

Ce travail a été réalisé dans le Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,
Unité mixte INSERM U. 162 - CNRS 624 de l'Institut Pasteur de Lille .

1, Rue du professeur A. Calmette B.P. 245 Lille Cedex (France)

Sous la direction du Professeur André CAPRON

Ce travail a bénéficié de l'appui financier de:

- L'Unité mixte INSERM U. 167 - CNRS 624
- Institut Pasteur de Lille

Je dédie cette thèse ,

A Sidi Hamza Ben Abbas EL BOUTCHICHI EL KADIRI

Reçois à l'occasion de ce travail l'expression de mon plus profond attachement ainsi que mon respect et mon dévouement les plus grands .

A mon époux **Nourreddine** ,

Par ta présence en permanence à mes côtés, par tes encouragements continus, tes précieux conseils et ton amitié, j'ai trouvé en toi le réconfort, le soutien moral, et la force nécessaire pour mener à bien ce travail .

A ma petite **Rim - Faten**,

Ton sourire, ta joie de vivre et ton amour ont été les rayons de soleil qui illuminaient ma vie . C'est certainement grâce à toi que j'ai pu trouver l'espoir, le courage et le dynamisme nécessaires à la poursuite de ces travaux de recherches

A mon très cher Père,

Je souhaite que tu puisses trouver en ce travail, le témoignage de toute la confiance et les espoirs que tu as placé en moi . Reçois cet ouvrage avec toute ma reconnaissance, mon amour et mon profond respect

A la plus douce, la plus tendre et la plus affectueuse des
Mamans ,

Je te dédie cette thèse, qu'elle soit pour toi , la récompense, de tout ce que tu as supporté comme tourments à mon égard , au cours de ces quatre longues années passées en France . Reçois ce travail comme un modeste cadeau de ma part .

A mes parents,

A toute ma grande et petite famille,

A tous mes amis,

REMERCIEMENTS

A mon Directeur de recherches ,

Monsieur le Professeur André CAPRON .

Pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour m'avoir honoré de votre confiance, je souhaiterais que ce travail soit, le témoignage de ma profonde gratitude, ainsi que celui de mon respectueux attachement .

A mon Président de thèse

Monsieur le Professeur M. PORCHET ,

Pour le grand honneur que vous me faites d'accepter la présidence de cette thèse, veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde reconnaissance .

A

Madame le Docteur Monique CAPRON ,

Pour avoir suivi mon travail avec bienveillance, pour l'avoir imprégné de votre enthousiasme ,de votre vivacité et de votre dynamisme, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mes sentiments de grande admiration, joints à ma profonde et sincère reconnaissance .

A Messieurs les membres de mon jury

Monsieur le Professeur D. LESIEUR

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à la constitution de mon jury veuillez accepter mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur A. DAIHNAULT

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury, soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect.

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à mener à bien ce travail et en particulier :

- Mr. G. Ovlaque (Institut Pasteur de Lille)

- Mr. L. Prin (CIBP . Lille)

- Mr. J. Charon (CIBP. Lille)

- M^{lle} C. Champagne (CIBP . Lille)

- M^{lle} V. Gruart (CIBP. Lille)

- M. J. P. Kusnierz (CIBP. Lille)

Pour m'avoir enseigné la technique d'hybridation cellulaire, pour leur dynamisme, leur présence permanente et leur participation efficace à l'élaboration de ce travail, je souhaiterais remercier et exprimer toute ma reconnaissance , en premier lieu , à :

- M^{me}. A. M. Schacht

et

- M^{me}. S. Lafitte

Je remercie tout particulièrement :

- Mr. J. P. Papin
- Mr. J. M. Grzych
- Mr. K. Wandji
- Melle A. Joubel
- M^{elle} M. H. Kocmirski
- Mr. C. Drolez
- M^{elle} C. Colson
- M. M. Chamekh
- M^{me}. M. F. Massard

A tous les membres des laboratoires du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
de l'Institut Pasteur de Lille :

*Acceptez mes plus sincères remerciements pour la gentillesse dont vous
avez tous, toujours fait preuve à mon égard.*

MOTS - CLES

- NEUTROPHILES
- GRANULOCYTES
- ANTICORPS MONOCLONAUX
- ACTIVATION METABOLIQUE
- HETEROGENEITE
- EXTRACTION MEMBRANAIRE
- EOSINOPHILES
- POLYNUCLEAIRES
- SPECIFICITE
- RECEPTEUR IgE
- SOUS POPULATIONS PMN
- DETERGENTS

Quelques
ABREVIATIONS & SYMBOLES
Utilisés

PMN	PolyMorphoNucléaire
Ac.	Anticorps
Ac.m.	Anticorps monoclonal
NCF	Neutrophil Chemotactic Factor
ECF	Eosinophil Chemotactic Factor
MBP	Major Basic Proteins (Gleich)
ECP	Eosinophil Cationic Proteins (Olsson & Venge)
Fc _γ R	Récepteur du fragment Fc de l'immunoglobuline G
Fc _E R ₁	Récepteur 1 et 2 du fragment Fc de l'immunoglobuline E
Fc _E R ₂	
Fc _μ R	Récepteur du fragment Fc de l'immunoglobuline M
ADCC	Anticorps Dependant Cells Cytotoxicity
Ig G,	Immunoglobulines G, E ou M
IgE,	
IgM	
PMA	Phorbol Meristate Acetate
FMLP	Synthetic f Met-Leu-Phe

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Dans le cadre des études récentes effectuées dans notre laboratoire sur l'aspect fonctionnel des granulocytes humains notamment l'étude des éosinophiles par le Dr M. Capron et des neutrophiles par le Dr J. Charon , nous nous sommes penchés sur la production et l'étude d'anticorps monoclonaux dirigés contre chacune de ces deux sous-populations granulocytaires.

De toutes les cellules impliquées dans la réponse immunitaire, les polynucléaires en général et les neutrophiles-éosinophiles en particulier, semblent être encore mal définis. Pour la plupart des immunologistes ces cellules n'ont aucune spécificité vis-à-vis de l'antigène mais elles jouent un rôle essentiel dans l'inflammation aiguë et dans la défense contre les micro-organismes, en association avec les anticorps et le complément. Elles semblent également responsables de la première fonction défensive apparue au cours de l'évolution (phagocytose et digestion intracellulaire) avant l'apparition des anticorps et des composants du complément qui ont amplifié cette défense. L'accroissement de la susceptibilité aux infections chez les sujets présentant un faible taux de polynucléaires témoigne bien de l'importance de ceux-ci dans les défenses anti-infectieuses de l'organisme.

Les polynucléaires représentent 60 à 70 % des leucocytes sanguins, mais ils peuvent aussi être retrouvés à l'extérieur du système vasculaire : ceci s'explique par leur capacité à adhérer aux cellules endothéliales et à traverser les parois vasculaires. Leur durée de vie, très courte (2 à 3 jours) par rapport à celle des monocytes/macrophages (plusieurs mois ou années), explique leur très grande productivité (80 millions/min).¹¹⁵

Leur classification en granulocytes polynucléaires s'explique par le fait que leur forme mature contient un noyau à plusieurs lobes et un cytoplasme très riche en granules (figure 1). C'est d'ailleurs selon la réaction de leurs granules à différents colorants histologiques qu'ils ont été classés en neutrophiles, éosinophiles ou basophiles, il y a déjà plus d'un siècle (1879). Cet unique critère de classification et de distinction entre neutrophiles et éosinophiles, encore insuffisant pour définir chacune de ces cellules, nous a poussés à effectuer une étude comparative plus appropriée de la structure antigénique et du caractère fonctionnel de chacune d'entre elles, par le biais d'anticorps monoclonaux.

CHAPITRE II

GENERALITES

I. LES GRANULOCYTES HUMAINS : HISTORIQUE

ET FONCTION

A- LE POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE (P.M.N.)

1- INTRODUCTION

Les neutrophiles à eux seuls représentent 90 % des polynucléaires circulants et ont un diamètre de 10 à 20 μm . Ils possèdent deux types de granules : les lysosomes ou granules primaires (azurophiles) contenant des hydrolases acides, une myéloperoxydase et une muriminidase (lysozymes) ; et les granules secondaires (spécifiques) contenant de la lactoferrine en plus du lysozyme. Au cours de la réponse anti-infectieuse, les organismes ingérés sont inclus dans des vacuoles, les phagosomes, qui fusionnent avec les granules à activité enzymatique pour former les phagolysosomes (figure . 1).

2- PROPRIETES BIOLOGIQUES ET FONCTIONS IMMUNOLOGIQUES DU POLYMORPHONUCLEAIRE NEUTROPHILE HUMAIN

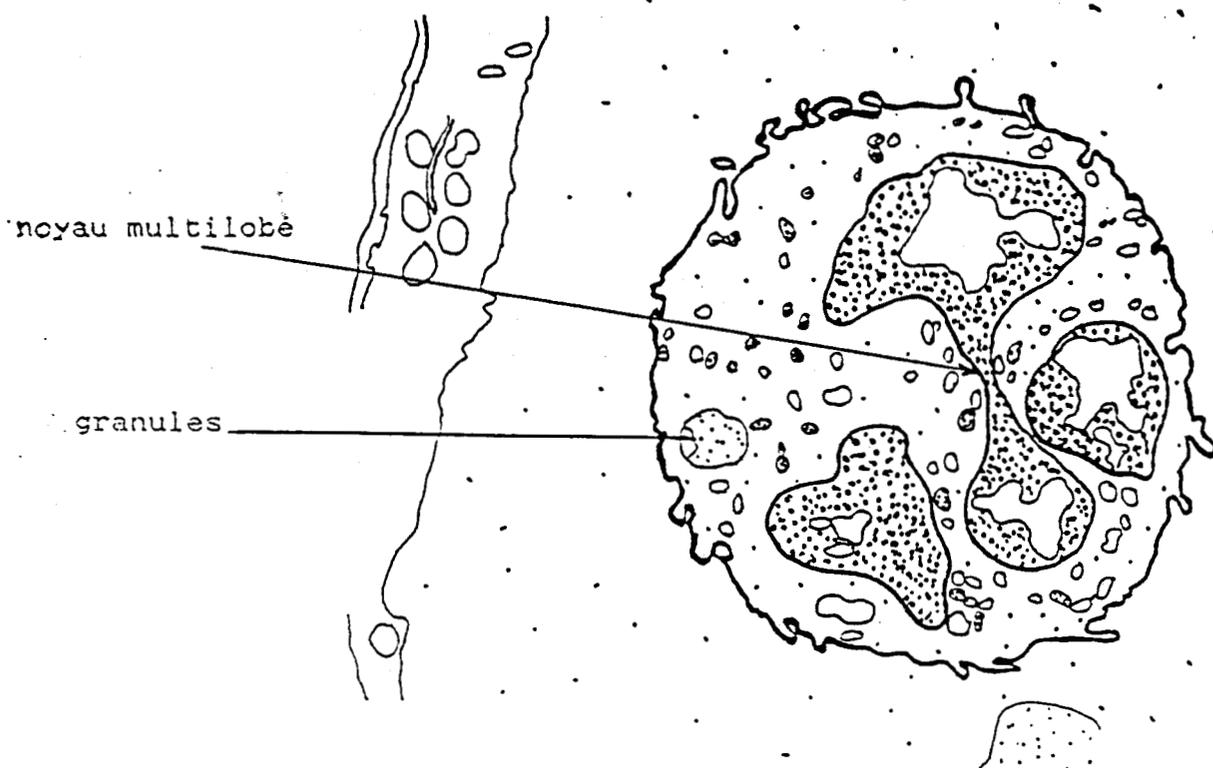
Par son ultrastructure, sa constitution cytologique et sa présence en grande quantité dans le sang circulant (90 % des polynucléaires), le neutrophile représente une entité cellulaire aux fonctions biologiques et immunologiques remarquables.

2- 1- Propriétés et fonctions biologiques du PMN

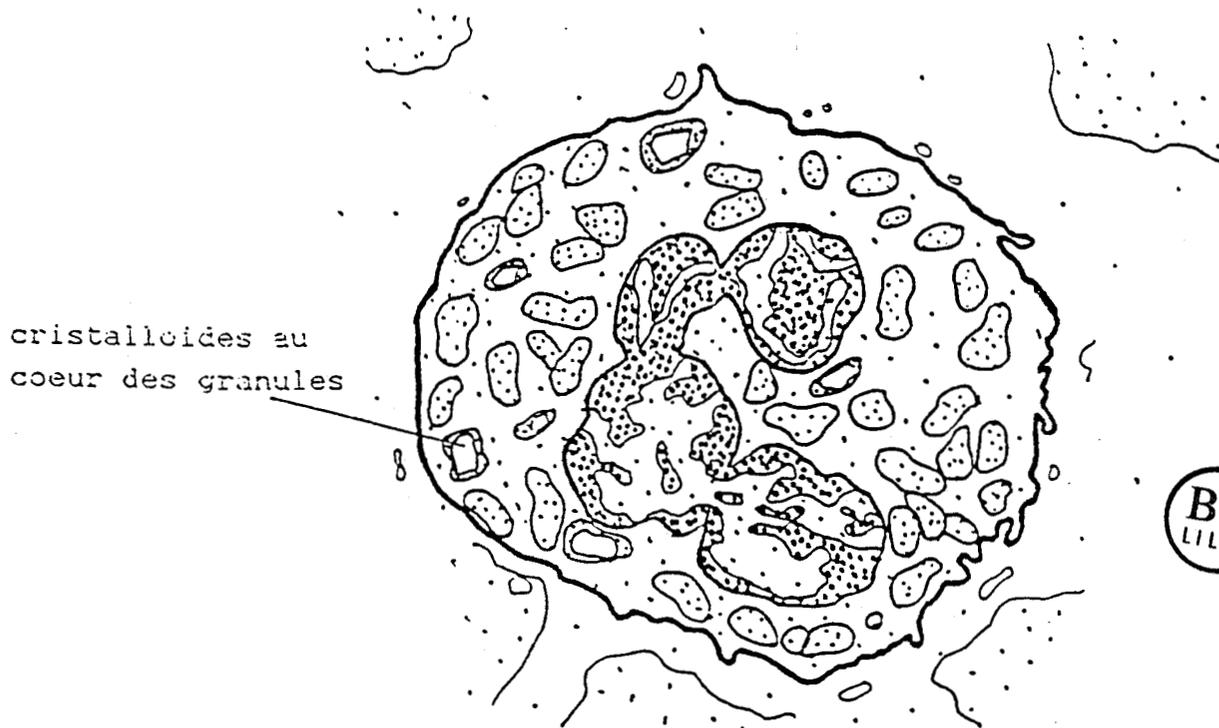
a -Inflammation défense anti- microbienne et anti -virale

Après une augmentation de l'afflux sanguin vers la région infectée favorisant le

FIGURE 1



ULTRASTRUCTURE DU NEUTROPHILE : Le cytoplasme du neutrophile contient des granules primaires et secondaires présentant une opacité différente aux électrons (x 10.000)



ULTRASTRUCTURE DE L'EOSINOPHILE : L'éosinophile mature contient des granules incluant un " crystalloïde " central (x11.500)

cheminement de l'oxygène, du glucose et des éléments actifs du système immunitaire, on constate, au cours d'une inflammation, une augmentation de la perméabilité des capillaires, favorisant le passage des médiateurs solubles et une migration par chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles vers le site de l'infection. (figure 2)

§- Chimiotactisme du PMN neutrophile : C'est effectivement, au cours de la défense antimicrobienne ou d'une réponse inflammatoire que le PMN neutrophile entre en activité. La libération de peptides chimiotactiques (C5a) due aux altérations tissulaires et à l'activation du complément par l'agent infectieux, provoque la stimulation du chimiotactisme du neutrophile. Par leurs pseudopodes, ces cellules phagocytaires s'insinuent entre les cellules endothéliales et perforent la membrane basale. Une fois hors du vaisseau, les neutrophiles se déplacent en remontant le gradient de concentration du peptide chimiotactique jusqu'au foyer inflammatoire 115.

§- Adhésion du PMN neutrophile aux microorganismes : Une fois parvenu au site de l'inflammation les PMN-neutrophiles doivent reconnaître l'agent infectieux, cela leur est possible, d'une part, par leurs récepteurs de surface (FcγR), leur permettant de fixer de nombreux microorganismes recouverts d'anticorps G, et ceci d'autant mieux que le microorganisme a également été opsonisé par le composant C3b qui se fixe sur le récepteur correspondant : le CR1.

§- Phagocytose des microorganismes par le PMN-neutrophile : Après la phase d'adhésion, les neutrophiles vont englober le microorganisme en émettant autour de lui des pseudopodes qui fusionnent et le microorganisme se trouve alors internalisé dans un phagosome. Le microorganisme piégé sera détruit par la fusion des lysosomes avec le phagosome.

PRINCIPALES ETAPES DE LA LYSE BACTERIENNE PAR LES
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

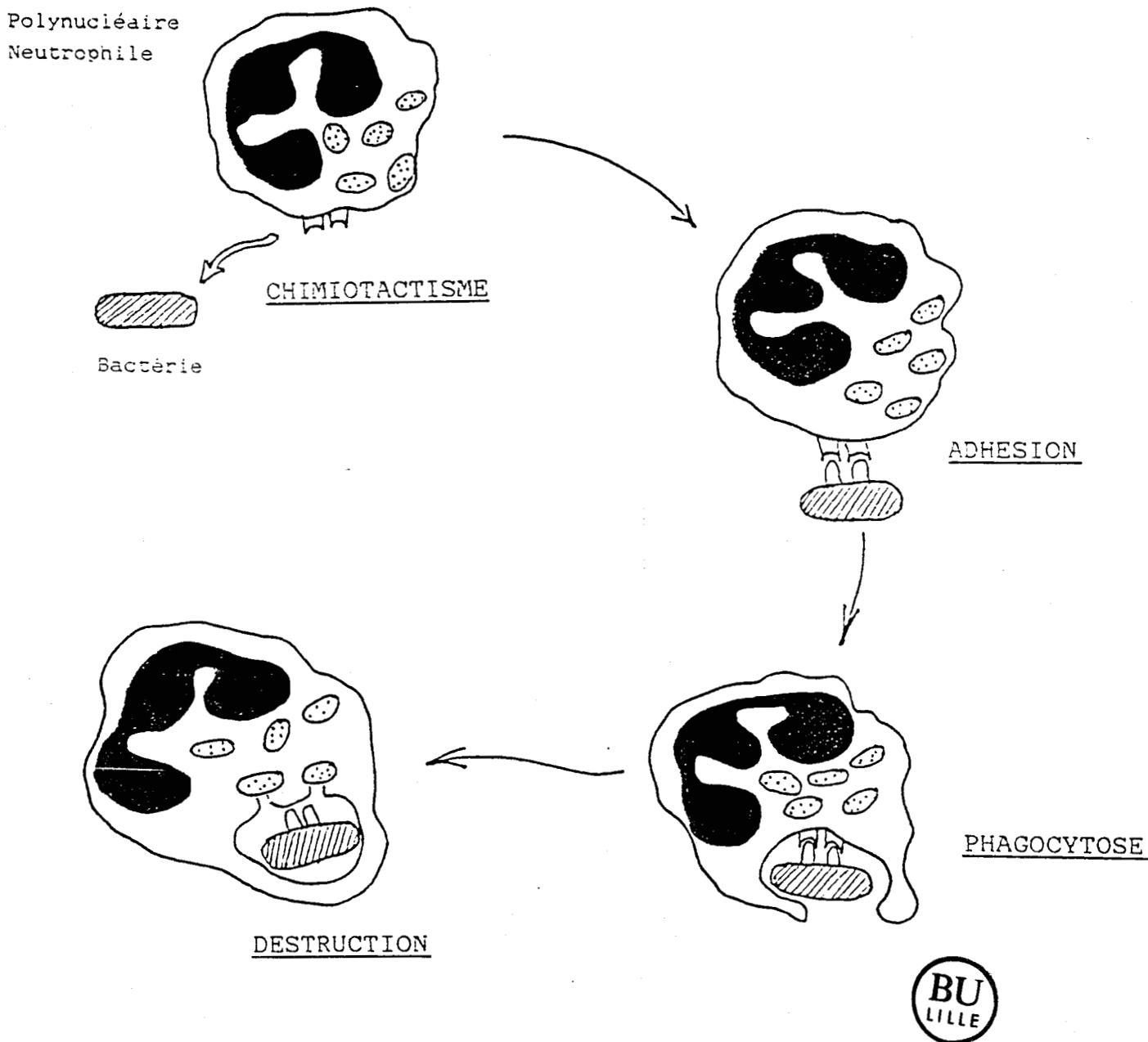


FIGURE 2

Le polynucléaire est attiré vers le site infectieux par chimiotactisme. Il se fixe aux bactéries par l'intermédiaire du récepteur C3b et d'autres récepteurs. Les bactéries sont phagocytées. Enfin, les lysosomes fusionnent avec le phagosome en libérant dans le phagolysosome des substances bactéricides et des enzymes.

§-. Lyse des microorganismes : Les composés bactéricides et enzymatiques des lysosomes attaquent le corps étranger afin de le détruire. Après la phagocytose, il se produit une augmentation transitoire du pH du phagosome qui, sous l'action des protéines cationiques, devient basique. Puis le pH baisse et les enzymes lysosomiales entrent en action, la lactoferrine fixe les ions libres et le lysosome digère le peptidoglycane des parois bactériennes entraînant la mort du microorganisme ¹¹⁵.

b- Défense anti-bactérienne et anti-virale :

Le PMN-neutrophile possède un rôle primordial dans les mécanismes de défense antibactérienne et anti-virale.

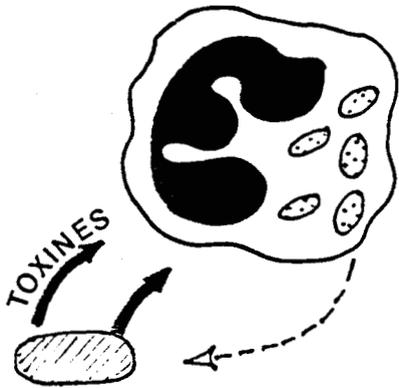
Bien que pratiquement toutes les bactéries soient tuées par le PMN-neutrophile, certaines espèces devenues pathogènes ont développé diverses façons de bloquer cette interaction à chaque étape de la lyse depuis l'attraction initiale, jusqu'à la lyse finale intracellulaire. Elles auraient donc développé un mécanisme "d'échappement à la lyse" par le PMN-neutrophile (figure 3.). Certaines bactéries empêchent l'arrivée des phagocytes en sécrétant des molécules toxiques ou des molécules qui bloquent l'activité inflammatoire et le chimiotactisme.

D'autres organismes résistent à la phagocytose grâce à des parois interdisant l'adhésion des phagocytes aux neutrophiles. Une fois phagocytés, certains organismes peuvent encore résister à la lyse de différentes façons : soit en empêchant la fusion des lysosomes avec le phagosome, soit par l'intermédiaire de leur membrane très résistante ou par leurs capacités à neutraliser les protéines antibactériennes ou encore en s'échappant du phagosome dans le cytoplasme où ils résistent à l'attaque lysosomiale. N'importe lequel de ces mécanismes permet aux bactéries de survivre et parfois de se multiplier à l'intérieur du neutrophile, ce qui peut conduire à sa mort.

Pour certains parodontologues, par exemple, cette prolifération intensive des bactéries, due également à la déficience de la défense immunitaire du neutrophile, serait à l'origine de

MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT A LA LYSE PAR LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

.1. Blocage du chimiotactisme



.2. blocage de l'adhésion et de la pénétration



.3. Blocage de la lyse

.4. Prolifération de la bactérie

(a)

(b)

(c)



Différentes espèces de bactéries ont évolué de façon à échapper à différentes phases de la phagocytose :

.1. Certaines bactéries empêchent l'arrivée des neutrophiles en sécrétant des molécules toxiques ou qui bloquent l'activité inflammatoire et le chimiotactisme .

.2. D'autres bactéries résistent à la phagocytose grâce des parois interdisant l'adhésion des phagocytes (exp. la protéine M DE LA microcapsule Streptococcus pyogenes .).

.3. Une fois phagocytés certains organismes peuvent encore résister à la lyse :

.a. En empêchant la fusion des lysosomes avec les phagosomes

.b. Grâce à leur membrane très résistante ou à leurs capacités de neutraliser les protéines antibactériennes.

.c. En s'échappant du phagosome dans le cytoplasme ou'ils résistent à l'attaque lysosomiale.

.4. Le microorganisme peut à la suite de l'échappement proliférer

à l'intérieur du neutrophile jusqu'à sa destruction totale

certaines pathologies de la gencive ²³ .

2 - 2 - Fonctions immunologiques du PMN-neutrophile Humain

Les neutrophiles peuvent être activés par les immunoglobulines de type G (IgG) complexées et par des composants activés du complément. Leurs propriétés biologiques telles que le chimiotactisme, l'adhésion aux microorganismes, les propriétés phagocytaires et de dégranulation, de même que leur abondance et leur grande sensibilité aux stimuli, contribuent à faire jouer un rôle relativement important aux neutrophiles dans les mécanismes de défense immunitaire et en particulier dans les réponses d'hypersensibilité.

a - Rôle du neutrophile dans la réaction d'hypersensibilité immédiate

A la suite d'une deuxième exposition d'un sujet atopique à un même allergène les mastocytes, sensibilisés par les IgE produites localement, au cours de la première exposition du sujet à l'allergène, dégranulent et libèrent des médiateurs (Histamine, NCF (Neutrophil Chemotactic Factor)) ¹¹⁵. Pendant que le NCF stimule la migration du neutrophile vers le site de localisation de l'allergène, l'histamine exerce un rétrocontrôle sur les neutrophiles. De plus, elle a un effet inhibiteur sur la libération d'enzymes lysosomiales par les neutrophiles.

b - Rôle du neutrophile dans la réaction d'Arthus (type II)

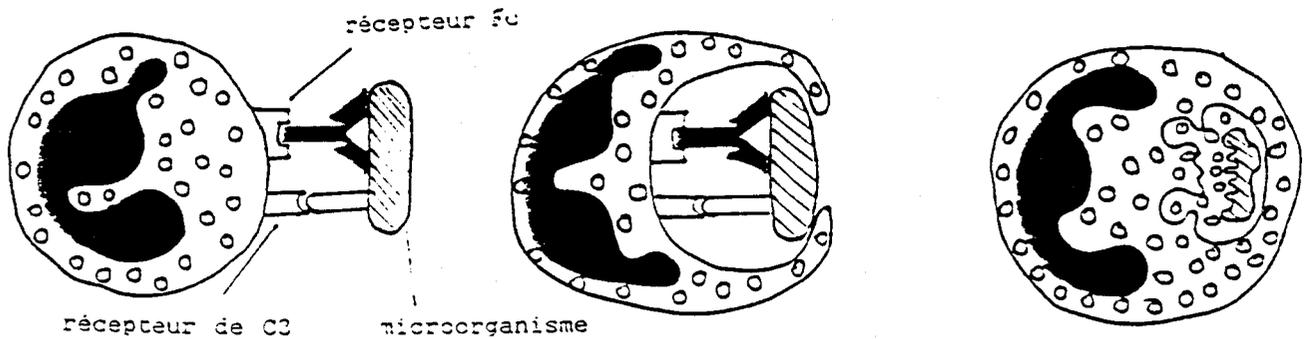
Dans ce mécanisme, les lésions provoquées par le neutrophile ne sont qu'un reflet de leur activité antimicrobienne normale (figure 4). Dans les réactions d'hypersensibilité, les cellules de l'hôte recouvertes d'anticorps sont phagocytées de la même façon que les microorganismes, mais quand la cible est de taille trop importante, dans le cas d'une membrane basale par exemple, la phagocytose ne peut être menée à son terme et les neutrophiles "frustrés" libèrent le contenu de leurs lysosomes dans le milieu extracellulaire, endommageant ainsi les cellules environnantes.

A. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE NORMALE DU NEUTROPHILE

1. Liaison du neutrophile

2. Phagocytose

3. Digestion



1. Les neutrophiles se lient aux microorganismes opsonisés grâce à leurs récepteurs pour le Fc et le C3 .

2. Le microorganisme est ensuite ingéré dans la cellule.

3. Puis digestion microorganisme par action des lysosomes le phagosome.

B. MECANISME DE CONSTITUTION DES LESIONS DANS L'HYPERSENSIBILITE DE TYPE II.

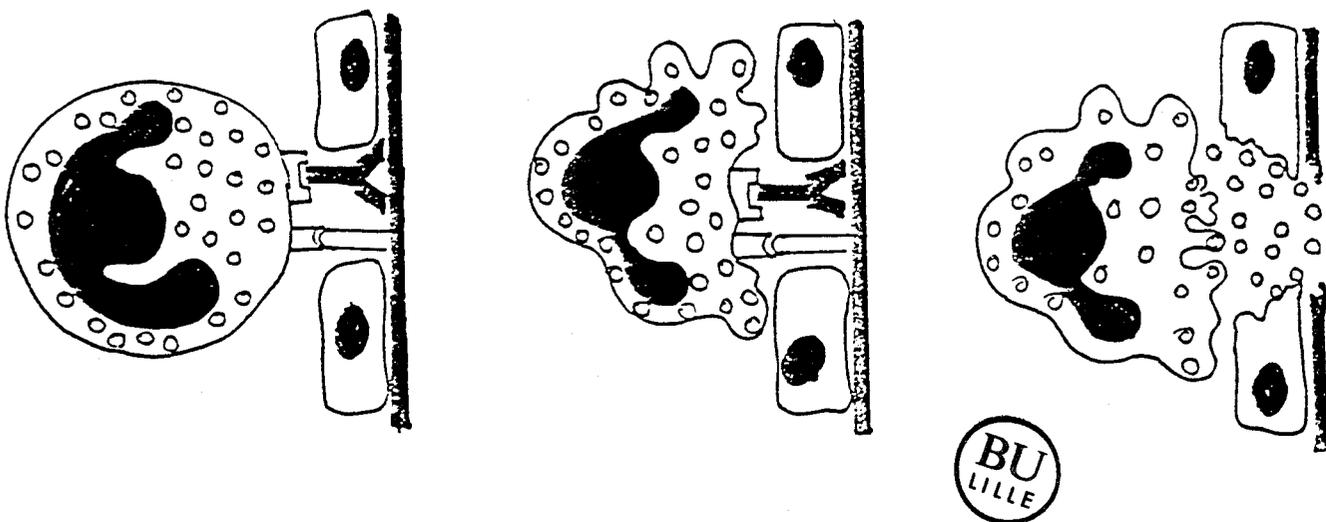


FIGURE 4

Dans les réactions d'hypersensibilité: type II , les cellules de l'hôte recouvertes d'anticorps sont phagocytées dans le cas de microorganismes . Mais quand la cible est trop grande (exp: dans le cas d'une membrane basale) la phagocytose ne peut être menée à son terme et le neutrophile "frustré" libère le contenu de ses lysosomes dans le milieu extra cellulaire endommageant ainsi les cellules environnantes.

BU
LILLE

c - Rôle du neutrophile dans la réaction d'hypersensibilité à complexes immuns (type III)

Cette hypersensibilité est caractérisée par un dépôt de complexes immuns dans la paroi des vaisseaux. Ce dépôt est dû à une augmentation de la perméabilité vasculaire par les amines vasoactives libérées par les plaquettes et les basophiles à la suite d'une stimulation par les complexes "antigène-anticorps".

Les plaquettes agrégées par ces complexes forment des microcaillots que ne peuvent plus phagocyter les PMN-neutrophiles attirés localement par le complément et par le même phénomène que précédemment, ils libèrent leurs enzymes lysosomiales qui lèsent la paroi vasculaire (figure 5.).

3- ETUDE ANTIGENIQUE ET FONCTIONNELLE DU NEUTROPHILE PAR LES Ac. MONOCLONAUX

Grâce à la nouvelle technologie apportée, en immunologie, par la production et la purification d'anticorps monoclonaux, de nombreuses études ont pu être menées à terme, dans le cadre des structures antigéniques du PMN-neutrophile.

1- Historique

Depuis les premières études de Köhler et Milstein en 1975 ⁷⁴, à l'origine des premières fusions cellulaires en vue de la production d'anticorps monoclonaux (appelés AcM) de nombreux travaux ont été consacrés à cette nouvelle technologie et en particulier dans le domaine des granulocytes humains.

C'est ainsi que Skubitz et coll. ¹²⁸, en 1983 produisent un AcM nommé AHN-1-6

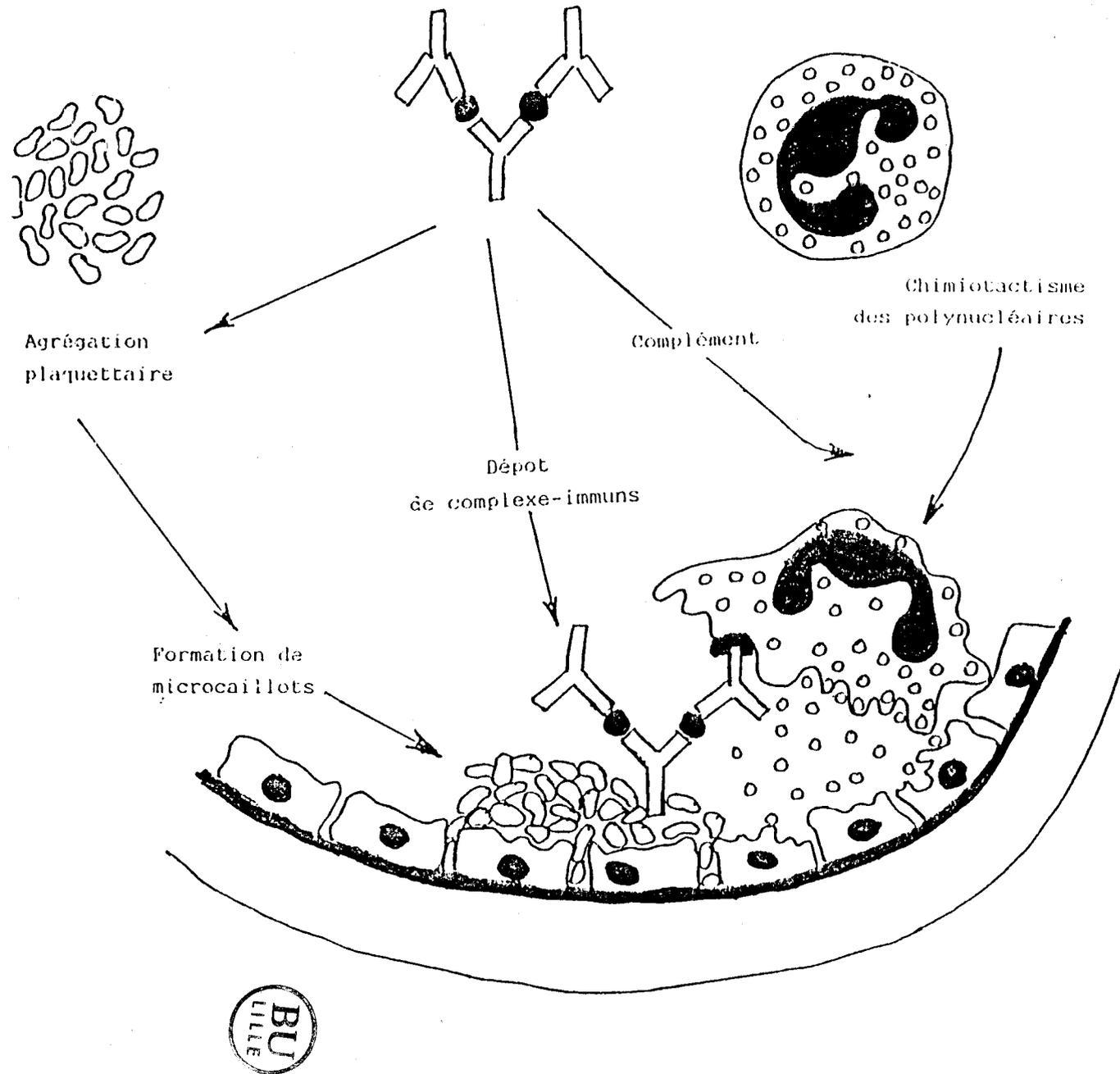
HYPERSENSIBILITE DE TYPE III

L'augmentation de la perméabilité vasculaire par les amines vasoactives par les basophiles et les plaquettes, provoque le dépôt des complexes immuns dans la parois des vaisseaux.

Les complexes induisent l'aggrégation plaquettaire et l'activation du complément. Les plaquettes agrégées forment des microcaillots au contact du collagène de la membrane basale endothéliale.

Les polynucléaires (PMN) attirés localement par les peptides chimiotactiques du système du complément ne peuvent phagocyter les complexes ils libèrent sur place leurs enzymes lysosomiales qui lésent la parois vasculaire.

FIGURE 5



PARTICIPATION DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES AUX REACTIONS
D'HYPERSENSIBILITE DE TYPE III

spécifique des granulocytes humains circulants, reconnaissant une structure antigénique de surface de 105 et 145 kDa de poids moléculaire et absente sur les lymphocytes, monocytes, basophiles, les globules rouges ou les plaquettes. Alors que la même année, Perussia et coll. ¹⁰⁴ produisent l'Acm B73-1 dont l'antigène reconnu serait, cette fois-ci, de 50 à 72 kDa et qui aurait la propriété de bloquer le récepteur Fc (FcγR) des sous populations lymphocytaires et du neutrophile.

Parallèlement, Kurlander ⁷⁷, (1983), synthétise quatre Acm (respectivement A163, 23D6, 4F2 et 3410) dirigés contre une variété d'antigène de surface bloquant le récepteur Fc, se fixant aux cellules U937, aux cellules HL-60 et aux cellules monocytes du sang périphérique (les cellules U 937 = lignée cellulaire humaine présentant certaines caractéristiques des macrophages. Les cellules HL60 : lignée cellulaire pouvant être induites à se différencier en PMN-Neutrophiles par 1,25 % de DMSO). De même dans le cadre de l'étude des granulocytes par les Acm. Clément et coll. ²⁵ (1983), montrent par leurs deux anticorps monoclonaux 1B₅ et 4D₁ la possibilité de l'existence de sous-populations de neutrophiles. Et afin de prouver l'intérêt de l'hétérogénéité fonctionnelle des neutrophiles à travers la différenciation normale ou anormale des cellules myéloïdes, il ont, par ces deux anticorps monoclonaux 1B₅ et 4D₁, démontré la différence des déterminants antigéniques reconnus pour chaque sous-population de PMN-neutrophiles. Une année plus tard, Perussia et Trinchieri ¹⁰⁶, (1984) démontrent que les PMN-neutrophiles et les cellules "Natural Killer" (NK) expriment les mêmes récepteurs Fc pour les complexes immuns grâce aux Acm B73-1 et 3G8. Ces deux Acm reconnaîtraient sur le même récepteur deux épitopes différents respectivement sur les PMN-neutrophiles et les cellules NK. Les épitopes reconnus par le B73-1 seraient responsables de l'activité cytotoxique des cellules NK.

Les Acm ont permis également à Strauss et Coll. ¹³², (1984) d'effectuer une analyse antigénique des PMN-neutrophiles humains normaux par comparaison à des PMN-neutrophiles

leucémiques. Par la production de cinq Acm : AHN 1 ; AHN 2 ; AHN 3 ; AHN 7 ; AHN 8., ces auteurs ont démontré l'importance des Acm anti-neutrophiles dans la différenciation hématologique et la classification des leucémies. La même année, Madyatha²³ décrit l'incidence des antigènes de neutrophiles sur les neutrophiles osseux de nouveau-nés sains par la synthèse de cinq Acm, Na₁, Na₂, NB₁, NC₁ et 9A. Dans ce travail, ils démontrent que l'ensemble des antigènes courants chez le neutrophile sont déjà exprimés à la naissance. Plus tard en 1985, Schwartz et coll.¹²⁰ produisent un Acm le 60-3 définissant un complexe antigénique de membrane qui serait impliqué dans le processus d'agrégation "neutrophile-neutrophile". Cet Acm 60-3 serait à l'origine d'une baisse de l'agrégation après stimulation par du PMA, par du plasma activé, par du zymozan ou du FMLP. Alors que Rojas et coll.¹¹⁶, (1985) rapportent la purification et la caractérisation d'un nouvel antigène (une globuline de PM 47 kDa) des PMN-neutrophiles, Vadas et coll.¹⁴² s'intéressent à l'expression sélective des antigènes fonctionnels 1 et 2 par le GFA1 et GFA2 (GFA = Granulocyte Fonctionel Antigen).

2- Etude fonctionnelle du PMN-neutrophile humain par les Acm

Par la production et l'étude de deux Acm, Seligman et coll.¹²⁴ ont démontré en 1984, l'existence de deux sous-populations, présentant une hétérogénéité antigénique. Cette différence aurait lieu au niveau de la synthèse protéique. De plus, cette hétérogénéité a été observée essentiellement dans la capacité du neutrophile à répondre au chimiotactisme, dans sa dépolarisation en réponse aux chimioattractants synthétiques (FMLP), de même que dans sa libération de radicaux oxygénés issus de la respiration.

C'est également dans le cadre de l'étude des propriétés du neutrophile que Skubitz et coll.¹²⁸ ont étudié le rôle des glycoprotéines de sa membrane plasmique. Leurs travaux ont abouti au fait, qu'en association avec une modification de la composition membranaire, il y aurait une nette distinction entre le neutrophile différencié et le neutrophile stimulé. D'autre part,

une défaillance dans la fonction du neutrophile, liée à une plus grande susceptibilité aux infections a été associée à une déficience en une glycoprotéine de surface de 110 kDa

a- Importance des Acm dans l'étude du rôle du PMN-neutrophile au cours de la réaction inflammatoire

En 1982, Gallin et coll. ⁴⁶ décrivent le rapport entre la déficience du neutrophile en granules spécifiques et l'évolution d'une réponse inflammatoire chez un enfant de 9 ans. Puis, Beatty et coll. ¹⁰ démontrent la corrélation étroite entre une infection bactérienne sévère chez un garçon de 8 ans et l'absence de complexes protéiques à la surface des PMN-neutrophiles. L'ensemble de ces travaux souligne l'importance des structures antigéniques de surface et intracellulaires du neutrophile dans l'intervention de cette cellule au cours de la réponse inflammatoire et dans la lutte contre les infections bactériennes.

b- Etude, par les Acm, des structures antigéniques intervenant dans le chimiotactisme du neutrophile

La migration du neutrophile par diapédèse, au travers de différentes couches de tissus, en réponse à un stimulus chimioattractant donne à cette propriété du neutrophile une importance capitale quant au déclenchement du processus de la réponse inflammatoire. C'est ainsi que de nombreux groupes de recherche ont plus particulièrement étudié cette fonction du neutrophile. Schiffman et coll. ¹¹⁹ (1983) se sont intéressés à l'étude des effets de certaines molécules sur l'adhérence et le chimiotactisme du PMN-neutrophile. Leurs travaux peuvent être ainsi résumés : d'une part les neutrophiles et d'autres cellules mobiles utilisent la **laminine** pour adhérer au collagène de la membrane basale, au cours de leur migration vasculaire et d'autre part à la suite d'une stimulation par un chimioattractant induisant l'inactivation de la **lipomoduline** (lipomoduline = inhibiteur d'une enzyme essentielle pour le chimiotactisme : "la phospholipase A2"). Ces mêmes cellules peuvent migrer vers le site de l'infection.

En 1984, Hirata et coll.⁵⁶ étudient les effets inhibiteurs du chimiotactisme du neutrophile par deux peptides le "MT peptide" et le "SRC peptide". D'autre part, Thomas et son équipe¹³⁹ ont produit, en 1981, une IgG1 monoclonale, le MCD₃ inhibant l'induction du chimioactisme des PMN-neutrophiles humains par le FMLP. En 1983, Pember et coll.¹⁰⁸ mettent en évidence une relation entre une hétérogénéité de densité du neutrophile, par séparation sur gradient (décrivant ainsi des PMN de haute densité, de moyenne densité et de faible densité) et leurs réponses différentes à une stimulation du chimiotactisme. En 1984, Cotter et Henson²⁷ réussissent la purification et la caractérisation d'un antigène impliqué dans le chimiotactisme et la dégranulation du neutrophile par l'Acm NCD1

c - Importance des Acm dans l'étude de la phagocytose par le neutrophile

De toutes les propriétés biologiques du PMN-neutrophile, la phagocytose est certainement la propriété la plus étudiée. C'est ainsi qu'en 1984, Thompson et coll.¹³⁶ ont mis en évidence, à l'aide d'un Acm, l'OKM₁, une déficience de la phagocytose du PMN associée à l'absence d'une glycoprotéine de surface. Cette structure antigénique intervient à la fois dans la fixation d'un ligand spécifique le C3_{bi} et dans l'adhésion aux membranes ("adhésiotopes"). En 1985, Leopaz et coll.⁹⁰ identifient des antigènes fonctionnels des granulocytes, GFA-2 impliqués dans l'ADCC et la phagocytose. Cet antigène spécifique des neutrophiles et éosinophiles, reconnu par un Acm, le WEM-G1, serait à l'origine de la stimulation de la phagocytose par le neutrophile de globules rouges de mouton, prétraités avec l'anticorps.

Parallèlement, les travaux de Melnick et coll.⁹⁸ sur l'Acm PMN₇-C3 inhibant l'activation du processus respiratoire (par un sérum avec du zymosan opsonisé), montrent que la fixation de cet Acm n'affectait pas la phagocytose de ces particules stimulantes par le PMN-neutrophile.

D'autre part, grâce à leur 2 Acm 60-3 et 60-1 dirigés contre les récepteurs du

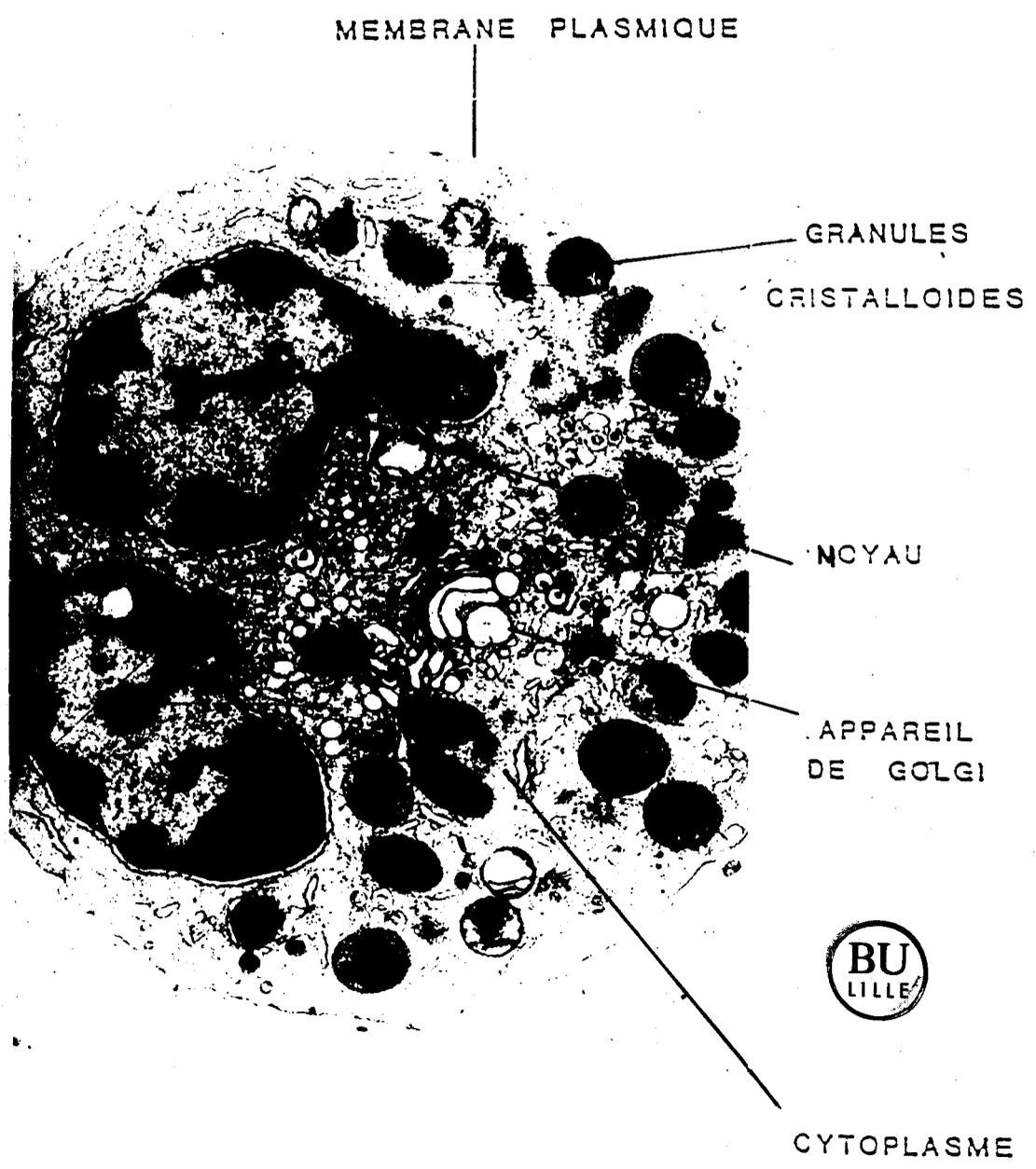
complément, Klébanoff et coll.⁷¹ ont enregistré des effets inhibiteurs de ces monoclonaux sur la phagocytose par les PMN, de granules de zymosan opsonisés par des sérum. Skubitz et coll.¹²⁷ décrivent des résultats similaires, soit une inhibition de la phagocytose par le PMN-neutrophile, avec un Acm AHN-1 qui immunoprécipiterait des protéines de surface de 105 et 145 à 150 kDa.

BUT DU TRAVAIL : PREMIER OBJECTIF

La quantité relativement importante de travaux, à travers le monde ayant utilisé des anticorps monoclonaux dans l'étude des granulocytes humains, n'exclut pas la présence de nombreux points encore obscurs concernant ces deux populations leucocytaires que sont les neutrophiles et les éosinophiles humains, notamment dans leur hétérogénéité l'une vis-à-vis de l'autre ainsi que dans l'hétérogénéité suggérant l'éventuelle existence de "sous-populations" cellulaires à l'intérieur de chacune d'entre elles 124 - 128 - 108 - 109 .

Dans un premier temps, notre but sera donc de produire un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre les neutrophiles humains, de déterminer le poids moléculaire de l'antigène qu'il reconnaît par une approche immunochimique, et enfin d'en étudier les effets biologiques sur l'ensemble des propriétés de cette cellule par comparaison à ceux des autres monoclonaux produits jusqu'ici.

EOSINOPHILE HUMAIN



B- LE POLYMORPHONUCLEAIRE - EOSINOPHILE

1- Introduction

L'identification du polynucléaire éosinophile date des premières observations cytohistologiques de Ehrlich ¹¹⁵, il y a déjà plus d'un siècle (1879). L'affinité tinctoriale particulière de ces granules cytoplasmiques pour les colorants acides, tels que l'éosine, donne à cette cellule un aspect *rouge orangé*, dès le stade promyélocyte. Chez un individu sain, les éosinophiles sont en très faibles quantités, ils représentent seulement 1 à 5 % des leucocytes. Comme les neutrophiles, ils sont capables de phagocyter et de digérer des microorganismes, mais cela n'est pas leur fonction primaire. Les éosinophiles humains matures présentent un noyau bilobé et de nombreuses vésicules cytoplasmiques (planche : Eosinophile Humain). Le nombre important de ribosomes, de mitochondries et de microtubules contenu dans leur cytoplasme suggère une importante activité métabolique. Les granules des éosinophiles matures sont des organelles liées aux membranes et au centre desquels on peut observer des "noyaux" cristalloïdes au microscope électronique.

Les éosinophiles peuvent être induits à dégranuler en réponse à des stimuli appropriés. Ce phénomène est le seul par lequel ces cellules peuvent utiliser leur potentiel cytolytique contre des cibles trop grandes pour être ingérées. Ainsi, il leur a été attribué un rôle effecteur dans l'immunité antiparasitaire en particulier dans la schistosomiase (figure 6).

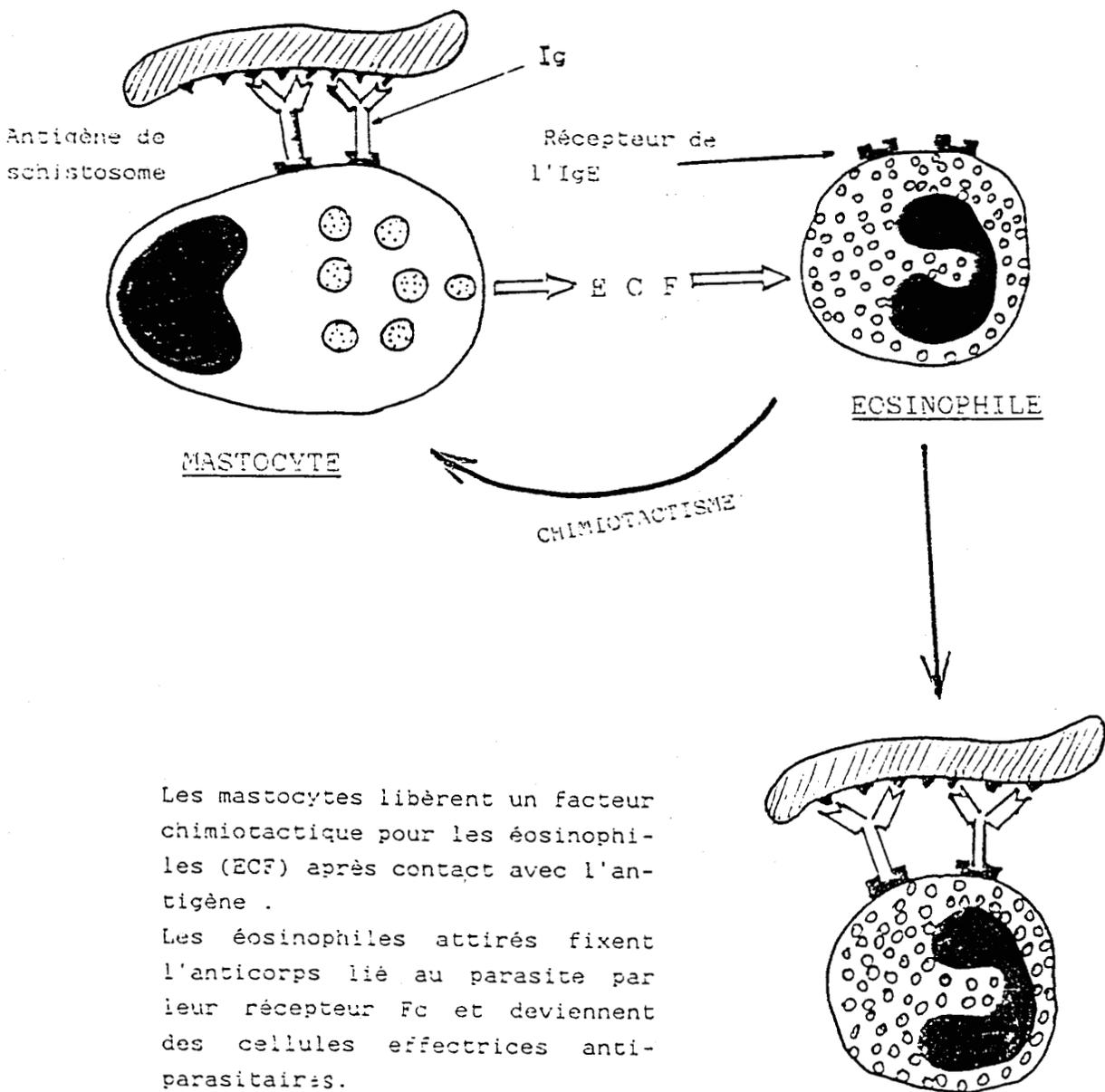
2- Propriétés biologiques et fonctions effectrices de l'éosinophile

Par son intervention au cours d'importants processus immunologiques, l'éosinophile à susciter l'intérêt de nombreux groupes de recherche dans le monde et a fait l'objet d'un nombre important de publications dans la littérature (17-22-49-59-66-68-90-97-109-110-128-130-131-138-143).

FIGURE 6

ROLE DE L'EOSINOPHILE AU COURS D'UNE REACTION

ANTIPARASITAIRE .



Les mastocytes libèrent un facteur chimiotactique pour les éosinophiles (ECF) après contact avec l'antigène .

Les éosinophiles attirés fixent l'anticorps lié au parasite par leur récepteur Fc et deviennent des cellules effectrices antiparasitaires.

Cependant, les fonctions de ce granulocyte restent encore mal définies. En effet dans les réactions de type anaphylactique ou dans l'hypersensibilité à complexes immuns, l'éosinophile joue un rôle immunomodulateur, mais dans un grand nombre de circonstances cliniques et histopathologiques, on suppose qu'il jouerait plutôt un rôle cytolytique aboutissant à une destruction tissulaire.

2-1- Propriétés biologiques du polynucléaire éosinophile

Trois caractères fonctionnels apparaissent essentiels pour l'éosinophile :

- a- Ses capacités de mobilité (chimiotactisme)
- b- Ses capacités de phagocytose
- c- Ses capacités d'exocytose d'enzymes.

a- ses capacités de mobilité

La mobilisation des éosinophiles, en réponse à un stimulus chimioattractant, peut être spécifiquement dirigée ou non, elle peut dépendre d'une concentration d'agents chimiotactiques. Il existerait un processus d'activation-désactivation de la cellule qui, une fois stimulée et recrutée au niveau du site inflammatoire, deviendrait insensible à l'action des agents chimiotactiques.¹¹⁰

b- Sa phagocytose

La capacité de phagocytose a surtout été mise en évidence, *in vitro*, en présence d'hématies sensibilisées, de granules mastocytaires ou de bactéries opsonisées. Cependant, *in vivo*, cette activité d'englobement au cours des mécanismes de lutte antibactérienne ne semble pas aussi importante que celle des neutrophiles. Par ses propriétés de phagocytose, l'éosinophile offre une protection très faible, voire inexistante, lors du processus anti-infectieux.

c- Sa fonction sécrétoire ou exocytose

Les capacités d'exocytose de l'éosinophile peuvent avoir, comme effets positifs la libération de médiateurs à action bénéfique, ayant pour but la destruction de certaines cibles étrangères et, comme effets négatifs, la libération de composés moléculaires toxiques pour les cellules normales. C'est dans l'exocytose que peut être soulignée la dualité fonctionnelle de l'éosinophile ; d'une part une cellule *immunomodulatrice*, facteur d'homéostasie, dans certaines réactions d'hypersensibilité ; mais d'autre part, *une cellule effectrice* pouvant participer activement au développement d'une réaction inflammatoire.¹¹⁵

2- 2- Fonctions effectrices de l'éosinophile

a- Eosinophile : Cellule "immunomodulatrice" (aspect bénéfique)

Le rôle du polynucléaire éosinophile était, jusqu'à présent, considéré comme bénéfique pour l'hôte de par son rôle de cellule régulatrice de l'hypersensibilité immédiate.

Les travaux de Hallgren et Coll. en 1979 ont mis en évidence la capacité de l'éosinophile à limiter les manifestations allergiques résultant de la dégranulation des mastocytes ou des basophiles, par la libération de médiateurs de l'anaphylaxie. D'autre part, Weller et Coll.¹¹⁰ (1979) ont résumé la capacité qu'ont les éosinophiles de neutraliser ces médiateurs libérés grâce au contenu enzymatique de leurs granules dont l'histaminase, l'arylsulfatase et la phospholipase inactivant respectivement l'histamine, la SRS-A et le P.A.F. Peu d'arguments convaincants sont venus étayer ces hypothèses *in vivo*.

b- Eosinophile : Cellule "effectrice" (aspect néfaste)

Butterworth et Coll ¹⁸ ont, en 1975, mis en évidence les fonctions effectrices de l'éosinophile vis-à-vis des cellules cibles parasitaires . En effet, ils ont démontré que les éosinophiles humains, incubés en présence de sérum de sujets atteints de bilharziose intestinale sont capables de détruire les larves de *S. mansoni* ou "schistosomules", cultivées *in vitro* . Par la suite, ces mêmes auteurs soulignent l'importance des récepteurs de membrane de l'éosinophile, par la mise en évidence d'une interaction entre les éosinophiles et les anticorps de classe IgG et une inhibition par les IgG agrégées (1A9). Plus tard, M. Capron et coll.²⁰ (1978), confirment ces observations dans un modèle expérimental, en identifiant l'IgG_{2a} comme sous classe d'anticorps IgG, effectrice chez le rat, et démontrent par la suite que des anticorps de classe IgE peuvent également rendre l'éosinophile cytotoxique (1981) soulignant ainsi , pour la première fois , l'interaction privilégiée entre éosinophile et anticorps de classe anaphylactique. Le mécanisme d'action de cette éosinotoxicité présente deux étapes : la première est une étape d'adhérence à la cible opsonisée, grâce au récepteur pour l'IgG ou l'IgE, puis la deuxième étape consiste en une dégranulation et une exocytose de médiateurs présents dans les granules de l'éosinophile, au contact de la cible.

A l'échelon moléculaire, le rôle de la protéine basique majeure (MBP) de Gleich ou celui des protéines cationiques de l'éosinophile (ECP de Olsson et Venge), semble déterminant dans l'induction de la lyse. D'autres auteurs soulignent la participation du système des peroxydases (EPO) et le rôle de l'activation du métabolisme oxydatif, avec génération d'anions superoxydes, dans le processus de cytotoxicité-éosinophile dépendante . L'ensemble de ces résultats suggère un mécanisme de lyse multifonctionnel.

c- Modèles expérimentaux de mise en évidence de processus pathologiques liés à une hyperéosinophilie périphérique ou tissulaire

Il existe quelques exemples en pathologie humaine où l'expression d'une éosinotoxicité a été évoquée à la suite d'un parallélisme entre hyperéosinophilie périphérique ou tissulaire, et l'évolution de certains aspects histopathologiques.

Des modèles expérimentaux permettent d'évoquer un rôle direct possible, de l'éosinophile dans la survenue de certaines de ces atteintes viscérales.

§- Eosinophilie et bronchopneumopathie

* Sur le plan clinique, la pneumopathie à éosinophile est caractérisée par un infiltrat d'éosinophiles plus ou moins étendu et souvent transitoire au sein du parenchyme pulmonaire.

* Sur le plan immunologique, cette pathologie peut être ou non liée à des manifestations d'hypersensibilité immédiate, mais elle est souvent associée à des taux élevés d'IgE.

Par ailleurs, Frigas et Coll. (1980) ont montré que la Major Basic Protein (MBP), purifiée à partir d'éosinophiles péritonéaux de cobaye, était cytotoxique pour des cellules épithéliales de trachée de cobaye, en culture *in vitro*. Les modifications histopathologiques et ultrastructurales de la muqueuse de la trachée induite par les MBP, *in vitro*, seraient tout à fait similaires à celles observées au cours de l'asthme bronchique chez l'homme. En effet, les résultats de Venge et Coll.¹⁴³ (1977), sur l'étude et le dosage des protéines cationiques de l'éosinophile (ECP) par des tests de provocation au cours de l'asthme allergique, ont apporté d'importantes informations sur le rôle de l'éosinophile dans les réactions d'hypersensibilité immédiate. Parallèlement à une baisse du taux d'éosinophiles circulants, ils observent une élévation du taux sérique d'ECP ainsi que l'apparition des premiers symptômes cliniques.

Une situation similaire est retrouvée au cours de l'asthme intrinsèque (cas de l'intolérance à l'aspirine) suggérant l'existence d'une relation entre l'ECP sérique et la sévérité des symptômes. Afin d'expliquer la pathogénèse de l'atteinte tissulaire dans l'asthme, ces auteurs

suggèrent l'hypothèse suivante : "A la suite d'une réaction anticorps IgE-allergène et de la libération de facteurs chimiotactiques variés, les éosinophiles sont attirés vers la paroi et la lumière bronchique. Après leur accumulation dans les bronches, les éosinophiles libèrent leurs médiateurs, soit à la suite d'une autolyse ou à celle d'un processus de dégranulation.

§- *Eosinophile et cardiomyopathie*

L'association hyperéosinophilie-cardiomyopathie a fait l'objet de très nombreuses publications depuis les premières observations de Loëffler (1936). De tous les organes où l'infiltration de l'éosinophile traduit le syndrome hyperéosinophile (foie, rate, coeur, poumon, rein et la peau) le coeur est, certainement le plus sérieusement touché avec une endocardite dense et une fibrose myocardique (cardiomyopathie de Loëffler).

L'activité cytotoxique de l'éosinophile vis-à-vis des tuniques endocardiques a été décrite par Spry et Tai ¹³⁰ (1978). Les éosinophiles dans ce cas expriment beaucoup plus de récepteurs de surface, ils sont vacuolés et contiennent moins de granules cristalloïdes. Le rôle de l'éosinophile et son mécanisme d'action sont encore mal définis. Néanmoins, les résultats de ces travaux laissent supposer que cette cardiomyopathie consécutive à une hyperéosinophilie majeure, résulterait d'une libération continue de facteurs provenant des éosinophiles dégranulés dans la circulation. Des études récentes démontrent la présence de MBP sur des biopsies de l'endocarde réalisées par Mostem chez des patients atteints de syndrome hyperéosinophile.¹¹⁰

§- *Eosinophile et neuropathie*

En 1933, Gordon ⁵³ constate qu'un extrait d'homogénat de ganglions Hodgkiniens, injecté dans les citernes ventriculaires d'animaux provoque une encéphalite. La participation de l'éosinophile et surtout de ses granules spécifiques dans ce processus pathogène, a été ensuite démontrée ³⁶. Durack et Coll.³⁷ confirment ces observations et isolent une "neurotoxine" dans les granules de l'éosinophile induisant des lésions cytotoxiques, vis-à-vis du système nerveux

central et périphérique.

3- Etude antigénique et fonctionnelle du polynucléaire éosinophile par les Acm

Parmi tous les Acm dirigés contre les cellules leucocytaires, la plupart de ceux produits jusqu'à présent sont dirigés plus spécifiquement contre les granulocytes, les monocytes et les cellules myéloïdes (⁹⁴⁻⁸⁷⁻²⁶⁻⁵⁴⁻¹³⁻⁶⁻⁷⁻¹¹⁻⁵⁵⁻³⁸⁻). Un nombre très limité d'auteurs se sont plus particulièrement intéressés à la production d'Acm dirigés spécifiquement contre les éosinophiles humains. Dans la majorité de ces cas, ces Ac. semblent reconnaître également les granulocytes, les mastocytes, les lymphocytes et même parfois les cellules myéloïdes. Entre autre, l'Acm produit par K. Foon et Coll.⁷⁸ (1983) répond à cette description et se fixe à un antigène de surface de 95 kDa. Cette IgG1 ne semble avoir aucun effet sur l'agrégation des granulocytes, la production de superoxydè, le relargage enzymatique, le chimiotactisme ou sur l'activité cytotoxique de l'éosinophile. Par contre, il semblerait que cet Acm nommé Eo1 stimulerait la sécrétion de β glucuronidase et qu'il aurait, par lui-même, une activité bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Parallèlement, Tai et Coll.¹³⁸ ont produit six Acm dans le but d'isoler les éosinophiles sanguins de patients atteints du syndrome hyperéosinophile. Ces anticorps reconnaîtraient à la fois, les éosinophiles et les neutrophiles circulants, ainsi que les cellules de la lignée hématopoïétique. Ils en déduisent alors que la majorité des principaux antigènes de la membrane plasmique, chez l'éosinophile, seraient également présents sur les neutrophiles et sur les cellules hématopoïétiques immatures. Au cours de l'étude du processus de dégranulation et de libération de l'ECP, ces mêmes auteurs immunisent des souris contre les extraits de granules de l'éosinophile d'une part et contre les produits de leurs sécrétions d'autre part. Les Acm obtenus se fixeraient de façon distincte à l'ECP sécrétée et à l'ECP stockée par l'éosinophile humain.

Récemment, Saito et Coll.⁵⁹ (1986) décrivent un anticorps monoclonal nommé EO-1 reconnaissant les éosinophiles, les basophiles, les plaquettes et une minorité (2 %) de cellules mononucléaires, mais ne reconnaissant pas les neutrophiles. Cet anticorps monoclonal serait l'unique IgG1 à reconnaître un antigène de 23 kDa présent spécifiquement sur l'éosinophile, les basophiles et les plaquettes qu'ils soient matures ou immatures. Parallèlement, M. Capron et Coll.²² (1986) rapportent l'étude fonctionnelle d'un Acm produit contre les éosinophiles humains et dirigés contre le récepteur IgE sur l'éosinophile, les plaquettes et les macrophages humains. Cet anticorps monoclonal nommé BB10 a été déterminé comme spécifique du récepteur Fc de l'IgE, grâce au niveau élevé d'inhibition de rosettes IgE formées par les éosinophiles à la suite d'une préincubation avec de l'IgM purifiée de BB10, alors que d'autres récepteurs tels que le $Fc_{\gamma}R$ ou le CR1 ne sont pas affectés. De plus ce même groupe de recherche démontre une similitude entre le récepteur Fc de l'IgE sur l'éosinophile et celui des plaquettes ou des macrophages, ce qui a abouti à la notion de second récepteur pour l'IgE ($Fc_{G}R2$), par opposition au récepteur IgE présent sur les basophiles et les mastocytes ($Fc_{E}R1$) ²¹⁻²².

BUT DU TRAVAIL: DEUXIEME OBJECTIF

A l'appui de l'ensemble des travaux réalisés sur l'éosinophile humain et dans le but de participer à l'éclaircissement de certains points obscurs concernant la structure antigénique de surface de ce leucocyte, nous nous sommes fixé comme objectif, dans un deuxième temps, de produire un nouvel anticorps monoclonal anti-éosinophile et d'en effectuer une étude biochimique, et immunologique approfondie, afin de déterminer les fonctions biologiques propres à ce leucocyte polynucléaire.

II- PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX PAR HYBRIDATION CELLULAIRE:

A- INTRODUCTION

1- DEFINITION

L'hybridation cellulaire consiste à fusionner deux cellules différentes pour former une entité cellulaire, possédant la totalité ou une partie du matériel génétique des deux cellules d'origine. La cellule hybride ainsi formée, ou "hybridome" peut exprimer simultanément, les propriétés biologiques des deux cellules "parentales".

On peut donc par cette technique, envisager la fusion entre un B lymphocyte, cellule productrice d'anticorps, et une cellule myélomateuse, possédant la propriété de se multiplier (*in vitro*) de façon exponentielle. Dans les cas favorables, l'hybridome formé conservera ces deux propriétés et donnera lieu à une population cellulaire croissante qui, par plusieurs clonages successifs permettra de produire des anticorps monoclonaux. Ces anticorps monoclonaux qui, par définition, sont synthétisés par un seul clone cellulaire, sont dirigés contre un même déterminant antigénique et forment par conséquent une population d'immunoglobuline de même spécificité anticorps.

Des anticorps monoclonaux peuvent également être obtenus, suite à la transformation en lignées continues de lymphocytes B par le virus Epstein-Barr (Steinitz et coll., 1977). Cette technique qui conserve les caractéristiques des cellules B ainsi immortalisées, permet de travailler à partir de cellules humaines. Cependant, le rendement est faible, les anticorps sécrétés sont bien souvent de faible affinité et la production massive d'anticorps monoclonaux est moins fructueuse que par le biais de l'hybridation cellulaire.

En fait, il existe, tant chez l'homme que chez l'animal, une très grande hétérogénéité moléculaire des immunoglobines. 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 est pratiquement impossible de séparer ces différents anticorps de sorte que les antisérums conventionnels contiennent un mélange d'anticorps variant d'un animal à un autre.

*Ceci présente un très grand handicap pour le sérodiagnostic, surtout au niveau de la standardisation des tests.

2- HISTORIQUE

La technique de fusion cellulaire, et l'utilisation qu'il en est fait pour produire des anticorps, est le fruit de nombreuses observations qui ont débuté avec les travaux de Barski et coll.⁸ (1960).

C'est cependant à Kohler et Milstein⁷⁵, que revient le mérite d'avoir, en 1975, réalisé les premières fusions de lymphocytes qui ont été à l'origine de la technique actuelle. Entre ces deux époques, de nombreuses équipes ont, de par le monde, apporté leur contribution à l'évolution de cette technique. L'historique peut en être résumée de la façon suivante :

* En 1960, Barski et coll.⁸ ont fait l'observation de fusion cellulaire spontanée. Une année plus tard, en 1961, Sorieul et Ephrussi¹²⁹ confirment les observations de Barski . C'est en 1963 que Gershon et Sach⁴⁷ , confirment l'identification d'hybrides pouvant exprimer les antigènes parentaux.

* L'année d'après, Littlefield⁹² met au point un système de sélection des cellules hybrides.

* Et c'est enfin en 1965 que Schletta et Ephrussi¹²¹ effectuent la fusion d'une cellule "immortelle" avec une cellule néonatale. A ces travaux ont succédé, une année plus tard, ceux de Yerganian et Nell¹⁵³ qui augmentent par 100 le rendement de fusion cellulaire spontanée par le virus de Sendai. La fusion cellulaire par agent chimique (DMSO) renforcée par la théorie du

processus de fusion n'a été effectuée qu'une dizaine d'années plus tard, 1975, par Akong et coll.² Ceci a ouvert la voie à Pontecorvo ¹¹¹ 1976, puis Davidson ³⁴, pour l'utilisation du Polyéthylène glycol (PEG) et l'augmentation du rendement de la fusion.

L'historique en est résumée dans le tableau suivant :

<u>ANNE</u>	<u>AUTEURS</u>	<u>TRAVAUX</u>
1973	SELIGMAN et BROUET ¹²²	<i>Définition d'anticorps homogènes issus du développement excessif d'une lignée lymphocytaire.</i>
1973	COTTON et MILSTEIN ³²	<i>Etude du contrôle génétique de synthèse des Immunoglobulines.</i>
1974	WEIGERT et Coll. ¹⁴⁷	<i>Induction de plasmocytome chez la souris.</i>
1975	KOHLER et MILSTEIN ⁷⁴	<i>Première fusion entre des cellules myélomateuses et une population lymphocytaire.</i>

B- FUSION CELLULAIRE

1- LES CELLULES

1- 1- Les lymphocytes producteur d'anticorps

Ils proviennent de la rate, des ganglions ou du sang. Le choix dépend principalement du modèle expérimental, de la localisation particulière de certaines populations lymphocytaires, ou encore de la facilité d'obtention d'une grande quantité de cellules immunes.

1- 2- Les cellules myélomateuses ou plasmocytomes.

Depuis les travaux de Kohler et Milstein ⁷⁵ (1975) de nombreuses souches myélomateuses ont été exploitées pour leur capacité de fusion. La lignée myélomateuse que nous avons utilisé au cours de nos travaux est la lignée SP₂O dérivée de la lignée P3 x 63 Ag8.

2 - LES AGENTS FUSOGENES

La fusion spontanée entre cellules est très rare d'où la nécessité d'utiliser des agents fusogènes.

2- 1- Le virus de Sendai inactivé

Les premiers travaux montrant le rôle fusogène du virus de Sendai inactivé sont ceux effectués par Arris et Watkins (1965) ¹⁰¹. Ils n'obtiennent pas de cellules hybrides viables mais cet échec s'explique par le choix des cellules et non pas par l'utilisation du virus.

Les premiers hybrides viables induits par le virus de Sendai inactivé sont décrits par Yerganian et Nell ¹⁵³ (1966), puis Coon et Weiss ¹⁰¹ (1969) qui définissent les conditions optimales d'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.

Cependant, l'utilisation du virus de Sendai comme agent fusogène présente plusieurs inconvénients :

- 1. La préparation et le maintien de la souche virale sont délicates,*
- 2. l'activité des différentes préparations virales est très variable,*
- 3. le virus est infectant pour certains types cellulaires,*
- 4. l'introduction d'une information dans le génome cellulaire n'est pas exclue.*

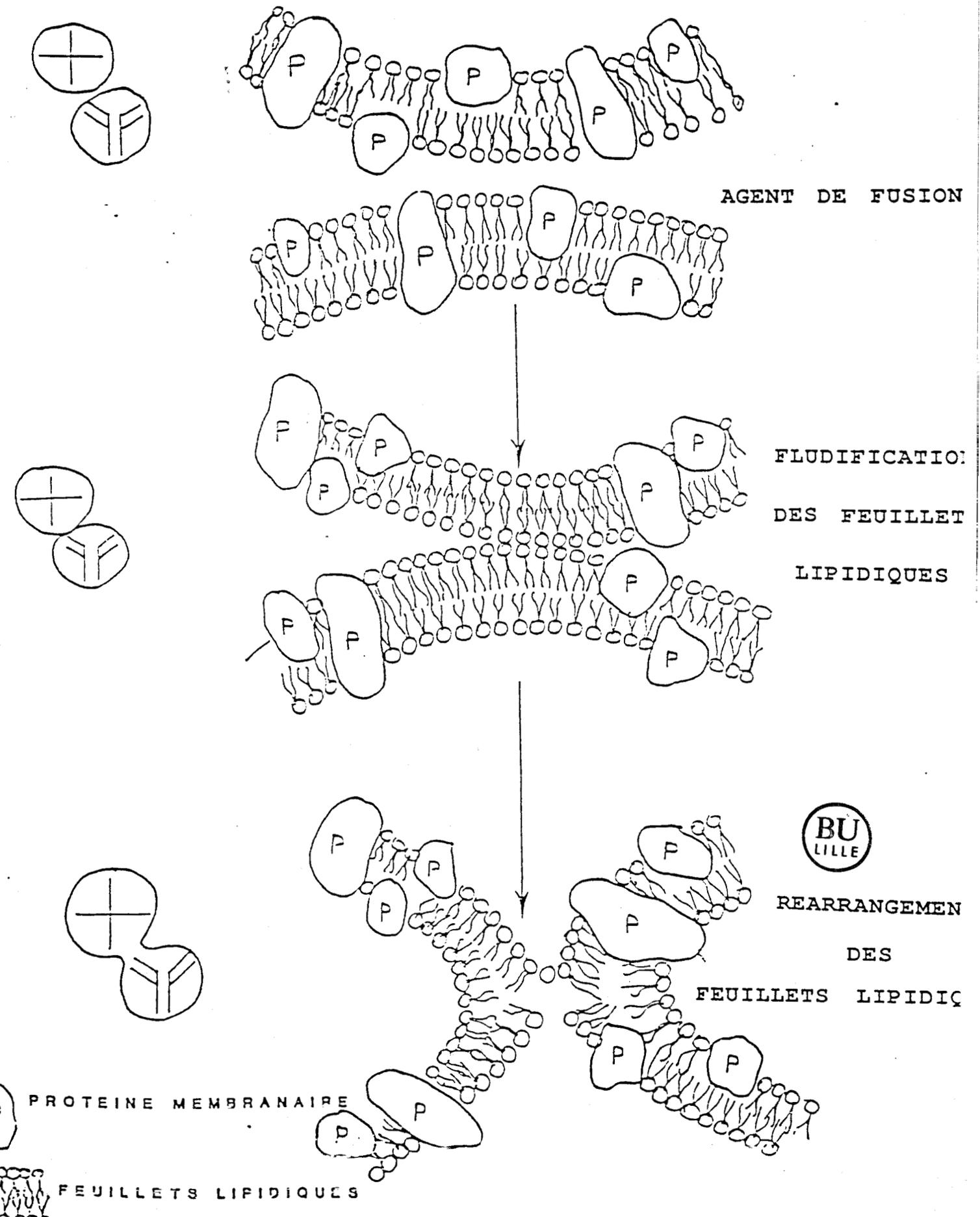
2- 2- Les agents chimiques

Les problèmes posés par l'utilisation du virus de Sendai ont poussé les recherches vers l'obtention d'un agent fusogène chimique. Akong et coll ² (1975) ont étudié notamment l'effet fusogène du diméthyl sulphoxyde (DMSO) et du glycérol. Pontecorvo ¹¹¹ (1975), montre que l'utilisation du polyéthylène glycol (PEG) comme agent de la fusion cellulaire permet l'obtention de nombreux hybrides cellulaires. Peu après, Davidson et Gérald ³⁴ (1976) définissaient les paramètres de la fusion cellulaire par le PEG.

3- MECANISMES DE LA FUSION CELLULAIRE

Le mécanisme intime de la fusion cellulaire n'est pas connu avec précision, cependant, il semble que l'étape essentielle se situe au niveau de la membrane. Akong et coll ² (1975) proposent le schéma suivant pour expliquer l'action fusogène de substances chimiques telles que le PEG (Figure 7).

Figure 7 : Mécanisme de la fusion cellulaire
 Akong et coll (1975)



Dans un premier temps, les agents de fusion chimique entraînent une fluidification des deux couches lipidiques membranaires. Ceci est suivi par une agglutination des protéines de membrane. Lorsque deux cellules présentant ce même phénomène sont en contact, la fusion membranaire s'amorce. Un réarrangement des feuillettes lipidiques des deux cellules s'opère, conduisant à une fusion localisée. La généralisation de la fusion se fait par l'intermédiaire du gradient osmotique intracellulaire. Des fusions localisées induites par le virus de Sendai ont été observées au microscope électronique par Toister et Loyter (1973). Les travaux de Sekiguchi et coll. (1981) apportent des renseignements plus précis sur cette fusion. Ils montrent que l'activité du virus est associée à deux glycoprotéines virales : la glycoprotéine HANA portant une activité neuraminidase qui permet l'agglutination cellulaire, et la glycoprotéine F qui est responsable de la fusion cellulaire localisée. La phase suivante de généralisation de la fusion qui dépend essentiellement du gradient osmotique intra-cellulaire est inhibée par des concentrations extra-cellulaires élevées en sérumbumine ¹⁰¹.

Les agents fusogènes chimiques entraînent une désorganisation des feuillettes lipidiques membranaire (L) favorisant l'agglutination des protéines de la membrane.

Les membranes ainsi désorganisées deviennent plus fluides et permettent alors une fusion locale des deux membranes cellulaires voisines par réarrangement (Figure 7).

4- SELECTION DES HYBRIDES

La présence aléatoire des partenaires cellulaires au moment de la fusion implique l'obtention de cinq groupes cellulaires possibles :

Des cellules non fusionnées.

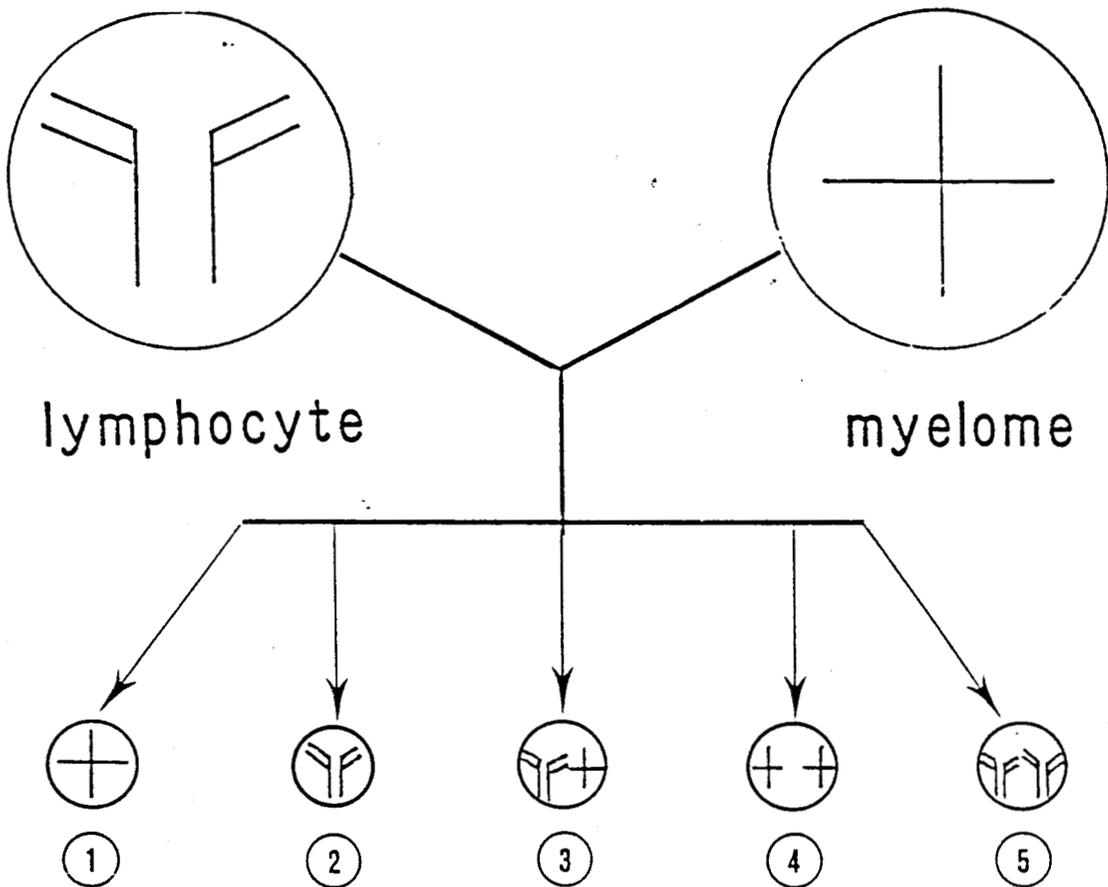
1. Les myélomes .
2. Les lymphocytes

Des cellules fusionnées

3. Myélomes-lymphocytes
4. Myélomes-myélomes,
5. Lymphocytes-lymphocytes

FIGURE 8

-SELECTION DES HYBRIDES AU COURS DE LA FUSION CELLULAIRE -



Ces cinq groupes cellulaires sont le résultat de la fusion aléatoire des cellules aux cours de l'hybridation (Figure 8).

Aucune sélection n'est à envisager vis-à-vis des cellules immunes du fait de leur inaptitude à proliférer *in vitro*. Il faut cependant empêcher la multiplication des cellules de myélomes de telle sorte que seules les cellules hybrides se développent ; grâce aux travaux de Littlefield ⁹² (1964), un tel système de sélection a pu être mis au point

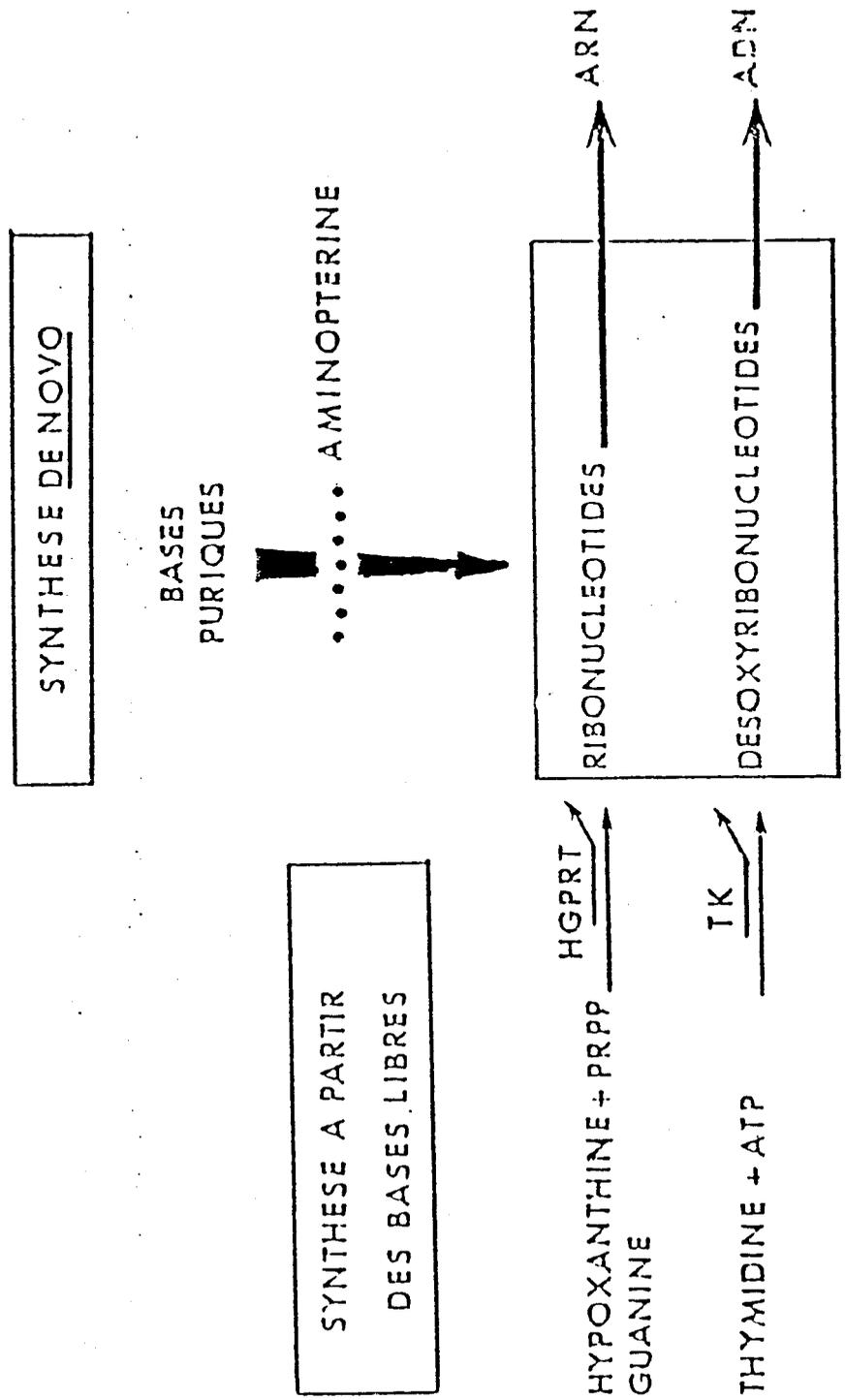
Le système de Littlefield repose sur le fait que les cellules de mammifères possèdent deux voies de synthèse des nucléotides (Figure 9) : soit une synthèse de Novo à partir de sucres et d'acides aminés, soit une voie de synthèse utilisant des nucléotides préformés, l'hypoxanthine et la thymidine. La synthèse de Novo est bloquée par la présence d'aminoptérine ; l'autre voie de synthèse nécessite, quant à elle, la présence des enzymes Hypoxanthine, Guanine Phosphoribosyl Transférase (HGPRT) et Thymidine kinase (TK). Or, Littlefield a isolé, à partir d'une souche hétéropléide de souris, deux sous-lignées cellulaires respectivement déicientes en HGPRT et en TK. Ces déficiences mettent en corrélation respectivement une résistance à la 8-Azaguanine et la 5-bromodésoxyuridine. En fusionnant ces deux sous-lignées cellulaires, seuls les hybrides possédant par complémentation des deux génomes parentaux la TK et la HGPRT, peuvent se développer dans un milieu sélectif HAT (Hypoxanthine - Aminoptérine - Thymidine). En résumé, il suffit donc que la lignée cellulaire myélomateuse utilisée soit déficiente en HGPRT ou en TK pour que la sélection des hybrides s'effectue en milieu HAT.

5- STABILITE DES HYBRIDES

Au premier stade de leur prolifération, les cellules hybrides perdent une partie de leur chromosomes. La stabilité des hybrides dépend essentiellement de l'homogénéité du système d'hybridation, donc l'origine des partenaires de fusion sera le principal élément qui conditionnera la stabilité des hybrides.

FIGURE 9 : BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES, ROLE DE L'AMINOPTERINE

(LITTLEFIELD, 1964) 92



Dans le système 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. La perte de chromosomes ne s'effectue pas d'une manière aléatoire et dans les hybrides interspécifiques, on observe une perte préférentielle de chromosomes d'une des deux espèces.

C'est le cas pour les chromosomes de rat dans les hybrides rat x souris et pour ceux de souris dans les hybrides souris x hamster. Cette perte chromosomique se limite en général à 10 à 20 % du total des chromosomes. Une exception cependant, les hybrides Homme x souris, sont particulièrement instables. En effet, Weiss et Green ¹⁴⁹ (1967), signalent qu'après 20 générations, il ne reste que de 2 à 15 chromosomes humains et qu'à la suite de la stabilisation des hybrides, 100 générations plus tard, les hybrides ne contiennent plus que 1 à 3 chromosomes humains. Ce sont généralement les mêmes chromosomes humains qui sont conservés.

Ce mécanisme de déstabilisation des hybrides est encore mal connu. Il pourrait résulter, d'un manque de coordination dans la transmission des génomes parentaux aux cellules filles lors de la méiose. En fonction de ce mécanisme, il est aisé de comprendre que toutes les cellules viables ne garderont pas systématiquement leurs propriétés immunologiques.

Outre l'information génétique, minimale, nécessaire à la survie de l'hybride, la cellule devra en plus posséder trois informations génétiques indispensables et qu'elle se devra de conserver impérativement.

- le génome induisant l'immortalité
- le génome codant l'enzyme HGPRT,
- le génome codant la synthèse d'anticorps spécifiques.

La perte de l'une ou l'autre de ces informations, survenant au cours des mitoses, qui suivent la fusion, conduira le clone cellulaire à perdre son activité ou à ne plus pouvoir survivre en culture.

C- LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les premières expériences conduisant à la production d'anticorps monoclonaux sont celles de Köhler et Milstein ²⁵ (1975). Des B lymphocytes de souris immunisées par une suspension de globules rouges de mouton ont été hybridées avec des cellules de la lignée myéломateuse P3 x 63 -Ag8. Ils obtiennent des cellules hybrides, dont certaines synthétisent des anticorps spécifiques du globule rouge de mouton, démontrant ainsi que le génome lymphocytaire, s'exprime dans les cellules hybrides néoformées. De plus, ces cellules hybrides possédant la capacité de multiplication *in vitro* des cellules myéломateuses, représentent une source abondante d'anticorps monoclonaux. La lignée myéломateuse P3 x 63 Ag8 sécrète une immunoglobuline (chaînes légères et chaînes lourdes). Par conséquent, les cellules hybrides vont sécréter des hybrides moléculaires, mélangeant les chaînes lourdes et les chaînes légères du myélorne et du B lymphocyte. Pour augmenter les chances d'obtenir des hybrides exprimant le génome des B lymphocytes, il est donc préférable d'utiliser une lignée cellulaire ne sécrétant aucune immunoglobuline (non sécrétante), ce qui justifie notre choix de la souche myélorneuse SP₂0.

1- LE CLONAGE

L'état instable dans lequel se trouve l'hybride, peu de temps après la fusion, conduit certaines cellules à perdre leur activité. Le puits de culture, dans lequel se trouve l'hybride producteur, renferme la plupart du temps plusieurs clones cellulaires différents. Aussi, faudra-t-il, très rapidement isoler les cellules sécrétantes, afin de les préserver d'un "étouffement" causé par le développement plus rapide, des autres cellules présentes dans le puits. La technique de clonage consiste à individualiser un certain nombre de cellules, celles-ci pouvant alors évoluer, séparément et faire l'objet d'un développement autonome.

Cette individualisation s'effectue en plaques de culture (96 puits) dans lesquelles sont réparties les cellules à raison d'une cellule par puit. Cette étape est fondamentale dans le processus d'obtention d'anticorps monoclonaux si l'on veut assurer à la souche une stabilité génomique à long terme, deux clonages successifs sont, au minimum nécessaires, le clonage ultime devant donner naissance à des populations cellulaires homogènes (toutes sécrétantes).

2- LA PRODUCTION MASSIVE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

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

- une culture massive *in vitro*,
- une culture massive *in vivo*,

2- 1- Culture massive *in vitro* par culture cellulaire.

Les hybrides cellulaires gardent la propriété du myélome de se multiplier rapidement *in vitro*. Cela permet la culture massive des hybridomes qui synthétisent des anticorps monoclonaux et les sécrètent dans le milieu de culture. Dans les conditions idéales de culture, certaines lignées cellulaires peuvent produire jusqu'à 50 ou même 100µg de protéines monoclonales par millilitre. Cependant, la production d'anticorps varie suivant les lignées cellulaires et on observe, beaucoup plus souvent, des concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre.

Le surnageant de telles cultures de masse constitue un matériel abondant, à partir duquel les anticorps monoclonaux peuvent être isolés. Cette source de production est la seule qui permette d'obtenir un anticorps rigoureusement monoclonal.

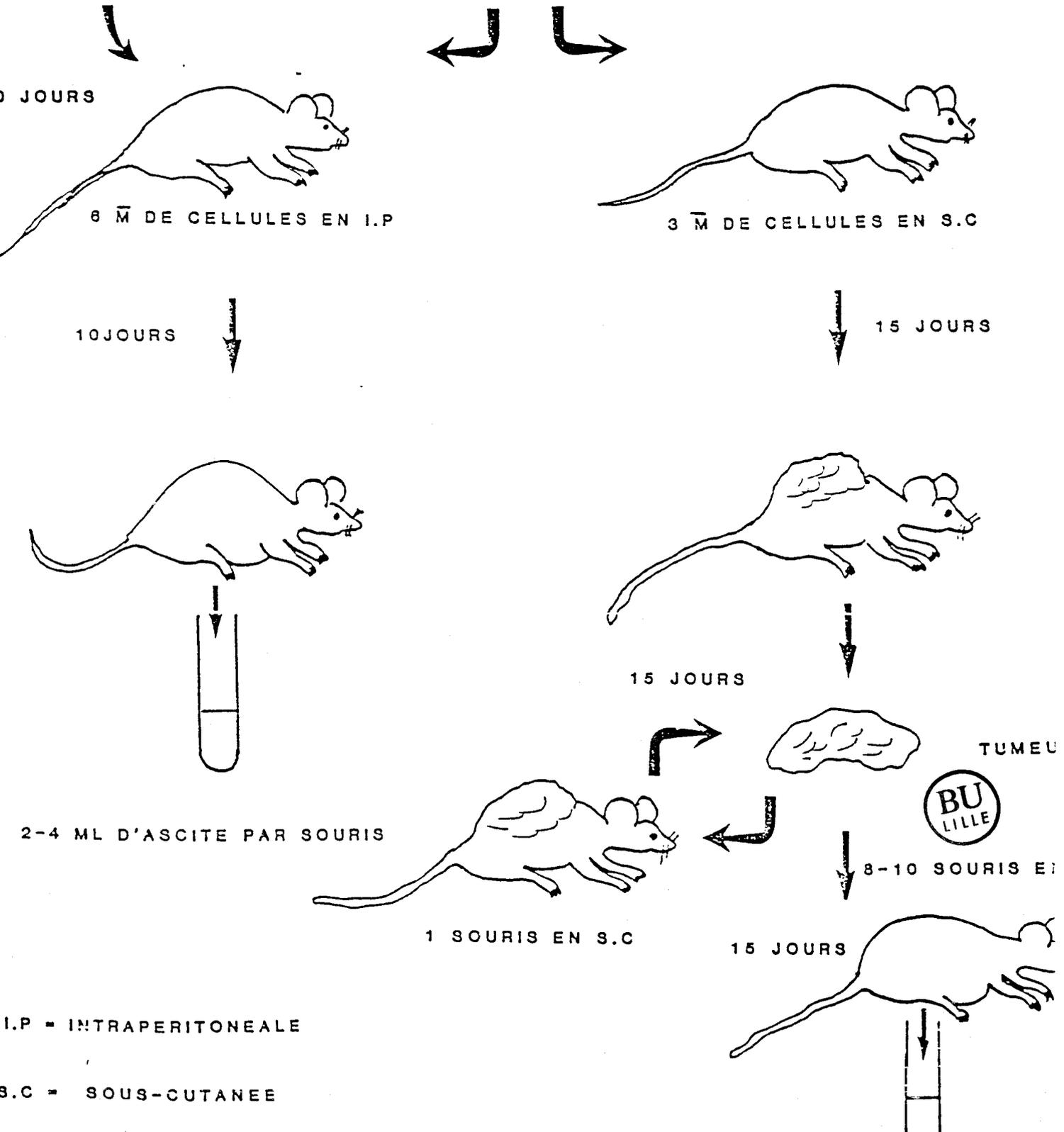
Jusqu'à présent, la principale difficulté de cette technique résultait de l'importante contamination protéique des surnageants, causée par le sérum de veau foetal. Les purifications

PRODUCTION D'ASCITE

FIGURE 10,

CELLULES EN CULTURE

0,5 ML PRISTANE



ultérieures posant alors des problèmes. Cependant, l'utilisation de substitut synthétique du sérum de veau foetal devrait en abaissant la concentration en protéine, favoriser cette voie de production.

2- 2- Culture massive *in vivo* par production d'ascite.

La production d'ascite *in vivo* se base sur le fait que les cellules hybrides acquièrent la propriété tumorigénique des cellules myélomateuses. Les cellules hybrides injectées par voie intrapéritonéale à un animal histocompatible ou incapable de rejeter les hybrides (athymique ou nu/nu) entraînent le développement d'une tumeur intrapéritonéale. Cette tumeur conduit à la production d'un liquide d'ascite riche en anticorps monoclonaux. (figure 10 A)

Cette technique est plus fructueuse que la précédente : en effet, les concentrations en anticorps monoclonaux sont 10 à 1000 fois supérieures à celles observées dans les surnageants de cultures cellulaires. Cependant, elle nécessite une importante infrastructure animalière pour la production de quantités importantes d'anticorps monoclonaux.

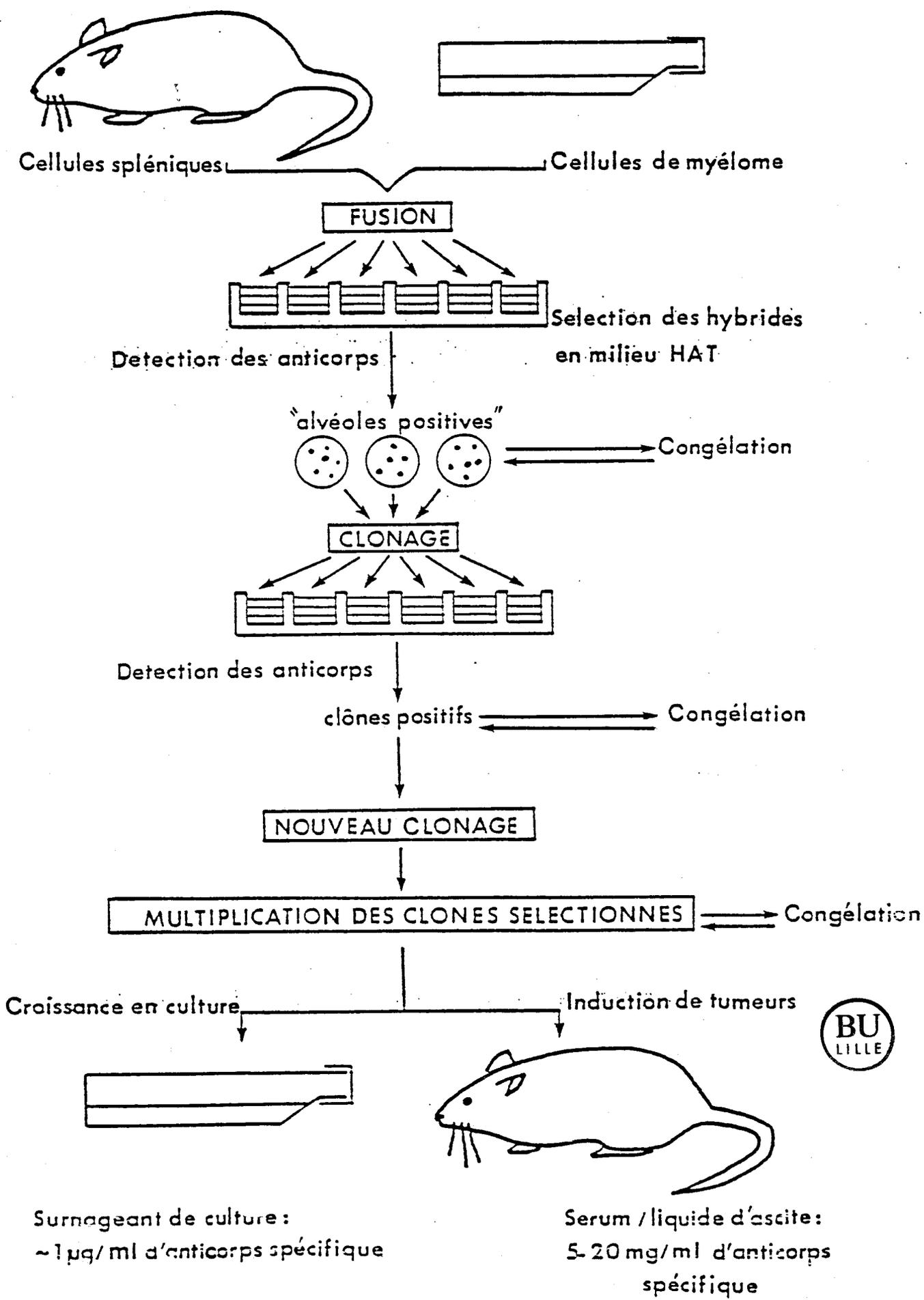
D- CONCLUSION.

Schématiquement et pour conclure ce chapitre important dans nos travaux de recherche, nous pouvons résumer les différentes étapes présidant à la production d'un clone cellulaire hybride, producteur d'anticorps monoclonaux par la figure 10 B

L'utilisation des anticorps polyclonaux pour le diagnostic est, depuis de nombreuses années, d'une grande utilité. Cependant, au fur et à mesure de l'évolution des techniques et de l'amélioration des réactifs, les limitations des anticorps polyclonaux se font de plus en plus sentir, notamment par plusieurs points : d'une part, les antigènes non purifiés entraînent une grande hétérogénéité, au niveau des anticorps produits, ce qui nécessite une purification des anti-sérums.

FIGURE 10 : PROTOCOLE DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

B



D'autre part, les résultats des immunisations sont imprévisibles car ils varient d'un animal à un autre et par conséquent, sont difficilement reproductibles. En troisième lieu, les anti-sérums ou hyperimmunsérums sont très hétérogènes au niveau de leur avidité, des réactions croisées et de leurs fonctions effectrices. Et enfin, il est difficile de produire de grandes quantités d'un anti-sérum donné.

Les anticorps monoclonaux résolvent, en partie, tous ces problèmes car leur production ne nécessite pas forcément des antigènes purifiés, de plus les quantités obtenues sont quasiment illimitées et leurs réactivités reproductibles.

Quelques problèmes subsistent néanmoins, dans cette nouvelle technologie. On peut noter, par exemple, la grande part laissée au hasard, au niveau de la fusion cellulaire, ainsi que l'instabilité des hybrides, ce qui induit un manque de reproductibilité d'une hybridation à l'autre.

De plus il faut signaler que les Ac. monoclonaux ont d'une manière générale une affinité pour l'antigène inférieure à celle des anticorps polyclonaux.

*Des améliorations restent encore à faire pour augmenter la fréquence des fusions cellulaires ou pour obtenir une population initiale plus riche en cellules productrices d'anticorps.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATION ET PURIFICATION DES LEUCOCYTES CIRCULANTS.

A- PREPARATION ET ISOLEMENT DES NEUTROPHILES HUMAINS

La purification des neutrophiles se fait d'après la technique de Boyüm basée sur une séparation cellulaire en fonction d'un gradient de densité et qui se résume de la façon suivante :

- 15 ml de sang de donneurs sains, prélevés sur héparine, sont repris dans un volume final de 40 ml en Tampon PBS. Au fond d'un tube Corning sont déposés 10 ml de Ficoll Paque, puis, délicatement, les 40 ml contenant le sang de façon à éviter l'émulsion "sang-Ficoll".

- Après centrifugation 30 mn à 1500 tours/mn à 15°C, le surnageant est éliminé en conservant environ 10 ml de plasma. Le culot est repris V/V avec le plasma et ensuite dilué V/V dans du dextran à 3% en eau physiologique.

- Après une sédimentation de 30 mn, le surnageant est soigneusement récupéré en évitant les hématies.

- Effectuer un premier lavage avec du HBSS à 1800 tours/mn pendant 5 mn puis deux chocs hypotoniques avec une solution de 20 ml de NaCl à 0,2%. Laisser agir 20 secondes puis ajouter 20 ml de NaCl à 1,6% et centrifuger à 1800 tours/mn pendant 5 mn.

Après le deuxième choc hypotonique en NaCl, le culot est resuspendu dans un volume précis de HBSS $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ puis un comptage en cellule de Thoma est effectué.

Le pourcentage de pureté des sous-populations leucocytaires est de l'ordre de 90% soit un rendement élevé par rapport à une simple purification du sérum sur un gradient BSA-Hypaque.

B - PREPARATION ET ISOLEMENT DES EOSINOPHILES HUMAINS

Le principe de la purification se base sur un gradient de métrizamide d'après la technique de Vadas et Coll (1979) ¹⁴², avec quelques modifications.

La purification de ces granulocytes s'effectue sur des prélèvements de donneurs hyperéosinophiles, de 60 ml en moyenne sur 0, 3 ml de calciparine. Après avoir ajouté 10 ml de Dextran à 4, 5% en eau physiologique, laisser sédimenter 1 heure à 37°C. (Les solutions utilisées sont représentées dans le tableau A .

La préparation des gradients est une opération très délicate, elle consiste en un dépôt de 2 ml d'un gradient de 25 % à 18% de métrizamide, diluée à partir d'une solution mère. Comme il est représenté sur le tableau B.

Après une heure de sédimentation, le plasma est récupéré, en évitant les hématies, centrifugé à 2000 tours/mn pendant 10 mn, puis lavé deux fois en gel de Tyrode DNase après un choc osmotique dans 20 ml NaCl 2% (agiter vigoureusement pendant 20 secondes) et 20 ml de NaCl 1, 6%. Les cellules sont enfin numérées puis déposées, très soigneusement à une concentration de 100 millions de cellules, par gradient. A la suite d'une centrifugation de 45 mn à 3000 tours/mn, les cellules sont récupérées, au niveau de chaque couche du gradient de 0 à 9 (B) très délicatement avec une aiguille à ponction lombaire ; trois lavages successifs sont alors effectués en tampon HW sans Calcium (HW : Hank's Wallace) puis en tampon HBSS sans calcium. Dans l'objectif de déterminer le pourcentage de pureté, après une dernière numération, est effectuée une cyto-centrifugation, puis une coloration au GIEMSA avant lecture au microscope optique.

TABLEAU -A-

Solutions utilisées dans la technique de préparation des Eosinophiles Humains.

Gel de Tyrode DNase

Dextrose	1	G
NaH CO ₃	1	G
Kcl	0,2	G
Na ₂ HPO	0,05	G
Nacl	8	G
Gélatine	1	G
DNase	30	mG
QSP	1 L	en eau distillée



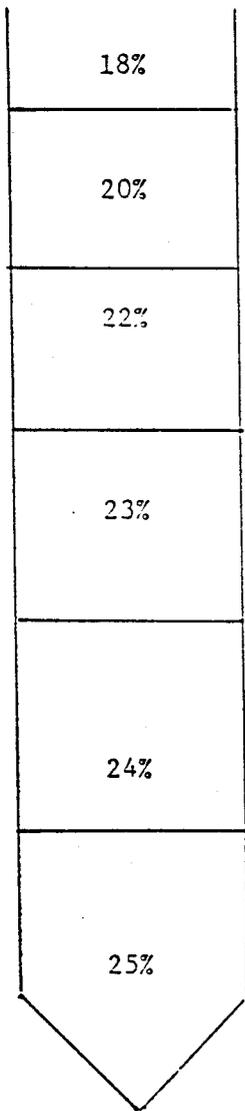
Solution de métrizamide à 30 G pour 100 ml de gel de Tyrode.

La densité de la solution mère doit être de 1,165.

TABLEAU -B-

TECHNIQUE DE PURIFICATION DES EOSINOPHILES HUMAINS

B1



DENSITE

d= 1,105

d= 1,115

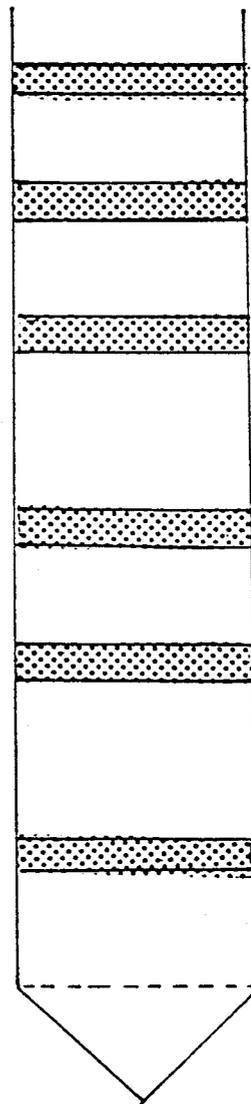
d= 1,123

d= 1,130

d= 1,135

d= 1,140

B2



couche 0

couche 1

couche 2

couche 3

couche 4

couche 5

couche 6

couche 7

couche 8

couche 9

CONCENTRATION
DE METRIZAMIDE

C- PREPARATION ET ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES ET DES MONOCYTES

HUMAINS

D'après la même technique de Boyüm, en même temps que le culot de neutrophiles et d'hématies, on récupère un anneau de cellules mononuclées dans le gradient Ficoll. Cet anneau rassemble les monocytes et les lymphocytes (tableau C).

La séparation de ces deux sous populations cellulaires, se fait par simple sédimentation en plaque de cultures "super cluster" en présence de milieu de culture RPMI ou DULBECCO. Après 30 mn à 37°C, les lymphocytes sont retrouvés en suspension dans le surnageant, alors que les monocytes adhèrent au fond du puit de plastique.

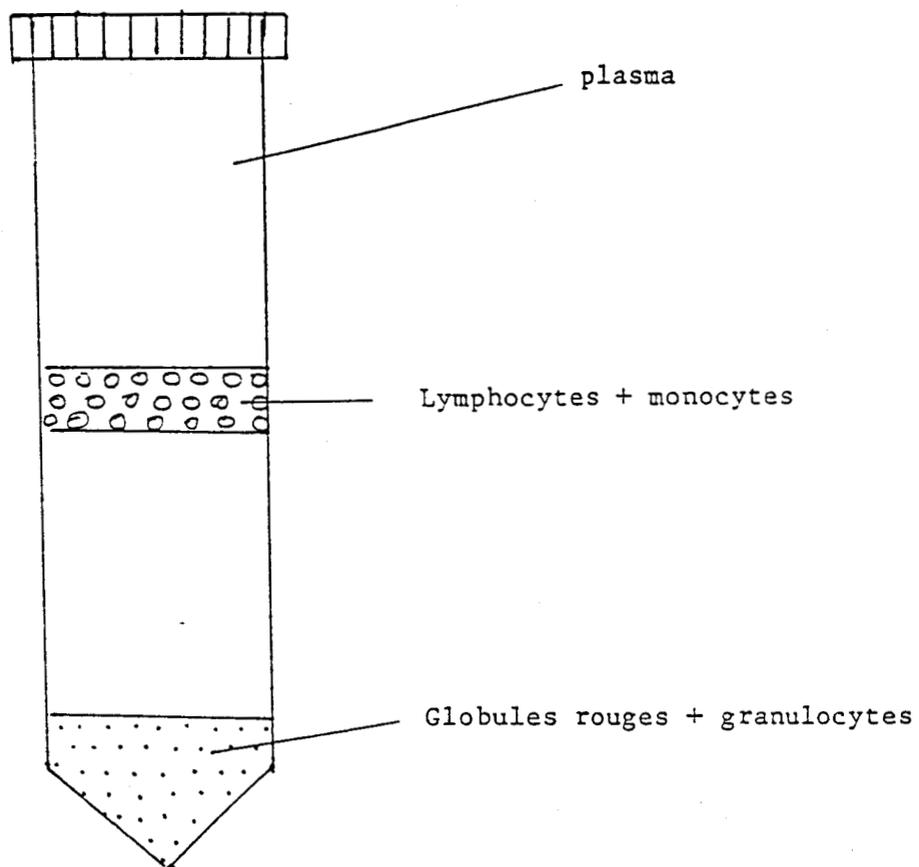
Après plusieurs lavages en tampon PBS, les cellules mononuclées sont reprises dans un volume bien précis de tampon PBS ou HBSS puis comptées en cellules de Thoma.

D- PREPARATION ET ISOLEMENT DES PLAQUETTES HUMAINES

La procédure, généralement utilisée pour l'isolation des plaquettes humaines, se fait à la température du laboratoire et de la manière suivante : le sang est centrifugé à 120 x g pendant 15 mn, en plusieurs fractions de 5 ml et le plasma riche en plaquettes, est collecté dans un volume final précis et centrifugé à 2000 g pendant 15 mn.

La contamination des plaquettes par les globules rouges nous a conduit à une resuspension pour 3 lavages, des plaquettes dans un tampon PBS à 2000 x g, puis nous avons collecté les plaquettes dans un milieu de culture (MEM). Les plaquettes sont, enfin, comptées en cellule de Thoma après plusieurs dilutions appropriées (1/20, 1/40, 1/100) en fonction de la concentration du culot.

TABLEAU -C-



TECHNIQUE DE BOYUM : SEPARATION DES CELLULES MONONUCLEES
ET DES POLYNUCLEAIRES



E- PREPARATION ET ISOLEMENT DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS

Les cellules récupérées par plusieurs lavages bronchiques sur des donneurs, sont lavées trois fois en milieu MEM-PS (Penicilline-Streptomycine), centrifugées à 400 x g pendant 10 mn à 4°C, puis numérées en cellule de Thoma. Le culot est repris dans un volume précis de façon à avoir une concentration saturée en CO₂ à 5% pendant 2 heures dans une boîte de pétri de 3 cm de diamètre en milieu MEM à 20% en SVF inactivé.

Après avoir éliminé les cellules non adhérentes, par plusieurs lavages en MEM, nous les avons compté en cellule de Thoma pour les déduire des cellules totales déposées, de façon à avoir le nombre de cellules ayant adhéré. Le décollement des macrophages s'effectue par simple resuspension à la pipette.

II. FUSION CELLULAIRE POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

A- OBTENTION ET CULTURE DES LIGNEES CELLULAIRES

1- LA LIGNEE MYELOMATEUSE

Notre utilisation de la lignée myéломateuse SP₂0 dérivée de la lignée P3 x 63 Ag8, s'explique d'une part, par le fait que ces cellules sont non sécrétantes, résistantes à 20 mg/ml de 8-Azaguanine, et d'autre part, du fait de leur déficience en HGPRT, elle sont sensibles à l'Aminoptérine.

Au moment de la fusion cellulaire, les cellules doivent se trouver en phase exponentielle de croissance. Après le décollement de leur milieu de culture, les cellules sont lavées deux fois en milieu TCM (tableau des milieux de cultures figure 11), puis comptées.

2- LES LYMPHOCYTES

Les lymphocytes sont préparés à partir d'une rate prélevée chez une souris Balb/c immunisée avec des neutrophiles ou des éosinophiles humains purifiés.

2- 1- Protocole d'immunisation.

Quatre souris Balb/c ont été immunisées avec une préparation de 10^7 cellules granulocytes (neutrophiles ou éosinophiles) avec le plus grand respect de leur intégrité cellulaire et de leur viabilité (95% de cellules viables en moyenne), et ceci selon le protocole suivant :

a- Injection par voie sous-cutanée.

Dix millions de granulocytes dans 100 μ l d'eau distillée et 100 μ l d'adjuvant complet de Freund, sont injectés à chaque souris.

b- Injection par voie intrapéritonéale.

Après trois semaines, 10^7 granulocytes sont injectés en intrapéritonéale dans 100 μ l d'eau distillée et 100 μ l d'adjuvant complet de Freund à chaque souris.

Quinze jours après la seconde injection, les souris sont saignées, le niveau de leur immunisation est contrôlé par une technique radio-immunologique décrite plus loin (RIA) ou immunoenzymatique (ELISA).

Selon les résultats du contrôle d'immunisation, les souris subiront une nouvelle injection par voie intrapéritonéale dans le cas où la réponse serait faible. Dans le cas contraire, un rappel

par injection de 5×10^6 granulocytes sera effectué par voie intra-veineuse, sans adjuvant complet de Freund, trois jours avant l'hybridation. Le but de cette opération essentielle, est de stimuler préférentiellement les lymphocytes sécrétant des anticorps spécifiques augmentant, ainsi, les probabilités d'obtention d'anticorps monoclonaux anti-neutrophiles ou anti-éosinophiles humains.

2- 2- Contrôle des immunisations.

Le contrôle des immunisations, puis, plus tard, la sélection des clones sécrétants, nécessite le choix d'une technique simple, rapide, et surtout répétitive, telle que le test radio-immunométrique sur phase solide (SRIA) ou le test immuno-enzymatique (ELISA). Leur souplesse d'utilisation, tant au niveau quantitatif, qu'au niveau du temps d'incubation, en font deux techniques particulièrement adaptées au dépistage des anticorps monoclonaux.

a - Phase d'adsorption de l'antigène sur la phase solide.

L'antigène préparé suivant la technique d'extraction membranaire, décrite au chapitre suivant, est fixé par simple adsorption, sur une plaque de polystyrène 96 puits (Falcon 3911), puis 100 μ l d'une solution à 5 μ l/ml d'antigènes extraits de neutrophiles ou d'éosinophiles humains, en tampon PBS 0,1 M pH 7,4 (tampon utilisé pour toute la technique) sont déposés dans chaque puit. Après 3 heures d'incubation, à la température du laboratoire, les protéines absorbées sur le support sont bien fixées, les autres sont éliminées par trois lavages successifs en PBS. Les sites du support, libres sont saturés par du PBS à 2% de sérumalbumine bovine (Tp PBS-BSA 2%) et ceci afin de limiter les bruits de fond.

La plaque est ensuite lavée deux fois, avec 200 μ l de tampon PBS-BSA à 0,1% par puit, puis, pour finir, par 200 μ l de Tampon PBS-Azide à 0,1%. Ces plaques correctement séchées, et conservées à 4°C peuvent être utilisées pendant un mois.

b- Incubation des sérums ou des surnageants de culture.

Les sérums des souris immunisées sont dilués en tampon PBS (au 1/10, 1/100, 1/1000 et au 1/10.000). Un sérum de souris saine est utilisé comme témoin négatif. 100 µl de chaque dilution sont déposés dans chaque puit, puis, après deux heures d'incubation au minimum à 37°C, la plaque est lavée deux fois avec 200 µl de tampon PBS-BSA 0,1% par puit.

*Le test est pratiqué, au moins en en double, afin d'en confirmer la répétitivité.

c- Révélation.

La révélation, dans le cas du test SRIA, s'effectue par un sérum de lapin anti-immunoglobulines de souris, marqué à l'I¹²⁵, par la méthode de la chloramine T (3,5 µci/µg) (Hunter et Greenwood, 1962) ⁶⁴. 100 µl d'une dilution ayant une activité d'environ 100.000 cpm (coups par minute) sont mis en incubation une heure à 20°C.

Après quatre lavages en PBS, les cupules sont coupées, puis mises à compter au compteur Gamma, dans des tubes à hémolyse, lesquels sont préalablement contrôlés avec leur support, afin d'éliminer les bruits de fond non spécifiques.

*Dans le cas du test ELISA, la révélation se fait par un sérum de chèvre ou de lapin anti-immunoglobulines de souris, marqué à la peroxydase.

Après incubation d'une heure 30 mn à 2 h à la température de 37°C, la plaque est lavée, trois fois en PBS-BSA 0,1%. La révélation, proprement dite, est faite par un substrat de la peroxydase : l'Orthophényl diamine (OPD) dans les proportions suivantes : 9 mg d'OPD sont repris dans 25 ml de tampon substrat plus 16 µl d'eau oxygénée H₂O₂ (30%).

Le tampon substrat est un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 ramené à pH 5,5 avec de l'acide citrique 0,1 M. L'incubation de l'enzyme-substrat se fait pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière, la révélation est alors stoppée par une solution H₂SO₄ (2N) ou HCl (1N). Puis lecture en lecteur de plaque à 490 mn.

2- 3- Préparation et récupération des lymphocytes de la rate .

La rate de l'animal immunisé est prélevée stérilement dans une boîte de pétri ; une suspension cellulaire est réalisée par homogénéisateur en verre muni d'un piston lâche. Les cellules sont lavées deux fois en milieu TCM et comptées en cellule de Thoma.

3- PREPARATION DES CELLULES NOURRICIERES

Certaines étapes importantes de la technique de fusion cellulaire, nécessitent la coopération de cellules nourricières et notamment, lors des phases de sélection et de clonage des cellules hybrides .

Ces cellules sont souvent des fibroblastes qui, par leurs produits de sécrétion, favorisent la croissance cellulaire des hybrides et permettent une meilleure stabilité du pH du milieu de culture, grâce à leur pouvoir tampon.

La présence de macrophages permet l'élimination rapide des débris cellulaires, purifiant, de ce fait, le milieu. Les cellules sont préparées par lavages de la cavité péritonéale de souris Balb/c (par injection de 5 ml de milieu A. Les cellules obtenues à partir d'une souris, sont mises en suspension dans un volume total de 12 ml en milieu A, et réparties en plaques de culture (27 puits NUNC) ou en plaques de clonage (96 puits limbro). Après incubation (48 H à 37°C), les cellules non adhérentes ainsi que les hématies sont éliminées par aspiration du surnageant de culture.

* Les cultures ainsi préparées peuvent être utilisées dans un délai d'une semaine environ.

4 - MILIEUX DE CULTURES

La composition de tous les milieux de culture utilisés dans la manipulation (TCM, HAT, HT, A) est détaillée dans le tableau de la figure 11.

Avant leur utilisation, tous ces milieux doivent être testés, afin de déceler une éventuelle contamination, ou un risque de cytotoxicité de leurs composants.

B - PROTOCOLE DE FUSION.

La technique utilisée est inspirée des travaux de Howard, Kearns et Clevinger, (1978) ¹⁰¹. La fusion est induite par un mélange PEG (Polyéthylène glycol)-DMSO (Diméthyl sulfoxyde). (figure 12)

- Trente grammes de PEG (1500) sont dissous dans 42 ml de Tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,015 M pH 7,2 et 6,2 ml de DMSO. La solution est ensuite stérilisée par autoclavage 20 mn à 115°C. La fusion est effectuée dans un tube à centrifugation 50 ml. Après numération, les lymphocytes et les cellules de myélomes sont mélangés, à raison d'une cellule de myélome pour cinq cellules spléniques. Le tube est centrifugé 5 mn à 500 t/mn.

- Le culot de centrifugation, après avoir été très légèrement remis en suspension est traité de la façon suivante : - Le PEG, préchauffé à 37°C , est additionné goutte à goutte, sous agitation, à raison de 1 ml en 60 seconde

- Puis 1 ml de milieu TCM en 1 mn puis 20 ml de milieu TCM sont, ensuite, ajoutés sous agitation lente et régulière. Après fusion, les cellules sont lavées en milieu TCM afin d'éliminer le PEG, puis reprises dans le milieu A, à raison de 10^6 cellules/ml. Les cellules sont ensuite réparties en plaques de culture de 24 puits ($0,5 \times 10^6$ cellules /puits) et placées en incubateur CO₂ 37°C, sous atmosphère humide.

COMPOSITION ET UTILISATION DES
MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

Nature	Composition	Utilisation
<p style="text-align: center;">Milieu A</p>	<p style="text-align: center;">Milieu DMEM (a) 4×10^{-3} M NaHCO_3 3,5 % AANE (b) 15 % SVF (c) 100 UI/ml penicilline 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycine pH 7,2 - 7,3</p>	<p style="text-align: center;">Culture des cellules myélomateuses et hybrides</p>
<p style="text-align: center;">Milieu TCM</p>	<p style="text-align: center;">Milieu DMEM (d) 4×10^{-3} M NaHCO_3 25 mM HEPES 100 UI/ml penicilline 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycine pH 7,3</p>	<p style="text-align: center;">Fusion cellulaire</p>
<p style="text-align: center;">Milieu HAT</p>	<p style="text-align: center;">Milieu A contenant : 1×10^{-4} M hypoxanthine 4×10^{-5} M thymidine 4×10^{-4} M aminoptérine</p>	<p style="text-align: center;">Sélection des hybrides cellulaires</p>
<p style="text-align: center;">Milieu HT</p>	<p style="text-align: center;">Milieu HAT sans aminoptérine</p>	<p style="text-align: center;">Culture des cellules hybrides (transition entre le milieu HAT et le milieu A)</p>

BU
LILLE

- 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)

- Le lendemain, 1 ml de milieu HAT est ajouté, afin de débiter la sélection des cellules hybrides par l'Aminoptérine. Le troisième jour, le surnageant est remplacé en totalité par du milieu HAT.

- Après une semaine de culture, les clones commencent à se développer, le milieu sélectif peut alors être remplacé par du milieu HT de transition, après vérification que les myélomes témoins soient morts. Les surnageants de culture bien métabolisés, sont testés deux à trois semaines après le début de la fusion, lorsque les cellules recouvrent la totalité de la surface du puit.

C - STABILISATION DES CLONES.

L'instabilité des hybrides rend obligatoire la mise en oeuvre de techniques permettant d'obtenir le plus rapidement possible une souche cellulaire stable, sous peine de perdre l'activité immunologique initialement mise en évidence.

Deux méthodes sont appliquées :

- soit une immobilisation temporaire des souches par congélation.
- soit la sélection et séparation des hybrides par plusieurs clonages successifs.

1 - CONGELATION

La congélation a pour but essentiel de conserver des cellules hybrides en réserve pour pallier à d'éventuels risques de contamination, de perte d'activités, de toxicité ou autres. Mais c'est aussi un moyen de bloquer, provisoirement, le réarrangement chromosomique des cellules hybrides, dans l'attente d'un clonage ultérieur.

Après remise en suspension des cellules, dans leur puit de culture, le culot est récupéré dans 1 ml de sérum de veau foetal à 10 % en DMSO et réparti en ampoules de congélation. Les cellules sont d'abord placées à 4°C pendant 30 mn, puis dans une tête de congélateur pendant trois

heures et enfin mises en place dans un conteneur à azote liquide (LR33 Union Carbide).

La décongélation s'effectue rapidement au bain-marie 37°C.

2 - LE CLONAGE

Le but du clonage est d'isoler une seule cellule de son environnement initial, afin de permettre le développement d'un clone homogène.

- * Le premier clonage, en général, permet d'isoler la population sécrétante des autres populations se trouvant initialement dans le puit de départ.
- * Le second clonage permet de sélectionner les clones ayant la meilleure activité de synthèse.
- * L'ultime clonage doit donner lieu à l'obtention d'une population homogène.

Le clonage est effectué par la technique de dilution limite. Les cellules en culture sont mises en suspension, puis transférées dans un nouveau puit de culture. Celles-ci sont ensuite comptées jusqu'à obtention d'une dilution contenant 20 cellules /ml de milieu. Cette suspension cellulaire est, ensuite, répartie en plaques de Cooks (96 puits) à raison de 50 µl par puits, soit en théorie, une cellule pour 50µl. Les plaques sont ensuite mises en incubateur CO₂ à 37°C. Seuls les surnageants issus des puits où un seul clone s'est développé, seront testés. Les clones positifs seront ensuite multipliés puis congelés en azote liquide.

D - CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE DES ANTICORPS.

1- DETERMINATION DE L'ISOTYPE

La détermination de l'isotype de l'anticorps à étudier s'effectue à partir des surnageants de culture des cellule clonées. Dans cette optique, deux méthodes ont été utilisées :

1 - 2- La technique de double diffusion en gel (Ouchterlony, 1958).

La technique est réalisée sur gel d'agarose à 0,9% (indubiose A 37, IBF France) dans un tampon barbital sodique HCl pH : 8,2, déposé avec une épaisseur de 2 mm, sur une lame de verre, au préalable, bien dégraissée à l'alcool. Dans les puits périphériques découpés à l'emporte-pièces, sont déposés les antisérums de chèvre ou de mouton anti Immunoglobulines G₁, G_{2a}, G_{2b}, G₃ et M de souris, alors que le surnageant de culture est déposé dans le puit central, suivant le diagramme suivant :

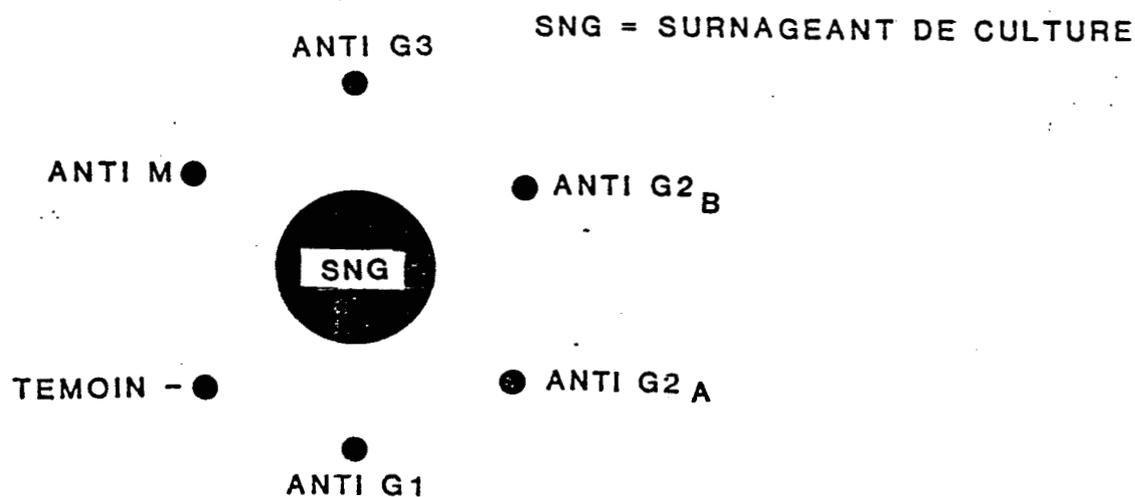


FIGURE 13

Volume antisérums: 20 μ l
Volume surnageant: 200 μ l

A la suite d'une diffusion de 48 H en chambre humide et à la température ambiante, le gel est lavé, une heure en tampon citrate 5 % (P/V), puis 48 H en NaCl 0,9%, puis il est déminéralisé en recouvrant le gel d'un papier Watman N°1, humidifié par de l'eau désionisée. Les lames sont alors séchées puis colorées au bleu de Coomassie.

1- 2- Technique immunoenzymatique en ELISA.

Cette technique rejoint directement celle, utilisée pour le contrôle d'immunisation des animaux, ainsi que le contrôle des surnageants de culture. 50 µl de chaque anti-immunoglobuline de souris diluée au 1/100 sont absorbés sur une plaque de polystyrène (Falcon 3911). Après une saturation en tampon PBS-BSA 0,1%, 50 µl de surnageants dilués cinq fois sont déposés, dans chacun des puits. L'incubation s'effectue deux heures à 20°C.

Après trois lavages en tampon PBS-BSA 0,1%, les immunoglobulines de souris fixées par les différents anti-sérums sont révélées par un sérum de lapin anti-immunoglobulines de souris, marqués à la peroxydase. Puis par incubation avec 9 µl d'OPD dans 25 ml de tampon substrat.

*Cette méthode est plus sensible et plus rapide que la diffusion en gel de plus elle permet de confirmer celle-ci.

La détection de l'isotype permet, non seulement, de connaître l'une des caractéristiques immunochimiques importantes de l'anticorps, donc de s'assurer de sa stabilité, mais aussi de choisir la technique appropriée à sa purification. Cette dernière sera différente selon que l'Immunoglobuline sera d' isotype M ou G .

E - PRODUCTION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL.

1-PRODUCTION D'ASCITES : PRODUCTION MASSIVE D'AC. MONOCLONAUX

Des quantités importantes d'anticorps monoclonaux peuvent être obtenues à partir de la sécrétion d'un liquide d'ascite par la souris .

Deux méthodes peuvent être utilisées :

1- 1- Une première méthode : intrapéritonéale avec pristane.

Elle consiste à injecter chez l'animal, ayant reçu dix jours auparavant, une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de pristane (2,6 ; 10 ; 14, Tétra-Méthyl Pentadécane) 5×10^6 cellules hybrides, préalablement lavées, afin d'éliminer le sérum de veau foetal. Cette injection de Pristane, au préalable, a pour but d'augmenter d'une façon importante la production d'ascite (Potter et Coll., 1973)¹¹².

Dix jours après l'injection des hybrides chez la souris Balb/c, 2 à 5 ml de liquide ascite peuvent être obtenus dans sa cavité péritonéale.

1- 2- Une deuxième méthode : sous cutanée sans Pristane.

Une autre méthode permettant d'obtenir, par injection sous-cutanée de $2 \text{ à } 3 \times 10^6$ cellules, et dans un délai de zéro à deux semaines, une tumeur, siège d'une multiplication cellulaire très importante.

Après prélèvement, la tumeur est broyée, les cellules sont lavées puis injectées par voies intrapéritonéale, chez d'autres souris Balb/c saines.

Afin d'entretenir le cycle de production d'ascite, une partie des cellules récupérées à partir de la tumeur, est injectée à une souris Balb/c en sous-cutanée, alors que le reste permet l'injection

à environ huit à dix souris par voie intrapéritonéale. Dans ces deux cas, l'ascite est recueillie, puis centrifugée, 10 minutes à 1000 g pour éliminer le culot d'hématies et, enfin, elle est récupérée avec addition finale de 10^{-4} M de PMSF afin d'inhiber l'action de protéases.

2- Contrôle de la production.

Le contrôle de la production d'anticorps monoclonaux est très important en raison de l'instabilité des souches. Après quatre à cinq passages successifs chez l'animal, une baisse d'activité est souvent observée, celle-ci ayant pour origine la baisse de la quantité d'anticorps sécrétés. Lorsque ce phénomène est observé, il est alors nécessaire de décongeler de nouvelles souches afin d'obtenir de nouveau, un taux de sécrétion maximum. Le contrôle quantitatif des immunoglobulines sécrétées est effectué par électrophorèse sur acétate de cellulose. L'intensité des bandes obtenues est lue par un lecteur permettant de transformer chaque bande en pic d'absorption. La surface de chaque pic, et notamment, celle correspondant à l'anticorps monoclonal, permet un calcul approximatif de la concentration de celui-ci dans l'ascite.

*Cette technique permet avant tout un contrôle "visuel" de la sécrétion.

Un contrôle des spécificités plus précis est ensuite effectué par la technique SRIA (cf. immunisation, contrôle surnageants), les dilutions logarithmiques de l'ascite étant effectuées jusqu'à perte de toute activité.

3- Purification des anticorps monoclonaux.

Les anticorps obtenus étant dans le cas de l'anti-neutrophile humain une IgG_{2a} et dans celui de l'anti-eosinophile humain une IgM, nous ont conduit à utiliser deux méthodes différentes quant à leur purification respective.

3- 1- Purification de l'IgG_{2a} anti-neutrophiles humains.

La méthode utilisée comporte quatre étapes principales.

-Précipitation au sulfate d'ammonium.

Deux précipitations successives, au sulfate d'ammonium, à 50 % final permettent d'obtenir une fraction protéique riche en IgG. Une partie de l'albumine, ainsi que l'hémoglobine est ainsi facilement éliminée. Le dernier précipité est repris dans un volume minimum d'eau distillée.

- Dessalage

L'élimination du sulfate d'ammonium est réalisée par gel filtration. Le gel filtration s'effectue sur une colonne GF05 (IBF France) ayant une limite d'exclusion protéique de 7 000. La colonne est équilibrée en tampon Tris 0,05 M NaCl 0,1 M pH8. La force ionique à la sortie de la colonne est en permanence contrôlée permettant ainsi une optimisation de la chromatographie.

- Echangeurs d'ions.

L'utilisation complémentaire de la DEAE-trisacryl (IBF-France) et du Blue-trisacryl (IBF-France) nous a permis d'optimiser, d'une façon importante le rendement de purification. La fraction dessalée est déposée sur une colonne échangeuse d'ions DEAE-Trisacryl équilibrée en tampon Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M pH8. Le premier pic d'absorption obtenu renferme la quasi-totalité des IgG monoclonales, mais également, une quantité assez importante d'albumine (40%). L'utilisation d'une force ionique plus faible (0,05 M NaCl, par exemple, au lieu de 0,1 M) permet d'obtenir des fractions non contaminées par l'albumine, mais le rendement de purification est alors inférieur à 50%.

- **Élimination de l'albumine contaminant :**

Le passage de la première fraction sur la colonne Blue-Trisacryl permet donc d'éliminer l'albumine. En effet, le chromophore fixé sur la colonne exprime une affinité importante à l'égard de certaines protéines et notamment l'albumine. La fraction non retenue sur DEAE est donc passée directement sans changement de tampon sur la colonne d'affinité. L'albumine reste absorbée. Ainsi les IgG purifiées sont recueillies dans la première fraction protéique.

3- 2- Purification de l'IgM anti-eosinophiles humains.

La molécule d'IgM étant d'un poids moléculaire beaucoup plus élevé que celle de l'IgG, nécessite une stratégie de purification légèrement différente de celle-ci : la filtration sur gel. La préparation des Immuinoglobulines M est réalisée par gel filtration avec une précipitation au sulfate d'ammonium, telle qu'elle a été décrite au chapitre précédent et par un dessalage identique à celui de l'IgG.

Le principe de cette gel filtration par rapport à celui de l'échangeur d'ion, se base sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique, les plus petites entrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement. Les molécules sont donc éluées dans l'ordre des masses moléculaires.

La colonne de gel filtration (G-25) est équilibrée en Tp antifongique P.S. (Penniciline ; Streptomycyne) Tris 0,05 M en NaCl 0,15 M de pH 7-8 à 8,5, le premier pic d'exclusion renferme la quasi-totalité des IgM monoclonales, le reste correspond aux IgG non spécifiques et à l'Albumine.

III- SOLUBILISATION ET EXTRACTION MEMBRANAIRE DES PROTEINES DE SURFACE DES LEUCOCYTES HUMAINS.

Dans le cadre d'une étude approfondie des propriétés de différents types de détergents et d'après les expériences de Howard et Barnwelle (1983) ⁶⁰, nous avons étudié leurs capacités de dissolution de différentes protéines de la surface membranaire des cellules.

A- EXTRACTION DES PROTEINES MEMBRANAIRE .

1- INHIBITEURS ENZYMATIQUES.

Quarante à cinquante millions de cellules fraîchement purifiées à partir de sang de donneurs placés dans des tubes en plastique (Eppendorf) sont repris dans un tampon PBS 1N pH7, 2 ou HEPES dans une concentration de l'ordre de 20 μ l pour 10^6 cellules.

A ce volume est ajouté un mélange; préparé extemporanément d'inhibiteurs enzymatiques dans une concentration de 10 μ l/ 10^6 cellules , ce mélange est constitué de :

- 2 mM de phénylméthyl sulfonyl fluoride (PMSF),
- 0,2 mM TPCK (Trypsine),
- 0,2 mM TLCK (Trypsine).

Après avoir bien agiter vigoureusement le mélange, y est rajouté le détergent en question à 1%.

2- DETERGENTS UTILISES

Les détergents utilisés sont de 3 types :

- 1- Type anioniques (SDS : Dolecyl Sulfate Sodium ; DOC : Desoxychlorate) .

-2- Type non anioniques (Tween 20; Tween 80 ;
Triton X 100 et Dodécyl - D - β - Maltoside)

-3- Type zwitterionique (CHAPS)

3- INCUBATION ET DYALISE

L'incubation des cellules avec les différents détergents testés se fait en rotation continue à 4°C, pendant 40 mn à 1 heure.

B- CONTROLE DE L'ETAT DES CELLULES

Après centrifugation à 2 500 t/mn pendant 10 à 15 mn, alors que le surnageant contenant les protéines solubilisées est récupéré dans un boudin de dialyse et dialysé contre de l'eau distillée, pendant 48H à 4°C, le culot est passé sur cytocentrifugeuse, puis les lames sont colorée au GIEMSA afin d'être observée au microscope optique. Nos résultats sont donnés à la suite d'un comptage du nombre de cellules encore intactes par champ optique (observé à l'objectif 40).

C- DOSAGE DES PROTEINES

Pour mieux suivre l'élimination du détergent et des inhibiteurs protéasiques avant et après dialyse, des mesures de la concentration de protéines sont réalisées en BIO-RAD puis passées en spectrophotométrie à 540nm.

IV. ETUDE BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DES ANTICORPS MONOCLONAUX PRODUITS.

A- CONTROLE DE LA SPECIFICITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX PRODUITS.

Trois techniques différentes , mais complémentaires, nous ont permis de confirmer les premiers résultats obtenus.

1- TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE (ELISA)

Ce test s'inspire directement de la technique d'ELISA, décrite dans le chapitre précédent, avec comme particularité, l'adsorption sur différentes plaques de polystyrène, d'antigènes issus de l'extraction au Dodecy- β -D-Maltoside de différentes populations leucocytaires : neutrophiles, eosinophiles, monocytes, lymphocytes, macrophages et plaquettes.

2- TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE EN PHASE LIQUIDE (CYTOFLUOROMETRIE DE FLUX)

Principe

Son principe est simple et repose sur une première reconnaissance des antigènes, de la surface des cellules entières, et encore viables (95% de viabilité), par l'Ac monoclonal. La révélation est effectuée par un anti-sérum de lapin, anti-souris marqué à la fluorescéine.

Technique

Deux cent μ l d'une solution à 2×10^6 cellules/ml de PBS, de neutrophiles, eosinophiles, lymphocytes, monocytes, macrophages, ou plaquettes humaines, sont incubés 45 mn à une heure avec 100 μ l d'Ac monoclonal utilisé à différentes concentrations en tampon PBS.

Après trois lavages en PBS à 1 800 t/mn, pendant 10 mn, les cellules sont incubées pendant 45 mn à une heure à 4°C en présence d'un conjugué anti-souris marqué à la fluoréscéine.

Après deux lavages toujours dans le même tampon, le culot est resuspendu dans un volume de 400 µl. La lecture est alors effectuée au cytofluorimètre (.50H Cytofluorograf Ortho, Instruments, Westwood, MA).

B- ETUDE BIOCHIMIQUE : IMMUNO-ELECTROTRANSFERT "BLOTTING".

C'est dans le but, à la fois, de confirmer la spécificité des anticorps monoclonaux, et d'en déterminer les caractéristiques biochimiques, que nous avons effectué plusieurs immuno-électrotransferts.

1- ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE : (SDS-PAGE)

1- 1- . Solutions et tampons utilisés.

* Solution d'Acrylamide :- Solution à 13% d'Acrylamide,

- 13 g d'Acrylamide 2 cristallisé (SERVA),

- 0,35 de Bis Acrylamide (SERVA = N N Methylbis Acrylamide 2 cristallisés)

- 0,1 g de SDS (Lauryle Sulfate : SIGMA),

- 50 ml de Tampon Tris HCl 0,75 M pH 8,8.

Le tout est complété à 100 ml en eau déminéralisée, puis filtré, sur filtre de 0,25 µ de diamètre et enfin, dégazéifiée pendant quelques minutes.

* Tampons utilisés.

- Tampon Tris 0,75 M/250 ml pH 8,8 ajusté en HCl (1N),
- Tampon Tris 0,50 M/250 ml pH 6,8 ajusté en HCl (1N),
- Tampon échantillon 62,5 mM Tris 0,5 M HCl pH 6,8,
- 3% de SDS,
- 10% de Sucrose (Saccharose UCB).

Le tout est complété à 50 ml en eau distillée et dans lequel est rajouté 0,1 g de Bromophénol (Bleu).

*Tampon électrophorèse. (préparation pour deux litres de tampon de pH 8,8)

- 6 g de Tris (Trizma Base)
- 28,8 g de Glycocol (glycer : Merck),
- 2 g de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate).

1- 2- Préparation du gel extemporanément

Dans une éprouvette sont rapidement mélangés, 30 ml de solution Acrylamide à 13 % , 15 µl de TEMED (N-N-N-N-Tetra éthyl thylène Diamine , SERVA) et Persulfate à 10 % en eau distillée (SERVA-Ammonium-Persulfate).

Cette solution encore liquide, est déposée délicatement, entre les lames montées sur portoir pour électrophorèse, puis recouverte de la phase supérieure d'une solution d'alcool isobutilique dilué au demi.

Après deux heures de polymérisation, à la température du laboratoire, l'extrémité supérieure du gel est lavée plusieurs fois avec du tampon Tris 0,37mM.

Puis dépôt du "Stacking gel" Acrylamide 5%, également préparé extemporanément de la façon suivante : 7,5 ml de solution Acrylamide 5% mélangée à 4,5 μ l de TEMED et 45 μ l de Persulfate à 10 % est déposée au dessus du gel, polymérisé puis délicatement, dépôt du peigne moulant les puits où se feront les dépôts. Après une heure de consolidation, le peigne est retiré, et les fentes lavées au Tampon électrophorèse.

1- 3- Préparation des échantillons.

Quarante à 100 μ l d'antigènes ou de protéines solubilisées ou lyophilisées, sont repris dans 20 à 40 μ l de Tampon échantillon (avec ou sans dénaturant β -Mercapto-Ethanol) bouillis deux fois deux minutes dans un bain-marie à 100°C et déposés dans les puits du gel.

Les poids moléculaires standards (Pharmacia), sont traités de la même façon et déposés comme repère de migration.

L'ensemble du montage est placé dans une cuve électrophorèse, contenant le tampon, puis le tout est branché sur générateur à une intensité de 20 Volts et de 6 mA par gel.

2- IMMUNOELECTROTRANSFERT ("BLOTTING")

Cette technique permet de caractériser l'antigène reconnu, par l'anticorps monoclonal, soit marqué à l'iode 125 soit, révélé par un anti-Immunoglobulines de souris marqué à la Peroxydase.

Après séparation par SDS-PAGE, le gel est récupéré, puis placé sur papier Watman n°3 au préalable immergé, dans un tampon de transfert (20 mM Tris, 150 mM glycine 20% et méthanol) sur lequel est déposée une feuille de nitrocellulose, avec la plus grande délicatesse et en évitant l'intrusion de bulles d'air entre la feuille et le gel, puis une deuxième feuille de papier Watman n°3 également trempée dans le même tampon, au préalable. Le tout est placé sur un support en plastique, puis l'ensemble est mis en place sur la cuve de transfert de manière à ce que la feuille de nitrocellulose soit du côté de l'électrode positive. Le transfert est réalisé pendant deux

heures à 60 Volts , 0,5 A et 4°C.

La feuille de nitrocellulose, est alors récupérée, découpée, si nécessaire, puis lavée trois fois 15 mn en tampon phosphate de Sodium 0,01M, NaCl 0,15 M, Tween 20 à, 0,3 % (PBS-TWEEN).

Après trente minutes de saturation des sites libres en tampon PBS - 4 % BSA, quatre lavages de dix minutes sont nécessaires en PBS - Tween 0,3%, la feuille de nitrocellulose est incubée avec l'Ac monoclonal d'après la méthode de Tsang et Coll (1983), pendant au moins deux heures.

Une fois lavée trois fois en PBS Tween, la feuille de nitrocellulose est incubée pendant une heure, en présence de conjugué anti-souris marqué à la Peroxydase puis deux lavages de dix minutes, sous agitation en PBS Tween et une dernière fois en PBS seul.

La révélation se mesure à l'oeil nu en quelques minutes, et s'effectue par une solution contenant 100 mg de substrat à la Peroxydase, le DAB (Diamine Benzoïque ou OPD), 20 μ l d' H_2O_2 et complétée à 100 ml en PBS. Après quelques minutes sous agitation, on peut observer une ou plusieurs bandes représentant le ou les fragments d'antigènes reconnus par l'Ac monoclonal.

Les poids moléculaires de référence sont directement colorés sur la feuille de nitrocellulose, pendant cinq minutes au Bleu de Coomassie à 0,025 % en une solution (A) de la composition suivante :- Méthanol : 5 V,

- Acide acétique : 1 V,

- Eau : 5 V / V,

Puis décolorés en trois bains successifs de 30 mn chacun dans la solution (A). Par cette technique, nous avons d'une part, confirmé la spécificité de l'Ac monoclonal dirigé contre une population de leucocytes donnée et d'autre part, déterminé le poids moléculaire de l'antigène, déduit en se référant aux poids moléculaires témoins commercialisés.

C- ETUDES FONCTIONNELLES DES ANTICORPS MONOCLONAUX PRODUITS.

1- ANTICORPS MONOCLONAL ANTI NEUTROPHILE HUMAIN: LE NW-224

1- 1- Etude des effets de l'anticorps monoclonal NW-224 sur l'activation du métabolisme des neutrophiles humains par Chimiluminescence.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la quantité de radicaux oxygénés, libérés par la cellule, stimulant ainsi le luminol, lequel, grâce aux molécules d'eau oxygénée, amplifie le phénomène et le traduit sous forme d'émission de lumière mesurée par un chimiluminomètre. Les tests sont toujours effectués, au moins en double.

Les neutrophiles purifiés, lavés et comptés, sont mis en incubation avec l'Ac monoclonal, le témoin tampon HBSS ou un activateur du métabolisme cellulaire des PMN-neutrophiles comme le PMA ou le FMLP pendant 15 mn à 37°C, et à l'abri de la lumière et ceci dans les proportions suivantes : 100 µl d'une solution de neutrophile à $1,5 \times 10^6$ cellules/ml avec 10 µl du test et 50 µl de luminol. Les résultats sont obtenus en MEV à la suite d'une lecture de 30 secondes, en intégration, par le chimiluminomètre.

1- 2- Etude de la migration spontanée du neutrophile en présence de l'Ac monoclonal par rapport à l'effet chimioattractant du FMLP.

La technique utilisée dérive de celle décrite pour étudier le chimiotactisme du neutrophile en chambre de Boyden. Dans les puits de la chambre inférieure, sont déposés, en "triplicate" et délicatement de façon à éviter les bulles d'air, 24 µl de Tampon HBSS et différentes dilutions de FMLP (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Une rangée sera remplie par du HBSS en duplicate, et une autre, le sera par le FMLP à 10^{-6} en HBSS. Un premier filtre sera déposé délicatement le côté brillant en contact avec les dépôts inférieurs. Après dépôt du deuxième filtre, 45 µl de solution, contenant

des cellules prétraitées avec différentes doses d'anticorps, sont placés dans les puits supérieurs, la chambre est bien refermée, enveloppée de papier aluminium et placée à 37°C pendant 30 mn en atmosphère 5% CO₂.

Une fois la migration terminée, le filtre récupéré, la face supérieure bien nettoyée de façon à éliminer les cellules qui ne l'ont pas traversé, il est alors plongé dans un fixateur (Méthanol), puis coloré au RAL deux fois pendant deux minutes.

Le filtre contenant les cellules qui l'ont traversé est alors déposé sur lame et observé au microscope optique.

1- 3- Etude de la libération de myéloperoxydase (MPO) par le neutrophile humain sous l'effet de l'anticorps monoclonal : NW-224.

Cette étude a été faite en trois étapes successives :

- Première étape : Incubation des neutrophiles avec l'Ac monoclonal : NW-224, 15 mn à 37°C. 2×10^6 cellules / 200 µl de PBS (à 10 mM) sont incubés avec l'Ac monoclonal à 25 µl/ml ; 50 µl/ml et 100 µl/ml. 2×10^6 cellules / 200 µl subiront une lyse totale soit par le Triton x 100 à 1 g/l soit par Sonicat ion.

- Deuxième étape : Addition du stimulus 30 mn à 37°C soit 100 µl de PLA à 20 ng/ml. Centrifugation 2000 t/mn pendant dix minutes à 4°C puis test du surnageant.

- Troisième étape : Révélation : La mesure de la quantité de MPO libérée, par le neutrophile au cours de cette expérience, a été mise au point dans notre laboratoire en s'inspirant de la technique ELISA.

*Le test est effectué sur une plaque rigide pour ELISA et les résultats sont donnés par un lecteur de plaques à 490 nm .

Cinquante μ l de surnageants sont déposés dans deux puits différents auxquels sont rajoutés 100 μ l du mélange suivant préparé extemporanément : 25 ml de Tampon substrat = tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à ramener à pH 5,5 avec de l'acide citrique 0,1 M dans lesquels sont dissous 9 mg d'OPD (Orthophényldiamine) et 15 μ l d'eau oxygénée (H_2O_2) à 30 %. Après une demi-heure d'incubation à 37°C à l'abri de la lumière, la réaction est stoppée par du H_2SO_4 (2N) ou du HCl (1N) et la plaque est enfin lue au lecteur de plaques à 490 nm.

1- 4- Etude de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles circulants, d'un parasite *Leishmania brasiliensis brasiliensis* (L.bb).

a- Préparation du parasite (L.bb).

La souche *L.bb.* nous a été aimablement fournie par le Docteur F. Santoro (CIBP) cultivée en milieu G.L.S.H.

Les parasites sont lavés trois fois en milieu MEM à 1 800 t/mn pendant cinq à dix minutes puis énumérés dans un volume final connu en cellule de Thoma.

b- Préparation des polynucléaires neutrophiles.

Un million de PN-neutrophiles humains sont mis en incubation, dans des tubes à hémolyse à la température du laboratoire, en présence des divers réactifs à tester : 100 μ l de l'anticorps monoclonal NW-224, de l'eosinophile 100 μ l, un anticorps monoclonal (IgM), le BB10 Acn anti-récepteurs IgE et 100 μ l de PBS dans un volume final de 500 μ l de milieu MEM.

Après 20 mn d'incubation, 100 μ l NaI d'une solution de parasites et deux gouttes d'une solution d'Azide Sodium à 10 mM sont rajoutés à chaque tube test, de façon à obtenir un rapport de trois parasites pour une cellule.

Les tubes sont alors centrifugés à 400 g à 4°C afin d'améliorer le contact "parasite-cellule" puis mis en incubation à 37°C pendant cinq à dix minutes. La réaction est alors stoppée par

addition d'une solution d'EDTA 10 mM froid (Ethylène-Diamine-Tétracétique-Acide). Une fraction aliquote de 100 µl, de chaque tube test est analysée, par cyto centrifugation et coloration au GIEMSA . Le comptage s'effectue à l'objectif 40 du microscope optique , ceci sur plusieurs champs. Un pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins un parasite est alors, calculé par rapport à l'ensemble des neutrophiles sains.

2- ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-EOSINOPHILES HUMAINS: E06-71

2-1- Technique des Rosettes IgE sur l'éosinophile :

Principe :

La méthode utilisée dans ce travail fait appel à une technique de rosettes qui consiste à sensibiliser chimiquement des cellules indicatrices (érythrocytes de mouton) par des immunoglobulines . La présence d'un site récepteur pour l'immunoglobuline sur une cellule donnée se traduit par la formation de rosettes entre cette cellule et plusieurs globules rouges. Du fait de l'utilisation de globules rouges de mouton, sensibilisés à l'Aldéhyde pyruvique et au Formaldéhyde, dans un premier temps, puis des éosinophiles purifiés, dans un deuxième temps, ce test des rosettes s'effectue en deux étapes :

- Première étape : Sensibilisation des érythrocytes de moutons.

Le premier jour : Nous avons toujours utilisé le même mouton. Le sang a été mélangé avec 50 % (V/V) de la solution suivante : glucose à 2,05 g NaCl à 4,2 g, Citrate de Na à 80 g et d'acide citrique 0,55 g, QSP 1000 ml en eau distillée. Après centrifugation de 10 mn à 2 500 t/mn, le culot est repris puis lavé deux fois dans 5 ml de PBS et enfin répartie dans 20 tubes après une dilution finale de 10 % en PBS.

La Trypsine (Trypsine TPCK : Worthington, Freehold, NJ) est ajoutée à raison de 1 ml par tube d'une solution de 0,2 mg/ml PBS, le tout est incubé une heure à 37°C en agitation continue.

Après l'addition d'un inhibiteur de Trypsin, à raison de 1 ml/tube de solution contenant 0,2 mg/ml PBS, trois lavages sont faits par centrifugation, à 2 500 t/mn pendant 5 mn. Le culot sera resuspendu dans 1 ml de PBS.

Dans chaque tube, est ajouté 1 ml / d'aldéhyde pyruvique (6 ml aldéhyde pyruvique à 40 % + 70 ml PBS pH 7,2 (NaOH) QSP 80 ml PBS) et mis en incubation sous rotation toute la nuit à la température du laboratoire.

Le deuxième jour : Après cinq lavages à 2 500 t/mn est rajouté 1 ml de Formaldéhyde 3 % en PBS (6 ml Formaldéhyde 37 % + 68 ml PBS) puis mise en rotation des tubes pendant 20 H à la température ambiante.

Le troisième jour : A la suite de trois lavages, la moitié des tubes sont récupérés dans 10 ml de solution à 10 % pour la post-sensibilisation, alors que l'autre moitié est mélangée avec 10 ml de solution à 10 %. Après comptage en cellule de Thoma, une dilution est effectuée en Tampon acétate à raison de 10×10^8 cellules/ml.

**Sensibilisation* : Dans chaque tube, 0,05 ml de globules rouges fixés à 10×10^8 /ml, en tampon acétate, sont rajoutés à 0,5 ml de tampon acétate contenant 400 µg de protéine (soit de l'IgE humaine, soit de l'albumine bovine : SAB) puis mis sous rotation pendant deux heures à la température du laboratoire.

**Stokage* :: Après trois lavages successifs , le culot est repris dans un ml de PBS et correspond à la solution stock (à une concentration de 5×10^8 globules rouges / ml) qui peut être conservée pendant 4 à 6 semaines à 4° C.

- Deuxième étape : Incubation des globules rouges de mouton sensibilisés et des éosinophiles humains :

Soixante μl d'une solution de 3×10^6 éosinophiles humains purifiée par millilitre en milieu MEM (Minimal Essentiel Medium, Difco Laboratoires, Detroit MI.) sont incubés avec 60 μl de globules rouges sensibilisés ou globules rouges contrôles en SAB ou en milieu MEM à 2×10^8 cellules par ml en MEM .

Le mélange est centrifugé à 100 g à 4° C. pendant 10 min , puis placé à 4) C. pour 30 min . Le sédiment est légèrement remis en suspension puis l'on ajoute une suspension d'éosinophiles . Les pourcentages des rosettes formées par les éosinophiles sont alors évaluées au microscope optique .

2 - 2 Test de cytotoxicité de l'éosinophile et des plaquettes vis à vis du schistosomule de *S. mansoni*

Le schistosomule est préparé d'après la technique de "pénétration cutanée" .

Test sur l'éosinophile : Le test de cytotoxicité dépendante du récepteur IgE de l'éosinophile est réalisé de la façon suivante : 50 μl d'une suspension aliquote de schistosomules contenant 50 cibles en MEM à 1% de sérum humain inactivé (MEM - NHS) sont incubés en plaques de cultures (NUNC , ROSKILDE , Denmark) , 50 μl de sérum de patients infectés par *S. mansoni* , ou de sérum humain normal sont ajoutés à une dilution finale de 1: 32 à 100 μl d'une solution contenant des éosinophiles purifiés à partir de donneurs hyperéosinophiles (ratio de 5000 E/C) .

Test sur les plaquettes : Le test de cytotoxicité des plaquettes est réalisé comme suit : 50 schistozomules en 80 μ l de MEM sont incubés en plaque de culture avec 20 μ l de sérums de patients infectés par *S. mansoni* (dilution finale de 1/10) ou avec du sérum humain normal, et 100 μ l de $7,5 \times 10^7$ plaquettes de donneurs sains en milieu MEM.

Chapitre IV

RESULTATS

I. PRODUCTION D'ANTIGENES DE SURFACE PAR EXTRACTION

MEMBRANAIRE : Comparaison de différents types de détergents

L'immunisation des souris ayant été effectuée avec des granulocytes fraîchement isolés et dans le plus grand respect de leurs intégrités cellulaires (taux de viabilité en moyenne de 96 %), permet de supposer l'obtention d'un anti-sérum plus riche en anticorps dirigés contre les antigènes de surface des granulocytes, par rapport à une immunisation par des broyats cellulaires. Afin de nous assurer de la qualité des antigènes fixés sur les puits des plaques "ELISA", et afin d'améliorer le rendement du criblage des puits contenant des clones susceptibles de produire l'anticorps en question (encore appelés "clones positifs") nous avons comparé, en vue de l'extraction membranaire, différents détergents de type anioniques, non anioniques et zwitterioniques, dont le tableau figure 15 récapitule les résultats. Dans le cadre de cette étude comparative 3 caractéristiques essentielles du détergent ont été prises en considération :

1 - L'état des cellules après leur contact avec le détergent, état apprécié au microscope optique,

2 - La concentration de protéines extraites mesurée par spectro-photométrie en densité optique puis convertie en mg / ml à partir d'une courbe étalon,

3 - Et enfin, l'élimination du détergent en question par dialyse.

Dans un premier temps et comparativement aux autres détergents utilisés (Tween 20, Tween 80, Triton X100, SDS et le DOC 2%) seul le Nonidet P 40 et le CHAPS semblent préserver plus ou moins intactes les cellules étudiées, alors que le Dodécyle- β -D-Maltoside apparaît comme étant le détergent le moins agressif envers la cellule .

EXTRACTION MEMBRANAIRE DES PROTEINES DE SURFACES
DES LEUCOCYTES HUMAINS : COMPARAISON DE DIFFERENTS
TYPES DE DETERGENTS .

	Témoin sans détergent	Détergent non anioniques					Détergents anioniques		Détergent Zwitterionique
		Tween 80	Tween 20	Triton X100	Nonidet P.40	Dodécyl D β Maltoside	S.D.S	D.O.C 2%	CHAPS
Etat des cellules pourcentage de cellules saines par champ	72,32 ± 0,15	06,01 ± 0,76	12,93 ± 8,21	04,51 ± 1,17	25,12 ± 0,23	56,81 ± 7,92	5,61 ± 0,33	18,6 ± 3,44	36,12 ± 4,76
concentration de protéines	0,03 mg/ml	0,73 mg/ml	0,42 mg/ml	1,45 mg/ml	1,75 mg/ml	2,97 mg/ml	1,69 mg/ml	1,55 mg/ml	1,60 mg/ml
Elimination par dialyse du détergent(48h)	+	+	++	-	+++	+++	-	-	-+



Pour ce qui concerne la quantité de protéines solubilisées, alors que le Tween 20 et Tween 80 semblent peu efficaces avec une concentration moyenne de 0,60 mg/ml, le Triton X100, le Nonidet P 40, le SDS, le DOC 2% et le CHAPS présentent des valeurs numériques voisines un peu plus élevées que les précédentes mais, statistiquement, encore très inférieures (test de comparaison des moyennes) aux 2,87 mg/ml de protéines extraites par le Dodécyl-D- β -Maltoside (DD β M).

* Notre choix du DD β M a donc été justifié par son pouvoir de décaper les protéines de la surface cellulaire sans trop modifier l'état de la cellule.

* D'autre part et, comparativement aux autres détergents, le DD β M offre un rendement relativement élevé quant à la concentration en protéines qu'il est capable de solubiliser.

* C'est donc ce détergent que nous avons décidé d'utiliser pour toute extraction membranaire tant pour les granulocytes que pour les autres populations leucocytaires étudiées dans nos travaux.

CLONES POSITIFS DE L'HYBRIDATION NW : Degrés de positivité
 maximum en ELISA

	NW-125	NW-36	NW-91	NW-250	NW-251	NW-224	SURNAGEANT SP20
10-1	1.91 ± 0.10	1.63 ± 0.11	1.43 ± 0.01	1.82 ± 0.08	1.65 ± 0.11	1.99 ± 0.11	0.20 ± 0.01
10-2	1.20 ± 0.07	1.11 ± 0.09	1.05 ± 0.07	1.61 ± 0.11	1.21 ± 0.01	1.73 ± 0.09	0.31 ± 0.20
10-3	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.33 ± 0.23	0.99 ± 0.08	1.54 ± 0.01	0.17 ± 0.51
10-4	0.93 ± 0.08	0.90 ± 0.01	0.63 ± 0.11	1.00 ± 0.02	0.67 ± 0.02	1.22 ± 0.14	0.40 ± 0.14
10-5	0.61 ± 0.00	0.43 ± 0.07	0.44 ± 0.09	0.80 ± 0.01	0.73 ± 0.02	1.01 ± 0.09	0.20 ± 0.06
10-6	0.20 ± 0.05	0.11 ± 0.09	0.11 ± 0.14	0.40 ± 0.01	0.10 ± 0.06	0.97 ± 0.08	0.20 ± 0.07
10-7	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.08 ± 0.02
10-8	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.81 ± 0.01	0.13 ± 0.01

valeurs exprimées en DO à 490 nm

Témoins négatifs : 0,12 ± 0,01

PBS

II . PRODUCTION ET PURIFICATION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL: LE NW-224 ANTI-NEUTROPHILES HUMAINS

A- .ETUDE IMMUNOCHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE

1- CLONAGE ET PURIFICATION

Des six clones positifs résultant de notre hybridation, (figure 16) le choix du clone NW-224 dans son clonage, dans sa production massive en ascite et dans sa purification a été motivé par sa réponse positive allant jusqu'à une dilution au 1/ 10.000.000 , par rapport aux autres clones, de même que par sa spécificité vis à vis du neutrophile par rapport à l'éosinophile .

2- ISOTYPE : DETERMINATION

Un premier test par la technique d'Ouchterlony en immunodiffusion, nous a permis de visualiser un arc de précipitation de l'Ac monoclonal NW-224 en présence d'un anti-sérum anti-immunoglobulines G (IgG) figure 17 a .

Un deuxième test par cette même technique a déterminé la sous-classe de cette IgG qui est l'isotype IgG_{2a} (figure 17b).

Ces résultats rejoignent ceux que nous avons obtenu par ELISA et qui sont détaillés dans le tableau figure 18 . Celui-ci résume bien les résultats constatés par immunodiffusion, à savoir que:

* l'anticorps monoclonal NW-224 produit est bien une IgG_{2a} .

DETERMINATION DE L'ISOTYPE DE LAC.
MONOCLONAL NW-224 PAR OUCHTERLONY

FIGURE 17

FIGURE 17A

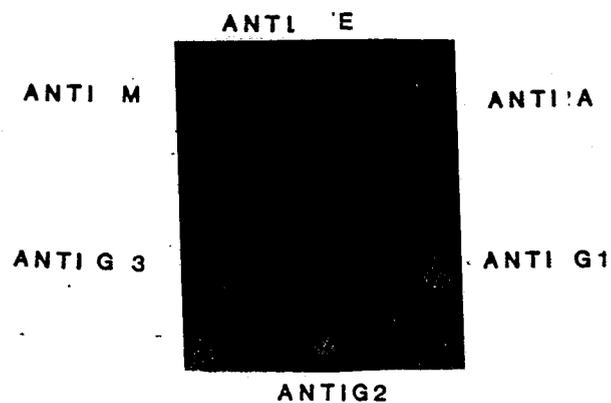
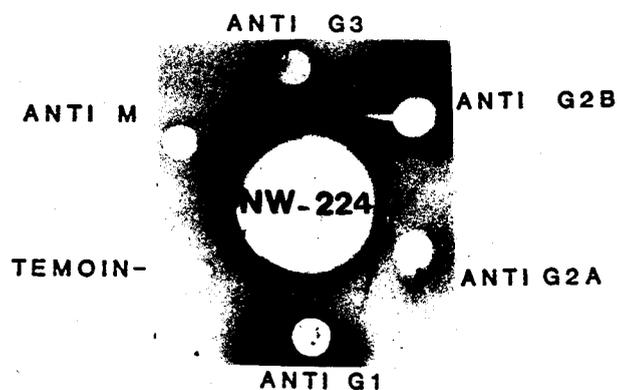


FIGURE 17B



DETERMINATION DE L'ISOTYPE DES
ANTICORPS MONOCLONAUX EO₆-71 ET NW-224

<u>ELISA</u>	EO ₆ -71	NW-224	Tampon PBS	Surnageant SP ₂ O
Sérum de lapin anti IgA de souris	0,088±0,017	0,045±0,026	0,070±0,044	0,082±0,071
Sérum de lapin anti IgG totale de souris	0,605±0,118	1,712±0,163	0,093±0,002	0,102±0,017
Sérum de lapin anti IgG1 de souris	0,412±0,134	0,618±0,213	0,154±0,015	0,255±0,022
Sérum de lapin anti IgG2a de souris	0,210±0,107	1,674±0,151	0,107±0,008	0,234±0,014
Sérum de lapin anti IgG2b de souris	0,137±0,044	0,777±0,056	0,181±0,017	0,215±0,014
Sérum de lapin anti IgG3 de souris	0,099±0,011	0,370±0,118	0,085±0,008	0,137±0,005
Sérum de lapin anti IgE de souris	0,234±0,042	0,188±0,015	0,105±0,055	0,236±0,084
Sérum de lapin anti IgM de souris	1,733±0,104	0,489±0,210	0,089±0,077	0,104±0,018
Sérum de lapin sain	0,332±0,084	0,284±0,018	0,027±0,009	0,095±0,012
Sérum de lapin anti souris	1,441±0,132	1,343±0,175	0,089±0,051	0,184±0,044



SPECIFICITE DES CLONES POSITIFS ANTINEUTROPHILES HUMAINS

DE L'HYBRIDATION NW EN ELISA

	NEUTROPHILES	EOSINOPHILES	MASTOCYTES	LYMPHOCYTES	PLAQUETTES	MACROPHAGES ALVEOLAIRES	MACROPHAGES LYMPHATIQUES
NW-125	1.55 ± 0.11	1.43 ± 0.11	1.23 ± 0.14	1.18 ± 0.09	0.51 ± 0.02	0.66 ± 0.08	0.72 ± 0.06
NW-36	1.64 ± 0.13	1.32 ± 0.09	0.43 ± 0.12	0.32 ± 0.02	0.51 ± 0.08	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.04
NW-91	1.54 ± 0.12	1.22 ± 0.02	0.64 ± 0.21	0.11 ± 0.09	0.24 ± 0.01	0.33 ± 0.10	0.10 ± 0.10
NW-250	1.72 ± 0.14	1.62 ± 0.10	0.24 ± 0.08	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.07	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.05
NW-251	1.45 ± 0.09	1.54 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02
NW-224	1.99 ± 0.11	0.30 ± 0.08	0.10 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.05
SURNAGEANT	0.19 ± 0.08	0.24 ± 0.02	0.17 ± 0.14	0.20 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.24 ± 0.08
SP20							
EMOIN BLANC	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.09	0.11 ± 0.05
PBS							

FIGURE 19

Valeurs exprimées en DO à 490 nm



3 - SPECIFICITE DU NW-224 VIS A VIS DU NEUTROPHILE

1. Le tableau figure 19 récapitule les résultats obtenus par la méthode ELISA et montre l'existence ou non d'une spécificité des anticorps issus de la culture de différents clones vis à vis de la plupart des leucocytes humains .

Il apparait que le clone NW-125 semble reconnaître pratiquement de la même façon et sans aucune distinction les granulocytes et les cellules mononuclées. D'autre part alors que l'anticorps NW-224 ne reconnaît que le neutrophile, les anticorps NW-36 , NW-91, NW-250 et NW-251 ont plus tendance à se fixer aux granulocytes qu'aux lymphocytes , monocytes , macrophages ou aux plaquettes sanguines .

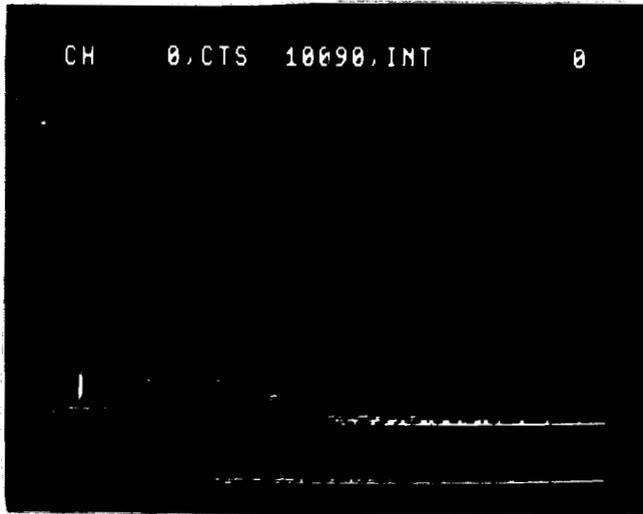
2 . Une étude en immunofluorescence indirecte par cytofluorométrie en flux (figure 20) , nous a permis de confirmer que le NW-224 se fixe préférentiellement aux polynucléaires neutrophiles (figure 20-b) et ne présente pratiquement aucune affinité pour les monocytes (figure 20-c) les lymphocytes (figure 20-a) ou les plaquettes (figure 20-e) .

*La faible fréquence de donneurs hyperéosinophiles nous a amené à étudier une population hétérogène de granulocytes par cette technique : Soit une population de 40 % d'éosinophiles et de 60 % de neutrophiles . La fluorescence observée alors semblait très faible et n'était visible que sur les neutrophiles .

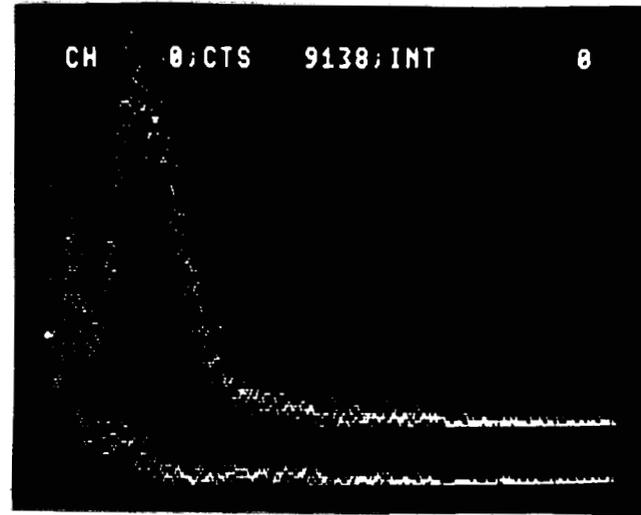
* De l'ensemble de ces constatations nous pouvons suggérer que l'Ac. monoclonal NW-224 pourrait être plus spécifique du neutrophile que de l'éosinophile .

DE LA SPECIFICITE DU MONOCLONAL NW-224

(20-a) LYMPHOCYTES

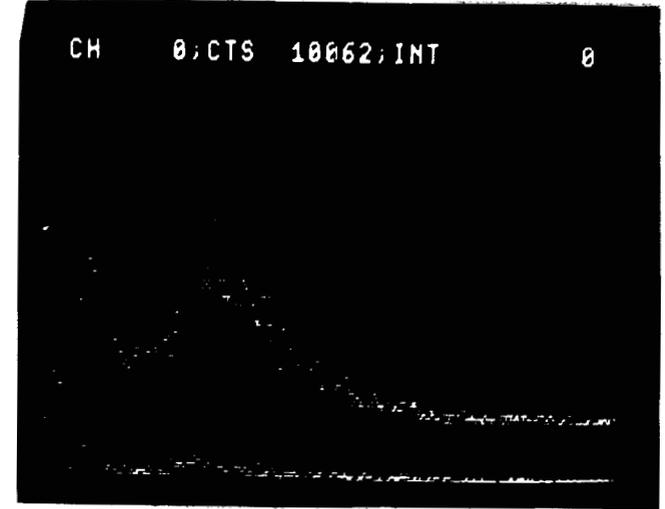


(20b) NEUTROPHILES

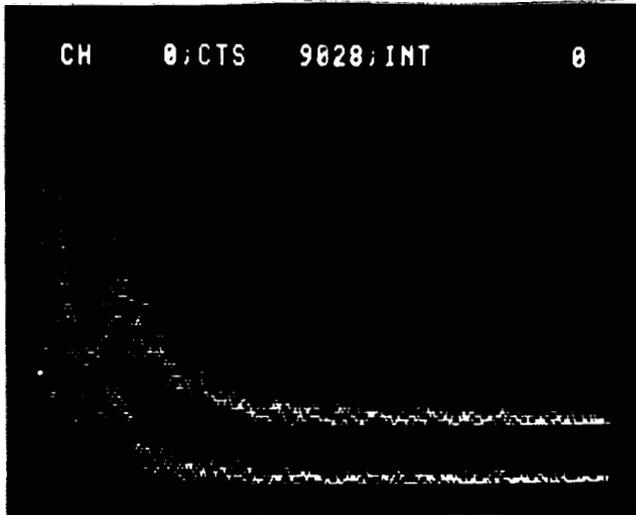


(20-c) MONOCYTES

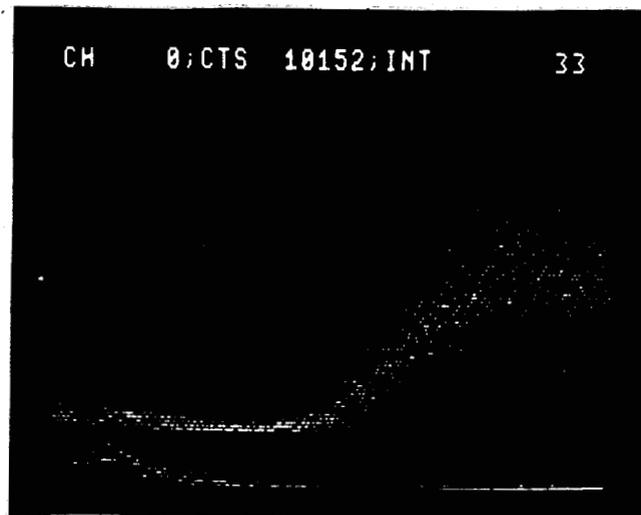
+10% DE CONTAMINANTS NEUTROPHILES



(20-d) EOSINOPHILES :60%
+
NEUTROPHILES :40%

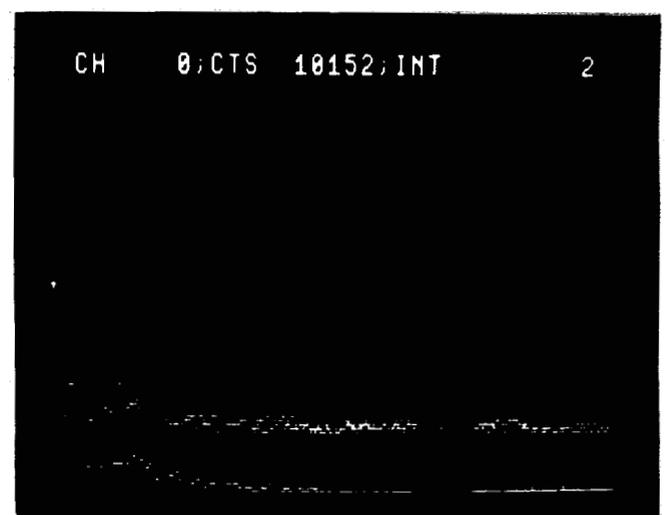


(20-e) AP2 ANTIPLAQUETTES



PLAQUETTES

NW-224



4- ETUDE BIOCHIMIQUE ET DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DE L'ANTIGENE RECONNU PAR LE NW-224

La technique d'immunoblotting , nous a permis a la fois d'appuyer les résultats précédemment obtenus concernant la spécificité du NW-224 pour le neutrophile et de déterminer le poids moléculaire de l'antigène qu'il reconnaît (figure 21) .

Dans quatre puits différents d'un gel de polyacrylamide polymérisé sont déposés 100 µg d'extraits de neutrophiles ,d'éosinophiles , de monocytes ou de lymphocytes . Après 16 à 18 heures de migration des protéines dans le gel , un électrotransfert sur feuille de nitrocellulose, est réalisé pendant deux heures à 60 Volts et 0,5 Ampères ; cette dernière est incubée avec l'anticorps monoclonal pendant au moins deux heures et enfin après plusieurs lavages successifs et une saturation des sites libres en tampon PBS à 4 % de BSA , elle est mise une heure en incubation avec du conjugué anti-souris marqué à la peroxydase . La révélation par un substrat à cette enzyme tel que le DAB (DiAmineBenzoidine) , montre une bande colorée de 14,5 Kd présente uniquement au niveau des polynucléaires neutrophiles .

Afin de s'assurer de la spécificité du NW-224 pour les neutrophiles et afin d'éliminer l'éventuelle existence d'une reconnaissance non spécifique de cette molécule de 14,5 Kd par une IgG autre que le NW-224 , nous avons réalisé une deuxième expérience par cette même technique (figure 22). Des extraits de protéines membranaires du neutrophile et de l'éosinophile ont été déposés à la même concentration que précédemment et de la même procédure avec la différence dans ce test là, que l'incubation de la feuille de nitrocellulose découpée a été faite avec trois anticorps monoclonaux différents :Une I gG de souris anti *Toxoplasma gondii* , une IgM de souris anti récepteur IgE de l'éosinophile : le BB10 et l'anticorps monoclonal NW-224 . Un témoin sans anticorps a été également effectué .

DETERMINATION DU PM DE L'ANTIGÈNE RECONNU PAR LE
NW-224 ET SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE SUR LES
NEUTROPHILES

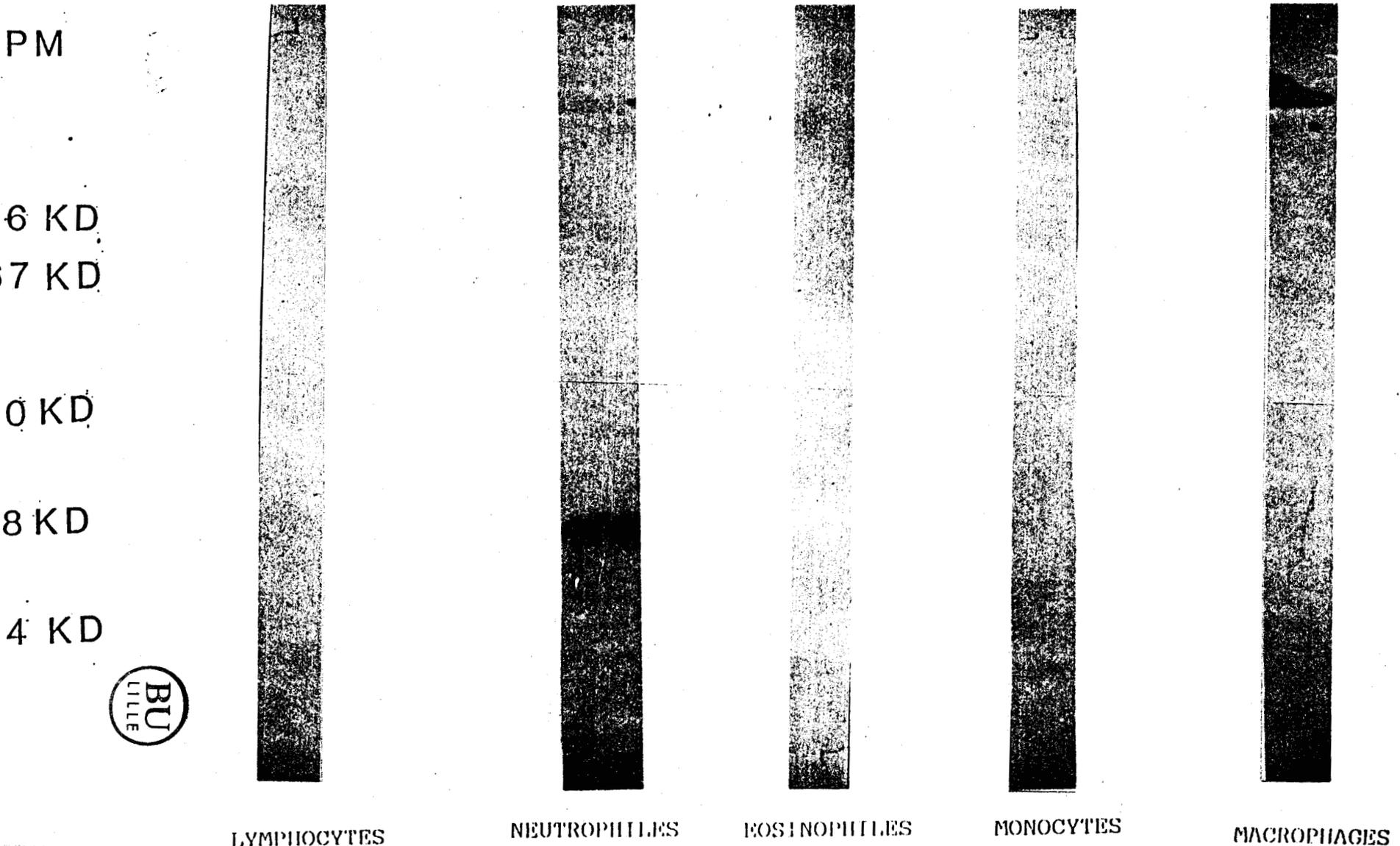


FIGURE 21

Les résultats obtenus (figure 22), permettent d'aboutir à trois constatations qui sont les suivantes :

* La molécule antigénique portant l'épitope ayant induit la production de l'Ac monoclonal NW-224 possède un poids moléculaire de 14,5 Kd

* Cette molécule n'est retrouvée que sur le neutrophile seul .

* Enfin, la bande détectée sur la feuille de nitrocellulose, à la suite de la réaction enzymatique n'est pas le résultat d'une reconnaissance par une IgG non spécifique autre que l'IgG du NW-224 .

En conclusion nous pouvons déjà déduire que:

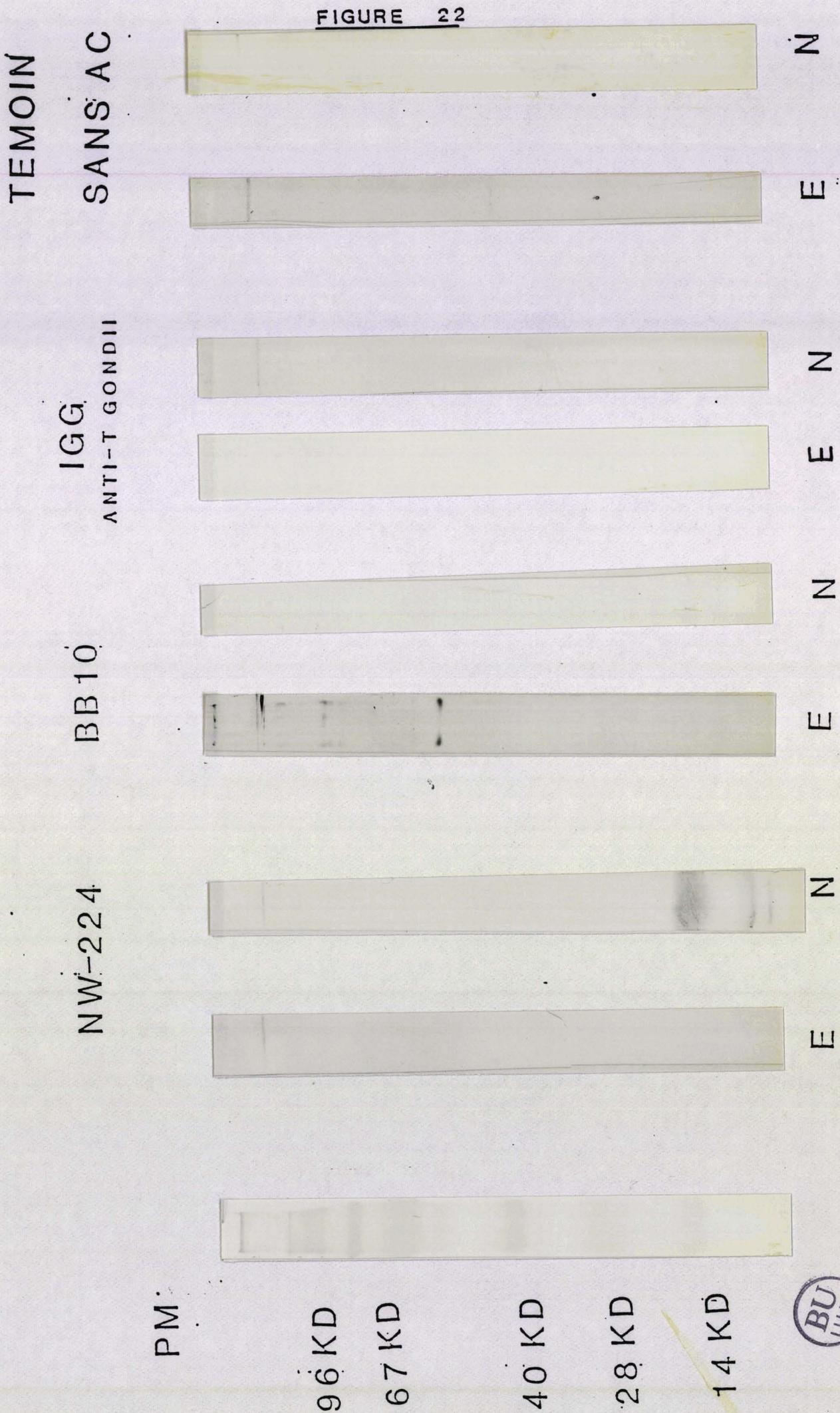
L'anticorps monoclonal NW-224 est une IgG d'isotype G_{2a}, que l'antigène qu'il reconnaît est de poids moléculaire de 14,5 Kd et enfin que cet épitope est présent sur les neutrophiles et semble indétectable sur la surface des éosinophiles.

B- ETUDE BIOLOGIQUE DU NW-224

Connaissant les propriétés biologiques du neutrophile observés *in vivo*, notamment son rôle au cours d'une réaction de défense antimicrobienne , nous avons étudié les effets de l'Ac. monoclonal NW-224 sur les différentes fonctions du neutrophile *in vitro* à savoir :

- son activation métabolique (induisant sa mise en activité)
- son chimiotactisme (c'est à dire sa migration vers le site infectueux)

ETUDE DE LA SPECIFICITE DU NW-224 VIS-A-VIS DU NEUTROPHILE



- sa propriété phagocytaire (dans l'ingestion des microorganismes)
- son relargage enzymatique (dans l'éventualité où la cible serait de taille trop grande pour être ingérée) .

1 . EFFET DU NW-224 SUR L'ACTIVATION METABOLIQUE DU NEUTROPHILE

Le principe de la méthode de chimioluminescence que nous avons utilisée , repose sur la propriété que possèdent certains radicaux oxygénés libérés au cours de la respiration par la cellule , de stimuler le luminol, lequel, grâce aux molécules d'eau qui amplifient le phénomène , libèrent une énergie sous forme d'émission de lumière , mesurée par chimioluminomètre .

Par ce moyen nous pouvons alors étudier la respiration du neutrophile , donc son activité métabolique en présence ou non de l'Ac. monoclonal NW-224 et par comparaison avec un stimulateur de l'activation du neutrophile : le FMLP ou le PMA .

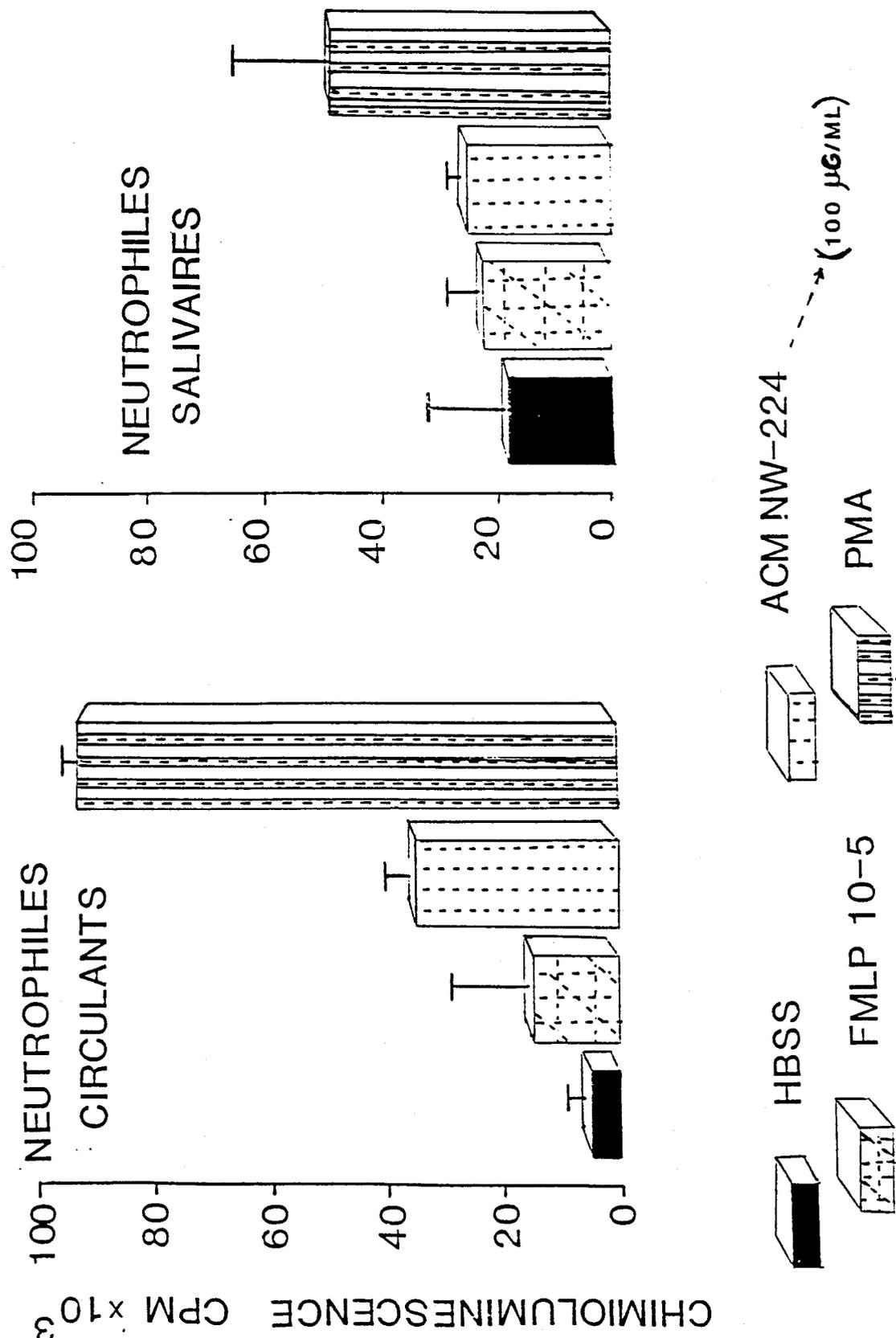
Par quelques tests préliminaires rapportés figure 23 nous avons pu constater que l'Ac. monoclonal NW-224 utilisé à la dose de 100 µg / ml avait un effet statistiquement plus important (test de comparaison des moyennes) que le FMLP , sur l'activation des neutrophiles circulants .

Par ailleurs , une dose identique d'Ac. monoclonal NW-224 appliquée aux neutrophiles salivaires ne présente plus aucun effet sur l'activation de cette cellule . Il est à signaler que le neutrophile de la salive présente une activité de base supérieure à celle du neutrophile circulant , suggérant ainsi une hyperactivité du neutrophile salivaire contrairement à celui de la circulation considéré comme une cellule au "repos" .

Connaissant ainsi son pouvoir activateur sur le métabolisme du neutrophile circulant , notre but était de déterminer, en premier lieu , la dose à laquelle le NW-224 avait un effet optimal sur cette propriété du neutrophile . Pour cela et dans un premier temps nous avons effectué un test nous permettant d'évaluer l'effet "dose - réponse" du NW-224 sur la mise en activation du neutrophile circulant .

REPONSES DES NEUTROPHILES CIRCULANTS ET SALIVAIRES A DIFFERENTS STIMULI

FIGURE 23



COURBE DOSE-REPONSE DE L'ACTION DU NW-224 SUR L'ACTIVATION DU NEUTROPHILE HUMAIN CIRCULANT ET SALIVAIRE

FIGURE 24

FIGURE 24A

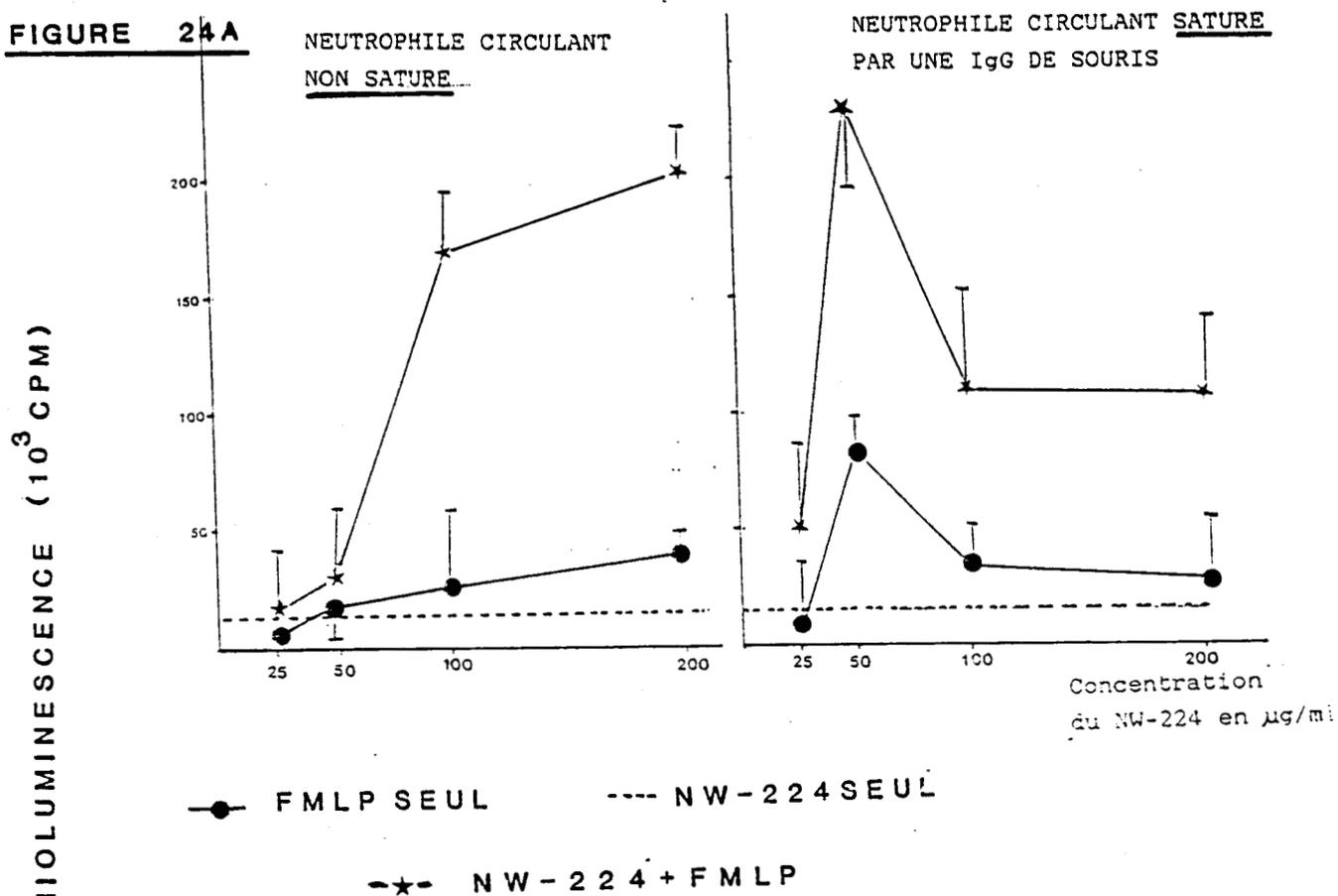
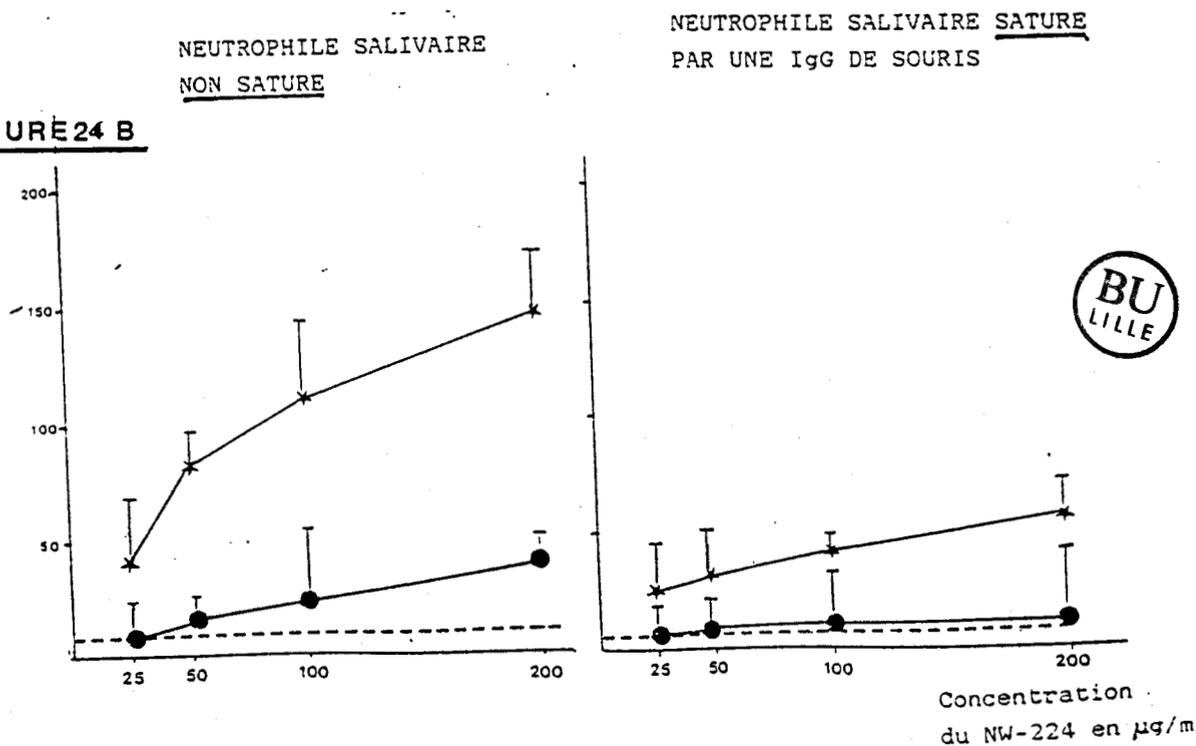


FIGURE 24 B



BU
LILLE

§ - A une même quantité de neutrophiles sanguins ont été ajoutés , dans différents tubes 25 µg/ml , 50 µg/ml , 100 µg/ml et 200 µg/ml de l'Ac monoclonal NW-224 . Parallèlement des doses identiques ont été mises en incubation avec le même nombre de cellules traitées par du FMLP (figure 24-a) . Les résultats obtenus montrent bien un effet "dose-réponse" activateur du NW-224 sur le métabolisme du neutrophile par rapport à un traitement témoin en tampon HBSS seul .

D'autre part, une deuxième constatation nous a permis de déduire, qu'en association avec le FMLP , l'Ac monoclonal semble avoir un effet cumulateur sur la stimulation du neutrophile : il agirait donc en synergie avec le FMLP.

§ - Ces mêmes expériences ont, parallèlement, été effectuées sur le neutrophile de la salive qui semble moins sensible que le premier aux importantes variations de la concentration de l'Ac monoclonal NW-224 (figure 24-b) .

Sachant que le NW-224 est une IgG la question était de s'assurer de la nature de la fixation de cette immunoglobuline sur le neutrophile . Se fixe-t-elle par son fragment Anticorps Fab à l'antigène ou par son fragment Fc aux récepteurs Fc (RFc) présents à la surface de ce polynucléaire ?

C'est afin d'éclaircir ce problème que nous avons procédé à une saturation des RFc de cette cellule pendant 45 minutes par 100 µg/ml d'une IgG monoclonale de souris anti *Toxoplasma gondii*. les résultats ont été représentés sur la figure 24-a pour les neutrophiles circulants et sur la figure 24-b pour ceux de la salive . Dans le premier cas , on peut déjà observer une différence par rapport aux mêmes tests effectués sur des cellules non saturées . D'autre part nous pouvons enregistrer l'existence d'un effet optimal d'activation du neutrophile à la dose de 50 µg/ml . Dans le cas des neutrophiles de la salive , l'effet de synergie entre l'Ac monoclonal NW-224 et le FMLP amplifiant l'activation de cette cellule est beaucoup moins évident .

EFFET DU NW-224 SUR L'ACTIVATION DU
NEUTROPHILE CIRCULANT A LA DOSE DE

50JG/ML

APRES SATURATION

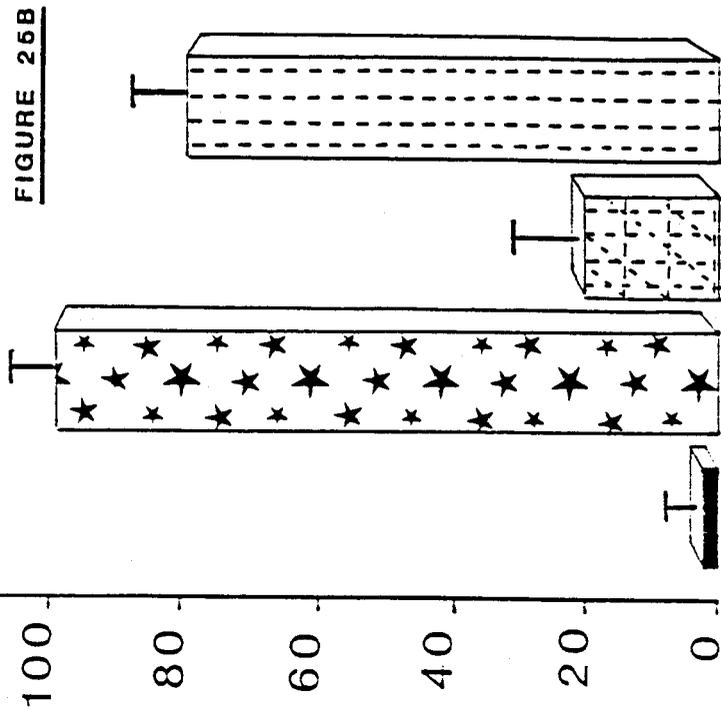
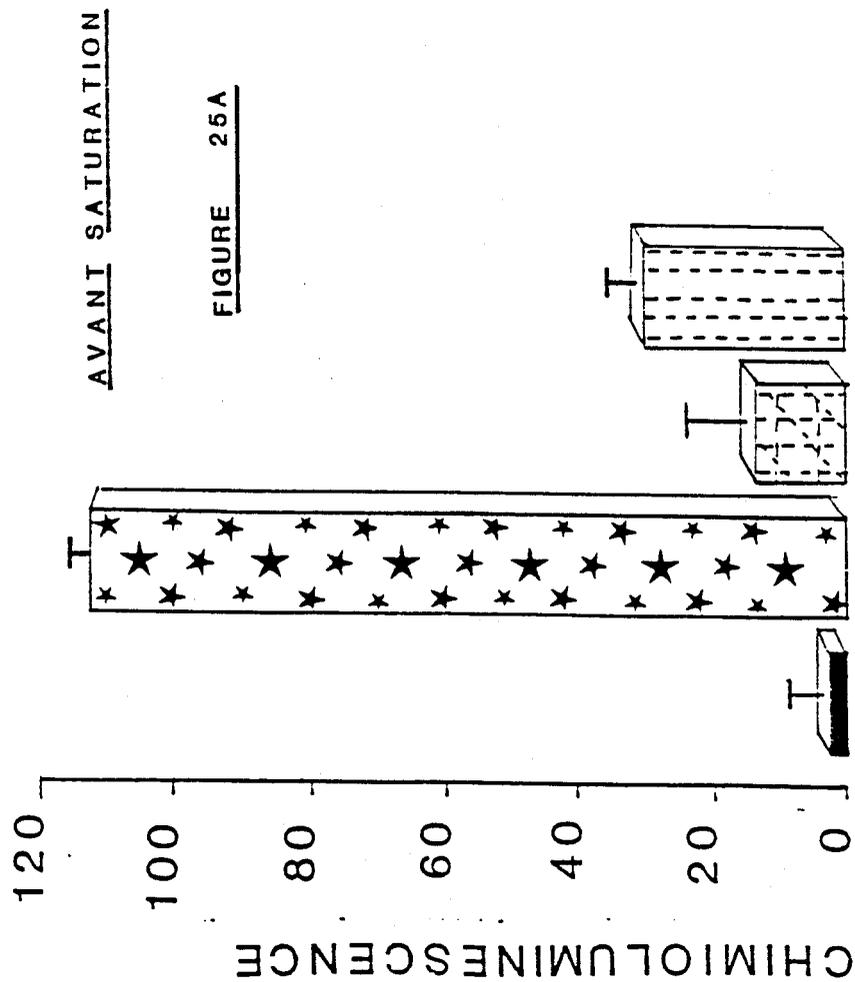


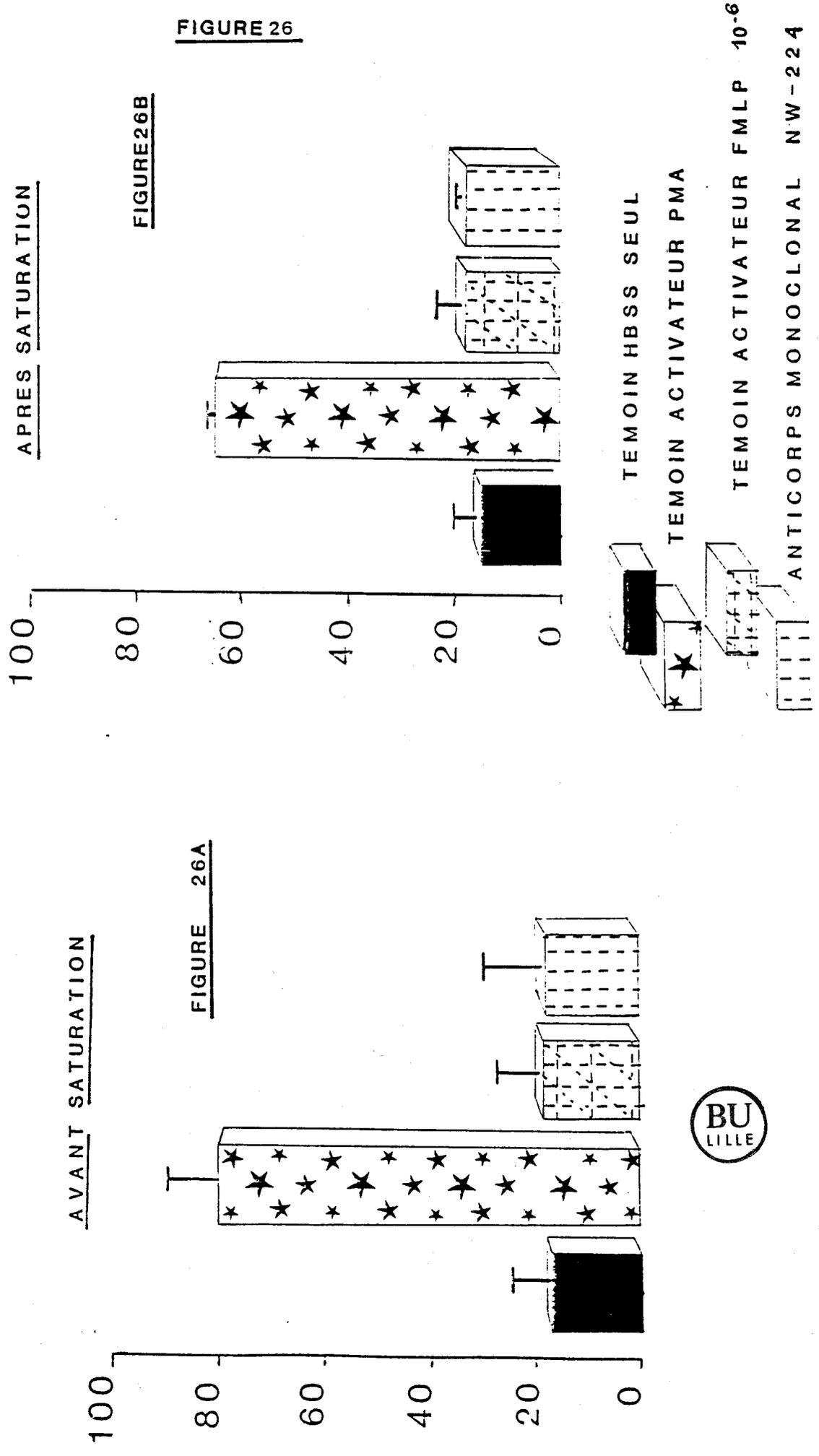
FIGURE 25



TEMOIN HBSS SEUL
 TEMOIN ACTIVATEUR PMA
 TEMOIN ACTIVATEUR FMLP
 ANTICORPS MONOCLONAL NW-224 (50 JG/ML)

EFFET DU NW-224 SUR L'ACTIVATION DU
NEUTROPHILE SALIVAIRE A LA DOSE DE

50 µG/ML



CHIMIOFLUORESCENCE (CPM) *10

Afin de mieux visualiser l'effet du NW-224 sur la stimulation de la respiration du neutrophile circulant et en comparaison avec celui de la salive , nous avons testé ces cellules dans les mêmes conditions que précédemment avec une dose unique de 50 µg/ml de l'Ac monoclonal NW-224 .

Dans un premier temps, nous pouvons comparer les résultats obtenus avant et après saturation de chacune de ces deux sous populations de neutrophiles par une IgG de souris figure 25 . Pour ce qui concerne le neutrophile circulant figure 25-a et figure 25-b on constate qu'à la dose de 50 µg/ml , le NW-224 exerce un effet activateur plus élevé sur le neutrophile saturé que sur le neutrophile non saturé . Cette différence significative peut s'expliquer par l'effet de compétition existant entre la fixation du fragment anticorps du NW-224 (fragment Fab) à l'antigène et celle de son fragment Fc aux récepteurs R Fc encore libres avant saturation . Ceci confirme l'hypothèse d'un effet stimulateur de l'activité métabolique du neutrophile par l'anticorps monoclonal NW-224 , non lié à la fixation de son fragment Fc sur les RFc (lorsque ceux-ci sont saturés par une autre IgG) .

Dans le cas du neutrophile de la salive (figure 25-a et 26-b), il n'existe pas de différence significative entre, la réponse à une stimulation par l'anticorps NW-224 avant, ou après la saturation par des IgG de ses sites récepteurs du fragment Fc .

Par ailleurs , la comparaison des résultats obtenus avec les deux sous populations de neutrophiles montre que dans le cas des cellules non saturées (figure 25-a et 26-a) une même dose du NW-224 stimule l'activation du neutrophile de la circulation alors qu'il n'a aucun effet sur celui de la salive, par rapport à un taux d'activité de base, mesuré en présence de tampon HBSS seul. De plus ces résultats semblent mieux visualisés dans la comparaison de ces deux neutrophiles après saturation par une IgG de souris (figure25-b et 26-b) .

En résumé de ces premières études sur les effets biologiques de l'Ac monoclonal NW-224 sur le neutrophile, nous pouvons déjà conclure que :

* Le NW-224 exerce un effet stimulateur très important sur le neutrophile de la circulation ,neutrophile dit "au repos " alors qu'il ne possède, à ce niveau , pratiquement plus aucun effet sur celui de la salive , cellule dite "hyperactive" .

* Cet Ac monoclonal présente un effet "dose-réponse" sur l'activation de ce leucocyte , avec un effet optimal à la dose de 50 $\mu\text{g/ml}$.

* Enfin cet Ac monoclonal agit en synergie avec le FMLP, pour provoquer une hyperactivation de cette cellule .

Notre hypothèse concernant l'effet de l'Ac. monoclonal NW-224 sur cette fonction du neutrophile est la suivante : De la liaison Antigène-Anticorps sur le neutrophile résulte une stimulation presque immédiate de l'activité métabolique de cette cellule , exprimée par le relargage des produits de la respiration dans le milieu extracellulaire , cette stimulation n'ayant pas été observée sur le neutrophile de la salive, considéré comme une cellule déjà activée par certains médiateurs chimiques . La migration du neutrophile du système circulatoire vers la cavité buccale est justifiée par sa réponse à un stimulus dont l'origine se trouve liée à la présence en abondance et de façon permanente, de bactéries au niveau de la plaque dentaire .

C'est en référence à cette propriété physiologique normale du neutrophile *in vivo*, suggérant son passage de l'état de repos , au niveau sanguin, à un état d'hyperactivité dans le système extracirculatoire , que nous avons choisi d'étudier le rôle de l'Ac monoclonal NW-224 dans la stimulation de la migration du neutrophile circulant *in vitro* .

2 -EFFET DU NW-224 SUR LA STIMULATION DE LA MOBILITE DU NEUTROPHILE

Le principe de la technique utilisée se base sur la propriété du neutrophile à traverser, sous l'effet d'un facteur chimioattractant tel que, le FMLP, différentes membranes de porosités voisines de celles contenues dans les vaisseaux sanguins, cela dans un appareil appelé " Chambre de Boyden " . Dans un premier temps, les cellules ont été prétraitées par l'Ac monoclonal NW-224 seul, par le FMLP seul ou par les deux réactifs simultanément à des concentrations de l'Ac. monoclonal respectivement de 25, 50, 100 et 200 µg/ml en présence d'un témoin négatif correspondant à l'incubation des cellules avec du tampon HBSS seul . Après une heure d'incubation à 37° C. , les cellules ayant traversé toutes les membranes sont figées par fixation à l'alcool sur la dernière membrane , colorées au GIEMSA puis observées au microscope optique .

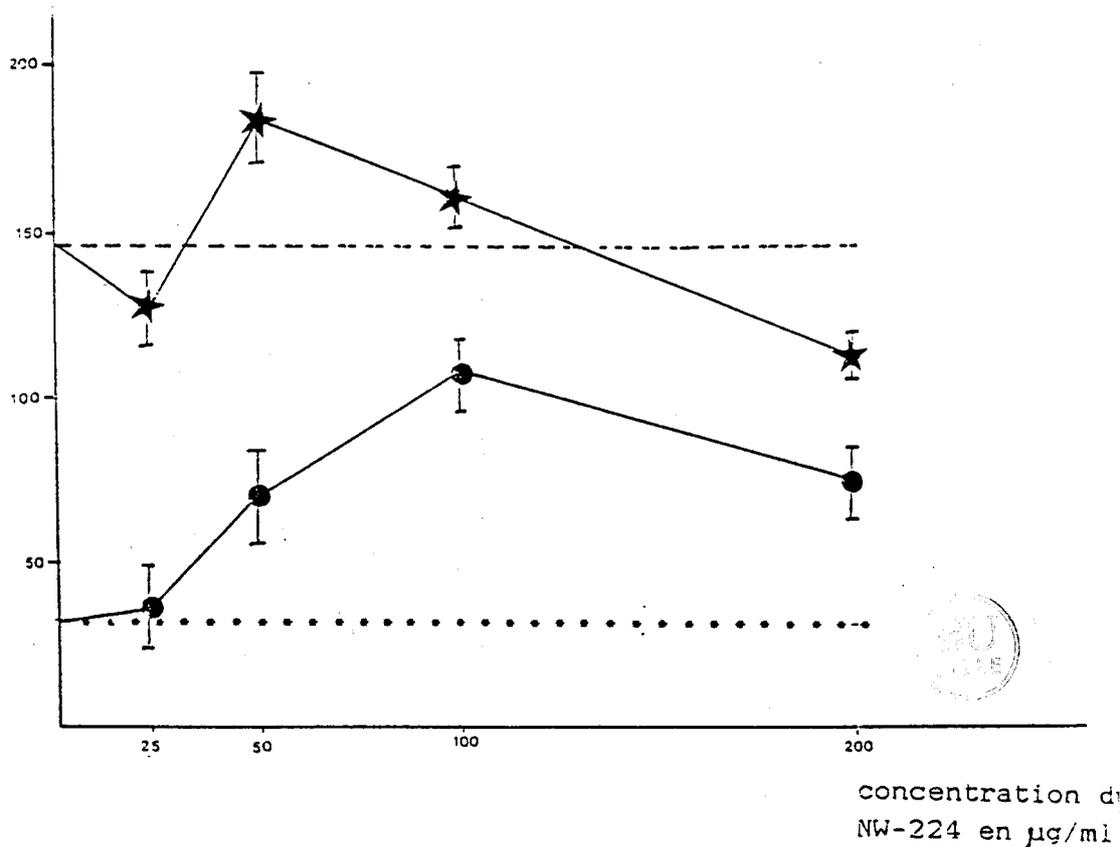
Tels qu'ils ont été schématisés, sur la figure 27 , les résultats observés, représentent le nombre de cellules présentes par champ optique, c'est à dire les cellules qui ont pu traverser l'ensemble des barrières constituant la "Chambre de Boyden", après l'incubation avec différents traitements . Nous pouvons, en premier lieu, constater un effet dose-réponse de l'Ac. monoclonal NW-224 sur la stimulation de la migration spontanée du neutrophile à travers différentes membranes . Cette stimulation reste, malgré tout, inférieure à celle induite par le FMLP seul . Alors que l'association " NW-224 - FMLP " semble présenter une réponse encore plus importante que celle induite par le FMLP seul . Le NW-224 présente donc un effet de stimulation , cumulé à celui du FMLP, sur le chimiotactisme du neutrophile .

* De cette étude, nous pouvons déduire qu'en se fixant à l'antigène, qui a induit sa production, le NW-224 exerce un effet stimulateur de l'activation de la migration spontanée du neutrophile circulant *in vitro* . De plus il aurait également

EFFET DU NW-224 SUR LA STIMULATION DE LA
MIGRATION SPONTANEE DU NEUTROPHILE
HUMAIN EN COMPARAISON AVEC L'EFFET
CHIMIOTACTIQUE DU FMLP

FIGURE 27

NOMBRE DE CELLULES PAR
CHAMP OPTIQUE



TRAITEMENT DES NEUTROPHILES PAR LE NW-224 SEUL (●) ET PAR LE
NW-224 EN PRESENCE DE FMLP A 10⁻⁵ (★) PAR RAPPORT AU TEMOIN
HBSS SEUL (.....) ET FMLP 10⁻⁵ SEUL (-----)

un effet synergique avec un chimioattractant tel que le FMLP . Ces constatations suggèrent, d'une part, qu'il existe un rapport étroit entre la fixation du NW-224 sur l'antigène ayant induit sa production et le déclenchement du mécanisme responsable de la mobilité de ce polynucléaire .

* D'autre part, du fait de l'action synergique de l' Ac monoclonal avec le FMLP, nous pouvons penser que ces deux facteurs ne reconnaissent pas la même structure à la surface du neutrophile circulant .

3 - EFFET DU NW 224 SUR LA PROPRIETE PHAGOCYTAIRE DU NEUTROPHILE

in vitro

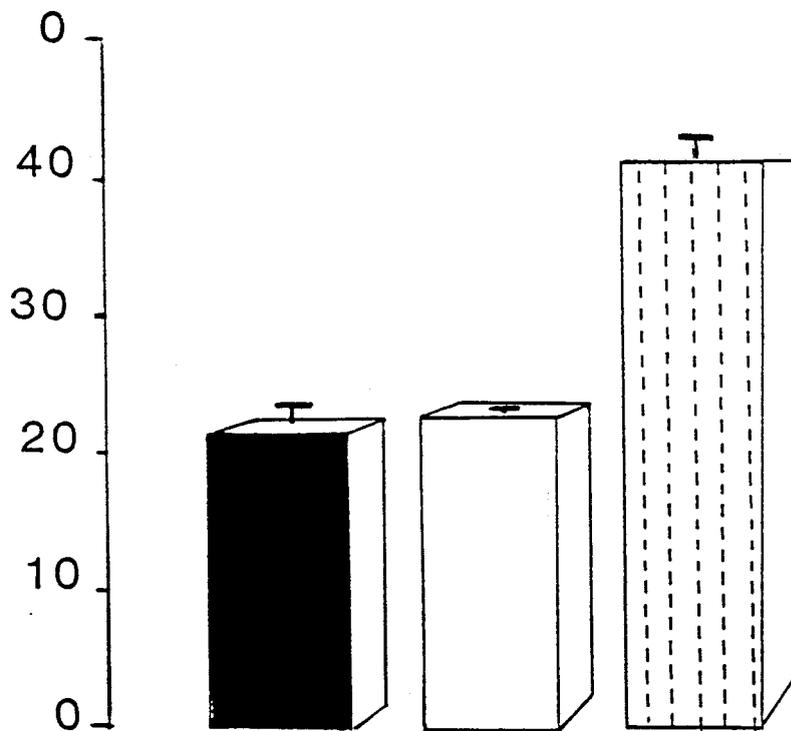
Dans la succession logique des fonctions du neutrophile intervenant au cours d'une réaction inflammatoire *in vivo* ; après son activation métabolique, sa diapédèse et sa migration vers le site infectieux, ce polynucléaire entre en contact avec le microorganisme afin de l'ingérer par phagocytose .

C'est cette propriété physiologique du neutrophile que nous avons cherché à tester, sous l'effet du monoclonal NW-224, par comparaison à un second anticorps témoin , anti récepteur IgE de L'éosinophile : le BB10 et un traitement sans anticorps . Comme nous l'avons déjà décrit dans le chapitre matériel et méthodes, cette technique inspirée de la méthode de Detito , a pour principe l'incubation du polynucléaire neutrophile prétraité par l'Ac monoclonal NW-224, par le BB10 ou le tampon HBSS, avec un parasite le *L.b.b. (Leishmania brasiliensis brasiliensis.)* . Après une demi-heure d'incubation à 37° C., en milieu de GLSH-PS , les cellules cytocentrifugées sur une lame de verre , sont fixées pendant une minute au méthanol, colorées au GIEMSA pour être observées puis comptabilisées au microscope optique .

ETUDE DE L'EFFET DU NW-224 SUR LA
PHAGOCYTOSE D UN PARASITE LBB
PAR LE NEUTROPHILE HUMAIN

FIGURE 28

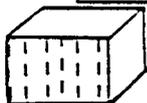
POURCENTAGE DE CELLULES AYANT PHAGOCYTE
AUMOINS UN PARASITE



NEUTROPHILES TRAITES AVEC DU HBSS



NEUTROPHILES TRAITES AVEC LE BB10 (50µG/ML)



NEUTROPHILES TRAITES AVEC LE NW-224 (50µG/ML)

Les résultats, figurés sous forme de graphique (figure 28) représentent le pourcentage de neutrophiles, par champ optique, ayant ingéré au moins un parasite . L'étude des résultats obtenus, effectuée par le test de comparaison des moyennes, montre une différence significative entre la phagocytose du neutrophile traité par le NW-224 ou incubé avec l'Ac monoclonal BB10 .

Cette différence se caractérise par une augmentation de cette fonction du polynucléaire, consécutive au traitement par le NW-224, par rapport à un témoin négatif effectué en HBSS , alors que la comparaison des résultats obtenus avec le BB10 et le tampon HBSS ne montre pas de différence significative .

En résumé, nous pouvons déduire que :

***l'anticorps monoclonal NW-224 agit en stimulant les propriétés de phagocytose du neutrophile .**

4 - ETUDE DE LA LIBERATION DE L'ENZYME MYELOPEROXYDASE PAR LE NEUTROPHILE PREINCUBE AVEC LE NW-224

L'observation d'un effet stimulateur du NW-224 sur l'activation métabolique, le chimiotactisme et la phagocytose du neutrophile, nous a amené, à étudier son effet sur la libération d'une enzyme granulaire : la myéloperoxydase , par ce polynucléaire . Le choix de cette enzyme par rapport à toutes celles contenues dans les granules primaires et secondaires de ce granulocyte , telles que les hydrolases acides, les muriminidases (lysozymes) ou la lactoferrine, nous a été dicté par le rôle important de cette enzyme dans certaines fonctions spécifiques du neutrophile . Le principe de la technique utilisée se base sur le dosage de la quantité de peroxydase libérée par le neutrophile prétraité par l'Ac monoclonal NW-224 en comparaison avec celui prétraité par une IgG témoin ou du tampon HBSS .

Les mesures de la densité optique effectuées par un lecteur de plaques ELISA , après incubation pendant 15 à 20 minutes du surnageant cellulaire en présence d'un substrat de la peroxydase : l'OPD (OrthoPhénylDiamine) , représentant les résultats de la réaction enzymatique " myéloperoxydase libérée - OPD " .

La figure 29 résume ces résultats, représentés en pourcentage d'enzyme libérée par le neutrophile vivant par rapport au contenu intracellulaire, considéré comme total, par suite de l'éclatement de la cellule par le Triton X 100 ou aux ultra-sons

Notre première constatation est, que l'Ac monoclonal NW-224 exerce un effet stimulateur sur la libération de myéloperoxydase par le neutrophile . Cet effet est observé à partir d'une concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à la dose de 100 $\mu\text{g/ml}$ en passant par un effet maximum à la dose de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Par sa fixation à l'antigène qu'il reconnaît sur le neutrophile, l'Ac monoclonal NW-224 provoque une stimulation très importante du relargage de la myéloperoxydase , par ce polynucléaire *in vitro

POURCENTAGE DE LIBERATION DE PEROXYDASE
 PAR RAPPORT A UNE LYSE CELLULAIRE TOTALE

EFFET DU NW-224 SUR LA STIMULATION DE
LA LIBERATION DE MELOPEROXYDASE

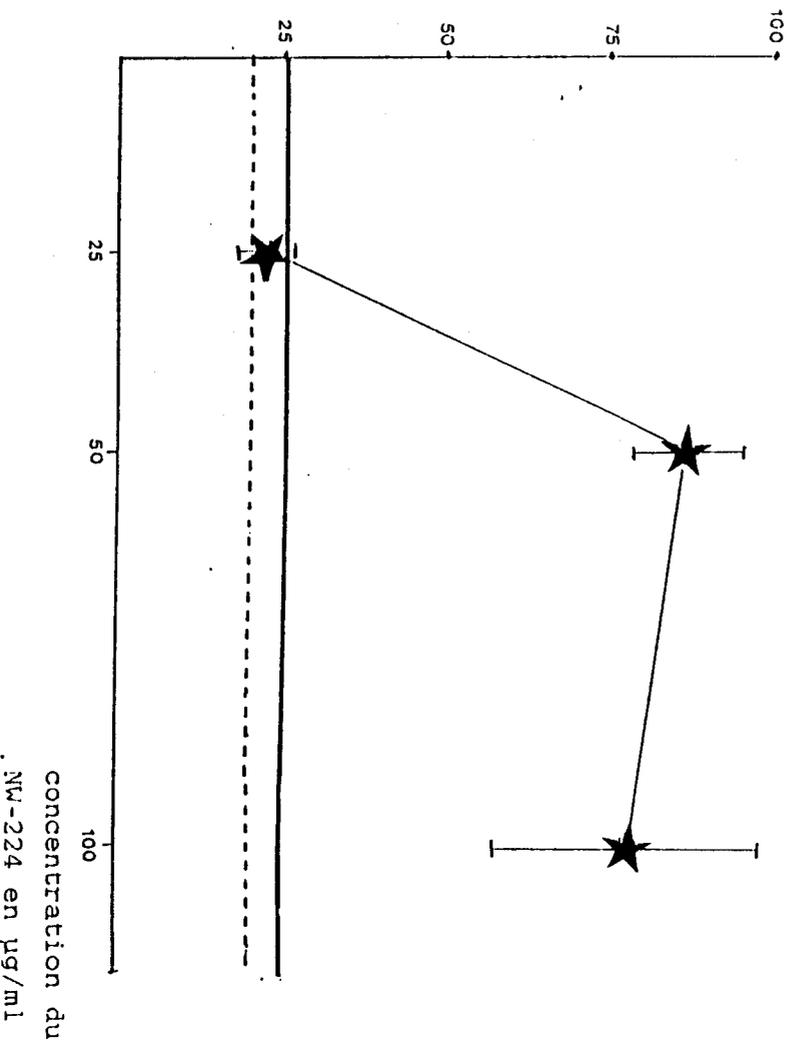


FIGURE 29



--- TEMOIN TAMPON HBSS

— ACM ANTI IGG HUMAINE



ACM NW-224

PREMIERES CONCLUSIONS

A la suite de l'ensemble de ces études biochimiques , immunologiques et biologiques apparaissent deux caractéristiques essentielles de l'anticorps monoclonal NW-224 anti-neutrophiles produit :

1- Une caractéristique immunologique :

Sa reconnaissance de façon spécifique du neutrophile par rapport à l'éosinophile , permet de confirmer l'existence d'une hétérogénéité antigénique des polynucléaires granulocytes humains , hétérogénéité déjà mise en évidence auparavant sur les granulocytes de souris^{88*} .

Ceci suggère, donc, une composition antigénique de la surface du neutrophile différente de celle de l'éosinophile . De plus, l'antigène reconnu par le NW-224 sur le neutrophile serait de l'ordre de 14,5 Kd , soit un poids moléculaire relativement faible par rapport à l'ensemble des anticorps monoclonaux produits jusqu'à présent.

2- Une caractéristique biologique et fonctionnelle

La fixation de l'Ac monoclonal NW-224 à l'antigène ayant induit sa production, provoque la stimulation du mécanisme responsable du déclenchement de l'activation générale de ce polynucléaire spécialisé dans l'intervention au cours des réactions immunologiques de défenses anti microbiennes ou antivirale, ou encore, dans l'inflammation .

§ - Cette fixation du NW-224 provoque chez le neutrophile une réaction d'hyperactivation dans toutes ces fonctions métaboliques (la respiration, le chimiotactisme, la diapédèse puis phagocytose et la libération de myéloperoxydase) , à l'image de celle induite par des micro-organismes envahisseurs *in vivo*

§ - Nous avons pu également observer un effet "dose - réponse " de ce monoclonal sur l'activation du neutrophile .

La diminution progressive de cet effet à partir d'une dose supérieure à 50 $\mu\text{g/ml}$, jusqu'à son absence totale à 200 $\mu\text{g/ml}$ suggère que le neutrophile présente un seuil de sensibilité au delà duquel le NW-224 n'exerce plus aucun effet .

§ - Cette observation, associée à la première, permet une approche de l'explication des résultats obtenus avec le neutrophile de la salive . Ce neutrophile présent dans la cavité buccale serait en état d'"hyperactivation" stimulée par son combat permanent des bactéries de la plaque dentaire, donc insensible au stimulus du NW-224 .

III. PRODUCTION ET PURIFICATION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-EOSINOPHILES HUMAINS : L' EO6 - 71

A - ETUDE IMMUNOLOGIQUE

1- CLONAGE ET PURIFICATION

Des six puits positifs notés EO6-71, EO6-145, EO6-146, EO6-247, EO6-310, et EO6-352 issus de la seconde hybridation , nous avons sélectionné préférentiellement le clone EO6-71, du fait de sa positivité très élevée en ELISA par rapport aux autres surnageants de culture . Sa fixation à l'antigène à une dilution allant jusqu'au 1/10.000.000 (figure 30) nous a poussé à son clonage , sa production massive en ascite puis à sa purification .

2- ISOTYPE : DETERMINATION

Comme le montre la figure 31 , résumant les résultats de la double diffusion en gel par la technique Ouchterlony , le clone EO6-71 produit une immunoglobuline de type M
Ces résultats ont été confirmés par ELISA expérience dont les données ont été transcrites sur le tableau figure 18 : L'Ac monoclonal EO6-71 est donc bien une IgM.

3- SPECIFICITE DE L'AC.MONOCLONAL EO6-71

L'étude de la spécificité de cet Ac monoclonal vis à vis de l'éosinophile a été effectuée en ELISA puis contrôlée par cytofluorométrie .

Ces deux tests se complémentarisent dans la mesure où, le premier a pour principe une reconnaissance par l'Ac monoclonal d'un extrait antigénique solubilisé par un détergent , alors que

FIGURE : 30

CLONES POSITIFS DE L'HYBRIDATION EO-6 :
DEGRES DE POSITIVITE MAXIMUM EN ELISA

	EO6 - 71	EO6-145	EO6-146	EO6-247	EO6-310	EO6-352	SNG SP20
0-1	1,9995±0,020	1,605±0,090	1,704±0,033	1,801±0,105	1,341±0,084	1,971±0,341	0,310±0,014
0-2	1,986±0,015	1,631±0,095	1,201±0,080	1,203±0,108	0,931±0,071	1,631±0,218	0,204±0,090
0-3	1,741±0,013	1,102±0,010	0,950±0,034	1,000±0,010	0,806±0,029	1,070±0,034	0,170±0,005
0-4	1,432±0,045	0,809±0,013	0,855±0,071	0,973±0,025	0,455±0,017	0,844±0,104	0,403±0,060
0-5	1,150±0,09	0,404±0,045	0,631±0,036	0,434±0,077	0,308±0,024	0,455±0,208	0,109±0,078
0-6	1,002±0,060	0,080±0,090	0,184±0,041	0,101±0,088	0,067±0,009	0,301±0,081	0,084±0,013
0-7	0,991±0,070	0,102±0,018	0,071±0,017	0,050±0,043	0,234±0,081	0,102±0,018	0,0125±0,098
0-8	0,873±0,018	0,053±0,060	0,183±0,042	0,072±0,045	0,197±0,056	0,063±0,023	0,134±0,048



leurs exprimées DO à 490 nm

Témoins négatifs : 0,195 ± 0,057

FIGURE 31

DETERMINATION DE L'ISOTYPE DE L'AC.

MONOCLONAL EO6-71 PAR OUCHTERLONY

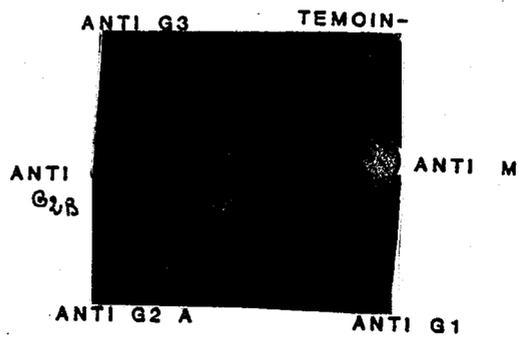


FIGURE 32

SPECIFICITE EN ELISA DES CLONES DE L'HYBRIDATION E06 VIS A VIS DE CERTAINS LEUCOCYTES HUMAINS

	NEUTROPHILES	EOSINOPHILES	MONOCYTES	LYMPHOCYTES	PLAQUETTES SANGUINES
E06-71	0.531 ± 0.038	1.641 ± 0.015	0.350 ± 0.072	0.410 ± 0.048	1.472 ± 0.290
E06-145	1.012 ± 0.047	1.412 ± 0.072	0.991 ± 0.110	0.910 ± 0.055	0.616 ± 0.015
E06-146	1.431 ± 0.019	1.391 ± 0.079	1.002 ± 0.115	0.942 ± 0.102	0.231 ± 0.034
E06-247	1.210 ± 0.116	1.120 ± 0.012	1.112 ± 0.089	0.841 ± 0.087	0.702 ± 0.036
E06-310	1.010 ± 0.091	0.991 ± 0.178	1.076 ± 0.013	0.904 ± 0.104	0.599 ± 0.124
E06-352	0.834 ± 0.204	1.204 ± 0.034	0.334 ± 0.059	0.218 ± 0.023	0.106 ± 0.018
TAMPON PBS	0.045 ± 0.014	0.089 ± 0.013	0.101 ± 0.041	0.064 ± 0.030	0.051 ± 0.016
ASCITE DE SOURIS SP ₂ O	0.190 ± 0.049	0.186 ± 0.054	0.150 ± 0.032	0.097 ± 0.008	0.243 ± 0.073
SURNAGEANT SP ₂ O	0.288 ± 0.034	0.166 ± 0.016	0.273 ± 0.007	0.310 ± 0.024	0.178 ± 0.024

VALEURS EXPRIMEES EN DO à 490 nm



le second correspond à une fixation de l'Ac sur la cellule entière et viable . Le tableau figure 32 représente en densité optique , les résultats de la réaction enzymatique résultant de la reconnaissance de l'antigène extrait de différentes sous populations leucocytaires , par l'Ac monoclonal EO6-71 . Bien qu'il ait été produit par immunisation de souris avec des éosinophiles , l'Ac monoclonal EO6-71 semble reconnaître aussi bien l'éosinophile que les plaquettes sanguines .

Sa fixation aux lymphocytes, aux monocytes ou aux neutrophiles est non significative par comparaison aux témoins négatifs PBS ou sérum de souris saines . Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus en cytofluorométrie (figure 33) . La fluorescence observée sur les éosinophiles et les plaquettes présente une différence significative par rapport à celle enregistrée sur les monocytes, les lymphocytes ou les neutrophiles dont l'intensité rejoint celle du témoin négatif (tampon HBSS) .

Ces résultats nous ont permis de suspecter la reconnaissance par l'EO6-71 d'une structure commune à l'éosinophile et à la plaquette : Le récepteur IgE (Fc_E R₂)

4- TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE EN CYTOFLUOROMETRIE

Afin de comparer l'Ac monoclonal EO6-71 par rapport au BB10, anticorps reconnaissant également le récepteur IgE de l'éosinophile humain, nous avons utilisé la technique de cytofluorométrie .

Dans un premier temps nous avons effectué une comparaison de la fluorescence de l'EO6-71 et du BB10, sur les éosinophiles d'un même patient (figure 34) puis, nous avons comparé les résultats obtenus sur les éosinophile (figure 35a) et sur la lignée U.937, lignée Fc_ER positive (figure 35b) .

Dans les deux cas, nous avons constaté, qu'à une concentration identique des deux Ac monoclonaux, l'effet du BB10 mesuré en pourcentage de cellules fluorescentes était nettement plus élevé que celui de l'EO6-71 .

**ETUDE DE LA SPECIFICITE DU CLONE EO6-71 ET
NW-224 MESURE EN POURCENTAGE DE
CELLULES FLUORESCENTES (au Cytofluoromètre)**

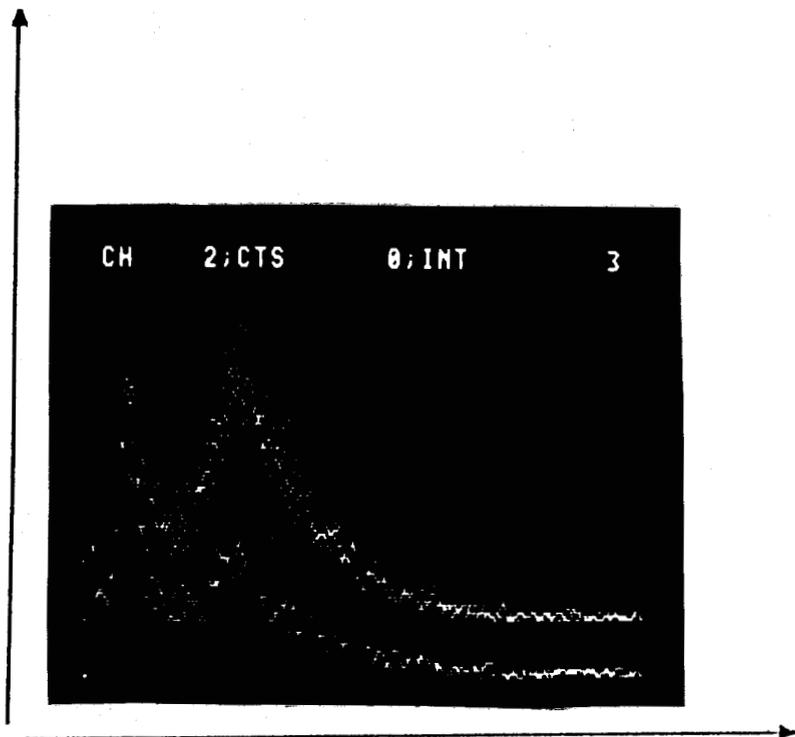
	NEUTROPHILES	EOSINOPHILES	MONOCYTES- LYMPHOCYTES	PLAQUETTES
EO6-71	9,54 ± 0,19	38,61 ± 6,25	6,07 ± 0,17	35,43 ± 0,32
NW -224	67,61 ± 8,03	12,60 ± 0,16	6,45 ± 0,24	3,11 ± 0,19
Ac M ANTI-PLAQUETTE AP2	4,12 ± 0,22	5,70 ± 0,13	2,4 ± 0,78	85,42 ± 9,15
BB 10 ANTI-RECEPTEUR IgE	5,61 ± 0,08	59,84 ± 8,32	7,71 ± 0,06	41,02 ± 5,09
TEMOIN NEGATIF SURNAGEANT SP20	6,78 ± 0,01	3,49 ± 0,35	7,44 ± 0,4	8,12 ± 0,07
TEMOIN NEGATIF TAMPON PBS	3,22 ± 0,18	3,71 ± 0,95	6,56 ± 1,32	5,43 ± 0,78

FIGURE 33



COMPARAISON EN CYTOFLUORIMETRIE DU POURCENTAGE
D'EOSINOPHILES FLUORESCENTS TRAITES PAR
LE BB10 OU L'EO6-71

INTENSITE
DE FLUORESCENCE

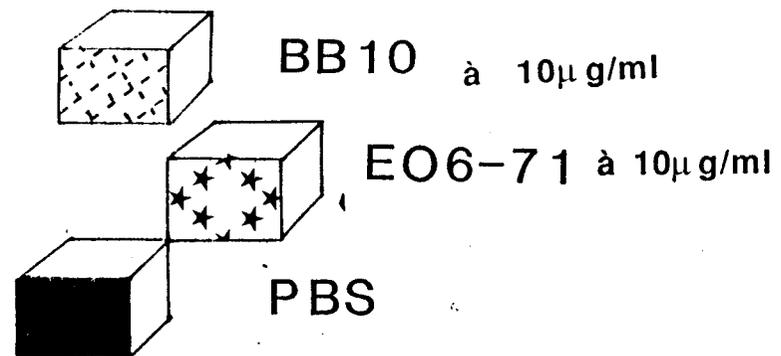
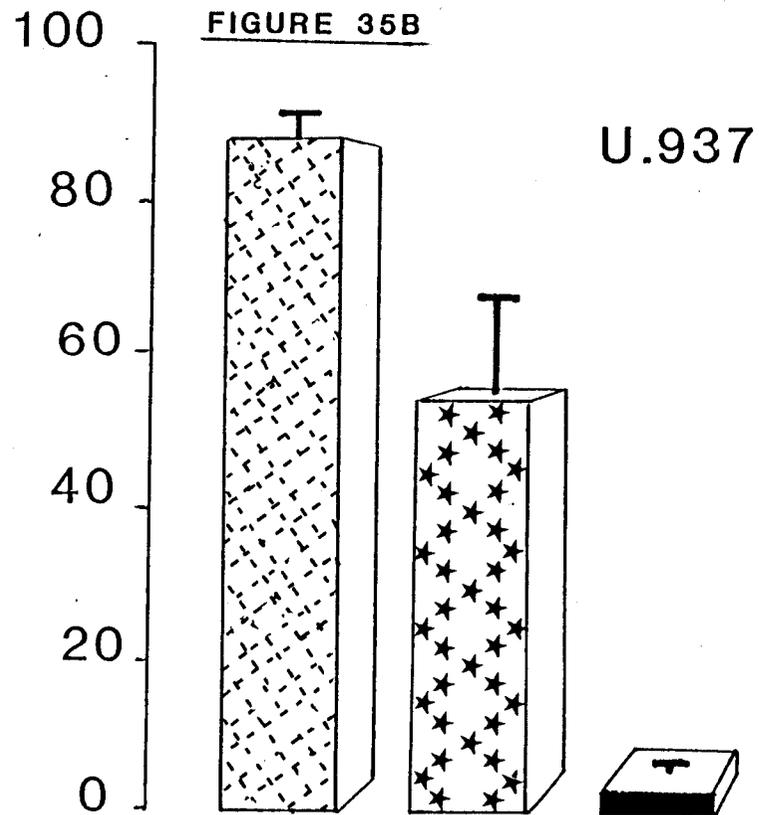
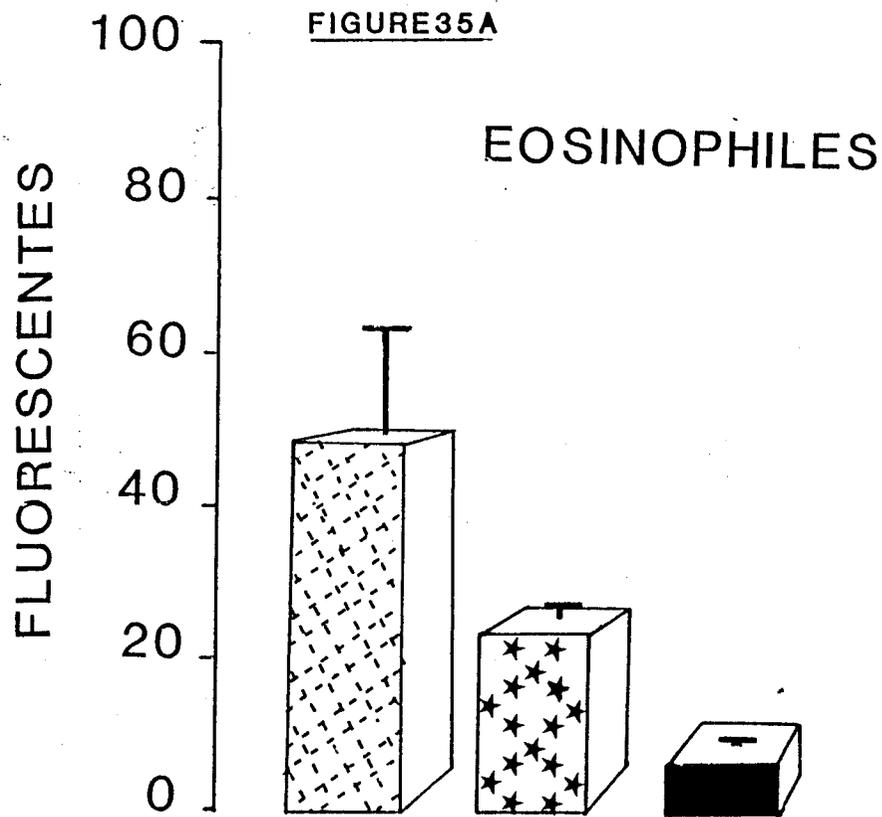


% DE CELLULES
FLUORESCENTES

EO6-71 = 23,58 % \pm 3,44%

BB10 = 47,2 % \pm 10,71 %





Néanmoins, par comparaison au traitement en tampon témoin, l'EO6-71 reconnaît ces deux populations cellulaires de façon significative .

A- ETUDE BIOLOGIQUE ET DETERMINATION BIOCHIMIQUE DE L'ANTIGENE RECONNU PAR L'EO6-71

1- TEST D'INHIBITION DES ROSETTES IgE PAR L'EOSINOPHILE

A la lumière des travaux effectués sur ce granulocyte grâce au BB10 ^{20 21 22} premier Ac . monoclonal reconnaissant le récepteur IgE de surface de l'éosinophile, nous avons cherché à déterminer le rôle de l'EO6-71 sur la formation des rosettes IgE par l'éosinophile humain . Le principe de cette technique se base sur la propriété de l'éosinophile à fixer l'IgE " coatée " sur des globules rouges de mouton par ses récepteurs de surface spécifiques pour l'IgE (Fc_εR) .

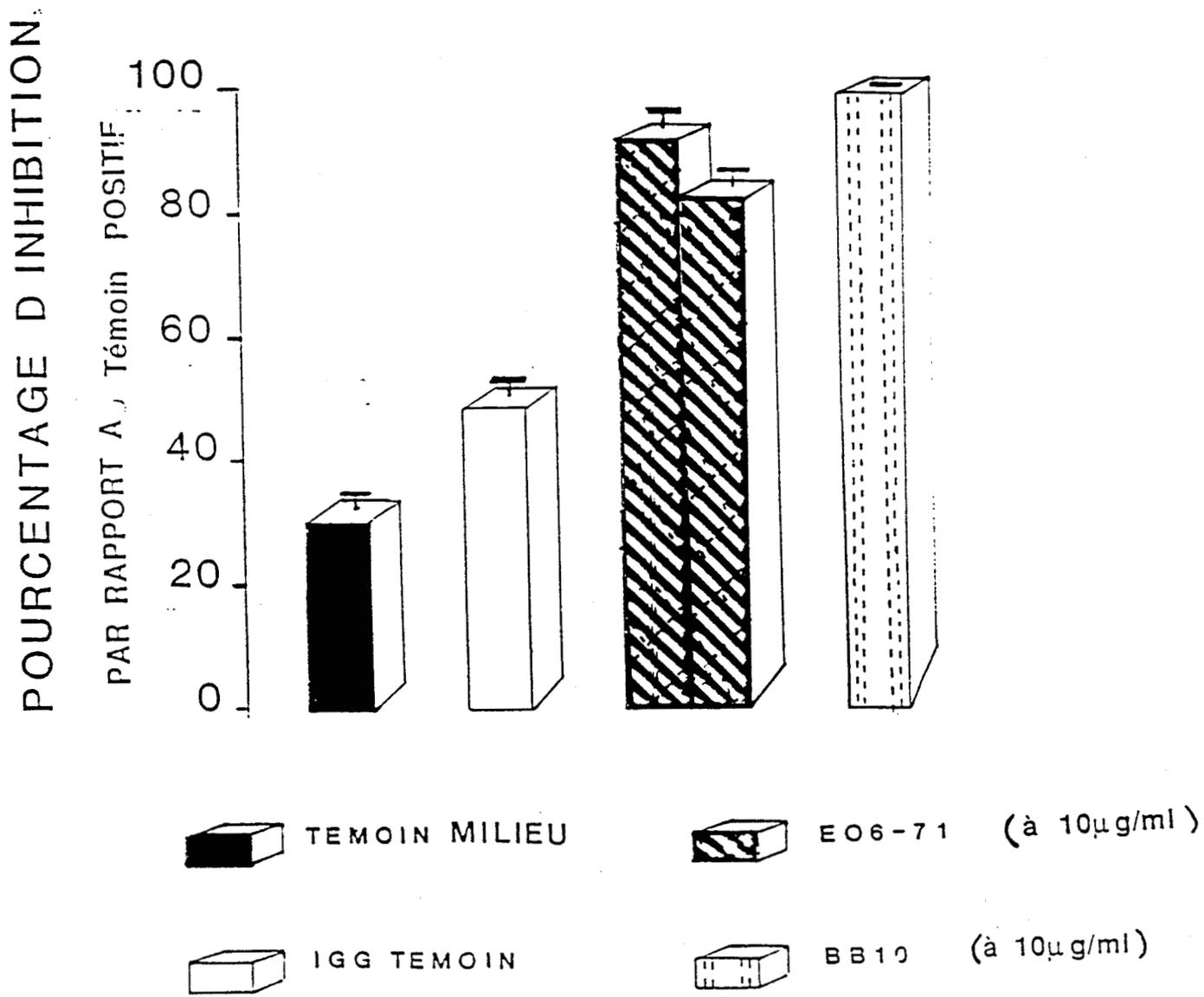
C'est ainsi que des globules rouges de moutons préalablement sensibilisés par des IgE humaines myélomateuses , sont mis en incubation avec des éosinophiles ayant subi différents traitements soit par le BB10, soit par une IgM témoin , par du milieu ou encore par l'Ac. monoclonal EO6-71 .

Lorsque les récepteurs IgE de surface sont libres, les globules rouges adhèrent aux cellules de façon à former des rosettes . Par contre dans le cas où ces récepteurs sont bloqués, le nombre de rosettes ayant pu se former se trouve diminué . Ce qui a déjà été démontré par M. Capron et coll. ^{21, 22}) , lorsque l'éosinophile est traité par l'Ac monoclonal anti-FcR : le BB10

Les résultats que nous avons représentés sous forme de graphe (figure 36) montrent que l'Ac monoclonal EO6-71 inhibe de manière très significative la formation de rosettes IgE à un

INHIBITION DE LA FORMATION DE
ROSETTES PAR L'EO6-71
SUR L'EOSINOPHILE

FIGURE 36



niveau sensiblement égal à celui du BB10 .

Ces résultats ayant permis de considérer des similitudes entre la structure antigénique reconnue par le BB10 et l'EO6-71, nous ont amené à une étude biochimique comparative des molécules de surfaces de l'éosinophile reconnue par le BB10 et l'EO6-71 .

2- COMPARAISON DU BB10 ET DE L'EO6-71 EN IMMUNOELECTROTRANS -FERT : "IMMUNOBLOTTING"

Dans un premier temps et afin de visualiser les antigènes reconnus par l'EO6-71 et le BB10, nous avons déposé en migration sur gel de polyacrylamide des extraits d'antigènes d'éosinophiles provenant d'un même patient . Puis à la suite d'un électrotransfert la feuille de nitrocellulose découpée est placée en incubation avec les Ac monoclonaux BB10, EO6-71 et une IgM témoin (figure 37) . De nombreuses expériences similaires ont , par la suite , pu être effectuées sur des éosinophiles provenant de donneurs différents (figure 38) .

Dans tous les cas , les résultats obtenus se rejoignent et laissent à croire , à la reconnaissance par le BB10 et l'EO6 -71 de deux épitopes portés par des antigènes de poids moléculaires différents . Le premier, fixé par le BB10 serait de poids moléculaire voisin de 30.000 Dalton alors que celui de l'EO6-71 serait plutôt de l'ordre de 45 à 50.000 Dalton .

Ces observations , jointes à celles du test précédent , nous ont permis de formuler deux hypothèses concernant les rapports existant entre ces deux monoclonaux .

§ - BB10 et EO6-71 reconnaissent deux structures différentes mais faisant partie, toutes deux, du récepteur IgE

FIGURE 37

IMMUNOELECTROTRANSFERT

M

BB 10

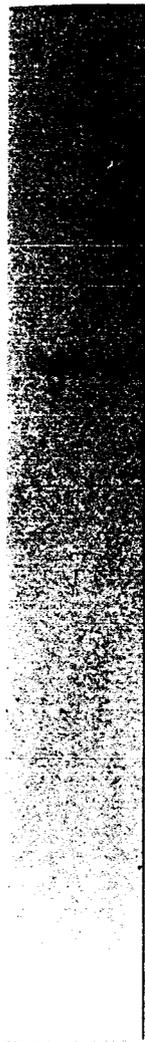
E06-71

IGM
TEMOIN

96.000
67.000
40.000
28.000
4.000

30.000

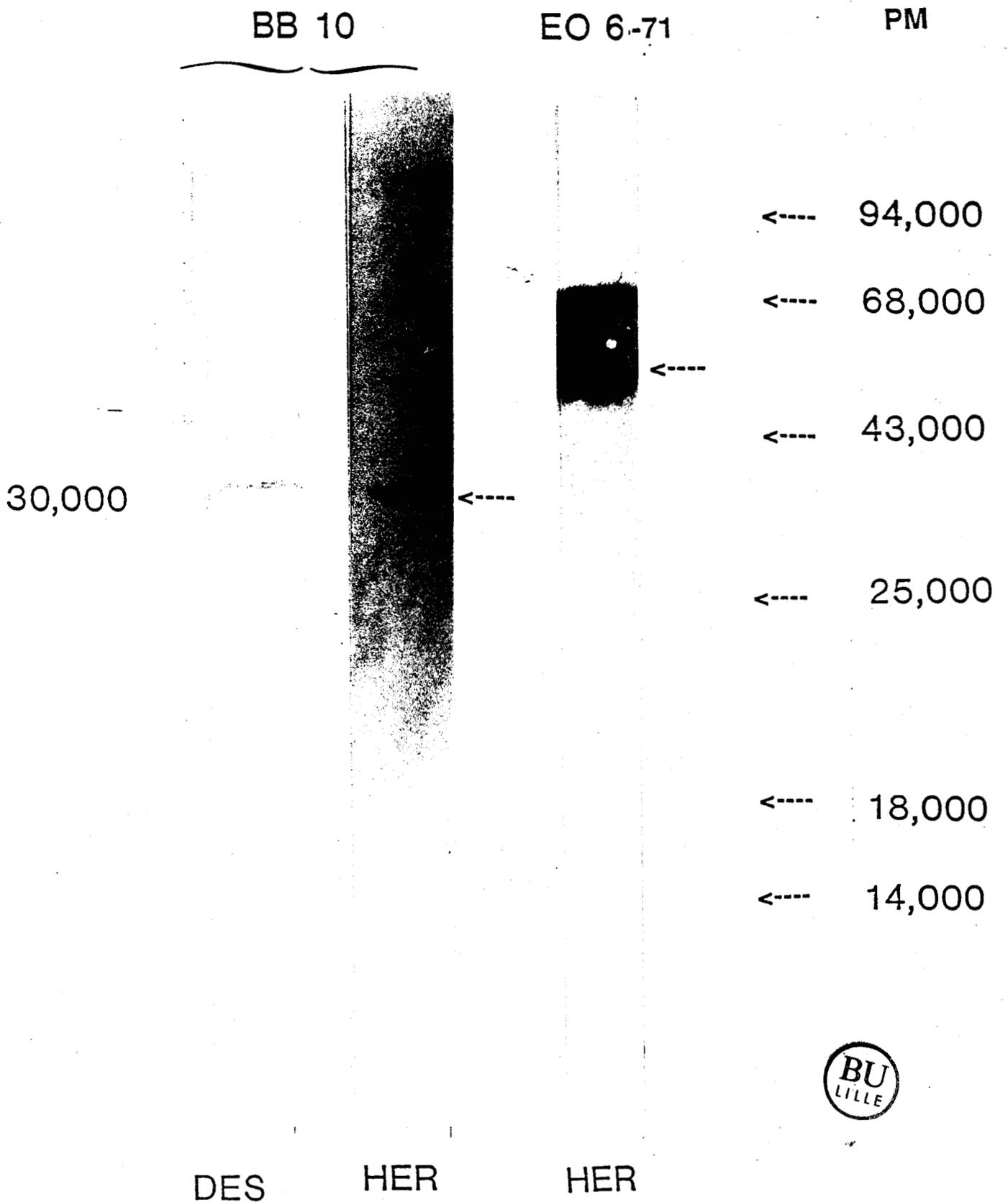
45.000



EOSINOPHILES D'UN MEME
PATIENT

WESTERN BLOTTING

FIGURE 38 :



EOSINOPHILES DE PATIENTS DIFFERENTS;

§ - *L'EO6-71 reconnaît une fraction antigénique ne faisant pas partie du récepteur IgE, mais suffisamment rapproché de lui, pour que sa configuration spatiale puisse être à l'origine d'un encombrement stérique du récepteur IgE expliquant l'inhibition de la formation de rosettes par l'éosinophile*

Du fait des similitudes entre le récepteur IgE des plaquettes et celui de l'éosinophile et afin de départager entre ces deux hypothèses, l'effet de l'EO6-71 a été étudié dans le mécanisme de cytotoxicité dépendante d'anticorps IgE et de plaquettes sanguines

3- INHIBITION DE LA CYTOTOXICITE DES PLAQUETTES : COMPARAISON ENTRE EO6-71 ET BB10

Comme le montre la figure 39, la préincubation des plaquettes avec l'EO6-71 inhibe de façon significative le pourcentage de cytotoxicité de ces cellules, similairement à l'effet du BB10 utilisé à la même concentration (100 µg/ml)

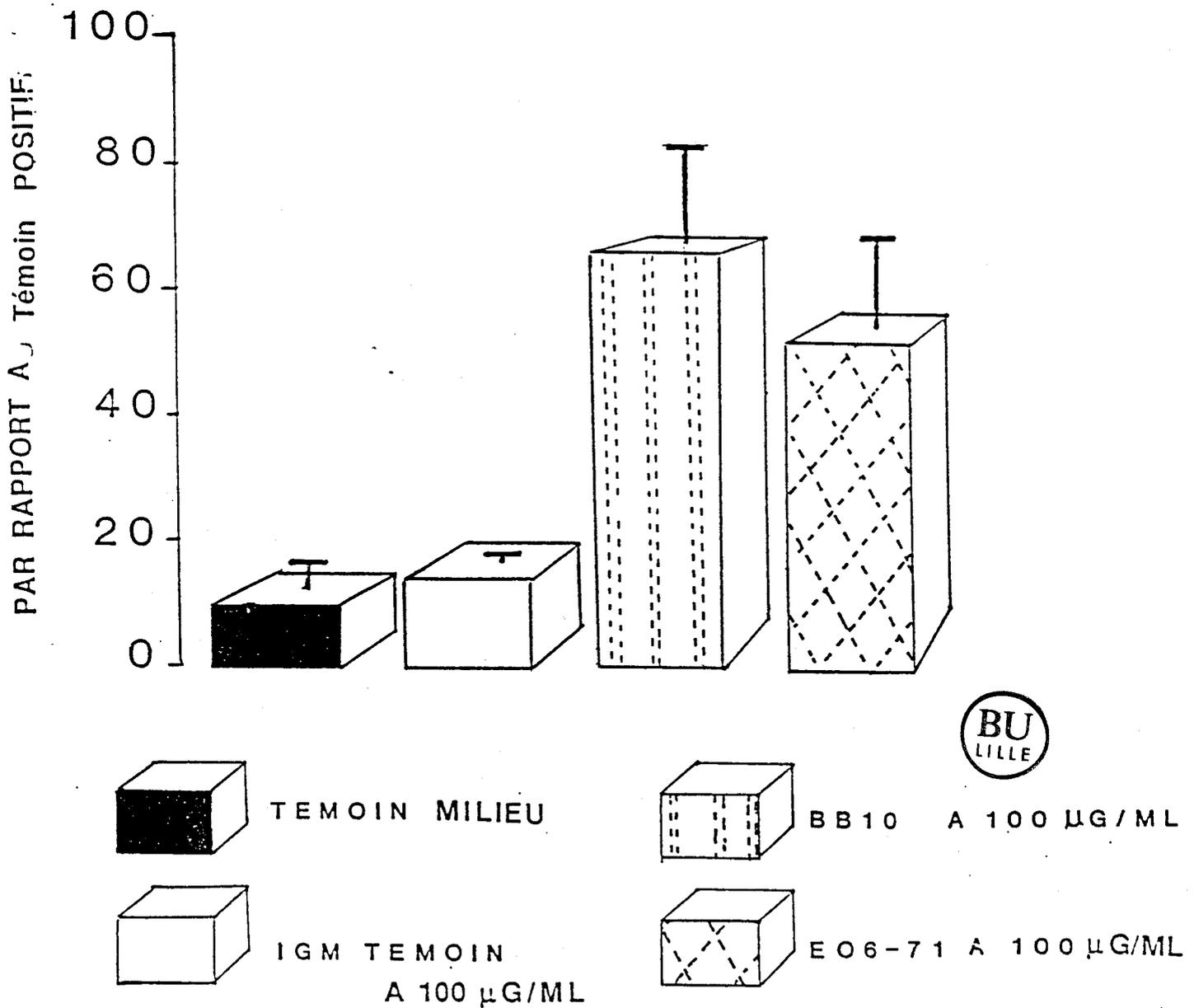
Afin de mieux distinguer des deux Ac monoclonaux, nous avons étudié l'existence d'un éventuel effet synergique entre eux, en comparant les effets cumulés et séparés de chacun de ces Ac monoclonaux.

Si le BB10 et l'EO6-71 utilisés à des doses suboptimales (10 µg/ml) inhibent faiblement la cytotoxicité des plaquettes (32 % - 30 %) par rapport au traitement témoin (5 %), lorsqu'on les place ensemble, à cette même concentration, leurs effets s'accumulent : puisque le pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité des plaquettes atteint 72 %. C'est ainsi que, grâce à ces résultats, nous avons pu appuyer et, peut être même, confirmer la première hypothèse de l'existence de fractions ou structures antigéniques différentes, mais complémentaires au niveau du récepteur IgE.

INHIBITION DU POUVOIR CYTOTOXIQUE DES PLAQUETTES

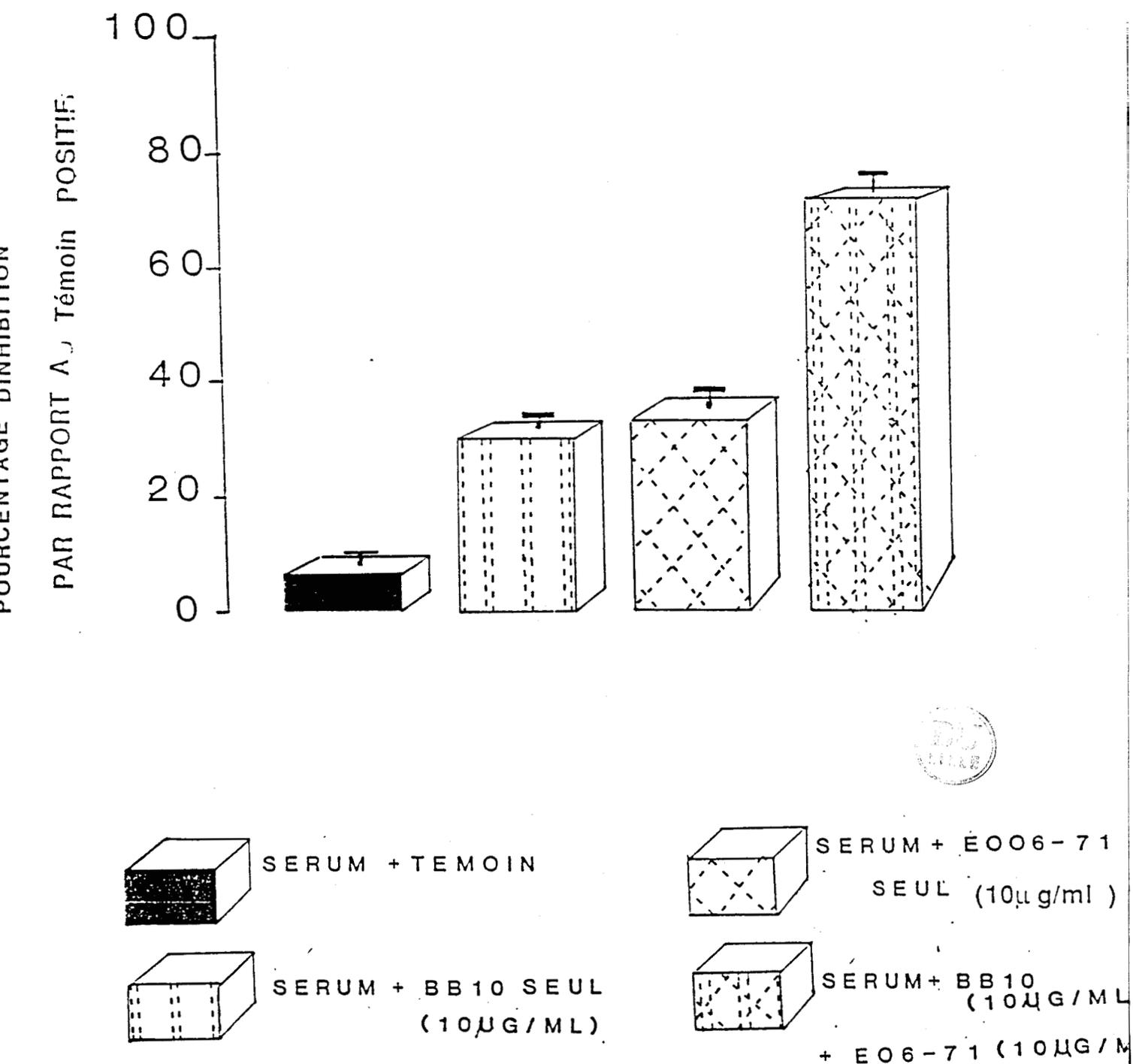
PAR L'ANTICORPS MONOCLONAL E06-71

FIGURE 39



ETUDE DE L'EFFET DE SYNERGIE ENTRE
LE BB10 ET L'EO6-71 SUR L'INHIBITION
DE LA CYTOTOXICITE DES PLAQUETTES
SANGUINES

FIGURE 40



DEUXIEMES CONCLUSIONS

De l'ensemble de cette étude immunologique, biochimique et biologique de l'Ac monoclonal EO6-71 et, en résumé de tous les tests comparatifs réalisés avec le BB10 , nous pouvons déjà décrire trois caractéristiques spécifiques de l'EO6-71.

1 - Sa reconnaissance préférentielle de l'éosinophile et des plaquettes sanguines par rapport aux autres leucocytes testés *in vitro* , en fait déjà un anticorps spécifique d'un antigène commun à ces deux types cellulaires .

2 - Son effet inhibiteur sur la formation des rosettes IgE par l'éosinophile , nous a permis de supposer sa spécificité pour le récepteur IgE .

3 - Par la détermination d'une distinction entre le poids moléculaire de l'antigène reconnu par le BB10 (30.000 Dalton) et par l'EO6-71 (45 à 50.000 Dalton) , nous avons pu confirmer la différence existante entre les épitopes reconnus par chacun de ces deux anticorps monoclonaux

De plus , du fait qu'ils agissent en synergie , en inhibant la cytotoxicité IgE dépendante des plaquettes , nous pouvons suggérer que les Ac. monoclonaux EO6-71 et BB10 reconnaissent des épitopes différent mais probablement complémentaires au niveau du récepteur IgE.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Avant même l'apparition des anticorps monoclonaux la préparation d'hétéroantisérums avait déjà permis de montrer l'existence d'antigènes spécifiques de certaines lignées leucocytaires comme cela était déjà le cas des antigènes particuliers aux leucémies aiguës lymphoblastiques ⁴¹. Certains auteurs(24, 80 à 86, 144 à 146, 135, 154.) ont même pu mettre en évidence l'existence d'allo-antigènes spécifiques des granulocytes neutrophiles qu'ils ont, au fur et à mesure de leur découverte, classés en système : NA, NB, NC, ND, NE, tableau (figure 41).

Aujourd'hui grâce aux anticorps monoclonaux, les progrès accomplis dans le domaine des antigènes leucocytaires en général et granulocytaires en particulier, sont remarquables. En l'espace de quelques années, un nombre considérable d'anticorps monoclonaux dirigés contre les éosinophiles et les neutrophiles humains ont déjà pu être produits. Leur abondance et leur variété nécessitent une étude à la fois analytique et comparative. Afin de mieux situer nos travaux par rapport à tous ceux que nous avons pu étudier dans la littérature et afin de faciliter cette comparaison, nous avons jugé utile de résumer l'ensemble des caractéristiques biochimiques, immunologiques et spécifiques de tous les anticorps monoclonaux que nous avons étudié sous forme d'un tableau (figure 42)

Tous les Ac monoclonaux décrits dans ce tableau ont pour point commun une reconnaissance à la fois des éosinophiles et des neutrophiles humains. Cependant, leur fixation aux granulocytes n'en font pas des Ac monoclonaux spécifiques de cette seule sous population leucocytaire.

Du fait d'une telle abondance d'anticorps monoclonaux anti granulocytes produits, on pourrait s'attendre à ce que quelques uns d'entre eux, au moins, puissent être spécifiques de l'une ou l'autre de ces sous populations polynucléaires. De plus, la spécialisation fonctionnelle de chacune de ces lignées leucocytaires pourrait se refléter dans une spécificité étroite de leurs molécules antigéniques de surface.

Or, récemment, la plupart des anticorps monoclonaux que l'on connaît spécifiques de l'une ou l'autre de ces sous populations granulocytaires, se sont avérés réagir également avec d'autres lignées leucocytaires (cf. fig42).

HISTORIQUE DES ALLOANTIGENES

DECRIITS AU NIVEAU

DES GRANULOCYTES HUMAINS.

SYSTEME	ANTIGENES	SPECIFICITE	ANNEE	AUTEURS
	NA1	GRANULOCYTES	1960	LALEZARI & coll.
	NA2		1974	LALEZARI & RODEL
NB	NB1 NB2	GRANULOCYTES	1971	LALEZARI & coll.
NC	NC	GRANULOCYTES	1977	LALEZARI
9	9a=NB2	GRANULOCYTES	1967	VON-ROOD & coll.
ND	ND1	GRANULOCYTES	1978	VERHENGST & coll.
NE	NE1	GRANULOCYTES	1979	CLAAS & coll.
HGA-3	5	GRANULOCYTES	1980	THOMSON & coll
MART		GRANULOCYTES	1982	YOMTOVIAN & coll.
ABO		UBIQUITAIRE		-
HLA	HLA-A HLA-B HLA-C	GRANULOCYTES & LEUCOCYTES		-

BS
FILES

FIGURE 41

La plupart des auteurs ayant décrit les propriétés et fonctions d'anticorps dirigés contre les granulocytes humains n'ont pu justifier l'existence d'une discrimination proprement dite entre les antigènes de surface des éosinophiles et ceux des neutrophiles humains ^{41, 117, 94, 29, 30}. Dans tous les cas où ces auteurs parlent de spécificité de l'Ac monoclonal produit, ils se limitent à confondre neutrophiles et éosinophiles sous le terme général de " granulocytes ", lorsque bien entendu, celui-ci ne reconnaît pas les autres leucocytes.

Tel qu'il serait aisé de le constater sur le tableau de la figure 42, onze Acm sur les 34 décrits, reconnaissent aussi les monocytes (au moins à 80%); douze autres se fixent également à la lignée HL60 alors que les neuf derniers sont en plus positifs avec la lignée K562 . De plus , lorsque la comparaison a pu être effectuée quatre Acm. (le MMA (LeuM) , l'Ig10, le G2 et le WEMG1) reconnaissent sans aucune distinction les granulocytes, les monocytes , la lignée HL60 ou K562 . Bien que certaines de leurs réactivités semblent similaires, il n'y a pas deux Acm. de tous ceux qui constituent ce tableau, qui soient absolument identiques, suggérant ainsi que chaque Ac monoclonal soit unique .

Les caractéristiques de l'ensemble des Acm. décrits, lorsqu'elles ont pu être données , supposent que certains antigènes portants des épitopes identiques pourraient être présents sur différents types cellulaires à la fois. Cette observation serait à l'appui de l'hypothèse sur l'évolution de la cellule mère commune à l'ensemble des leucocytes humains (figure 43) . Etant théoriquement tous originaires d'une même cellule souche , il n'est pas étonnant de trouver des épitopes ou même des antigènes de surfaces , communs à l'ensemble des globules blancs humains. Néanmoins au cours de leurs différenciations (figure 43) , ces cellules se sont de plus en plus spécialisées dans l'une ou l'autre des réactions de défense du système immunitaire qu'elle soit à médiation cellulaire ou humorale .

Depuis longtemps déjà les antigènes de surface de ces cellules ont été impliqués dans la réponse spécifique à tel ou tel stimulus particulier. C'est souvent dans l'objectif de déterminer le rôle exact de certains de ces antigènes que tous les Acm. du tableau (figure 42) et de nombreux autres encore ont été produits et étudiés

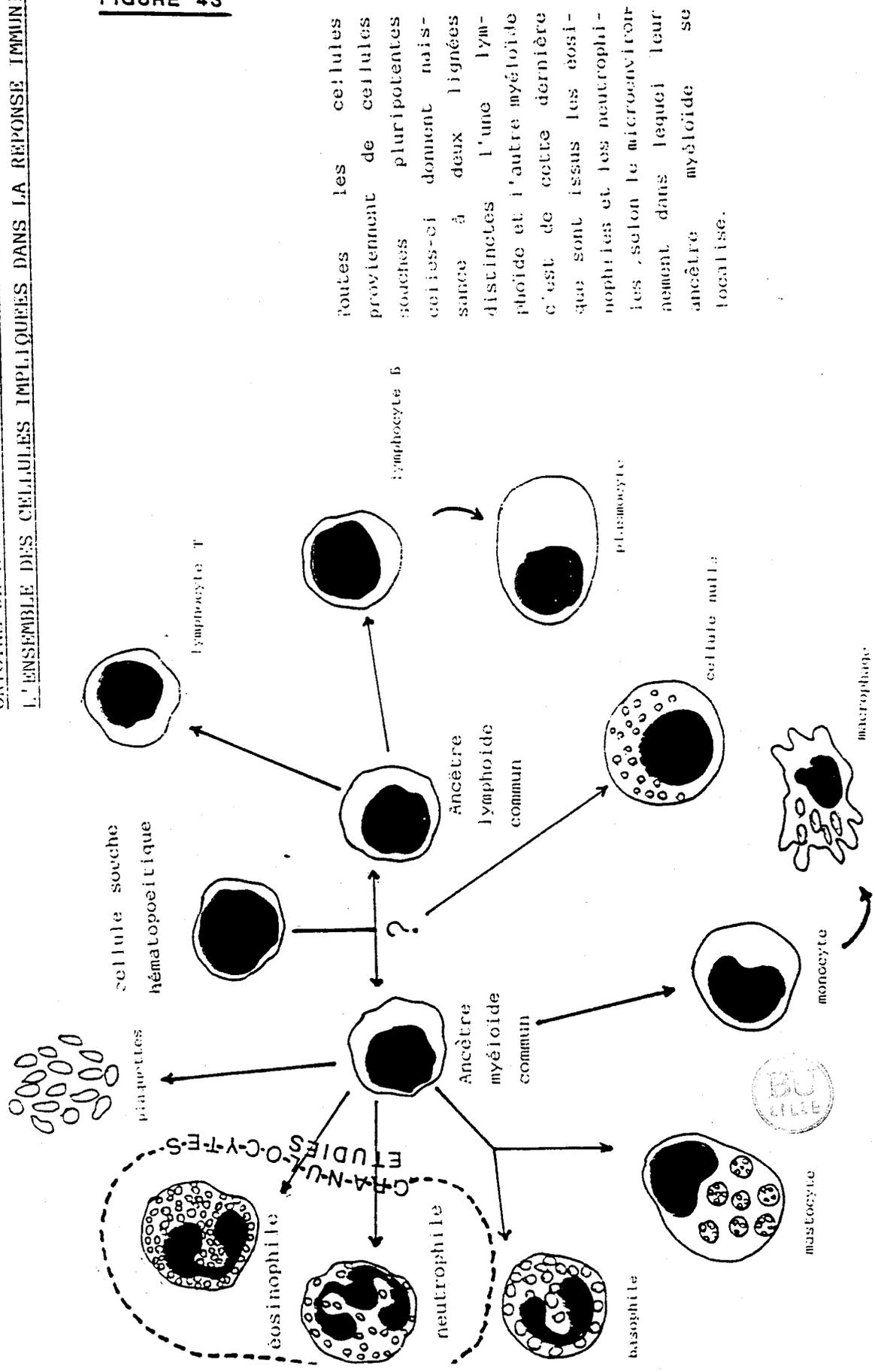
TABLEAU RECAPITULATIF DE L'ENSEMBLE DES ANTICORPS
MONOCLONAUX DECRITS CONTRE LES GRANULOCYTES HUMAINS

ALIM	ISOTYPE	PM DE L'Ag RECOGNU	GRANULOCYTES	MONOCYTES	HL60	K562	FONCTION	N° Ref
10KMT1	IgG2b		+	+	-	-		136
MU11	IgM		+	+	-	-	Reconnait les cellules Nulles	140
AM1A10.21	IgM		+	+		+	Reconnait la lignée T	55
M170	IgG2b		+	+				63
1010	IgM		+	+	+	+	Cytotoxiques vis à vis des cellules T	63
AM10.23	IgG1		+	80%	14%	-		5 - 6
19.10.1	IgM		+	+	-	-		103
119.10.1	IgM		+	+	-	-		103
130.5	IgG1		+	+	-	-		141
10A1	IgM		+	-	-	+		1
MU.1	IgM		+	-	+	+50%	+ avec les leucocytes lymphocytaires	27-95-96
EM110	IgM	105-150KD	+	-	+	+		156
EM111	IgG1	65KD	+	-	+	+		
EM112	IgM	150KD	+	-	+	+		
EM113	IgM	150KD	+	-	+	+		
PM16	IgM		+	-	+97%	-		
PM120	IgM		+	-	+30%	+11%		5 - 6
VEP13	IgM		+	-	-	-	Reconnait 21% PBL et cellules NK	117
105	IgM		+	-	-	+50%	Reagit 4% de cellules non lymphocytaires	94
NCD1	IgG1		+				Inhibe l'inducteur du PMN induit par PMA	29
NCD3	IgG1		+				Inhibition	30
GR	IgM		+	+21%	+	+	Inhibe les fonctions respiratoires	97
AHN-1			+	-			phagocytose	127
L12-2			+	-			+ Avec Ag en apparence dans la différenciation + stimule la phagocytose	35
31-D ₈			+				+ différentes sous populations de neutrophiles	123
65-22			+	+	+		0	35
PMN7-63	IgG3		+	-			Baisse le métabolisme oxydatif du neutro	100
B13-9	IgG1	105.150KD	+	-	+11%	-		41
116-3	IgM	105-150KD	+	-	+	+50%		
VIND5	IgM	105-150KD	+	-	+	+60%		73
MILNI	IgM	105-150KD	+	-	+	67%		41
UJ 308	IgM	105-150KD	+	-	-			
WEM131	IgM	110 KD	+	+	+			
2ED 8		95 KD	+	+			Stimule la secretion de β glucuronidase	63

FIGURE 42

ORIGINE DE L'EOSINOPHILE ET DU NEUTROPHILE PAR RAPPORT A L'ENSEMBLE DES CELLULES IMPLIQUEES DANS LA REONSE IMMUNITAIRE

FIGURE 43



toutes les cellules proviennent de cellules souches pluripotentes celles-ci donnent naissance à deux lignées distinctes l'une lymphoïde et l'autre myéloïde c'est de cette dernière que sont issus les éosinophiles et les neutrophiles selon le microenvironnement dans lequel leur ancêtre myéloïde se localise.

1. Antigènes responsables de réactions différentes présents sur des cellules différentes

Certains de ces Ac. ont été décrits comme étant à l'origine de réactions biologiques différentes sur des lignées cellulaires différentes : un exemple à citer : l'Ac. IgG10¹³ à la fois cytotoxique vis à vis de la lignée T et qui réagit avec les cellules myéloïdes.

Cette constatation pourrait suggérer une conservation de par deux leucocytes de lignées différentes, certains épitopes communs . Au cours de leur évolution ces cellules n'auraient modifié que l'aspect fonctionnel de ces structures antigéniques tout en leur conservant la même expression épitopique susceptible d'être reconnu par un même Ac monoclonal .

2. Antigènes différents responsables de réactions similaires sur une même lignée cellulaire

Dans le cas particulier des granulocytes humains , malgré le nombre important de travaux à ce sujet , de nombreuses questions restent encore sans réponse . C'est ainsi qu'à la suite d'une étude approfondie des événements précoces de l'activation des granulocytes Becher et coll. ¹¹ ont été amenés à la conclusion d'une très grande complexité dans le déclenchement et la synchronisation de ces mécanismes . Ils décrivent ainsi la capacité d'un récepteur du FMLP à provoquer le chimiotactisme, la libération d'ions superoxyde et la dégranulation des polynucléaires granulocytes.

D'autre part la stimulation des granulocytes par le PMA a été utilisée comme modèle d'étude de la phagocytose par Leyhmer et coll.⁸⁸ , qui suggèrent que celui-ci stimule la respiration par des mécanismes qui diffèrent de ceux provoqués par un peptide chimioattractant tel que le FMLP .

Il est donc évident que la nature du stimulus joue un rôle important dans les manifestations de ces activités cellulaires et du fait de la différence existant entre l'antigène récepteur du FMLP et celui

du PMA, nous pouvons constater qu'une même cellule peut présenter à sa surface et dans le même but fonctionnel, plusieurs antigènes différents.

3. Antigènes différents responsables d'effets multiples et sélectifs sur certaines fonctions des granulocytes.

Actuellement, dans le cadre de l'étude de l'activité biologique des polynucléaires granulocytes, les phénomènes de phagocytose ainsi que ceux de la production d'ions superoxyde, ont déjà été dissociés des processus de dégranulation et du chimiotactisme. Korchal et coll. ⁷⁶ démontrent qu'une stimulation par le calcium ionophore A 23187 et par des complexes humains, provoque une inhibition de la dégranulation des polynucléaires alors que la libération d'ions superoxydes n'est pas affectée. Les données rapportées ici sont donc en faveur de l'hypothèse que les phénomènes respiratoires et de dégranulation sont dissociables. D'autres travaux sont venus appuyer cette hypothèse, notamment ceux décrits par Cotter et coll. ^{27 à 30} à propos d'un Ac monoclonal le NCD₁ (IgG anti-neutrophiles humains), inhibant la dégranulation ainsi que le chimiotactisme des neutrophiles, induits par l'OPz. et le FMLP, mais restant sans aucun effet sur les phénomènes respiratoires. Alors que, d'un autre côté l'Ac monoclonal NCD₃ ³⁰, présente une activité plus spécifique quant à sa capacité d'inhiber le chimiotactisme des neutrophiles, induit par le FMLP, alors que les autres propriétés de cette cellule restent normales.

L'ensemble de ces constatations est en faveur de celles émises par Becher et Coll. ¹¹ à propos de la grande complexité des mécanismes responsables des évènements précoces de l'activation des granulocytes. Néanmoins, l'étude des caractéristiques de l'un de nos deux Ac monoclonaux anti-granulocytes produits, notamment, l'anti-neutrophile humain : NW-224 apporte d'importantes informations qui pourraient contribuer, au moins en partie, à l'éclaircissement de certaines énigmes

concernant les mécanismes d'activation de ce leucocyte

4. Anticorps monoclonal anti neutrophiles humains : le NW-224

Par l'originalité de l'ensemble de ses caractéristiques, l'Ac monoclonal NW-224, occupe une place privilégiée par rapport à tous ceux décrits dans le tableau (Figure 42).

En effet, un premier point important concernant cet anticorps, est : Sa spécificité vis-à-vis du polynucléaire neutrophile . L'épitope reconnu par le seul isotype IgG_{2a} de cette série semble être porté par un antigène non détectable et probablement inexistant au niveau des éosinophiles , d'un poids moléculaire très faible , de l'ordre de 14,5 kD. Cette caractéristique le distingue clairement des Ac monoclonaux B_{13,9}⁴¹ ; B₄₋₃ ; VINDS⁷⁹ ; Mi / Ni , UJ 308⁴¹ ; WEMG₁⁹⁰ ou FMC 10¹⁵⁶, dont les poids moléculaires respectifs définissent des antigènes de 105 à 150 kD (kilodalton), alors que les plus faibles poids moléculaires décrits étaient de 95 kD pour l'EOa et de 65 kD pour le FMC₁₁.

Lorsque le NCD1²⁹ inhibe le chimiotactisme du PMN induit par le FMLP, de même que le G2²⁷ diminue les fonctions respiratoires, le AHN-1¹²⁷ , la phagocytose et le PNM7-C3¹⁰⁰ baisse le métabolisme oxydatif de ce polynucléaire, le NW-224 à lui seul, stimule le neutrophile dans toutes ses fonctions biologiques tant pour le chimiotactisme que pour sa fonction phagocytaire, sa libération de myéloperoxydase ou encore sa libération d'ions superoxydes.

Seuls les Ac monoclonaux L12-2³⁵ et WEMG₁⁹⁰ possèdent la capacité de stimuler respectivement la phagocytose et l'ADCC du neutrophile.

D'autre part, le NW-224 présente un effet différent sur l'activation métabolique du neutrophile circulant considéré comme initialement au "repos" et le neutrophile extracirculatoire (comme par exemple, le neutrophile salivaire ou tissulaire) lequel serait plutôt une cellule en " hyperactivation ".

Le NW-224 n'a, en effet, plus aucun effet sur l'activation des neutrophiles de la salive, ce qui souligne l'importance du rôle de l'antigène auquel il se fixe dans le déclenchement des mécanismes responsables de l'activation de cette cellule.

A partir de ces résultats, nous pouvons déjà faire deux constatations :

1) l'épitope reconnu par le NW-224 identifie une différence antigénique entre éosinophiles et neutrophiles humains, et rejoint ainsi les travaux de Lopez et Coll.^{82*} sur l'hétérogénéité antigénique des granulocytes de souris.

2) Dans le cas où cet antigène de 14,5 kD serait présent indifféremment chez le neutrophile circulant et extracirculatoire (travaux en cours) cette entité antigénique pourrait être, pour une grande part, impliquée dans le passage du neutrophile d'un état de "repos" au niveau du sang à un état d'hyperactivation au niveau extracirculatoire.

Afin de rester dans le cadre d'une étude analytique de tous les Ac monoclonaux décrits dans le tableau (figure 42), le NW-224 semble contredire l'hypothèse émise précédemment 79: 27 à 30 par de nombreux chercheurs que le phénomène de dégranulation et de respiration seraient dissociables .

En fait , ces hypothèses ont été émises dans le cadre d'anticorps responsables de l'**inhibition** de l'une ou l'autre de ces fonctions du neutrophile, alors que le NW-224, au contraire, provoque une **stimulation** presque "générale" de cette cellule . Ce la rend la comparaison relativement difficile mais, pourrait suggérer l'existence pour le neutrophile d'une distinction entre les antigènes (récepteurs) intervenant dans les phénomènes d'activations et dans l'inhibition de certaines fonctions de cette cellule .

En définitive, l'antigène de 14,5 kD reconnu par le NW-224 serait, probablement une molécule clé intervenant dans les mécanismes " complexes " du déclenchement de l'activation du polynucléaire neutrophile.

5. Anticorps monoclonal anti-éosinophiles humains: l'EO6-71



Dans le contexte des travaux antérieurs sur l'hétérogénéité des granulocytes humains, il était intéressant de produire un Ac. monoclonal spécifique du polynucléaire éosinophile ; l'existence d'un tel Ac. n'étant pas encore rapportée dans la littérature. L'objectif de faire de cet Ac. un marqueur spécifique de cette cellule n'a pas été exactement atteint (du fait de la grande part laissée au hasard au cours de la fusion cellulaire Chap.II; II.), dans la mesure où celui-ci ne reconnaît pas l'ensemble des éosinophiles, mais reconnaît les plaquettes sanguines. Cependant l'intérêt de cet Ac. monoclonal n'est pas pour autant négligeable dans la mesure où il pourrait être utilisé comme marqueur des éosinophiles activés ou éosinophiles hypodenses ($Fc_E R^+$) retrouvé en plus grande quantité dans le sang et, dans les tissus des sujets présentant une hyperéosinophilie. Cet Ac. monoclonal pourrait, à ce niveau-là, faciliter le dépistage de ces éosinophiles hypodenses au sein des tissus de ces patients.

L'immunisation des animaux ayant été effectuée avec des éosinophiles purifiés pouvait laisser supposer que l'Ac. monoclonal EO6-71 soit, par comparaison aux résultats obtenus avec l'Ac. monoclonal NW-224 sur les neutrophiles, spécifique de l'éosinophile. Or, il est apparu tout de suite que l'EO6-71 reconnaissait également, les plaquettes sanguines et une lignée de cellules macrophagique humaine (la lignée U 937) .

Cette observation a guidé nos travaux de recherche vers une structure antigénique commune à toutes ces lignées cellulaires : le Récepteur Ig_E ($Fc_E R_2$) contre lequel avait déjà été produit un

Ac. monoclonal par M. Capron : le **BB10** . Nous avons donc comparé l'effet de ces deux Ac. monoclonaux (EO6-71 et BB10) sur le récepteur IgE en démontrant , l'inhibition des rosettes IgE sur l'éosinophile, ainsi que l'inhibition de la cytotoxicité IgE dépendante des plaquettes . De la même façon que le BB10, L'EO6-71 inhibe ces fonctions tout en se fixant à un épitope différent de celui-ci, confirmé par l'effet synergique observé .

De plus BB10 et EO6-71 semblent reconnaître des antigènes de PM différents par " ImmunoBlotting" sur des extraits d'éosinophiles humains . Nous pensons que ces différences sont probablement liées à des différences quantitatives des épitopes BB10 ou EO6-71 présents sur ces différentes structures antigéniques du récepteur IgE : Il semble également exister des différences d'expression de ces épitopes selon les patients . Néanmoins , ces structures de 45 - 50 kD et de 25.kD, sont de PM identiques à ceux décrits pour le récepteur IgE du B- lymphocyte par Masaki et coll. ^{27*} et confirment bien l'analogie structurale entre ces récepteurs IgE de faible affinité .

Il est intéressant de noter, d'autre part , que le **BB10** et l'**EO6-71** , deux Ac. monoclonaux issus de deux immunisations différentes, effectuées dans des conditions différentes , à partir de cellules provenant de patients différents , sont tout deux des IgM et tout deux spécifiques du récepteur IgE. Ceci nous amène à la conclusion que le récepteur IgE de l'éosinophile humain hypodense , semble relativement immunogène chez la souris et que les deux Ac. monoclonaux produits pourraient être des marqueurs de l'hétérogénéité des éosinophiles humains .

* Par ailleurs , du fait de la structure commune de leur isotype on peut se poser la question de savoir si l'effet similaire de ces deux Ac. monoclonaux ne serait pas lié à la structure polymère des anticorps IgM, effet néanmoins , non observé dans le cas des IgM témoins sans activité anticorps.

Il n'est pas improbable que cette structure favorise le rôle biologique de ces Ac. sur le récepteur IgE.

Dans la mesure où tous les Ac. anti-récepteur IgE du B lymphocytes , décrits dans la littérature , sont de classe IgG , il parait difficile de comparer leurs effets à ceux du BB10 ou, du EO6-71. Afin de répondre à ce problème des expériences sont actuellement en cours , avec l'objectif d'induire un "Switch" des cellules produisant les IgM EO6-71 et BB10 vers des hybridomes produisant des IgG (Travaux en collaboration avec J.L. Teillaud et W. H. Fridman , U. INSERM U.255 - Institut Curie - Paris) .

De toutes évidences l'EO6-71, en complément avec le BB10, représentent un outil d'un grand intérêt dans la détermination de la constitution moléculaire du récepteur IgE de faible affinité (lymphocytes B , macrophages , éosinophiles , plaquettes et récemment la cellule de Langherans) ainsi que dans la **dépistage des éosinophiles** activés au niveau des tissus de patients hyperéosinophiles .

CONCLUSION

La très grande abondance d'antigènes communs aux neutrophiles et aux éosinophiles humains, identifiés par la production d'Ac. monoclonaux (tableau figure 42), n'exclue pas l'hypothèse de l'existence d'antigènes spécifiques à chacune de ces sous populations granulocytaires .

Notre but de produire des Ac. monoclonaux dirigés spécifiquement contre chacun de ces polynucléaires a été , au moins , partiellement atteint .Car, si par sa fixation aux plaquettes sanguines, à la lignée U.937 et aux basophiles, l'Ac. monoclonal EO6-71 semble moins spécifique de l'éosinophile, le NW-224 , par contre, présente une spécificité relativement étroite pour le neutrophile et contribue pour une grande part à appuyer l'hypothèse de l'hétérogénéité antigénique des éosinophiles et des neutrophiles humains .Cette hétérogénéité pourrait trouver son explication , dans un début de spécialisation fonctionnelle de chacun de ces globules blancs, depuis une simple phagocytose (première fonction défensive apparue au cours de l'évolution) , vers une défense plus complexe, à l'image du degré d'évolution très élevé atteint par d'autres leucocytes du système immunitaire (dans leurs mécanismes de coopérations cellulaires ou, dans leurs capacités de produire des anticorps ...)

A la lumière des résultats très récents concernant l'identification d'un récepteur de type IgE ($Fc_{\text{E}}R_2$), sur les mastocytes et les basophiles reconnus à la fois par les L'EO6-71 et le BB10 (M. Capron communication personnelle) , l'ensemble de nos travaux associés à ceux de Trassey et Smith ^{131*} sont plus en faveur d'un rapprochement antigénique fonctionnel entre l'éosinophile et le mastocyte et entre l'éosinophile et le basophile que celui établi depuis plus d'un siècle par les hématologistes entre l'éosinophile et le neutrophile et permettraient ainsi, de remettre en question le regroupement

QUELQUES ANTIGENES DECRITS AU NIVEAU DES POLYNUCLEAIRES
NEUTROPHILES ET EOSINOPHILES HUMAINS

NA1 NA2

NB

NC

9

ND

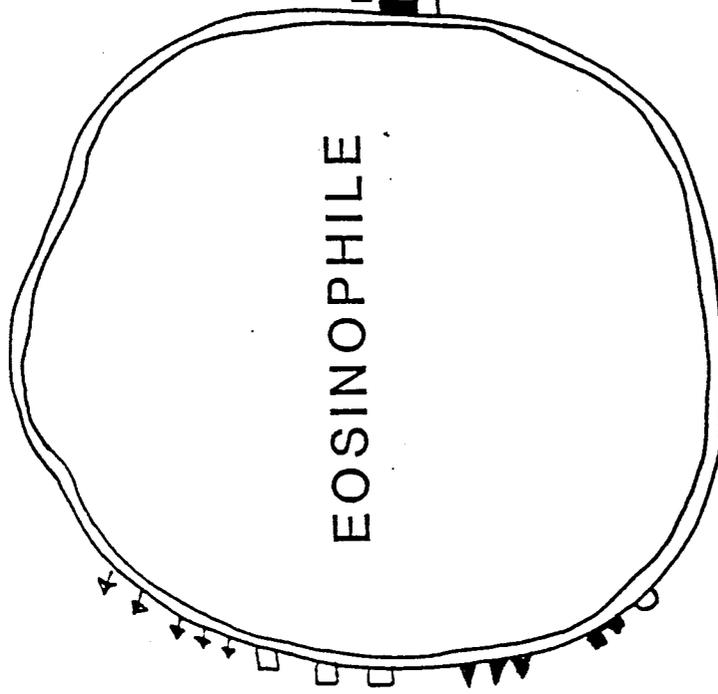
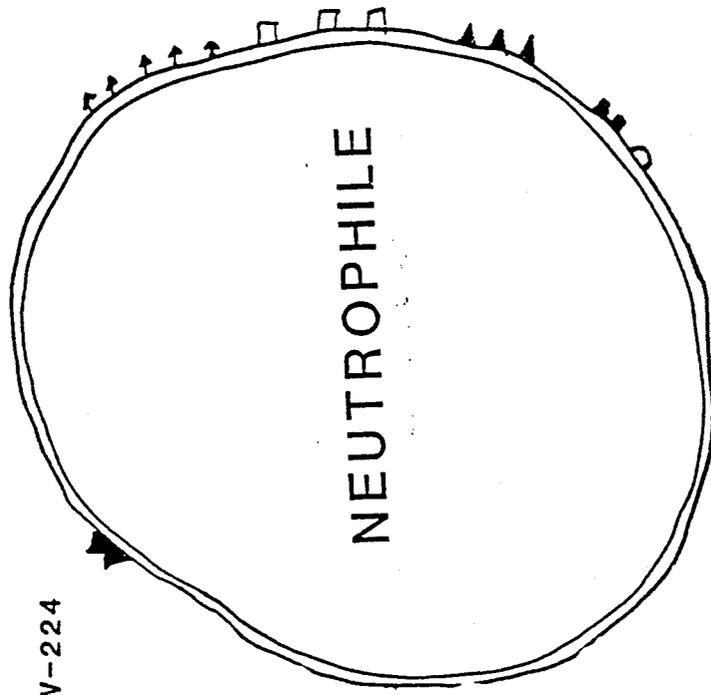
NE

MART

HGA-3

HLA

ABO



BB10 IGE RECEPT.



quasisystématique de l'"éosinophile et du neutrophile sous le terme général de "polynucléaires granulocytes"

Malgré les efforts considérables, fournis dans ce domaine par un nombre relativement important de chercheurs à travers le monde, les polynucléaires granulocytes humains (éosinophiles, neutrophiles, basophiles et mastocytes) restent des cellules encore assez mal définies.

Par la détermination de l'existence d'au moins un antigène de surface pouvant distinguer le neutrophile de l'éosinophile (grâce au "NW-224 ") et par l'identification d'une structure du récepteur IgE différente, mais complémentaire de celle reconnue par le BB10 ¹⁹ à ²³, (grâce à l'EO6-71), l'ensemble de nos travaux apporte une appréciable contribution à l'identification de ces deux sous-populations granulocytaires. Une étude plus approfondie de cette hétérogénéité antigénique devrait, par ailleurs, permettre de mettre en évidence une hétérogénéité à l'intérieur de chacune de ces deux sous populations .

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ABRAMSON C. S. , KERSEY J. H. , and LEBIEN T. W. A.
" Monoclonal Antibody (BA-1) reacted wiht cells of human B lymphocytes "
J. Immunol., 126: 83, 1981 .
- 2- AKONG, Q.F., FISCHER, D., TAMPION W. , LUCY J.A.
"Mecanism of cell fusion "
Nature , 253 : 194 , 1975
- 3- ALLAN R.B. and WILKINSON P.C.
"A visual analysis of chemotactic and chemokinetic locomotion of human neutrophil leucocytes "
Exp.Cell Res., 111 : 191, 1978.
- 4- AUSTEN K.F., WASSERMAN S.I., GOETZL E.J.
"Mast cell derived mediators : Structural and functional diversity and regulation of expression S.G.O. Strandberg K.,Molecular and biological aspects of the acute allergic reaction".
Int. Arch. All. Appl. Immunol. , 58 : 293, 1976
- 5- BALL E. D. , GRAZINIO R.F. , SHEN L. , and FRANGER M.W.
"Monoclonal antibodies to novel myeloid antigens revel human neutrophil heterogeneity" .
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 : 5374 , 1982
- 6- BALL E.D., KADUSHNIN J.M., SCHATER B., and FRANGER M.W.
"Studies on the ability of monoclonal antibodies to selectively mediate complement-dependent cytotoxicity of human myelogenous leukemia blast cells".
J.Immunol. , 128: 1476, 1982.
- 7- BALL E.D., and FRANGER M.W.
"Monoclonal antibodies reactive with human leukemia cells".
Clin. Exp. Immunol. , 48: 655, 1972

- 8- BARSKI G. and CORNEFERT F.
"Production dans des cultures *in vitro* de deux souches cellulaires en association avec des cellules de caractère "hybride" ".
C.R.Acad. Scie. (Paris), 251 : 1825, 1960
- 9- BAZIN H., GRZYCH J.M., VERWAERDE C., CAPRON A.
"A lou rat non secreting myeloma cell line stable for production of rat-rat hybridomas".
Ann. Immunol. , 1310 : 359, 1980.
- 10- BEATTY P.G., OCHS H.D., HARLAN J.M., PRICE T.H., ROSEN H., TAYLOR R.F.
"Absence of monoclonal-antibody-defined protein complex in boy with abnormal leucocyte fonction".
Lancet , 1: 8376, 1984
- 11- BECKER G.J., HANCOCK W.W., KRAFT N. LANYON H.C., and ATKINS R.C.
"Monoclonal antibodies to human macrophage and leucocytes common antigens".
Pathology. 13 : 669, 1981.
- 12- BERLIN R.D. and FERA J.P.
"Changes in membranes microviscosity associated with phagocytosis Effects of colchicine".
Proc. Natl. Acad. Scie. USA . 74: 1072, 1977.
- 13- BERSTEIN I.D., ANDREWS R.G., COHEN S.F., and Mac MASTER B.E.
"Normal and malignant human myelocytic and monocytic cells identified by monoclonal antibodies ".
J. Immunol. , 128: 2181 , 1982
- 14- BEVERLEY PCL., LINCH D. DELIA D.
"Isolation of human hematopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies".
Nature , 287 : 322, 1980.

- 15- BREARD J., REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G. and
SCHLOSSMANN S.F.
"A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood
monocytes"
J. Immunol. , 124 : 1943, 1980.
- 16- BROXMEYER H.E., RALPH P., BOGNACHI J., KINKADE P.W.
and DESSOUSA M.
"A subpopulation of human polymorphonuclear neutrophils contains an
active form of lactoferrin capable of binding to human monocytes and
inhibiting production of granulocyte-macrophage colony stimulatory
activity".
J.Immunol. , 125 : 903, 1980.
- 17- BUTTERWORTH A.E., STUOOCK R.F., HOUBAREES P.M.
"Eosinophils as mediator of antibody-dependent damage to
schistosomula".
Nature., 256 : 727, 1975
- 18- BUTTERWORTH A.E., WASSON D.L., GLEICH G.J.,
LOEGERING D.A., DAVID J.R.
"Damage to schistosomula of *S.mansoni*, induced directly by eosinophil
Major Basic Proteins".
J. Immunol., 122: 221, 1979
- 19- CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M., BAZIN H. macrophage
"Specific IgE antibodies in immune adherence of normal
to *Schistoma mansoni*".
Nature , 253 : 474, 1975
- 20- CAPRON M., BAZIN H., JOSEPH M., CAPRON A.
"Evidence for IgE dependant cytotoxicity by rat eosinophils".
J. Immunol., 126 : 1764, 1981
- 21- CAPRON M. and JOUAULT T.
"IgE receptors an human eosinophils and eosinophil heterogeneity 12°
Forum d'Immunologie"
Am. Inst-Pasteur , Immunol. , 137 C : 371, 1986

- 21*- CAPRON M., CAPRON A., DESSAINT J.P., TORPIER G., JOHANSSON S.G.O. and PRIN L.
"Fc Receptors for IgE on Human Rat Eosinophils"
J. Immunol. 126: 1981
- 22- CAPRON M., JOUAULT T., PRIN L., JOSEPH M., AMEISEN J.C., BETTERWORTH A.E., PAPIN J.P., KUSNIERZ J.P., and CAPRON A.
"Fonctionnal study of monoclonal antibody to IgE Fc Receptors (fc_ER2) of eosinophils, platelets and macrophages".
J. Exp. Med., 164: 72, 1986
- 23- CHARON J., STEPHANE E., MERGENHAGE Ph. D. and JOHN I. GALUN M.D.
"Gingivites and oral ulceration in patients with neutrophil dysfunction".
J. Parodontol., (Soumis)
- 24- CLAAS F.J.H., LANGERAK J., SABBE L.J.M., VAN ROOD J.J.
"NE1 a new neutrophil specific antigen".
Tissue Antigen. 13: 129, 1979
- 25- CLEMENT L.T., LEHMEYER J.E. GARTLAND G.
"Identification of neutrophil subpopulations with monoclonal antibodies".
Blood, 61(2) : 326, 1983
- 26- CIVIN C.I.; MIRRO J. and BENQUIRGO M.L.
"A new myeloide spécifique antigen identified by a monoclonal antibody".
Blood, 57: 842, 1981.
- 27- COTTER TG., HENSON P.M.
"Purification and characterization of an antigen involved in neutrophil chemotaxis and degranulation using a monoclonal antibody".
Eur. J. Immunol. 14(7): 605, 1984.

- 28- COTTER T.G., SPEARS P. and HENSON P.M.
"A monoclonal antibody inhibiting neutrophil chemotaxis and degranulation".
J. Immunol., 127: 1235, 1981.
- 29- COTTER T.G., KEELING P.J. and HENSON P.M.
"A monoclonal antibody-inhibiting FMLP-induced chemotaxis human neutrophils"
J. Immunol., 127: 2241, 1981.
- 30- COTTER T.G., SPEARS P., and HENSON P.M.
"A monoclonal antibody to human neutrophils".
J. Immunol., 127: 1355, 1981.
- 31- COHEN MS., ELIOTT D.M., CHAPLINSKI T., PIKE M.M., and NEIDEL J.E.
"A defect in the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes that remain in circulation early in hemodialysis".
Blood, 60: 1283, 1982.
- 32- COTTON R.G.H., SECHER D.S. and MILSTREIN C.
"Stomatic mutation and the origin of antibody diversity clonal variability of immunoglobulin produced by MOPC-21 cell in culture".
Eur. J. Immunol., 3: 135, 1973
- 33- CROWLEY C.A., CURNUTTE J.T., ROSIN R.E., SCHWARTZ A.J., GALLIN J.L., KLEMPNER M., SNYDERMAN R., SOUTHWICK F.S., STOSSEL T.P., BABIOR B.M.
" An inherited abnormality of neutrophil adhesion. Its genetic transmission and its association with a missing protein"
N.Engl. J. Med., 302: 1163, 1980.
- 34- DAVIDSON M.R., GERALD P.
"Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol".
Somat. Cell. Genet., 2: 165, 1976

- 35- DEBRA L., LASKIN G. and GIOVANNI R.
"Stimulation of human neutrophilic granulocyte chemotaxis by monoclonal antibodies".
J. Immunol., 134: 1146, 1985.
- 36- DREW S.I., TERASAKI P.I.,
"Autoimmune cytotoxic granulocyte antibodies in normal persons and various diseases"
Blood, 52: 941, 1978
- 37- DURAK D.T., SUMI S.M., KLEBANOFF S.J.
"Neurotoxicity of human eosinophiles"
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76: 1443, 1979
- 38- DEVRIES J.E., VAESSEN R., JANSSENS P., and FIGDOR C.F.
"Monoclonal antibodies directed against human monocyte differentiation antigens".
First International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Paris, France : 48, 1982.
- 39- EPHRUSSI B. and SORIEUL S.
"Nouvelles observations sur l'hybridation *in vivo* de cellules de souris".
C.R. Acad. Sci., Paris, 254: 181, 1962.
- 40- EPHRUSSI B..
"Hybridization of somatic cells".
Princeton, New Jersey, (Princeton University Press), : 23., 1972
- 41- ENGELFRIET C.P., TETTEROO P.A.T., VANDERVENN J.P.W.,
WERNER W.F., VAN DER PLAS-VAN C., DALEN A.E. and GIVONDER B.
"Granulocyte-Specific Antigens and Methods for their detection".
Prog. Clin. Biol. Res., 149: 121, 1984
- 42- FANGER M.W., SHEN L., PUGH J. and BERNER G.M.
"Subpopulation of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77: 3640, 1980.

- 43- GALFRE G., MILSTEIN C., WRIGHT B.W.
"Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fc of mouse IgG"
Nature, 217 : 131. 1979.
- 44- GAHMBERG C.G., NILSSON K., ANDERSON L.C.
"Specific changes in the surface glycoprotein pattern of human promyelocytic leukemia or line HL-60 during morphologic and functional differentiation".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 76: 4087. 1979.
- 45- GALLIN J.L.
"Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful?"
Blood , 63: 977, 1984.
- 46- GALLIN J.L., FLETCHER M.P., SELIGMAN B., HOFFESTEIN S., CEMRS K. and MOUMESSA N.
"Human neutrophils-specific granule deficiency : model to assess, the role of neutrophil - specific granules in the evaluation of the inflammatory response".
Blood , 59 : 1317, 1982
- 47- GERSHUN D., SACHS L.,
"Properties of a somatic hybrid between mouse cells with different genotypes".
Nature, 198 : 912 , 1983.
- 48- GILBERT H.S., GOLDBERG R. and WARD L.
"Increased circulated neutrophils with surface receptor activity for immunoglobulin G in polycythemia vera and myeloid metaplasia".
Blood., 53: 1106, 1979.
- 49- GLEICH G.J., FRIGAS E., LOEGERING D.A., WASSOM D.L., STEINMULLER D.
"Cytotoxic Properties of the eosinophil major basic protein".
J. Immunol., 123: 2925, 1979
- 50- GOLDENBERG.
"Radioactive antibodies in cancer detection *in vivo*".
International Symposium on Monoclonal Antibodies.
Venise, June 14: 1982

- 51- GOLDSTEIN I.M., ROOS D., KAPLAN H.B., and WEISSMANN G.
"Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leucocytes independently of phagocytosis".
J. Clin. Invest. 56: 1155, 1975.
- 52- GOLDSTEIN I.M.
"Polymorphonuclear leucocyte functions. Role of the plasma membrane".
Curr. Top. Hematol., 2: 145, 1979.
- 53- GORDON M.H.
"Remarks on Hodgking's disease a pathogenic agent in the glands and its application in diagnosis".
Br. Med. J., 1: 641, 1933
- 54- GRIFFIN J.D., RITZ J., MADLER L.M., and SCHLOSSMAN S.E.
"Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells".
J. Clin. Invest., 68: 932. 1981.
- 55- HANJAN S.N.S., KEARNEY J.F., and COOPER M.D.
"A monoclonal antibody (MMA) that identifies a differentiation antigen on human myelomonocytic cells".
Clin. Immunol. Immunopathol., 29: 172, 1982.
- 56- HIRATA F., NOSTU Y., MATSUDA K., VASANTHAKUMAR G.,
SCHIFFMANNE E., WONG T.W., GOLBERG A.R.
"Inhibition of leucocyte chemotaxis by glu-glu-glu-Try-Try-Pro-Met-glu and leu-ile-glu-Asp-Asn-glu-Try--Thr-Ala-Arg-Glu-Gly".
Biochem. Biophys. Res. Commun., 118(2): 682, 1984
- 57- HARVATH L. and LEONARD E.J.
"Two neutrophil populations in human blood with different chemotactic activities separation and chemoattractant binding".
Infect. Immunol ,36: 443, 1982.

- 58- HENSON P.M. and ODAES Z.G.
"Stimulation of human neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates. Secretion of granule constituents and increased oxidation of glucose".
J. Clin. Invest. , 56: 1053, 1975.
- 59- HIROSHI S., KAZUYOSHI Y., BREAR J., YOSHIE O., and GORGES M.
"A monoclonal antibody Reactive with Human eosinophils".
Blood, 67 : 50 , 1986
- 60- HOWARD H.J. and BARNWELL J.W.
"Solubilization and immunoprecipitation of I-labeled antigens from *Plasmodium knowlesi* schizonte infected erythrocytes using no anionic, anionic, and zwitterionic detergents".
Parasitol. , 88 : 27, 1984
- 61- HOWARD T.J.
"Quantification of the locomotive behavior of polymorphonuclear leukocytes in clot preparations".
Blood, 59 : 946, 1982.
- 62- HOWARD J.C., BUTCHER G.W., GALFRE G. MILSTEIN C.
"Monoclonal anti-rat MHC (H-I) alloantibodies".
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 181: 54. 1978
- 63- HO. M., and SPRINGER T.A.
"Antigen Quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen".
J. Immunol., 128 : 2281 , 1982.
- 64- HUNTER W.H., GREENWOOD F.C..
"Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity".
Nature, 194 : 495, 1982
- 65- IP. S.H.C. and COOPER R.A.
"Decreased membrane fluidity during differentiation of human promyelocytic leukemia cells in culture".
Blood , 56 : 227, 1980.

- 66- JONG E.C., KLEBANOFF S.J.
"Eosinophil mediated mammalian tumor cell cytotoxicity role of the
peroxydase system".
J. Immunol., 124: 1949 , 1980,
- 67- KAY A.B.
"The role of the eosinophils
J. All. Clin. Immunol., 64: 90, 1979
- 68- KENNETH A. FOON, BUESCHER S., KIMBAL E., HUANG L.C.
STEVENSON H.C. CLARKE G., GREGORIO, T and
HARLEY, J.B.
"Monoclonal Antibody to Human Eosinophils Recognizing 95 kd
Surface Membrane Antigen ""
Hybridoma , 2: 393, 1983
- 69- KELLER H.U., WISSLER J.H., and DAMERAU B.
"Diverging effects of chemotactic serum peptides and synthetic f
met-leu-phe *FMLP* on neutrophil locomotion and adhesion".
Immunology , 42: 379, 1981.
- 70- KLEBANOFF S.F., and CLARK R.A.
"The neutrophil : Function and clinical disorders".
New-York : Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1978.
- 71- KLEBANOFF S.F.,J., BEATTY P.G., SCHREIBER R.D.,
HANS, D. OCHS and WALTERDORPH A.M.
J. Immunol. , 134 : 1153, 1985
- 72- KLEMPHER M.S., and GALLIN J.L.
"Separation and characterization of human neutrophil subpopulation".
Blood, 51 : 659, 1978.

- 73- KLEMPHER M.S., GALLIN G.L., BALOW J.E., and KAMMEN D.P.
"The effect of hemodialysis and C5a-des-arg on neutrophil subpopulations."
Blood, 55: 777, 1980.
- 74- KOHLER G., MILSTEIN C.
"Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity".
Nature, 26: 495, 1975
- 75- KOHLER G., MILSTEIN C.
"Derivation of specific antibodies producing tissue culture and tumou lines by cell fusion".
Eur. J. Immunol, 6: 511 1976.
- 76- KORCHAK H.M., EISENSTAR B.A., HOFFSTEIN S.T., DUNHAM P.B., and WEISSMANN G.
"Anion channel blockers inhibit lysosomal neutrophils without affecting generation of superoxide anion".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77: 2721, 1980.
- 77- KURLANDER R.J.
"Blockade of Fc receptor-mediated binding to U. 937 cells by murine monoclonal antibodies directed against a variety of surface antigens".
J. Immunol, 131: 140, 1983
- 78- KUMPOLD H., KRAFT D., OBEXER G., BOCK G., and GEBHART W.A.
"A monoclonal antibody against a surface antigen shared by human large granular lymphocytes and granulocytes".
J. Immunol., 129: 1458, 1982.
- 79- KNAPP W.
"Monoclonal antibodies against differentiation antigens of myelopoiesis".
Blood, 45: 301, 1982

- 80- LALEZARI P., NUSSBAUM M., GELMAN S., SPACK TH..
"Neonatal neutropenia due to maternal iso-immunization".
Blood , 15 : 236, 1960
- 81- LALEZARI P., NURPHY G.B.
"Cold-reacting leukocyte agglutins and their significance, in : Curtoni ES,
Matting PL, Tosi R.M. (eds) : "Histocompatibility Testing 1967".
Baltimore : Williams and Wilkins Company, : 421, 1967.
- 82- LALEZARI P., THOLENFED B., WEINSTEIN W.J..
"The third neutrophil antigen. In Teraski PI (ed) : "Histocompatibility
Testing 1970".
Baltimore : Williams and Wilkins Compagny : p 319, 1970
- 83- LALEZARI P., MURPHY G.B., ALLEN F.H. .
NB1, "A new neutrophil antigen involved in the pathogenesis of neonatal
neutropenia".
J. Clin. Invest. , 50 : 1108 , 1971
- 84- LALEZARI P., RODEL E.
"Neutrophil specific antigen ; immunology and clinical significance".
Semin Haematol , 11 : 281.1964
- 85- LALEZARI P. .
"Neutrophil antigens : immunology and clinical implications".
In : Greenwalt TJ, Jamieson GA (eds).
Prog. clin.and biol.Res. New-York : Alan. Liss. Inc., 13 : 209.1977
- 86- LALEZARI P., PETROSOVA M., JIANG AF,
"NB2 an allele of NB1 neutrophil specific antigen ; relation ship to 9years
transferred boy ".
J. Cincial. Invest., 54: 1108, 1982
- 87- LEBIEN T.W., and KERSEY J.H. .
"A monoclonal antibody (TA-1) reactive with human T lymphocytes and
monocytes. "
J. Immunol. , 123 : 2203, 1980

- 88- LEHMEYER J.E., SNYDERMAN R., and JOHNSTON Jr R.B.
"Stimulation of neutrophil oxidative metabolism by chemotactic peptides :
Influence of calcium ion concentration and cytochalasin B and
comparaison with stimulation by phorbol myristate acetate".
Blood, 54 : 35 , 1979.
- 88*- LEOPEZ A. F. , STRATH M. and SANDERSON C.
"Differentiation Antigens on Mouse Eosinophils and Neutrophils Identified
by a Monoclonal Antibody"
Bri. J. Haemat. , 57 : 489 , 1984
- 89- LEOPAZ A.F., BELGLEY G., ANDREWS P., BUTTERWORTH
A.E., VADAS M.A.
"Indentification of a human granulocyte functional antigen (GFA-2)
involved in antibody dependent cell-mediated cytotoxicity and
phagocytosis".
J. Immunol., 134: 3969 , 1985
- 90- LEOPAZ A.F. and VADAS M.A.
"Stimulation of human granulocyte function by monoclonal antibody
WEM-G1".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81 : 181, 1984.
- 91- LINKER-ISRAELI M., BILLING R.J., FOON K.A., and TERASAKI
P.I.
"Monoclonal antibodies reactive with acute myelogeneous leukemia
cells".
J. Immunol., 127 : 2473, 1982
- 92- LITTLEFIEL D. J.
"Selection of hybrids from mating of fibroblasts *in vitro* and their
presumed recombinantes".
Science , 145: 709, 1964
- 93- MADYATHA P.R., GLASSMAN A.B., LEVINE D.H.
"Incidence of neutrophil antigens on Human cord neutrophils".
An. J. Reprod. Immunol. , 6 : 124, 1984.

- 94- MADJIC O., LISZKA K., LUTZ P., and KNAPP W.
"Myeloid differentiation antigen defined by a monoclonal antibody".
Blood , 58 : 1127, 1981.
- 95- MARIE J.P., IZAQUIRRE C.A., CIVIN C.I., MIRRO J. and Mac
CULLOCH E.A.
"Granulopoietic differentiation in AML blasts in culture".
Blood , 58 : 670, 1981.
- 96- MARIE J.P., IZAQUIRRE C.A., CIVIN C.I., MIRRO J.
"The presence within single K-562 cells of erythropoietic and
granulopoietic differentiation markers".
Blood , 58 : 708, 1981.
- 97- MARTIN L.S., WILSON M. , GORDON D., BROWNIGN S.W. and .
FRITZ.R. B.
"Monoclonal antibodies to human granulocyte cellular specificity and
Functional Studies".
Journal of Leukocyte biology , 35: 265, 1984.
- 97*- MASAKI S., KIKOTANI H. , BAR E.L. , HATORI S.Y. , SHIMOTO S.,
SATO R., MAEDA A., NAKAMURA H. , OWAKI H., HARDY R.R., and
KHISHIMUTO K.
"Monoclonal anti Fc_{Ce}R antibodies with different specificities and studies on
the expression on Fc_E Receptors on Human B and T cells "
J. Immunol., 134 : 1214 , 1984
- 98- MELNIK D.A. , NAUSSEF W.M. , MARKOWITZ S.D.
,GARDNER J.P. and MALECH H. L.
" Biochemical analysis and subcellar localization of a neutrophil specific
antigen , PMN-7 , involved in the respiratory burst " .
J. Immunol. , 134 : 3346 , 1985
- 99- MESSNER R. P. and JELINEK J.
"Receptor for human IgG globulin on human neutrophils "
J. Clin. Invest. 49 : 2165, 1970

- 100- NAUSEEF W.N. , ROOT R.K. , NEWMAN S. L. MALECH H. L.
"inhibition of zymosan activation of human neutrophil oxidative metabolism
by monoclonal antibody ."
Blood, 62 : 635, 1983.
- 101- OVLAQUE G.
" Production d'anticorps monoclonaux de spécificité anti IgE humaine ".
D.E.A.: Université des Sciences et Techniques de Lille : 1983
- 102- OLSSON L. et KAPLAN S.
" Human - human hybridomas producing monoclonal antibodies of
predefined antigenic specificity "
Proc. Natl. Acad. Sci. , 77 : 5929, 1980
- 103- PERUSSIA B., TRINCHIERI G. , LEBMAN D. , JANKIEWIEZ J. ,
LANGE B. and ROVERA G.
"Monoclonal antibodies that detect differentiation surface antigens on human
myelomonocytic cells "
Blood , 59 : 382 , 1982 .
- 104- PERUSSIA B. , ACUTO O., TERMORST C., FAUST J., LAZARUS ,
" Human natural killer cells analyzed by b73-1 , a monoclonal antibody
blocking Fc receptor II studies of B73-1 antibody-antigene interaction on the
lymphocyte membrane "
J. Immunol. , 130 : 2142 , 1983
- 105- PERUSSIA B. , LEBMAN D. , IP S. , ROVERA G. , TRINCHIERI G.
" Terminal differentiation surface antigens in human promyelocyte leukemia
cells (HL-60) treated with chemical inducer " .
Blood , 58: 836 , 1981 .
- 106- PERUSSIA B. , TRINCHIERI G.
" Antibody 3G₈ , specific for the human neutrophil Fc receptor reacts with
natural killer cells " .
J. Immunol., 132: 1410 , 1984

- 107- PERUSSIA B. , LEBMAN D. , IP S. , ROVERA G. , TRINCHIERI G.
" Terminal differenciation surface antigens in human promyelocyte leukemia cells (HL-60) treated with chemical inducer " .
Blood , 58 : 836 , 1981 .
- 108- PENBER O. , BARNES K. C. , STEPHEN J. , BRANDT J. and KINKAI M.
" Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes .Gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation " .
Blood , 61 : 1105 , 1983
- 109- PRIN L. , CAPRON M., TONNEL AB. , BLETRY O. , CAPRON A.
" Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils : variability in cell density and cytotoxicity ability in relation to the level and the origin of hypereosnophilia " .
Int. Arch.All. Appl. Immunol. , 72 : 336 , 1983
- 110- PRIN L.
" Eosinophile et ses fonctions " .
LARC MEDICAL , . III : 257, 1983.
- 111- PONTECORVO G.
"Production of mamalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment " .
Somat. Cell. Genet. , 1 : 397 , 1975
- 112- POTTER M. , PUMPHREY J. G. , WALTERS J. L.
" Growth of primary plasmocytomas in the mineral oil conditioned peritoneal environment " .
J. Natl. Cancer Institut , 49 : 305 , 1972 .
- 113- RAMSEY W. S.
"Analysis of individual leucocytes behavior during chemotaxis" .
Exp. Cell. Res., 70 : 129 , 1972
- 114- REPINE J.E., RASMUSSEN B., and WHITE J.G.
"An improved nitroblue tetrazolium test using phorbol myristate acetate coated coverslips" .
Am. J. Clin.Pathol., 71 : 582, 1979

- 115- ROIT I., BROSTOFF J., MALE D.
"Immunologie fondamentale et appliquée".
MEDSI. Médecine et Sciences fondamentales. 75007 Paris. 1985
- 116- ROJAS MORENO M., GOULU C., FONDANECHÉ M.C., BOURILLON R., BURTIN P.
"Purification and characterization of a new antigen from human polymorphonuclears".
Immunol. lett. 9: 215, 1985
- 117- RUMPOLD H., KRAFT D., OBEXER G., BOCK G., and GEBHART W.
"A monoclonal antibody against a surface antigen shared by human large granular lymphocytes Band granulocytes".
J. Immunol. , 129: 1458, 1982.
- 118- SCHIENLE A.W., and MULLER-RUCHOLTZ W.
"Specificity of a monoclonal anti-K-562 antibody".
J. Cancer. Res. Clin. Oncol. , 101 : 109, 1981.
- 119- SCHIFFMAN E., GEETHAU P., WARABI H., MATO J., BROWNSTEIN M., MANJUNATH R., MUKHERJEE A., LIOTTA L. and TERRANOVA V.
"Adherence and regulation of leukotoxis".
Agents Actions (Suppl) , 12 : 106, 1983.
- 120- SCHWATZ B. R. , OCHS H. D. , BEATTY P.G. and HARLAN J. M.
" A monoclonal antibody defined membrane antigene complex is required for neutrophils- neutrophils aggregation ".
Blood , 65 : 1553 , 1985
- 121- SCHLETTA L. and EPHRUSSI B. .
" Hybridization of normal and neoplastic cells *in vitro* ".
Nature , 207 : 1169 , 1965
- 122- SELIGMAN M. and BROUET J. C.
" Antibody activity of human myeloma globulins ".
Seminar in Immunology , 10 : 163 , 1973

- 123- SELIGMAN B. , CHUSED T.M. , and GALLIN J.L.
" Human neutrophil heterogeneity identified using flow microfluometry to monitor membrane potential .
J. Clin. Invest. 68 : 1125 , 1981.
- 124- SELIGMAN B. , HARRY L. , MALECH H. L. , MELNICK D. and GALLIN J. I.
" An antibody to a subpopulation of neutrophils demonstrate antigenic heterogeneity " .
Frans. Assoc. Am. Phys. 97 , 319 , 1981 .
- 125- SELIGMAN B. , CHUSED T.M. and GALLIN J. L.
" Differential binding of chemoattractant peptide to a subpopulation of human neutrophils " .
J. Immunol. 135 : 1568 , 1984
- 126- SHULMAN M. , WILDE C, D. , KHOLER G..
" A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies " .
Nature , 276 : 269 , 1978
- 127- SKUBITZ K.M. , WEISDORF D.J. , and PETERSON P. K.
" Monoclonal antibodies AHN-1 inhibits phagocytosis by human neutrophils"
Blood , 65 : 333 , 1985.
- 128- SKUBITZ K.M. , ZHEN Y. SU. and THON J.
" A human granulocyte specific antigen characterized by used of monoclonal antibodies " .
Blood , 61 : 351 , 1983
- 129- SORIEUL S. and , EPHRUSSI B. (1961) .
" Kariological demonstration of hybridization of mammilian cells *in vivo*"
Nature , 190 : 653 , 1961.
- 130- SPRY C.J.F.
" Eosinophils as effector cells in disease " .
Schweiz Med. Schr. , 108 : 1572 , 1978.

- 131- SPRY C.J.F. and TAI P.C.
"Studies on blood eosinophils II. Patients with Loefflers cardiomyopathy".
Clin. Exp. Immunol. , 24: 423 ,1976
- 132- STRAUSS L.C., SKUBITZ K.M., AUGUST J.T., CIVIN C.I.
"Antigenic analysis of hematopoiesis . II. Expression of human neutrophil on normal and anormal leukemic marrow -cells".
Blood , 63 : 574 , 1984
- 133- TETTEROO P., LANSDORP P.M., GEURTS-VAN-KESSEL A.H.,
HAGEMELJER M., VON DEM BORNE A.E.G., kr.
"Serologicall and biochemical characterization of human myeloid antigen associated to the antigenique expression in human mouse cell hybrids. ".
J. Clin. Invest. : 1963
- 134- THOMSON J.S., SEVERSON C.D., PARMELY M.J., MARMORSTEIN B., SIMMONS A.
Pulmonary "Hypersensitivity reactions" induced by transfusion of non-HLA-leukoagglutinins.
N Engl. J. Med. , 284 : 1120, 1971
- 135- THOMSON J.S., OVERLIN V.L., HERBICK J.M., SEVERSON C.D., CLASS F.J.H., AMARO J.D., BURNS C.P., STRAUSS R.G., KOEPKE J.A.
"New granulocyte antigens demonstrated by microgranulocytotoxicity".
J. Clin. Invest. , 65 : 1431, 1980
- 136- THOMSON R.A., CANDY D.C. and Mac MEIST A.S.
"Familial defect of polymorph neutrophil phagocytosis associated, with absence of a surface glycoprotein antigen (OKM1).
Clin. Exp. Immunol. , 58 : 229 , 1984.
- 137- TAI P.C., SPRY JC.J.F. , CHRISTER, P., VENGE P. and .OLSSON I.
"Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein".
Narure , 309: 182 , 1984

- 138- TAI P. C., BAVES D.M., BARTAIN L.R., and SPRY E.J.F.
"Plasma membrane antigens on light density and activated human blood eosinophils".
Clin. Exp. Immunol. 60: 168, 1985
- 139- THOMAS G., COTTER P.J., KEELING and HENSON P.M.
"A monoclonal antibody inhibiting FMLP induced chemotaxis of human neutrophil".
J. Immunol. , 127 : 2241 , 1981
- 139*- TRACEY R. , and SMITH H.
" An Inherited Anomaly of Human Eosinophils and Basophils "
Blood , 4 : 291, 1970
- 140- TOOD L.L. , NADLER L.M. , and SCHLOSSMAN S.F.
" Antigens of human monocytes identified by monoclonal antibody ".
J. Immunol 126 : 1435 , 1981 .
- 141- UGOLINI V., NUNEZ G. , SMITH R.G. , STATNY P. and CAPER J.D.
" Initial characterization of monoclonal antibodies against human monocytes"
Proc. Natl. Acad. U.S.A. 77 : 6764 , 1980
- 142- VADAS M.A. , LEOPAZ A.F. , WILIANSON D.J.
" Selective enhancement of the expression of granulocytes functional antigens 1 and 2 on human neutrophils "
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 82 : 2503 , 1985
- 143- VENGE P. , DAHL R. , ZETTERSTROM O. , ROXN L.E. , OLSSON I.
"Two levels of eosinophil cationic protein in patients with asthma " .
The Lancet ,. 20 : 373 , 1977
- 144- VERHEUGHT F.W.A., VON DEM BORME A.E.G. kr, VAN NOORD-BOKNORST J.C., NINENHUIS L.E., ENGELFRIET C.P..
ND1, a new neutrophil granulocyte antigen.
Vox Sang , 35 : 13 , 1978

- 145- VERHEUGHT F.W.A., VAN NOORD-BOKHORST J.C., VON DEM BORNE A.E.G., kr, ENGELFRIET, C.P.
"A family with allo-immune neonatal neutropenia : group-specific pathogenicity of maternal antibodies".
Vox Sang , 36 : 1., 1979
- 146- VON DEM BORNE A.E.G., kr, VERHEUGHT F.W.A., OOSTERHOF F., RIESZ E., VON BRUTEL DE LA RIVIERE A, ENGELFRIET C.P.E.
"A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies".
Br J. Haematol. , 39 : 195.1978
- 147- WEIGERT M., RASHKE W.C., CARSON D and COHN M.
"Immuno-analysis of the idiotypes of mouse myeloma proteins with specificity for levan or Dextran".
J. Exp. Med., 139 : 137, 1974
- 148- WEISS M.C., et EPHRESSI B..
"Studies of interspecific (rat x mouse) somatic hybrids : isolation, growth and evolution of karyotype".
Genetics, 54 : 1095 , 1966
- 149- WEISS M.C., et GREEN H.
"Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes".
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 58 : 1104 ,1967
- 150- WIDE L. , BENNICH H., et JOHANSSON S.G.O.
"Diagnostic of allergy by an *in vitro* test for allergen antibodies".
Lancet, 11 : 1105 , 1967
- 151- WITED S.C., SANTAELLA M., FRANK M.M., GAITHER T. and GALLIN J.I.
"Binding of immunoglobulin and complement-coated erythrocytes to human neutrophil subpopulations".
Inflammation , 5 : 103, 1981.

- 152- WONG L., and WILSON J.D.
"The identification of Fc and C3 receptors on human neutrophils"
J. Immunol. Methods. , 7 : 69, 1965.
- 153- YERGANIAN G., and NELL N.
"Hybridization of dwarf hamster cell by UV-inactivated Sendai virus".
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 55: 1066, 1966
- 154- YOMTOVIAN R., KLINE W., PRESS C., CLAY M., Mc CULLOUGH J.
"Pulmonary hypersensitivity and leukopenia associated with anti-NA2
neutrophil antibody in donor plasma".
Transfusion , 22 : 426 , 1982
- 155 - ZARLING J.M., KING P.C.
"Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and
cytotoxic T lymphocytes".
Nature , 288 : 394, 1980.
- 156- ZOLA H., Mc NAMARA P., THOMAS M., SMART I.J., and BRADLEY J.
"The preparation and properties of monoclonal antibodies against human
granulocyte membrane antigens".
Br. J. Hematol , 48 : 481, 1981.
-

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

CHAPITRE I :	<u>INTRODUCTION</u>	p 1
CHAPITRE II :	<u>GENERALITES</u>	p 4
I- <u>LES GRANULOCYTES HUMAINS; HISTORIQUE ET FONCTIONS</u>		p 5
A- <u>LE POLYMORPHONUCLEAIRE NEUTROPHILE</u>		p 5
1- <u>INTRODUCTION</u>		p 5
2- <u>PROPRIETES BIOLOGIQUES ET FONCTIONS IMMUNOLOGIQUES DU POLYMORPHONUCLEAIRE NEUTROPHILE HUMAIN</u>		p 5
2-1- <u>Propriétés et fonctions biologiques du PMN neutrophile</u>		" "
a- Inflammation défense anti microbienne et anti virale		" "
§-Chimiotactisme du PMn neutrophile		
§-Adhésion du PMN neutrophiles aux microorganismes		
§-Phagocytose des microorganismes par le PMN neutrophile		
§- Lyse des microorganismes par le PMN neutrophile		
b- Défense antibactérienne et anti virale		p 7
2-2- <u>Fonctions immunologiques du PMN neutrophile humain</u>		p 8
a - Rôle du neutrophile dans la réaction d'hypersensibilité à IgE		" "
b - Rôle du neutrophile dans la réaction d'hyper sensibilité de type II		" "
c - Rôle du neutrophile dans la réaction de type III		p 9

		130
<u>3 - ETUDE ANTIGENIQUE ET FONCTIONNELLE DU NEUTROPHILE PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX</u>	" "	
1- <u>Historique</u>	" "	
2- <u>Etude fonctionnelle du neutrophile humain par le biais des Ac. monoclonaux</u>	p	11
a - Importance des Ac. monoclonaux dans l'étude du rôle du PMN neutrophile au cours de la réaction inflammatoire	p	12
b - Etude par les Ac. monoclonaux des structures antigéniques intervenant dans le chimiotactisme des neutrophiles	" "	
c - Importance des Ac. monoclonaux dans l'étude de la phagocytose par le neutrophile	p	13
<u>BUT DU TRAVAIL : PREMIER OBJECTIF</u>	p	15
<u>B - LE POLYMORPHONUCLEAIRE EOSINOPHILE</u>	p	16
1 - <u>INTRODUCTION</u>	" "	
2 - <u>PROPRIETES BIOLOGIQUES ET FONCTIONS EFFECTRICES DE L'EOSINOPHILE</u>	" "	
2- 1- <u>Propriétés biologiques du polynucléaire éosinophile</u>	p	17
a- Ses capacités de mobilité	" "	
b- Sa fonction phagocytaire	" "	
c- Ses fonctions sécrétoires ou "exocytose"	p	18
2 - 2 - <u>Fonctions effectrices de l'éosinophile</u>		
a- Eosinophile : Cellule "Immunomodulatrice " aspect bénéfique"	p	18
b- Eosinophile : Cellule " Effectrice " aspect néfaste"	p	19
c- Modèles expérimentaux de mise en évidence de pathologie humaine liée à une hyperéosinophilie périphériques ou tissulaire	p	20
§-Eosinophilie et bronchopneumopathie	p	20
§-Eosinophilie et cardiomyopathie	p	21
§-Eosinophilie et neuropathie	" "	

3- ETUDE ANTIGENIQUE ET FONCTIONNELLE DU POLYNUCLEAIRE
EOSINOPHILE PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX p 22

BUT DU TRAVAIL : DEUXIEME OBJECTIF p 24

II. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX PAR
HYBRIDATION CELLULAIRE p 25

A- INTRODUCTION " "

1- DEFINITION " "

2- HISTORIQUE p 26

B- FUSION CELLULAIRE p 28

1- LES CELLULES " "

1 - 1 - Les lymphocytes producteurs d'anticorps " "

1 - 2 - Les plasmocytomes ou myélomes " "

2- LES AGENTS FUSOGENES " "

2 - 1 - Le virus de Sendai inactivé " "

2 - 2 - Les agents chimiques p 29

3- LES MECANISMES DE LA FUSION CELLULAIRE " "

4- LA SELECTION DES HYBRIDES p 30

5- LA STABILITE DES HYBRIDES p 31

C- LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX p 33

1- LE CLONAGE " "

2- LA PRODUCTION MASSIVE D'AC. MONOCLONAUX p 34

2 - 1 - <u>Production massive <i>in vitro</i> par culture cellulaire</u>	" "
2 - 2 - <u>Production massive <i>in vivo</i> par production d'un liquide d'ascite</u>	p 35
D- <u>CONCLUSION</u>	
CHAPITRE III - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	p 37
I. <u>PURIFICATION DES CELLULES CIRCULANTES</u>	p 38
A- <u>PREPARATION ET ISOLEMENT DES NEUTROPHILES SANGUINS HUMAINS</u>	p 38
B- <u>PREPARATION ET ISOLEMENT DES EOSINOPHILES HUMAINS</u>	p 39
C- <u>PREPARATION ET ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES ET DES MONOCYTES HUMAINS</u>	p 40
D- <u>PREPARATION ET ISOLEMENT DES PLAQUETTES HUMAINES</u>	" "
E- <u>PREPARATION ET ISOLEMENT DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS</u>	p 41
II- <u>FUSION CELLULAIRE POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX</u>	" "
A- <u>OBTENTION ET CULTURE DES LIGNEES CELLULAIRES</u>	" "
1- <u>LA LIGNEE MYELOMATEUSE</u>	p 42
2- <u>LES LYMPHOCYTES</u>	" "
2 - 1- <u>Protocole d'immunisation</u>	" "
a- <u>Injection par voie sous cutanée</u>	

b- Injection par voie intrapéritonéale

2 - 2 - Contrôle des immunisations p 43

a- Phase d'adsorption de l'antigène sur la phase solide

b- Incubation: contrôle des sérum ou des surnageants

c- Révélation

2 - 3 - Préparation et récupération des lymphocytes de la rate p 45

3- PREPARATION DES CELLULES NOURRICIERES " "

4- MILIEUX DE CULTURES p 46

B- PROTOCOLE DE FUSION " "

C- STABILISATION DES CLONES p 47

1- LA CONGELATION p 47

2- LE CLONAGE p 48

D- CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE DES AC. MONOCLONAUX PRODUIT p 48

1- DETERMINATION DE L'ISOTYPE " "

1-1-Technique de double diffusion en gel d'Ouchterlony " "

1-2-Technique immunoenzymatique ELISA p 50

E- PRODUCTION DE L'AC. MONOCLONAL p 51

1- PRODUCTION D'ASCITES: PRODUCTION MASSIVE D'ANTICORPS MONOCLONAUX " "

1-1Méthode intrapéritonéale " "

	134
1-2- <u>Méthode sous cutanée sans Pristane</u>	" "
2- <u>CONTROLE DE LA PRODUCTION</u>	p 52
3 - <u>PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX</u>	" "
3-1- <u>Purification de l'IgG_{2a} anti-neutrophiles Humains</u>	" "
§-Précipitation au sulfate d'ammonium	
§-Dessalage	
§-Echangeur d'ions	
§-Colonne d'affinité : Blue-TrisAcryl	
3-2- <u>Purification de l'IgM anti-éosinophiles Humains</u>	p 54
III- <u>SOLUBILISATION ET EXTRACTION</u> <u>MEMBRANAIRE DES PROTEINES DE</u> <u>SURFACES DES LEUCOCYTES HUMAINS</u>	p 55
A- <u>EXTRACTION DES PROTEINES MEMBRANAIRES</u>	" "
1- <u>INHIBITEURS ENZYMATIQUES</u>	" "
2- <u>DETERGENTS UTILISES</u>	" "
3- <u>INCUBATION ET DIALYSE</u>	p 56
B- <u>CONTROLE DE L'ETAT DES CELLULES</u>	" "
C- <u>DOSAGE DES PROTEINES</u>	" "
IV- <u>ETUDES BIOCHIMIQUES ET</u> <u>FONCTIONNELLES DES ANTICORPS</u> <u>MONOCLONAUX PRODUITS</u>	p 57

A- CONTROLE DE LA SPECIFICITE DES ANTICORPS
MONOCLONAUX PRODUITS

1- TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE (ELISA)

2- TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE
EN PHASE LIQUIDE (CHIMIO-LUMINOMETRE)

2-1- Principe

2-2- Technique

B -ETUDE BIOCHIMIQUE EN IMMUNOELECTRO
TRANSFERT OU "BLOTTING"

1- ELECTROPHORESE EN GEL POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

1- 1 - Solutions et tampons utilisés

a- Solution d'acrylamide

b- tampon

1- 2- Préparation du gel extemporanément

1- 3- Préparation des échantillons

2- IMMUNOELECTROTRANSFERT

C- ETUDE FONCTIONNELLE DES AC. MONOCLONAUX
PRODUITS

1- AC MONOCLONAL ANTI NEUTROPHILE HUMAIN : LE NW-224

1- 1- Etude des effets de l'antisorps monoclonal NW-224 sur
l'activation du métabolisme des neutrophiles humains par
chimioluminescence

1- 2- Etude de la migration spontanée du neutrophile en présence
de l'Ac. monoclonal par rapport à l'effet chimioattractant du FMLP

1- 3- <u>Etude de la libération de myéloperoxydase (MPO) par le neutrophile humain sous l'effet de l'anticorps monoclonal : NW-224</u>	p 63
1- 4- <u>Etude de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles circulants d'un parasite <i>Leishmania brasiliensis brasiliensis</i> : Lbb</u>	p 64
a- Préparation du parasite	" "
b- Préparation des polynucléaires neutrophiles	" "
2- <u>ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-EOSINOPHILES HUMAINS : EO6-71</u>	p 65
2-1- <u>Technique des rosettes IgE sur l'éosinophile</u>	" "
2-2- <u>Test de cytotoxicité de l'éosinophile et des plaquettes vis à vis du schistosomule de <i>Schistosoma mansoni</i></u>	p 67
CHAPITRE IV : <u>RESULTATS</u>	p 69
I - <u>PRODUCTION D'ANTIGENES DE SURFACE PAR EXTRACTION MEMBRANAIRE:</u>	
Comparaison de différents types de détergents	p 70
II- <u>PRODUCTION ET PURIFICATION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTINEUTROPHILE HUMAIN :</u>	
LE NW-224	p 72
A- <u>ETUDE IMMUNOCHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE</u>	p 72
1- <u>CLONAGE ET PURIFICATION</u>	" "
2- <u>ISOTYPES : DETERMINATION</u>	" "

3- <u>SPECIFICITE DU NW-224 VIS AVIS DU NEUTROPHILE</u>	p 73
4- <u>ETUDE BIOCHIMIQUE ET DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DE L'ANTIGENE RECONNU</u>	p 74
B- <u>ETUDE BIOLOGIQUE DU NW-224</u>	p 75
1- <u>EFFETS DU NW-224 SUR L'ACTIVATION METABOLIQUE DU NEUTROPHILE</u>	p 76
2 - <u>EFFET DU NW-224 SUR LA STIMULATION DE LA MOBILITE DU NEUTROPHILE</u>	p 80
3 - <u>EFFET DU NW-224 SUR LA PROPRIETE PHAGOCYTAIRE DU NEUTROPHILE <i>in vitro</i></u>	p 81
4 - <u>ETUDE DE LA LIBERATION DE L'ENZYME MYELOPEROXYDASE PAR LE NEUTROPHILE PREINCUBE AVEC LE NW-224</u>	p 82
 <u>PREMIERES CONCLUSIONS</u>	 p 84
 II- <u>PRODUCTION ET PURIFICATION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI EOSINOPHILE HUMAIN : L'EO6-71</u>	 p 86
A- <u>ETUDE IMMUNOLOGIQUE</u>	" "
1- <u>CLONAGE ET PURIFICATION</u>	" "
2- <u>ISOTYPE : DETERMINATION</u>	" "
3- <u>SPECIFICITE DE L'AC. MONOCLONAL EO6-71</u>	" "
4- <u>TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE EN CYTOFLUOROMETRIE</u>	p 87
 B- <u>ETUDE BIOLOGIQUE ET DETERMINATION BIOCHIMIQUE DE L'ANTIGENE RECONNU PAR L'EO6-71</u>	 p 88

- 1- TEST D'INHIBITION DES ROSETTES IgE SUR L'EOSINOPHILE " "
- 2- COMPARAISON DU BB10 ET DE L'EO6-71 EN IMMUNO ELECTRO TRANSFERT: "IMMUNOBLOTTING" p 89
- 3- INHIBITION DE LA CYTOTOXICITE DES PLAQUETTES: COMPARAISON ENTRE EO671 ET BB10 p 90

DEUXIEMES CONCLUSION p 91

CHAPITRE V : DISCUSSION p 92

- 1- Antigènes responsables de réactions différentes présents sur des cellules différentes p 95
- 2- Antigènes différents responsables de réactions similaires sur une même lignée cellulaire p 95
- 3- Antigènes différents responsables d'effets multiples et sélectifs sur certaines fonctions des granulocytes p 96
- 4- Anticorps monoclonal anti-neutrophile humain : le NW-224 p 97
- 5- Anticorps monoclonal anti - éosinophile humain : l'Eo6-71 p 99

CHAPITRE VI : CONCLUSION p 102

BIBLIOGRAPHIE p 105

TABLE DES MATIERES p 127