence de schistosomules et d'éosinophile de rats sains. Dans ces conditions, une inhibition nette de l'activité cytotoxique de l'IgG2a monoclonale est observée dans les alvéoles contenant le mélange IgG2c/IgG2a. Aucune activité cytotoxique n'est observée pour l'IgG2c monoclonale seule (Tableau 19).

Des expériences complémentaires ont permis d'établir l'aspect dose-réponse de l'inhibition de la cytotoxicité dépendante de l'éosinophile par l'IgG2c monoclonale produite par le clone B32.9. Dans ces expériences, les schistosomules de S. mansoni ont été incubés en présence d'une quantité fixe d'IgG2a monoclonale et de quantité croissante d'IgG2c. Les résultats présentés dans la figure 19 traduisent clairement l'effet dose-réponse de l'inhibition de la cytotoxicité induite par l'IgG2c monoclonale produite par le clone B32.9.

TABLEAU 19

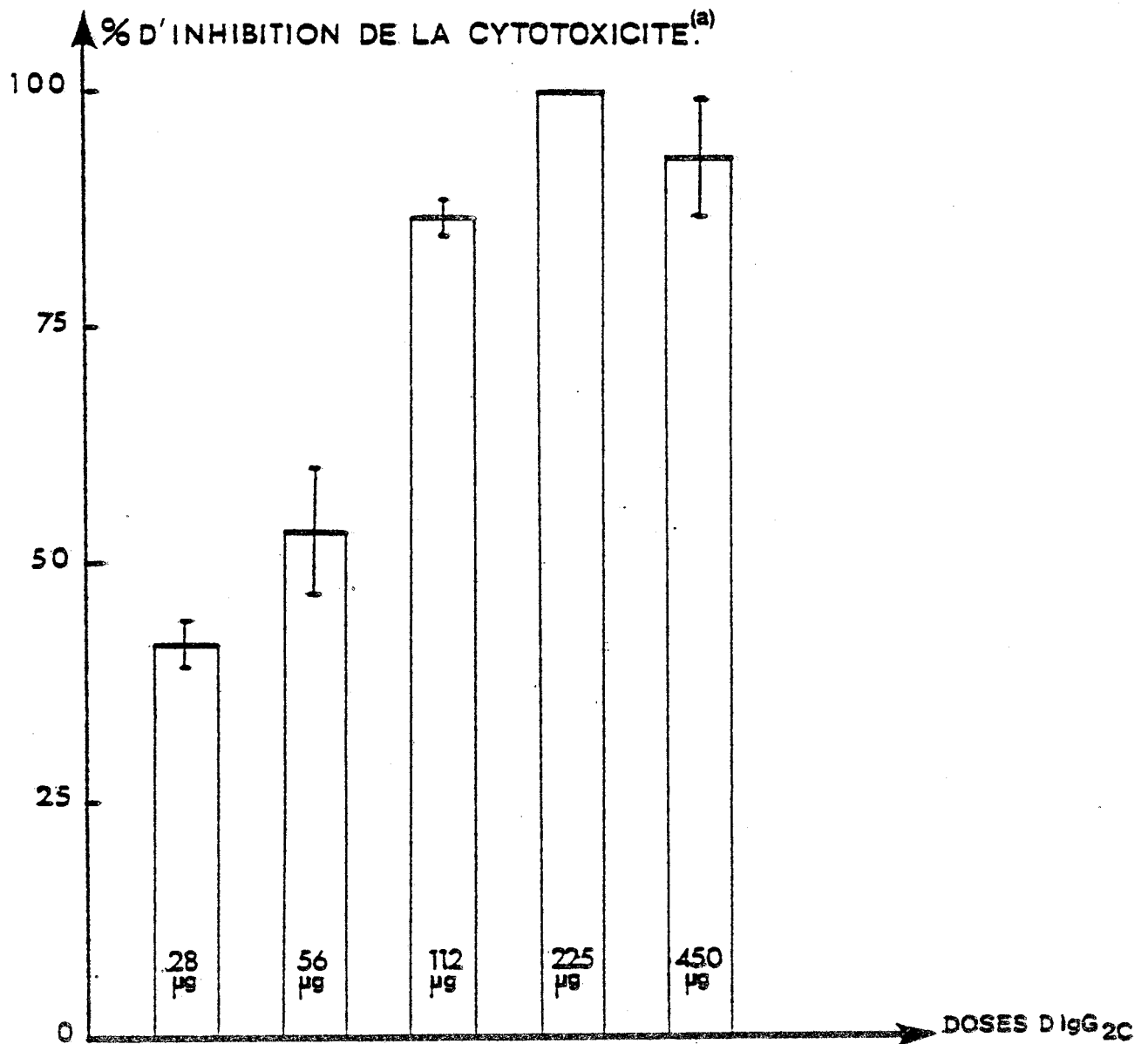
Etude de l'activité inhibitrice de l'IgG2c monoclonale du clone B32-9 vis-à-vis de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles induite par l'IgG2a du clone B42-11.

Source d'anticorps (a)	Pourcentage de cytotoxicité (b)
Liquide d'ascite du clone B42-11	61,5 ± 2,1
Liquide d'ascite du clone B32.9	14,5 ± 4,9
Liquide d'ascite du clone B42.11 + liquide d'ascite du clone B32-9	7,5 ± 4,9
Sérum de rat sain	11,5 ± 2,1
Sérum de rat infecté depuis 4 semaines par <u>S. mansoni</u>	59,0 ± 5,6

(a) Les schistosomules sont présensibilisés pendant 18 h en présence de 50 µl des différentes sources d'anticorps (Liquide d'ascite et sérum, dilution finale 1/32ème) chauffé 1 h à 56°C

(b) Le pourcentage de cytotoxicité (moyenne ± écart type de la moyenne) est mesuré après 48 h d'incubation des schistosomules sensibilisés en présence de cellules péritonéales de rat sain (43 % d'éosinophiles et 8 % mastocytes) rapport cellules effectrices/cible = 6000/1)

Etude de l'activité inhibitrice de l'IgG2c produite par le clone B32.9
vis-à-vis de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile induite par le clone
B42.11.



(a) Le pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile est déterminé après 48 h d'incubation des schistosomules dans 100 μ l d'un mélange IgG2a/IgG2c composé d'une dose fixe d'IgG2a produite par le clone B42.11 (450 μ g/ml) et de dose croissante d'IgG2c (28 à 450 μ g/ml).

B) Discussion

Les résultats que nous venons de présenter définissent clairement l'activité inhibitrice de l'IgG2c monoclonale synthétisée par le clone B32.9 vis-à-vis de la cytotoxicité dépendante de l'éosinophile induite par l'IgG2a monoclonale produite par le clone B42.11. Pourtant, nous ne disposons actuellement d'aucune information concernant le mécanisme de cette inhibition. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées, faisant intervenir un mécanisme de blocage, soit au niveau de la cible parasitaire, soit au niveau de la population cellulaire effectrice.

1. Au niveau du schistosomule

L'IgG2c monoclonale se fixe sur le même déterminant antigénique que l'IgG2a et empêche de fait, la fixation de l'IgG2a, mais l'IgG2c pourrait peut être agir au niveau d'un déterminant antigénique proche du site de fixation de l'IgG2a et inhiber sa fixation soit par encombrement stérique, soit par une modification conformationnelle de la membrane du parasite qui masquerait le site de fixation de l'IgG2a.

2. Au niveau de l'éosinophile

On peut aussi envisager une inhibition de la fixation de l'IgG2a au niveau du récepteurFc présent à la surface de l'éosinophile. Cette inhibition serait soit suscitée par une compétition de l'IgG2a et l'IgG2c au niveau d'un même récepteur, soit par l'encombrement stérique induit par la fixation de l'IgG2c au niveau d'un récepteur spécifique proche du site récepteur spécifique pour l'IgG2a.

L'activité biologique de l'IgG2c monoclonale est difficilement intégrable dans la dynamique de l'infection à S. mansoni, aucune donnée sur l'activité biologique de l'IgG2c n'a jusqu'à présent été rapportée dans les systèmes parasitaires. On peut peut-être à ce stade évoquer le rôle de l'anticorps IgG2c comme celui d'un anticorps bloquant. HELLSTRÖM et al. (1969a et 1969b) démontrent dans le système du sarcome à Moloney virus, et celui du papillome de Shope la présence d'un facteur inhibant la cytotoxicité dépendante de lymphocytes ganglionnaires. Ce mécanisme d'inhibition serait peut être pour le schistosomule une voie de protection vis-à-vis de la réponse immunitaire qu'il déclenche mais avant d'affirmer cette hypothèse, il nous faut prouver la réalité d'un tel mécanisme dans les conditions de l'infection expérimentale.

L'inhibition de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile s'explique peut-être dans le cadre des travaux de CAPRON et coll. (1979) qui démontrent que les complexes immuns prélevés chez le rat dans la période correspondant à l'absence de cytotoxicité des éosinophiles de rats infectés vis-à-vis de schistosomules non opsonisés, inhibent la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles de rats normaux vis-à-vis des schistosomules opsonisés. On pourrait dans ce cas supposer que l'un des facteurs bloquants correspond aux anticorps de classe IgG2c.

Nous abordons actuellement dans le cadre d'expériences de transfert passif, l'étude de l'activité in vivo de l'IgG2c afin de vérifier la réelle signification biologique de ce système.

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Notre travail avait pour but de produire grâce à la technique de fusion cellulaire, des anticorps monoclonaux spécifiques de S. mansoni et d'étudier leurs propriétés biologiques tant in vitro qu'in vivo afin de définir la possibilité d'une utilisation de ces sondes monoclonales dans la compréhension des mécanismes immunitaires suscités par l'infection parasitaire.

Cette approche nous a permis d'isoler de nombreuses populations cellulaires hybrides hétérologues et homologues productrices d'anticorps anti-S. mansoni décelables par la technique d'immunofluorescence indirecte sur coupe de schistosomules, ou de vers adultes de S. mansoni.

L'étude de ces anticorps anti-S. mansoni dans le système de sérotoxicité dépendant du complément et de cytotoxicité dépendant de l'éosinophile a révélé que ces anticorps possédaient des propriétés biologiques in vitro tout à fait comparables à celles précédemment décrites pour les sérums de rats infectés par S. mansoni.

L'utilisation de surnageants de culture cellulaire et/ou de liquide d'ascite obtenus à partir de cellules hybrides clonées a confirmé nos premières observations. Elle a permis la mise en évidence d'un anticorps spécifique de S. mansoni de classe IgM possédant une activité létale vis-à-vis des schistosomules de S. mansoni en présence de complément et conférant par immunisation passive un degré de protection significatif vis-à-vis de l'infection expérimentale du rat par S. mansoni. Ce résultat soulève l'hypothèse de l'existence d'un tel mécanisme in vivo et pose le problème de la signification biologique de ce mécanisme cytotoxique dépendant du complément dans l'expression de l'immunité à la schistosomiase.

Dans le cas précis des anticorps de classe IgG2a, les propriétés biologiques de l'anticorps produit par le clone cellulaire B42.11 sont identiques à celles des anticorps polyclonaux isolés des sérums d'animaux infectés, entre autre, la dépendance de facteurs mastocytaires pour l'expression de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile. Cet anticorps monoclonal transfère un pourcentage de protection hautement significatif vis-à-vis de l'infection par S. mansoni chez le rat, suggérant de fait, l'utilisation de cet anticorps comme une sonde à l'isolement et à la caractérisation dans une optique vaccinale d'un antigène potentiellement protecteur.

L'étude des anticorps monoclonaux a révélé un nouvel aspect de la réponse à médiation humorale, celui de la modulation des propriétés biologiques d'une population d'anticorps par une autre. Dans notre cas, il a été possible de démontrer le rôle inhibiteur de l'anticorps monoclonal de classe IgG2c dans l'expression de la cytotoxicité dépendante de l'éosinophile. Cette observation a de plus, soulevé l'hypothèse de l'existence d'anticorps bloquants permettant au parasite d'éluder la réponse immunitaire qu'il suscite. Ces résultats nous suggèrent donc d'étendre l'étude des mécanismes de modulation aux anticorps monoclonaux d'isotypes différents, la modulation pouvant s'exprimer en termes d'antagonisme ou de synergie.

L'anticorps monoclonal apparait donc comme un outil précieux à la dissection des mécanismes de l'immunité humorale, son exploitation chez l'animal sélectivement déplété en populations cellulaires effectrices sera certainement une étape décisive à la définition de la réelle signification biologique des paramètres de cytotoxicité définis in vitro. Le couplage des techniques de déplétion par irradiation ou par traitement par un sérum anti- γ et les techniques

de transfert passif d'anticorps d'isotype défini sera une base essentielle à la définition réelle de la participation de chaque isotype à l'élaboration de l'immunité. Si l'anticorps monoclonal autorise une approche fine des mécanismes immunitaires, il est aussi la sonde privilégiée à l'étude des antigènes parasitaires de par sa spécificité restreinte, il permettra la caractérisation et l'isolement des antigènes parasitaires dont l'extrême diversité limite l'efficacité des techniques d'investigations conventionnelles. L'anticorps monoclonal sera certainement une clé indispensable à la purification et à l'étude des antigènes parasitaires potentiellement protecteurs.

REFERENCES

REFERENCES

- AKONG, Q.F., FISCHER, D., TAMPION, W. & LUCY, J.A. (1975). Mechanism of cell fusion. Nature, 253, 194.
- ANDERSON, J. & MELCHERS, F. (1978). The antibody repertoire cell lines obtained by fusion of X63-Ag8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 130.
- ANWAR, A.R.E., SMITHERS, S.R. & KAY, A.B. (1979). Killing of schistosomula of S. mansoni coated with antibody and/or complement by human leucocytes in vitro : requirement for complement in preferential killing by eosinophils. J. Immunol., 122, 628.
- BACH, M.K., BLOCH, K.J. & AUSTEN, K.F. (1971a) IgE and IgG_a antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. I. Optimum conditions for in vitro preparation of target cells with antibody and challenge with antigens. J. Exp. Med., 127, 767.
- BACH, M.K., BLOCH, K.J. & AUSTEN, K.F. (1971b) IgE and IgG_a antibody-mediated release of histamine from rat peritoneals cells. II. Interaction of IgE and IgG_{2a} at the target cell, J. Exp. Med., 133, 772.
- BALLOU, B., LEVINE, G., HAKALA, T.R. & SOLTER, D. (1979). Tumor location detected with radioactively labeled monoclonal antibody and external scintigraphy. Science, 206, 844.
- BARNSTABLE, C.J., BODMER, W.F., BROWN, G., GALFRE, G., MILSTEIN, C. & WILLIAMS, A.F. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other cell surface antigens. New tools for genetic analysis. Cell., 14, 9.
- BARSKI, G. & CORNEFERT, F. (1960) Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association, de cellules de caractère "hybrides". C.R. Acad. Sci. (Paris), 251, 1825.

- BARSKI, G. & CORNEFERT, F. (1962) Characteristics of "hybrid" type clonal cells lines obtained from mixed culture in vitro. J.Nat. Cancer Inst. 28, 801.
- BARSKI, G., SORIEUL, S. & CORNEFERT, F. (1961) "Hybrid" type cells in combined culture of two different mammalian cell strains. J. Nat. Cancer Inst., 26, 1269.
- BAZIN, H., BECKERS, A. & QUERINJEAN, P. (1974) Three classes and four sub-classes of rat immunoglobulins : IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. Eur. J. Immunol., 4, 44.
- BAZIN, H., CAPRON, A., CAPRON, M., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. & PAUWELS, R. (1980) Effect of neonatal injection of anti- μ antibodies to schistosomes (S. mansoni) in the rat. J. Immunol., 124, 2373.
- BAZIN, H., GRZYCH, J.M., VERWAERDE, C. & CAPRON, A. (1980a) A LDU rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas. Ann. Immunol., 131D, 359.
- BLOCH, K.J. (1968) Anaphylactic antibodies of mammals including man. Progr. Allergy, 10, 84.
- BRODSKY, F.M., PARHAM, P., BARNSTABLE, G.J., CRUMPTON, M.J. & BODMER, W.F. (1979) Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system. Immunol. Rev., 47, 1.
- BUTTERWORTH, A.E., DAVID, J.R., FRANKS, D., MAHMOUD, A.A.F., DAVID, P.H., STURROCK, R.F. & HOUBA, V. (1977a) Antibody-dependent eosinophil dependent damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of S. mansoni : damage by purified eosinophils. J. Exp. Med., 145, 136.
- BUTTERWORTH, A.K., REMOLD, H.G., HOUBA, V., DAVID, J.R., FRANKS, D., DAVID, P.H. & STURROCK, R.F. (1977b) Antibody-dependent eosinophil mediated damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of S. mansoni : mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. J. Immunol., 118, 2230.

- BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V., MAHMOUD, A.A.F., SHER, A. & REES, P.H. (1975). Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. Nature, 256, 727.
- BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & REES, P.H. (1974) Antibody dependent cell-mediated damage to schistosomula in vitro. Nature, 252, 503.
- BUTTERWORTH, A.E., VADAS, H.A. & SHER, A. (1979) Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of Schistosoma mansoni, but fail to induced damage. J. Immunol., 122, 1314
- BUTTERWORTH, A.E., WASSOM, D.L., GLEICH, G.J., LOEGERING, D.A. & DAVID, J.R. (1979a) Damage to schistosomula of S. mansoni induced directly by eosinophil major basic protein. J. Immunol., 122, 221.
- CAPRON, A., BAZIN, H., DESSAINT, J.P. & CAPRON, M. (1975a) Macrophage adherence mediated by specific IgE antibodies. IRCS, 3, 52
- CAPRON, A., BIGUET, J., ROSE, F. & VERNES, A. (1965) Les antigènes de S. mansoni. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes : aspect immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de S. mansoni. Ann. Inst. Past., 109, 198.
- CAPRON, A., BIGUET, J., TRAN VAN KY, P. & MOSCHETTO, Y. (1969) Immunological studies in various types of Schistosomiasis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 160, 863.
- CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A. & AFCHAIN, D. (1968) Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte parasite. Path. Biol., 16, 121.
- CAPRON, A., CAPRON, M., BOUT, D., ROUSSEAU, R. & BAZIN, H. (1975c) IgE in immunity to schistosomes in the rat. Eur. Immunol. Meeting, Amsterdam, Sept., 16-19.

- CAPRON, A., CAPRON-DUPONT, M., CAMUS, D. & VERNES, A. (1972) Les phénomènes d'hypersensibilité dans les bilharzioses humaines. II. Etude in vitro de l'activité létale des sérums de malade pour les schistosomules de Schistosoma mansoni. Rapport avec les tests d'hypersensibilité. Société Française d'Immunologie, Paris, 8-9 décembre (Résumé).
- CAPRON, A., CAPRON, M., CAMUS, D. & VERNES, A. (1973) Les phénomènes d'hypersensibilité au cours des schistosomiasis humaines à Schistosoma mansoni et Schistosoma haematobium. II. Etude in vitro de l'activité létale de sérums de malades pour les schistosomules de Schistosoma mansoni. Rapport avec les tests d'hypersensibilité. Path. Biol., 21, 1079.
- CAPRON, A., CAPRON, M., DUPAS, H., BOUT, D. & PETITPREZ, A. (1974) Etude in vitro des phénomènes immunologiques dans la schistosomiose humaine et expérimentale. I. Etude comparative in vitro de l'activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur les adultes de Schistosoma mansoni. Int. J. Parasitol., 4, 613.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M. & BAZIN, H. (1975b) Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to Schistosoma mansoni schistosomules. Nature, 253, 474.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., JOSEPH, M. & PESTEL, J. (1980) Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. Am. J. Soc. Trop. Med. Hyg., 29, 849.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., JOSEPH, M. & TORPIER, G. (1982) Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. Immunol. Rev., 61, 41.
- CAPRON, A., VERNES, A., BIGUET, J. & TRAN VAN KY, P. (1967) Apport de l'immunoélectrophorèse à l'étude immunologique des bilharzioses. Ann. Soc. belge Med. Trop., 47, 127.

- CAPRON, A., VERNES, A., BIGUET, J., ROSE, F., CLAY, A. & ADENIS, L. (1966) Les précipitines sériques dans les bilharzioses humaines et expérimentales à S. mansoni, S. haematobium et S. japonicum. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 41, 123.
- CAPRON, A., WATTRE, P., CAPRON, M. & LEFEBVRE, M.N. (1972) Le diagnostic biologique moderne des parasitoses humaines. Rev. Prat., 22, 3661.
- CAPRON-DUPONT, M. (1974) Les mécanismes de cytotoxicité dans la bilharziose humaine et expérimentale. Rapport avec l'immunité. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Lille.
- CAPRON, M., BAZIN, H., JOSEPH, M. & CAPRON, A. (1981a) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. J. Immunol., 126, 1764.
- CAPRON, M., CAMUS, D., CARLIER, Y., FIGUEIREDO, J.F.M. & CAPRON, A. (1977) Immunological studies in human schistosomiasis. II. Antibodies cytotoxic for Schistosoma mansoni schistosomula. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 248.
- CAPRON, M., CAPRON, A., DESSAINT, J.P., TORPIER, G., JOHANSSON, S.G.O. & PRIN, L. (1981b) Fc receptors for IgE On human and rat eosinophil. J. Immunol., 126, 2087.
- CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D. & JOSEPH, M. (1978a) Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. Eur. J. Immunol., 8, 1270.
- CAPRON, M., ROUSSEAU, J., MAZINGUE, C., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1978b) Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to S. mansoni schistosomula. J. Immunol., 121, 2518.
- CAPRON, M., TORPIER, G. & CAPRON, A. (1979) In vitro killing of S. mansoni schistosomula by eosinophils from infected rats : role of cytophilic antibodies. J. Immunol., 123, 2220.
- CIOLI, D. & DENNERT, G. (1976) The course of Schistosoma mansoni infection in thymectomized rats. J. Immunol., 117, 590.
- CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R. (1972) The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of S. mansoni during cultivation in vitro. Int. J. Parasit., 12, 79.

- CLEVINGER, B., HANSBURG, D. & DAVIE, J. (1978) Murine anti- α (1-3) dextran antibody production by hybrid cells. Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 110.
- COON, H.G. & WEISS, M.C. (1969a) A quantitative comparison of formation of spontaneous and virus produced viable hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 62, 852.
- COON, H.G. & WEISS, M.C. (1969b) Sendai produced somatic cell hybrids between L cell strains and liver and L cells. In Heterospecific Genome Interactions, The Wistar Institute Symposium, pp. 83-96. The Wistar Institute Press, Philadelphia.
- COTTON, R.G.H., SECHER, D.S. & MILSTEIN, C. (1973) Somatic mutation and the origin of antibody diversity clonal variability of immunoglobulin produced by MOPC21 cell in culture. Eur. J. Immunol., 3, 135.
- DALCHAU, R., KIRKLEY, J. & FABRE, J.W. (1980) Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte -T lymphocyte antigen probably homologous to the W3/13 antigen of the rat. Eur. J. Immunol., 10, 745.
- DAMIAN, R.T. (1964) Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences. Am. Nat., 98, 129.
- DAMIAN, R.T. (1967) Common antigens between adult S. mansoni and laboratory mouse. J. Parasit., 53, 60.
- DAVIDSON, M.R. & GERALD, P. (1976) Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridation by polyethylene glycol. Somat. Cell. Genet., 2, 165.
- DEAN, D.A., WISTAR, R. & CHEN, P. (1975) Immune response of guinea pigs to Schistosoma mansoni. I. In vitro effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24, 74.
- DEAN, D.A., WISTAR, R. & MURRELL; K.D. (1974) Combined in vitro effects of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of Schistosoma mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 420.

- DESSAINT, J.P., TORPIER, G., CAPRON, M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1979) Cytophilic binding of IgE to macrophage. I. Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat. Cell. Immunol., 46, 12.
- DESSAINT, J.P., WAKSMAN, B.H., METZGER, H. & CAPRON, A. (1980) Cytophilic binding of IgE to the macrophage. III. Involvement of cyclic GMP and calcium in macrophage activation by dimeric or aggregated rat myeloma IgE. Cell. Immunol., 51, 280.
- DISSOUS, C., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1981) Isolation and characterization of surface antigens from Schistosoma mansoni schistosomula. Mol. Biochem. Parasitol., 3, 215.
- DISSOUS, C., GRZYCH, J.M. & CAPRON, A. (1982) Schistosoma mansoni surface antigen defined by a rat protective monoclonal IgG2a. Soumis pour publication.
- DOMINGO, E.O., COWAN, R.B.T. & WARREN, K.S. (1967) The inhibition of granuloma formation around S. mansoni eggs. I. Immunosuppressive drugs. Am. J. Trop. Med. Hyg., 16, 284.
- DOMINGO, E.O. & WARREN, K.S. (1968) The inhibition of granuloma formation around S. mansoni eggs. III. Heterologous anti-lymphocyte serum. Am. J. Path., 52, 613.
- EISENBARTH, G.S., WALSH, F.S. & NIRENBERG, M. (1979) Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4913.
- EPHRUSSI, B. (1964) Chromosomal markers. Somatic Cell Genetics, R.S. Krooth, ed., pp. 253-273, University of Michigan Press, Ann. Arbor, Michigan.
- EPHRUSSI, B. (1965) Hybridization of somatic cells and phenotypic expression in developmental and metabolic control mechanisms and neoplasma. The University of Texas, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute at Houston, 19th Annual Symp. on Fundamental Cancer Research, pp. 486-503, Williams and Wilkins, Co., Baltimore, Maryland.
- EPHRUSSI, B. (1972) in : Hybridization of somatic cells. Princeton, New Jersey, Princeton University Press, pp. 23.

- EPHRUSSI, B., SCALETTA, L.J., STENCHEVER, M.H. & YOSHIDA, M.C. (1964) Hybridization of somatic cells in vitro. Symp. Intern. Soc. for Cell. Biol. on Cytogenetics of Cell in Culture. Acad. Press, New York, 3, 13.
- EPHRUSSI, B. & SORIEUL, S. (1962) Nouvelles observations sur l'hybridation "in vitro" de cellules de souris. C.R. Acad. Sci. (Paris), 254, 181.
- EPHRUSSI, B., STENCHEVER, M.A. & SCALETTA, L.J. (1964) Hybridization as tool for cell genetics. In 2nd Intern. Med. Cong. Ltd., New York.
- EPHRUSSI, B., STENCHEVER, M.A. & SCALETTA, L.J. (1964b) Hybridization as a tool for cell genetics. 2nd Inter. Conf. on Congen. Malformations The intern. Med. Cong. Ltd, New York, pp. 85-93.
- GALFRE, G., MILSTEIN, C. & WRIGHT, B.W. (1979) Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd protion of mouse IgG. Nature, 217, 131.
- GANSHOWN, R. (1966) Glucuronidase gene expression in somatic hybrids. Science, 153, 84.
- GERSHON, D. & SACHS, L. (1963) Properties of a somatic hybrid between mouse cells with different genotypes. Nature, 198, 912.
- GILLILAND, D., STEPLEWSKI, Z., COLLIER, R.J. MITCHELL, K.F., CHANG, T.H. & KOPROWSKI, H. (1980) Antibody direct cytotoxic agents : use of monoclonal antibody to direct the action of A chains to colorectal carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4539.
- HALPER, J. & METZGER, H. (1976) The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. VI. Inhibition by IgG a immune complexes. Immunochimistry, 13, 907.
- HARRIS, H. & WATKINS, J.F. (1965) Hybrid cells dirived from mouse and man : artificial heterokaryons of mamalian cells from different species. Nature, 205, 640.
- HELLSTROM, I. & HELLSTROM, K.E. (1969a) Studies on cellular immunity and its serum mediated inhibition in moloney-virus-induced mouse sarcomas. Int. J. Cancer, 4, 587.

- HELLSTRÖM, I., EVANS, C.A., & HELLSTRÖM, K.E. (1969b) Cellular immunity and its serum-mediated inhibition in Shope-virus-induced rabbit papillomas. Int. J. Cancer, 4, 601.
- HOWARD, J.C., BUTCHER, G.W., GALFRE, G. & MILSTEIN, C. (1978) Monoclonal, anti-rat MHC (H-1) alloantibodies. Dans: Current Topics in Microbiol. and Immunol., 81, 54.
- JOHNSON, R.T. & HARRIS, H. (1969) DNA synthesis and mitosis in fused cells. III. Heba-Ehrlich heterokaryons. J. Cell. Sci., 5, 645.
- JOSEPH, M., CAPRON, A., BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F. & HOUBA, V. (1978) In vitro cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes induced by IgE immune complexes. Clin. Exp. Immunol., 33, 48.
- JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. (1977) Characteristics of macrophage cytotoxicity induced by IgE immune complexes. Cell. Immunol., 34, 247.
- JOSEPH, M., TONNEL, A., CAPRON, A. & VOISIN, G. (1980) Enzyme release and superoxide anion production by alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. Clin. Exp. Immunol., 40, 416.
- KAGAN, I.G. (1958) Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. Rice Inst. Pamph., 45, 151.
- KASSIS, A.I., AIKAWA, M. & MAHMOUD, A.A.F. (1979) Mouse antibody dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of S. mansoni. J. Immunol., 122, 398.
- KOHLER, G. (1976) Frequency of precursor cells against the enzyme B galactosidase. An estimate of the BALB/C strain antibody repertoire. Eur. J. Immunol., 6, 340.
- KOHLER, G. & MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 26, 495.
- KOHLER, G. & MILSTEIN, C. (1976) Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol., 6, 511.

- LIPINSKI, M. & HERZENBERG, L. (1981) Les hybridomes et leurs applications. La Recherche, 125, 952.
- LITTLEFIELD, J. (1964) Selection of hybrids from mating of fibroblast in vitro and their presumed recombinantes. Science, 145, 709.
- LOCKHART, C.G., STINSON, R.S., MARGRAF, H.W., PARKER, C.W. & PHILPOTT, G.W. (1980) Production of anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody by somatic cell hybridization. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. II 39 Abs 3476, 928.
- LYNCH, S.M., AUSTEN, K.F. & WASSERMAN, S.I. (1979) Release of arylsulfate A but not B from rat mast cells by non cytolytic secretory stimuli. J. Immunol., 121, 1394.
- MACKENZIE, C.D., RAMALHO-PINTO, F.J., Mc LAREN, D.J. & SMITHERS, S.R. (1977). Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of S. mansoni in vitro. Clin. Exp. Immunol., 30, 97.
- Mc KEARN, T.J., SARMIENTO, M., WEISS, A., STUART, F.P. & FITCH., F.W. (1978) Selective impression of reactivity to rat histocompatibility antigens by hybridoma antibodies. Cur. Top. Microbiol. Immunol., 81, 61.
- Mc LAREN, D.J., MACKENZIE, L.D. & RAMALHO-PINTO, F.J. (1977) Ultrastructural observation on the in vitro interaction between eosinophils and some parasitic helminths (Schistosoma mansoni, Trichinella spiralis and Nippostrongylus brasiliensis). Clin. Exp. Immunol., 30, 105.
- Mc LAREN, D.J. & RAMALHO-PINTO, F.J. (1979) Eosinophil-mediated killing of schistosomula of S. mansoni in vitro : synergistic effect of antibody and complement. J. Immunol., 123, 1431.
- Mc MICHAEL, A.J., PILCH, J.R., GALFRE, G., MASON, D., FABRE, J. & MILSTEIN, C. (1979) A human thymocyte antigen defined by a hybrid myeloma monoclonal antibody. Eur. J. Immunol., 9, 205.
- MADDISON, S.E., NORMAN, L., GEIGER, S.J. & KAGAN, I.G. (1970) S. mansoni infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, reexposed, and antigen sensitized animals. J. Parasit., 56, 1058.

- MAHMOUD, A.A.F., WARREN, K.S. & PETERS, P.A. (1975) A role for the eosinophil in acquired resistance to S. mansoni infection as determined by anti-eosinophil serum. J. exp. Med., 142, 805.
- MORSE, H.C. III, AUSTEN, K.F. & BLOCH, K.J. (1969) Biologic properties of rat antibodies. III. Histamine release mediated by two classes of antibodies. J. Immunol., 102, 327.
- MORSE, H.C. III, BLOCH, K.J. & AUSTEN, K.F. (1968) Biologic properties of rat antibodies. II. Time-course of appearance of antibodies involved in antigen-induced release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A^{rat}) association of this activity with IgG_a). J. Immunol., 101, 658.
- NAIMARK, D.H., BENENSON, A.S., OLIVER-GONZALEZ, J., MAC MULLEN, D.B. & RITCHIE, L.S. (1960) Studies of schistosomiasis in primates : observations on acquired resistance (progress report). Am. J. Trop. Med. Hyg., 9, 430.
- NAIMARK, D.H., OLIVER-GONZALEZ, J., CHAFFEE, E.F. & ANDERSON, R.I. (1957) Studies on schistosomiasis mansoni in primates. I. Initial occurrence of serologic antibodies correlated with egg recovery. J. Parasit. 43, suppl. 26.
- OLSSON, I., VENGE, P., SPITZNAGEL, J.K. & LEHER, R.J. (1977) Arginine-rich cationic proteins of human eosinophil granules. Comparison of the constituents of eosinophilic and neutrophilic leukocytes. Lab Invest., 36, 493.
- OLSSON, L. & KAPLAN, S. (1980) Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 5429.
- OUCHTERLONY, O. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5, 1.
- PEREZ, H. (1974) Investigation on the mechanism of protective immunity to S. mansoni in the rat. Ph. D. Thesis, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, England.
- PEREZ, H. (1975) Thèse de doctorat, Londres. Résultats cités in "A report of conference on newer immunologic approaches of schistosomiasis", WAKSMAN, R.H. & COOK, J.A. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 24, 1037.

- PEREZ, H., CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R. (1974) Acquired immunity to Schistosoma mansoni in the rat : measurement of immunity by the lung recovery technique. Parasitology, 69, 349.
- PHILLIPS, S.M., REID, W.A., BRUCE, J.I., HEDLUND, K., COLVIN, R.C., CAMPBELL, R., DIGGS, C.L. & SADUN, E.H. (1975) The cellular and humoral immune response to Schistosoma mansoni infections in inbred rats. I. Mechanisms during initial exposure. Cell. Immunity, 19, 99.
- PHILLIPS, M., REID, W.A. & SADUN, E.H. (1977) The cellular and humoral response to Schistosoma mansoni infection in inbred rats. II. Mechanisms during reexposure. Cell. Immunol., 28, 75.
- PICKART, L., THAYER, L. & THALER, M.M. (1973) A synthetic tripeptide which increases survival of normal liver cells, and stimulates growth in hepatoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 562.
- PONTECORVO, G. (1975) Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. Somat. Cell. Genet., 1, 397.
- RAMALHO-PINTO, F.J., GOLDRING, O.L., SMITHERS, S.R. & PLAYFAIR, J.H.L. (1976) T cell helper response to antigens of Schistosoma mansoni in CBA mice. Clin. Exp. Immunol., 26, 327.
- RAMALHO-PINTO, F.J., Mc LAREN, D.J. & SMITHERS, S.R. (1978) Complement-mediated killing of schistosomula of S. mansoni by rat eosinophils in vitro. J. Exp. Med., 147, 147.
- RAMALHO-PINTO, F.J., DE ROSSI, R. & SMITHERS, S.R. (1979) Murine Schistosomiasis mansoni : anti-schistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement- and eosinophil-mediated killing of schistosomula in vitro. Parasite Immunol., 1, 295.
- REINHERZ, E.H., KUNG, P.C., GOLSTEIN, G. & SCHLOSSMAN, S.F. (1979a) A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J. Immunol., 123, 1312.

- REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G. & SCHLOSSMAN, S.F. (1979b)
Further characterization of the human inducer T cells subset defined
by a monoclonal antibody. J. Immunol., 123, 2894.
- REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G. & SCHLOSSMAN, S.F. (1980a) A mono-
clonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T
cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2.
J. Immunol., 124, 1301.
- REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLSTEIN, G., LEVEY, R.H. & SCHLOSSMAN, S.F.
(1980b) Discrete stages of human intrathymic differentiation : ana-
lysis of thymocytes and leukemic lymphoblasts of T lineage. Proc.
Natl. Acad. Sci., 77, 1588.
- RITCHIE, L.S., KNIGHT, W.B., MAC MULLEN, C.B. & VON LICHTENBERG, F. (1966)
The influence of infection intensity of S. mansoni on resistance
against existing and subsequent infections in Macaca mulatta.
Am. J. Trop. Hyg., 15, 43.
- RITZ, J., PESANDO, J.M., MOTIS-Mc CONARTY, J., LAZARUS, H. & SCHLOSSMAN, S.F.
(1980) A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia
antigen. Nature, 283, 583.
- ROUSSEAU-PREVOST, R., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1977) I. Serum IgE levels after
infection by Schistosoma mansoni in various strains of rats.
Immunology, 33, 501.
- ROUSSEAU-PREVOST, CAPRON, M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1978) II. Quantitative
determination of specific IgE antibodies against S. mansoni : a
follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with
protective immunity. Immunology, 35, 33.
- SADUN, E.H. & GORE, T.W. (1970) S. mansoni and S. haematobium : homocyto-
tropic reaginic-like-antibodies in infections of man and experimental
animals. Exp. Parasit., 28, 435.

- SANFORD, K.K., LIKELY, G.D. & EARLE, W.R. (1954) The development of variations in transplantability and morphology within a clone of mouse fibroblast transformed to sarcoma producing cells in vitro. J. Nat. Cancer Inst., 23, 1035.
- SCALETTA, L. & EPHRUSSI, B. (1965) Hybridization of normal and neoplastic cells in vitro. Nature, 207, 1169.
- SEKIGUCHI, K., KURODA, K., OHNSHI, S.I. & ASANO, A. (1981) Virus induced fusion of human erythrocytes ghosts. I. Effect of macromolecules on the final stage of the fusion reaction. Biochemi. Biophys. Acta, 645, 211.
- SHEN, L., LYDYARD, P.M., ROITT, I.M. & FANGER, M.W. (1981) Synergy between IgG and monoclonal IgM antibodies in antibody dependent cell cytotoxicity. J. Immunol., 127, 73.
- SHER, A., KUSEL, J.R., PEREZ, H. & CLEGG, J.A. (1974a) Partial isolation of a membrane antigen which induces the formation of antibodies lethal to schistosoma cultured in vitro. Clin. Exp. Immunol., 18, 357.
- SHER, A., MACKENZIE, P. & SMITHERS, S.R. (1974b) Decreased recovery of invading parasites from lungs as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in mouse. J. Infect. Dis., 130, 626.
- SHER, A., SMITHERS, S.R. & MACKENZIE, P. (1975) Passive transfer of acquired immunity to Schistosoma mansoni in laboratory mice. Parasitology, 70, 347.
- SHER, A., SMITHERS, S.R., MACKENZIE, P. & BROOMFIELD, K. (1977) Schistosoma mansoni : Immunoglobulins involved in passive immunization of laboratory mice. Exp. Parasit., 41, 160.
- SHULMAN, M., WILDE, C.D. & KÖHLER, G. (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature, 276, 269.

- SMITHERS, S.R. (1967) Acquired resistance to S. mansoni in the Rhesus monkey (Macaca mulatta). Ann. Soc. belge Med. Trop., 47, 87.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965a) Naturally acquired resistance to experimental infections of S. mansoni in the Rhesus monkeys (Macaca mulatta) Parasitology, 55, 701.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965b) Acquired resistance to experimental infections of S. mansoni in the albino rat. Parasitology, 55, 711.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965c) The infection of laboratory hosts with cercariae of Schistosoma mansoni and the recovery of adult worms. Parasitology, 55, 695.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1969a) The immunology of schistosomiasis. Adv. Parasit., 7, 41.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1969b) Immunity in schistosomiasis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 160, 826.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1976) The immunology of schistosomiasis. Adv. Parasitol., 14, 399.
- SORIEUL, S. & EPHRUSSI, B. (1961) Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells in vitro. Nature, 190, 653.
- TOISTER, Z. & LOYTER, A. (1973) The mechanism of cell fusion. II. Formation of chicken erythrocyte polykaryons. J. Biol. Chem., 248, 422.
- UOTILA, M., ENGVALL, E. & RUOSLAHTI, E. (1980) Monoclonal antibodies in radioimmunoassay of alpha-fetoprotein. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. II 39 Abs. 3475, 928.
- Von LICHTERNBERG, F. & RITCHIE, L.S. (1961) Cellular resistance against schistosomula of S. mansoni in Macaca mulatta monkeys following prolonged infections. Am. J. Trop. Med. Hyg., 10, 859.

- WARREN, K.S., DOMINGO, E.O. & COWAN, R.B.T. (1967) Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am. J. Path., 51, 735.
- WEISS, M.C. & EPHRUSSI, B. (1966) Studies of interspecific (rat x mouse) somatic hybrids. I. Isolation, growth, and evolution of karyotype. Genetics, 54, 1095.
- WEISS, M.C. & GREEN, H. (1967) Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 58, 1104.
- YERGANIAN, G. & NELL, N. (1966) Hybridization of dwarf hamster cell by UV-inactivated sendai virus. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 55, 1066.
- YOSHIDA, M.C. & EPHRUSSI, B. (1967) Isolation and karyological characteristics of seven hybrids between somatic mouse cells in vitro. J. Cell. Physiol., 69, 33.
- YOSHIDA, N., POTONJAK, P., NUSSENZWEIG, V. & AIKAWA, M. (1980) Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. Science, 207, 71.

