

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**ANTICORPS MONOCLONAUX ET PERSPECTIVES D'APPLICATION
EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE**

P.-P. PASTORET

*Service de Virologie, Immunologie et Pathologie des maladies virales,
Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège,
45, rue des Vétérinaires, B-1070 Bruxelles, Belgique*

Summary

MONOCLONAL ANTIBODIES AND THEIR POSSIBLE APPLICATIONS IN VETERINARY MEDICINE. A REVIEW. — Monoclonal antibodies are a relatively recent discovery — the first ones were obtained by Köhler and Milstein in 1975. The results obtained by these authors were published in the journal « Nature » under the title: « Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity ». This title is almost a definition and contains all the elements involved in the problem. Monoclonal antibodies are obtained by applying a technique described in just a few pages (Thiry and Pastoret, 1981), but which combines many other techniques and is the fruit of the slow maturation of several fundamental biological problems. It is therefore impossible to present them out of this context. This article is comprised of two parts. The first, though far from being the most important, presents the problem and attempts to give the most exact picture possible of what a monoclonal antibody is. How is it obtained, what are its properties, of what use can it be? The second part attempts to describe present applications of monoclonal antibodies and to draw from this their prospects for the future, taking account of all the possibilities involved for Veterinary Medicine.

Les anticorps monoclonaux sont de découverte relativement récente. Les premiers ont été obtenus par Köhler et Milstein en 1975. Les résultats de ces derniers ont été publiés dans la revue Nature sous le titre : « Cultures continues de cellules fusionnées sécrétant un anticorps de spécificité prédéterminée ». Ce titre est presque une définition et contient tous les éléments du problème. L'obtention d'anticorps monoclonaux résulte de l'application d'une technique dont la description tient en quelques pages (Thiry et Pastoret, 1981), mais qui se situe au point de convergence de beaucoup d'autres techniques et est le fruit pratique de la lente

maturation de plusieurs problèmes biologiques fondamentaux. Aussi est-il impossible de les présenter en les dissociant de ce contexte. Cet article comportera deux parties. La première, de loin la plus importante, posera le problème et s'efforcera de donner une image, la plus exacte possible, de ce qu'est un anticorps monoclonaux, comment il est obtenu, quelles sont ses propriétés, à quoi peut-il servir? La seconde partie tentera de décrire les applications actuelles des anticorps monoclonaux et de dégager leurs perspectives d'avenir, en tenant compte des contingences propres à la médecine vétérinaire.

Antigène, immunogénicité et antigénicité

Les antigènes sont des molécules complexes qui sont reconnues comme étrangères par des cellules immunologiquement compétentes. Pour qu'une molécule soit antigénique, elle doit donc présenter deux propriétés fondamentales :

- elle doit posséder une composition étrangère à celle de l'organisme,
- elle doit être une macromolécule complexe.

En fait, la situation est un rien plus compliquée et il y a plusieurs limitations aux caractères physico-chimiques d'une macromolécule pour qu'elle soit antigénique :

- elle doit certainement être d'une taille importante,
- elle doit être d'une certaine complexité chimique,
- elle doit être d'une rigidité suffisante,
- elle ne doit pas être trop facilement dégradable.

On considère que pour être antigénique, une molécule doit posséder une masse moléculaire certainement supérieure à 1 000 daltons, mais de préférence supérieure à 5 000 daltons. S'il s'agit d'un polypeptide, une masse moléculaire de 1 000 daltons correspond à une chaîne d'une petite dizaine d'acides aminés.

D'un point de vue immunitaire, les antigènes présentent deux propriétés distinctes :

- l'*immunogénicité* ou capacité d'induire la formation d'anticorps,
- l'*antigénicité* ou capacité de réagir avec les anticorps.

Seules les macromolécules réunissent les deux propriétés. Il existe par contre des substances qui, sans être immunogènes, sont parfaitement antigéniques. Si pareille substance est isolée, on s'aperçoit qu'elle possède une structure trop simple pour induire la formation d'anticorps ; si elle est couplée à des macromolécules elle devient immunogène et induit la formation d'anticorps avec lesquels elle peut se lier même lorsqu'elle est séparée de la macromolécule. Ce type de substances est appelé haptène et la macromolécule est appelée porteuse. Si ces substances font partie intégrante d'un antigène elles sont appelées déterminants antigéniques ou épitopes. La spécificité d'un anticorps est dirigée contre l'haptène ou le déterminant antigénique et l'antigène résulte en général de l'association d'une série de déterminants antigéniques différents.

Les déterminants antigéniques ont une taille de 10 à 15 Å, ce qui correspond à une séquence de quatre à six acides aminés. On les trouve généralement sur les parties proéminentes, exposées, de la molécule. Le nombre de déterminants antigéniques est directement proportionnel à la taille de la macromolécule. Ainsi l'on admet généralement qu'il y a un déterminant antigénique supplémentaire pour toute augmentation de 5 000 daltons de la masse moléculaire. Plusieurs antigènes différents peuvent posséder les mêmes déterminants antigéniques et provoquer l'apparition de réactions sérologiques croisées ; certaines molécules peuvent donc présenter une parenté antigénique.

Comme la spécificité de l'anticorps est dirigée contre le déterminant antigénique et comme l'antigène, qui résulte de l'association de plusieurs déterminants antigéniques, est le seul à être immunogène, en réponse à l'antigène, l'organisme animal va toujours réagir par la synthèse de plusieurs catégories d'anticorps correspondant chacune à un déterminant antigénique particulier. La réponse de l'organisme sera donc toujours et obligatoirement hétérogène, puisque diverses populations d'anticorps seront fabriquées et sécrétées par des plasmocytes, cellules qui dérivent par différenciation de lymphocytes B.

Les études menées à l'aide d'haptènes ont également permis de démontrer que ce qui importait dans le déterminant antigénique, c'est sa structure spatiale plus que sa constitution chimique ; l'anticorps reconnaît cette structure spatiale. C'est ce que l'immunologiste Herremans appelait le sens tactile à l'échelle moléculaire.

La diversité des anticorps

Un des vieux problèmes de l'immunologie est celui de la diversité des anticorps qui doivent répondre à autant de déterminants antigéniques, d'antigènes différents.

La fonction anticorps est exercée par des protéines, des globulines. Comme Herremans l'avait suggéré, toutes les protéines qui exercent une activité anticorps ou qui sont antigéniquement apparentées aux molécules d'anticorps sont regroupées sous le nom d'immunoglobulines et représentées par le signe Ig.

Les immunoglobulines se répartissent en différentes classes et sont synthétisées et sécrétées par les plasmocytes. Nossal et ses collaborateurs

ont mis au point une technique de microgouttes qui contiennent un seul lymphocyte. A l'aide de cette technique, ils ont pu montrer que chaque plasmocyte pris séparément ne produit qu'un seul type d'immunoglobulines de même spécificité. Il y a autant de clones de plasmocytes qu'il y a d'anticorps spécifiques différents et chaque cellule est unipotente. Après contact avec l'antigène, le lymphocyte B correspondant se différencie en un clone de plasmocytes qui produisent des anticorps monospécifiques. Un antigène, même extrêmement purifié, va stimuler plusieurs clones de lymphocytes et donc induire la formation de plusieurs clones de plasmocytes ; l'immunsérum qui en résultera sera polyclonal et dès lors hétérogène pour ce qui est de sa spécificité et de la classe des anticorps d'une spécificité déterminée.

On a depuis longtemps tenté d'obtenir des sérums qui seraient strictement spécifiques d'un déterminant antigénique singulier. Posséder un tel sérum permettait d'étudier la structure des anticorps et plus précisément la portion de ceux-ci qui correspond au déterminant antigénique et remplit dès lors le rôle essentiel dévolu aux immunoglobulines. Les immunologistes se sont donc efforcés d'obtenir des populations homogènes d'immunoglobulines. Les premières tentatives en ce sens ont été faites en purifiant les anticorps selon leur spécificité, c'est-à-dire en les couplant au déterminant antigénique puis en dissociant ultérieurement les immun-complexes formés. On a pu obtenir, de la sorte, des populations de molécules homogènes à 80 %.

Une autre voie d'approche a été offerte par l'existence de myélomes ; elle s'est révélée la plus fructueuse.

Les myélomes et la structure des anticorps

Les myélomes sont des tumeurs des lymphocytes B ; ils sont encore appelés plasmocytomes ou lymphomes B.

Lorsqu'on procède à une simple électrophorèse des protéines sériques, les gamma-globulines, qui regroupent la plupart des immunoglobulines, sont très hétérogènes à la fois dans les sérums normaux ou dans ceux d'animaux souffrant de gammopathies polyclonales. Un exemple typique de gammopathie polyclonale est celui fourni par la maladie aléoutienne du vison, provoquée par un *Parvovirus*. En effet, les animaux atteints de maladie aléoutienne présentent une gammopathie polyclonale et les gamma-globulines de leur sérum représentent

62 % des protéines sériques alors qu'elles ne représentent que 14 % des protéines d'un sérum normal. Cette hétérogénéité des gamma-globulines est bien moins évidente si l'animal souffre de myélome multiple. Comme les myélomes multiples proviennent d'une seule cellule précurseur, ils produisent une immunoglobuline homogène, monoclonale, que l'on appelle protéine de myélome ou paraprotéine. Ces protéines de myélome peuvent appartenir à n'importe quelle classe des immunoglobulines. Lors d'atteinte par un myélome, des protéines particulières apparaissent dans les urines de l'animal malade. Ces protéines sont appelées protéines de Bence-Jones, parce qu'elles ont été observées par le Docteur Bence-Jones dans les urines de l'un de ses patients présentant un myélome. En fait, les protéines de Bence-Jones sont des fragments de la protéine pathologique qui apparaît dans le sérum de ces mêmes malades. Ces protéines existent en très grande quantité dans les urines et sont très aisément purifiables. Elles correspondent à des chaînes légères d'immunoglobuline.

L'intérêt de ces protéines est, qu'étant des fragments d'immunoglobulines monoclonales, elles sont toutes identiques chez un même individu, mais différent selon les individus. Les protéines de Bence-Jones ont une masse moléculaire de 45 000 daltons et sont en réalité des dimères de chaînes légères qui ont une masse moléculaire de 22 500 daltons. Cette dernière masse moléculaire correspond à une séquence de 214 acides aminés. L'étude de la structure primaire de plusieurs protéines de Bence-Jones provenant d'individus différents de la même espèce a permis de mettre en évidence deux domaines dans la protéine. En fait, la moitié N-terminale de la molécule est variable (acides aminés 1 à 107) alors que la partie C-terminale est constante. La moitié N-terminale est appelée région variable alors que la région C-terminale est appelée région constante. Lorsque les résultats de l'analyse de la structure primaire des chaînes légères ont été intégrés dans un ensemble de résultats obtenus à l'aide de plusieurs autres techniques, on a pu déduire la structure globale de la molécule d'immunoglobuline. La région variable de la molécule correspond à celle qui se lie à l'antigène. Au sein de la région variable, on distingue une région hypervariable. Cette région hypervariable correspond à 15 à 20 acides aminés de contact. Si n'importe quel acide aminé peut occuper chacun de ces sites, on conçoit facilement que les possibilités de variation sont énormes et peuvent répondre au besoin créé par la grande diversité des déterminants antigéniques rencontrés.

Les myélomes ont été des outils remarquables pour étudier la structure des anticorps et élucider les bases moléculaires de leur variabilité. Comme il existe des myélomes pour les différentes classes d'immunoglobulines, ils ont également permis une étude approfondie de ces classes. Cependant comme ces tumeurs apparaissent spontanément chez l'animal, il est impossible de savoir à quel déterminant antigénique répond la région hypervariable que l'on étudie. Pour étudier des régions hypervariables répondant à des antigènes déterminés, une étape supplémentaire devait être franchie. Elle l'a été avec l'obtention des cellules hybrides.

Les cellules hybrides

En 1960, Barski et ses collaborateurs, observant une culture mixte de deux lignées de cellules de souris de caryotypes différents y découvrent des cellules hybrides contenant le matériel chromosomique des deux lignées. En l'espace de cinq ans, des techniques ont été mises au point pour induire la fusion de cellules animales et pour sélectionner des lignées engendrées par la division clonale indéfinie de certaines cellules hybrides (Harris et Watkins, 1965 ; Davidson et Ephrussi, 1965 ; Littlefield, 1964 ; Okada, 1958).

Pour fusionner les cellules, on a commencé par exploiter une propriété bien connue de certains virus, comme le virus Sendai, de provoquer la fusion cellulaire (Irvin *et al.*, 1977). Le virus Sendai agit après avoir été inactivé et l'activité de fusion ne réclame donc pas de néosynthèses cellulaires viro-induites. C'est pourquoi le même effet a pu être obtenu grâce à un agent chimique comme le polyéthylène glycol (PEG). Les travaux sur les hybrides obtenus ont d'abord porté sur les possibilités qu'ils offraient de construire une carte chromosomique de l'homme (Ruddle et Creagan, 1975) et d'analyser certains aspects des régulations mises en œuvre dans les processus de différenciation cellulaire (Davidson *et al.*, 1966). Les expériences d'hybridation mettant en œuvre des cellules lymphocytaires ont initialement fusionné des cellules de lignées « permanentes », capables d'un nombre indéfini de divisions *in vitro*. Des lignées lymphoïdes exprimant les caractères de différenciation propres aux lymphocytes T ou B, peuvent en effet être établies en culture à partir de cellules tumorales ; elles sont caractérisées par leurs marqueurs antigéniques de surface et, dans le cas des

myélomes, par la sécrétion d'une immunoglobuline (Ig) particulière à chaque myélome.

L'isolement des hybrides à partir de deux lignées établies repose sur la définition de conditions de culture dans lesquelles les cellules hybrides, qui sont minoritaires dans la population, peuvent seules proliférer. Cette condition peut être satisfaite par l'introduction dans les lignées de « marqueurs génétiques » couplée avec le choix de milieux sélectifs appropriés (Buttin et Casenave, 1980).

En pratique, l'un des marqueurs génétiques choisi est presque toujours la déficience en une enzyme du métabolisme purique, l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT), dont l'activité conditionne l'utilisation d'hypoxanthine exogène comme source de nucléotides puriques. L'activité de l'HGPRT n'est en effet pas indispensable à la croissance de la plupart des cellules dans les conditions habituelles de culture : une voie de biosynthèse endogène assure la production des nucléotides puriques lorsque le milieu ne contient pas d'hypoxanthine.

Le marqueur introduit dans l'autre lignée est fréquemment la déficience en thymidine-kinase (TK). Comme l'HGPRT, cette enzyme, qui convertit la thymidine exogène en thymidilate, n'est pas indispensable à la croissance des cellules de mammifères, qui peuvent synthétiser leur thymidilate par une voie parallèle de biosynthèse endogène.

La contre-sélection simultanée des cellules HGPRT⁻ et TK⁻ est réalisée en incorporant au milieu de culture de l'aminoptérine, inhibiteur des voies de biosynthèse endogène des purines et du thymidilate. Un milieu de sélection pour les hybrides entre cellules d'une part HGPRT⁻ TK⁺ et d'autre part HGPRT⁺ TK⁻ est donc simplement réalisé en incorporant aux milieux de culture usuels hypoxanthine, aminoptérine et thymidine pour obtenir le milieu HAT. Seuls vont se multiplier dans ce milieu les clones hybrides chez lesquels la juxtaposition des deux génomes parentaux réalise la complémentarité génétique indispensable pour la synthèse sous forme active des enzymes HGPRT et TK (fig. 1).

La démonstration par Köhler et Milstein (1975) de ce que l'hybridation cellulaire permet de produire en quantité indéfinie des anticorps monoclonaux de spécificité prédéterminée devait attirer l'attention de la communauté scientifique sur une technologie susceptible de résoudre le problème crucial précédemment évoqué : la disposition d'anticorps monospécifiques strictement homogènes.

Les hybridomes et les anticorps monoclonaux : leur obtention

La technique d'obtention d'anticorps monoclonaux repose également sur la fusion de deux types de cellules et la sélection d'hybridomes. Le premier type de cellules provient de la rate d'une souris préalablement immunisée avec un antigène choisi, prédéterminé ; cette rate est en fait la source de lymphocytes B, parfaitement normaux et ne présentant donc aucun marqueur génétique. Les cellules du second type sont celles d'une lignée provenant d'un myélome, de souris le plus souvent, qui apportent l'immortalité. On choisit généralement une lignée qui a perdu l'enzyme HGPRT (fig. 2). La fusion des deux types cellulaires se réalise en présence de polyéthylène glycol. Une cellule myélomateuse sur mille en moyenne fusionne avec une cellule splénique. Les cellules fusionnées sont mêlées à des cellules spléniques et à des cellules de myélome non fusionnées (Bazin, 1981 ; Secher, 1980 ; Milstein, 1980). Il n'est pas nécessaire d'avoir un marqueur génétique pour les cellules de rate car, n'étant pas immortelles, elles disparaissent en quelques jours. Comme on

utilise le milieu HAT, les cellules myélomateuses, dépourvues d'HGPRT, ne survivent pas non plus. Seules subsisteront les quelques cellules hybrides qui ont incorporé les génomes des deux types cellulaires parentaux. En effet, elles conservent la propriété de survivre en culture, héritée de la cellule myélomateuse, et celle d'utiliser l'HGPRT pour la synthèse du DNA à partir d'hypoxanthine, héritée de la cellule splénique. L'utilisation du seul milieu HAT permet d'isoler une population d'hybrides synthétisant des anticorps de spécificité variée, car la fusion se fait au hasard, avec n'importe quelle cellule splénique. Cependant, la probabilité de posséder des hybrides ayant la spécificité désirée est grande, car la souris dont on avait prélevé les cellules spléniques avait été hyperimmunisée contre l'antigène choisi.

Après fusion et sélection des hybrides, la spécificité des anticorps sécrétés est encore totalement inconnue. De plus, de nombreux hybrides ne sécrètent pas. Les surnageants des cultures qui poussent sont dès lors récoltés et examinés pour rechercher la présence d'anticorps spécifiques. Pour isoler les cellules hybrides désirées, une étape supplémentaire, le

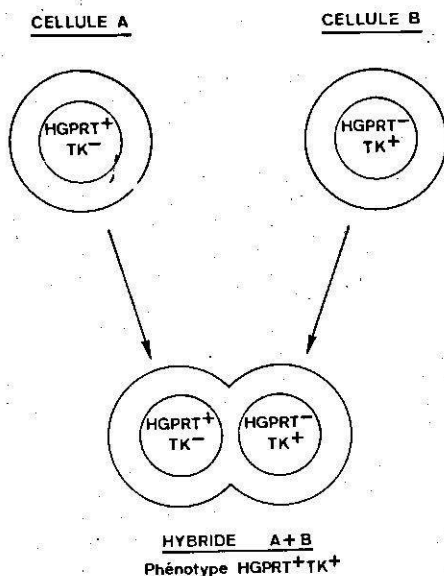


Fig. 1. — Principe d'obtention et de sélection de cellules hybrides.

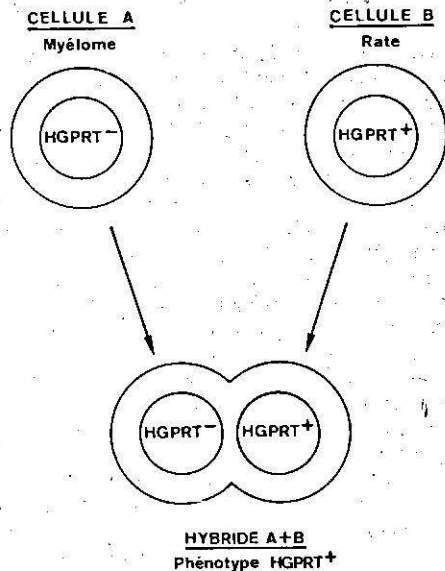


Fig. 2. — Principe d'obtention et de sélection d'hybridomes : hybrides entre un lymphocyte splénique et une cellule de myélome.

clonage, est nécessaire. Pour ce faire, une technique de dilution des cellules est employée, dans le but d'obtenir des lignées d'hybrides dérivant chacune d'une seule cellule souche, qui constituent des clones. Chaque clone est alors testé pour reconnaître ceux qui synthétisent bien l'anticorps recherché; les clones positifs sont sélectionnés et multipliés massivement en culture. Cette partie de la technique est la plus aléatoire et la plus fastidieuse; elle impose le recours à des tests immunologiques de réalisation rapide et qui puissent être appliqués simultanément à de nombreux échantillons. Seul ce type de test permet de découvrir l'aiguille dans la botte de foin. Les clones sélectionnés sont ensuite réinjectés à la souris, recloneés puis remultipliés avant de les conserver dans l'azote liquide. En fait, à chaque étape, les clones peuvent être conservés par congélation dans l'azote liquide. Dès que le clone hybride est sélectionné et conservé par congélation, la production d'anticorps monoclonaux peut commencer. Pour produire des anticorps monoclonaux à plus grande échelle, deux solutions sont offertes. Les clones peuvent être injectés à des souris syngéniques, qui vont développer des tumeurs productrices d'anticorps monoclonaux; ceux-ci seront alors récoltés dans le sérum et le liquide d'ascite des souris, associé à la tumeur. Les anticorps monoclonaux peuvent également être récoltés au départ du surnageant de culture des hybridomes, mais ce procédé de récolte est malheureusement moins productif que le précédent. Dans les deux cas, l'assurance de posséder un réactif toujours identique est absolue, car les clones producteurs d'anticorps sont immortels, conservés intacts dans l'azote liquide et c'est au départ d'une population de cellules ayant gardé les mêmes propriétés que, au cours du temps, on prépare l'anticorps monoclonal. Le myélome hybride synthétise non seulement l'immunoglobuline grâce à l'information génétique reçue de la cellule splénique parentale, mais également des fragments d'immunoglobuline par les gènes apportés par la cellule myélomateuse parentale. Ces fragments peuvent être considérés comme des impuretés dont on veut se débarrasser pour posséder des lignées ne sécrétant que l'anticorps monoclonal. Pour parvenir à cette fin, deux voies sont connues (Milstein, 1980). La première consiste à user de la faculté qu'ont les cellules hybrides de perdre, dans les premiers temps, un certain nombre de chromosomes; on isole les variants qui ont perdu la capacité de synthétiser les fragments d'immunoglobuline, mais conservent celle de sécréter l'anticorps monoclonal. La deuxième voie se propose de sélectionner des

lignées myélomateuses qui ne sécrètent aucun fragment d'immunoglobuline. L'hybride, dans ce cas, synthétisera uniquement l'anticorps monoclonal dont il a reçu l'information génétique par la cellule splénique parentale.

Les types d'hybridomes connus

Les hybridomes obtenus par la technique sommairement décrite ci-dessus sont des hybridomes souris \times souris. Il existe également des hybrides rat \times rat, rat \times souris, souris \times lapin (Bazin, 1981; Medrano *et al.*, 1979).

Pour l'utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique humaine, des hybrides spécifiques sont souhaitables et ont été recherchés. Avant l'obtention de cellules myélomateuses humaines susceptibles d'être utilisées pour la production d'hybridomes (Kaplan et Olsson, 1981), des hybrides de cellules de myélome de souris et de lymphocytes humains ont été formés (Levy *et al.*, 1980). Ces hybrides sont très difficiles à maintenir car, chez eux, il y a perte rapide et préférentielle des chromosomes humains. Les recherches sur les hybrides homme \times homme se sont donc poursuivies et ont récemment abouti. Le problème majeur des hybrides homme \times souris et homme \times homme reste d'ordre éthique. De telles perspectives peuvent par contre être envisagées sans trop de restrictions en médecine vétérinaire, pour autant que nous disposions de lignées myélomateuses dans les diverses espèces animales qui nous occupent.

Les propriétés des anticorps monoclonaux

L'exceptionnel intérêt porté aux techniques d'hybridation lymphocytaire se justifie parce que les produits de sécrétion des hybridomes constituent des sondes commodées pour diagnostiquer la présence d'une variété considérable de déterminants antigéniques distribués sur les structures ou dans les fluides biologiques.

A leur stricte spécificité de reconnaissance, ces anticorps ajoutent des avantages pratiques essentiels par rapport aux antisérums conventionnels: ils peuvent être produits en quantité quelconque et avec des caractéristiques constantes, qu'ils soient dirigés contre un antigène courant ou rare.

Ces propriétés sont d'un intérêt évident pour la constitution de banques d'un matériel de diagnostic standardisé (Buttin et Cazenave, 1980).

Deux propriétés sont encore à l'avantage des anticorps monoclonaux. Si l'on donne aux hybridomes en culture des acides aminés précurseurs marqués par un isotope radioactif, on peut obtenir des anticorps monoclonaux marqués au ^{14}C , au ^{35}S , au ^3H . De plus, le marquage radioactif interne ne modifie pas la structure chimique des immunoglobulines. C'est un avantage très intéressant en immunocytochimie (Milstein *et al.*, 1980). Enfin, il reste un avantage auquel on ne peut rester insensible, c'est celui d'économiser le nombre des animaux de laboratoire destinés à la production d'antisérums conventionnels si l'on produit l'anticorps *in vitro*.

Les anticorps monoclonaux peuvent en effet avoir l'usage de la plupart des antisérums conventionnels. Ils présentent cependant quelques défauts : ces derniers sont peu nombreux, mais réels. Ainsi, beaucoup d'anticorps monoclonaux ne précipitent pas l'antigène correspondant, car leur spécificité extrêmement restreinte ne leur permet pas de former un réseau. On pallie cette difficulté par le mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre des déterminants antigéniques différents du même antigène (Edwards, 1981). D'autre part, comme la population d'anticorps est homogène, ils appartiennent tous à la même classe et les propriétés physico-chimiques d'anticorps de même spécificité varient selon la classe à laquelle ils appartiennent (Edwards, 1981). La médaille des anticorps monoclonaux possède également son revers. Les anticorps monoclonaux, population homogène d'anticorps dirigés contre le même déterminant antigénique, peuvent retrouver celui-ci de manière parfois inattendue sur des substrats totalement étrangers à l'antigène prédéterminé, propriété qui passerait inaperçue si l'on usait d'un sérum conventionnel (Edwards, 1981).

Applications des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux commencent à remplacer les immunosérums conventionnels dans une série de domaines. Si la recherche fondamentale profite largement de cette nouvelle technique, celle-ci trouve aussi des applications importantes dans le diagnostic et certaines techniques de purification biochimique. Dans

l'avenir, elle fera peut-être partie de l'arsenal thérapeutique.

En fait, des anticorps monoclonaux peuvent être obtenus contre toute substance intéressante, pourvu qu'elle ne soit pas tolérée par l'animal qui fournit les cellules spléniques et qu'il existe un moyen simple de détecter les clones sécrétant l'anticorps recherché (Edwards, 1981 ; Staines et Lew, 1980 ; Lipinski et Herzenberg, 1981 ; Sevier *et al.*, 1981).

Diagnostic

Les applications les plus évidentes des anticorps monoclonaux se situent au niveau du diagnostic. C'est ainsi que des anticorps monoclonaux ont été préparés contre le virus rabique (Wiktor et Koprowski, 1978 ; Wiktor *et al.*, 1980 ; Kaplan et Koprowski, 1981), contre le virus influenza et nombre d'autres virus (Gerhard *et al.*, 1978). Signalons également que Gerhard et ses collaborateurs (1981) sont parvenus à simuler *in vitro* le phénomène de dérive antigénique en cultivant des virus influenza en présence d'anticorps monoclonaux. Des anticorps monoclonaux ont été produits contre des antigènes streptococciques (Polin, 1980), contre les antigènes de certains parasites (Mitchell *et al.*, 1979 ; Mitchell, 1981 ; Freeman *et al.*, 1980 ; Cox, 1980 ; Pearson *et al.*, 1980), pour la détection d'hormones humaines (Wang *et al.*, 1981). Cette liste ne donne que quelques exemples de réalisations, parmi les plus spectaculaires ; elles sont déjà tellement nombreuses qu'il est impossible d'être exhaustif.

Purification biochimique

Les anticorps monoclonaux sont également extrêmement intéressants pour obtenir des anticorps spécifiques lorsqu'on ne possède qu'un mélange antigénique complexe. La purification de l'interféron leucocytaire humain a été réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux (Secher et Burke, 1980). L'interféron ne représentait que 0,1 à 1 % des protéines contenues dans le matériel ayant servi à immuniser les souris avant la récolte des cellules spléniques. Parmi les clones obtenus, ont été retenus ceux qui sécrétaient un anticorps monoclonal neutralisant l'activité antivirale de l'interféron. L'anticorps monoclonal sélectionné est de spécificité parfaite, bien qu'il ait été préparé à partir d'un matériel immunisant très impur. Si le même matériel avait été utilisé pour la production d'un immunosérum conventionnel, il n'aurait donné aucun résultat. L'anticorps monoclonal, lié de manière covalente à un support

(chromatographie d'affinité), permet de purifier l'interféron 5 000 fois en une seule étape.

Recherche fondamentale

Les anticorps monoclonaux trouvent ici un terrain d'élection : pour l'étude des antigènes majeurs d'histocompatibilité (McKearn *et al.*, 1980 ; Lemke *et al.*, 1978), des lymphocytes (Denis *et al.*, 1980 ; Goldsby *et al.*, 1980 ; Mason *et al.*, 1980 ; Reinherz *et al.*, 1981), des déterminants idiotypiques des immunoglobulines (Urbain *et al.*, 1980).

Immunothérapie

Puisque les hybrides homme \times homme sont désormais réalisables, il est raisonnable de penser que, dans un proche avenir, les anticorps monoclonaux pourront être utilisés en sérothérapie en médecine humaine. Comme les anticorps constituent d'excellents antigènes, il serait de loin préférable de disposer d'anticorps homologues pour la sérothérapie.

La sérothérapie homologue existe déjà chez l'homme (ex. : sérothérapie antirabique), mais dans de rares circonstances. On imagine mal, en effet, d'hyperimmuniser l'homme contre n'importe quel antigène et de le soumettre ensuite à des prélèvements répétés de sérum en grande quantité. Les anticorps monoclonaux, obtenus *in vitro* vont permettre de résoudre ce problème dans une large mesure. De toute façon, ils offrent l'extrême avantage d'être un réactif purifié dès le départ. Expérimentalement, la sérothérapie à l'aide d'anticorps monoclonaux a déjà obtenu quelques résultats encourageants. L'immunothérapie passive pourrait employer de manière utile des anticorps monoclonaux de la classe appropriée ; de plus, les anticorps monoclonaux s'avèreront très intéressants pour mieux comprendre certains mécanismes de l'immunothérapie passive.

Les anticorps monoclonaux pourraient également être utilisés dans toutes les situations où l'on désire manipuler la réponse immunitaire. Tout d'abord, on pourrait administrer des anticorps définis chez le patient pour induire une réponse anti-idiotype et prévenir ainsi une réponse immunitaire ultérieure. Par ce biais, on pourrait par exemple obtenir une prolongation de la durée de vie de certaines allogreffes (Stuart *et al.*, 1979). Dans d'autres situations, on pourrait directement utiliser des anticorps monoclonaux anti-idiotypiques préparés contre certains idiotypes choisis (Urbain *et al.*, 1981).

Une autre application potentielle concerne la lutte contre le cancer. Les marqueurs de surface

des cellules tumorales sont en effet des candidats idéaux pour une analyse sérologique précise à l'aide d'anticorps monoclonaux. Des anticorps monoclonaux peuvent être utilisés seuls, directement pour lutter contre les cellules tumorales (Dillman *et al.*, 1981). C'est ainsi que des essais cliniques ont déjà été tentés chez l'homme, sur des malades atteints de leucémie et en fin d'évolution, à l'aide d'anticorps monoclonaux d'origine murine. Chaque injection a été suivie d'une chute rapide mais transitoire des leucocytes. On a pu démontrer que les anticorps monoclonaux se liaient bien *in vivo* aux cellules tumorales et constater des réactions anaphylactiques qui, fort heureusement, ont pu être corrigées.

Les anticorps monoclonaux peuvent également être associés à une toxine pour former des immunotoxines. C'est ainsi qu'on est parvenu à construire une immunotoxine (Blythman *et al.*, 1981), molécule hybride constituée d'un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène de cellule leucémique de souris et de la sous-unité A de la toxine diphtérique, qui inhibe la protéosynthèse dans les cellules touchées. L'immunotoxine contient à la fois un élément de reconnaissance de la cellule tumorale et un élément cytotoxique. Elle a été testée avec succès *in vitro* et *in vivo* sur souris. Pareilles immunotoxines pourraient également être très utiles en thérapeutique antivirale (O'Neill, 1979) et pour combattre certaines réactions auto-immunes.

Signalons enfin que dans des situations particulièrement complexes comme celles engendrées par les maladies parasitaires, les anticorps monoclonaux se révèlent particulièrement utiles pour discerner, parmi tous les antigènes disponibles aux différents stades, quels sont ceux contre lesquels la réponse immunitaire doit être dirigée.

Applications actuelles des anticorps monoclonaux en médecine vétérinaire

Au même titre que la médecine humaine, la médecine vétérinaire a vu se développer les applications des anticorps monoclonaux. En effet, elle commence à utiliser cette technique au moins dans un but de diagnostic et certainement dans un but de recherche. C'est ainsi que les anticorps monoclonaux ont été utilisés avec succès dans l'immunodiagnostic de certaines maladies parasitaires, comme l'hydatose du

mouton, provoquée par *Echinococcus granulosus* (Craig *et al.*, 1981), et de certaines maladies virales, comme la leucose bovine par l'équipe d'Arsène Burny (communication personnelle).

Cet outil a également été utilisé pour obtenir des anticorps dirigés contre les immunoglobulines bovines, comme l'IgM. Un des anticorps obtenu se lie à l'IgM pentamérique sérique, tout autant qu'à l'IgM monomérique présente à la surface des lymphocytes B, offrant ainsi un outil remarquable pour énumérer les cellules qui portent de l'IgM dans les suspensions de cellules lymphoïdes et pour distinguer les lymphocytes B ou les cellules dérivées dans des coupes de tissus (Pinder *et al.*, 1980).

Une des réussites les plus spectaculaires de la méthode vient sans conteste, comme je l'ai rappelé précédemment, de son application dans la lutte contre la rage, où la prophylaxie médicale spécifique continue à jouer un rôle déterminant (Toma et Andral, 1977). On pensait encore récemment que les antigènes du virus rabique étaient similaires, sinon identiques, quelle que soit la source de virus (Kaplan et Koprowski, 1980). Cette hypothèse se fondait sur le fait que les antigènes présentaient une réactivité immunologique similaire vis-à-vis des sérums antirabiques prélevés sur des animaux immunisés contre le virus de la rage. Pourtant, lorsqu'on étudia les préparations du virus de la rage à l'aide d'anticorps monoclonaux, il apparut clairement que les souches que l'on considérait auparavant comme identiques ou très voisines différaient parfois franchement, avec toutes les conséquences qui en découlent et que l'on devine.

Perspectives en médecine vétérinaire

La technique des anticorps monoclonaux ne peut connaître qu'un succès grandissant en matière de diagnostic et de recherche.

Pour son utilisation en thérapeutique vétérinaire, des adaptations de la méthode sont encore nécessaires avant d'y parvenir. Comme chez l'homme, il y aurait intérêt à posséder, pour les différentes espèces qui nous occupent, des lignées continues de myélomes spécifiques. Des myélomes multiples ont, à ma connaissance, été décrits chez le chien, le chat, le cheval, la vache, le porc et le lapin (Osborne *et al.*, 1968; Hurvitz *et al.*, 1971; Kehoe *et al.*, 1972; Cornelius *et al.*,

1979; Pedini et Romanelli, 1955; Barboni, 1947; Pascal, 1961; Groulade *et al.*, 1959). Il est donc vraisemblable que l'on pourra trouver les myélomes indispensables dans la plupart des espèces domestiques et que ceux-ci pourront permettre de tenter d'obtenir des lignées de cellules myélomateuses de ces diverses espèces. L'obtention de cellules sensibilisées homologues ne pose pas exactement les mêmes problèmes éthiques qu'en médecine humaine. Un magnifique travail de base reste donc à faire; l'enjeu en vaut la peine; le champ d'étude est immense et s'avèrera certainement passionnant. Il faut souhaiter que des moyens financiers suffisants seront octroyés pour poursuivre ce type de recherches.

Conclusions générales

Les anticorps monoclonaux sont un moyen d'investigation puissant, par leur spécificité prédéterminée et leur obtention en quantité illimitée, notamment *in vitro*. Ces avantages des anticorps monoclonaux suffisent à expliquer l'essor considérable de la méthode depuis sa création, bien que, comme tout outil, ils souffrent de limitations plus ou moins importantes selon l'usage que l'on veut en faire. Il faut bien les connaître pour bien les utiliser. Leur utilisation dans le domaine du diagnostic et de la recherche est une réalité, des essais thérapeutiques sont tentés avec un certain succès; la médecine vétérinaire devrait pouvoir en bénéficier.

Accepté pour publication, le 26 février 1982.

Remerciements

Tous mes remerciements vont à toutes les personnes de la Station de Recherche de Virologie et d'Immunologie de l'INRA à Thiverval-Grignon, France, qui m'ont aidé dans la rédaction de ce manuscrit et, plus particulièrement, J. Asso, P. Pery, Madame Grosclaude, ainsi que tous les membres de mon service qui ont participé à son élaboration: E. Thiry, A. Schwes et L. Dagenais.

Références

- BARBONI E., 1947. Il cloroma negli animali studio di un caso nel suino. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, **1**, 329-348.
- BARSKI G., SORIEUL S., CORNEFERT F., 1960. Production dans des cultures *in vitro* de deux souches cellulaires en association de cellules de caractère « hybride ». *C. R. Acad. Sci., Paris Série D*, **251**, 1825-1827.
- BAZIN H., 1981. Les anticorps monoclonaux. *Louvain Méd.*, **100**, 3-8.
- BLYTHMAN H.F., CASELLA P., GROS O., GROS P., JANSEN F.K., PAOLUCCI F., PAU B., VIDAL H., 1981. Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cells. *Nature*, **290**, 145-149.
- BUTTIN G., CAZENAVE P.A., 1980. L'hybridation des cellules lymphocytaires. *Bull. Inst. Pasteur*, **78**, 7-47.
- CORNELIUS C.E., GOODBURY R.F., KENNEDY P.C., 1959. Plasma cell myelomatosis in a horse. *Cornell Vet.*, **49**, 487-493.
- COX F.E.G., 1980. Monoclonal antibodies and immunity to malaria. *Nature*, **284**, 304-305.
- CRAIG P.S., HOCKING R.E., MITCHELL G.F., RICKARD M.D., 1981. Murine hybridoma-derived antibodies in the processing of antigens for the immunodiagnosis of hydatid (*Echinococcus granulosus*) infection in sheep. *Parasitology*, **83**, 303-317.
- DAVIDSON R.L., EPHRUSSI B., 1965. A selective system for the isolation of hybrids between L cells and normal cells. *Nature*, **205**, 1170-1171.
- DAVIDSON R.L., EPHRUSSI B., YAMAMOTO K., 1966. Regulation of pigment synthesis in mammalian cells, as studied by somatic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56**, 1437-1440.
- DENIS K., KENNETT R.H., KLINMAN N., MOLINARS C., SHERMAN L., 1980. Defining the B-cell repertoire with hybridomas derived from monoclonal fragment cultures. In: Kennett R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., *Monoclonal antibodies*, 49-59, Plenum Press, New York.
- DILLMAN R.O., SOBOL R.E., WORMSLEY S., COLLINS H., BEAUREGARD J., ROYSTON Y., 1981. Monoclonal antibody serotherapy in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Abs. XXIX Colloquium Protids of the Biological Fluids*, May 4-7, 1981, Brussels, n° 64.
- EDWARDS P.A.W., 1981. Some properties and applications of monoclonal antibodies. *Biochem. J.*, **200**, 1-10.
- EISENBARTH G.S., 1981. Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research. *Anal. Biochem.*, **111**, 1-16.
- FREEMAN R.R., TREJDOSIEWICZ A.J., CROSS G.A.M., 1980. Protective monoclonal antibodies recognising stage-specific merozoite antigens of a rodent malaria parasite. *Nature*, **284**, 366-368.
- GERHARD W., CROCE C.M., LOPES D., KOPROWSKI H., 1978. Repertoire of antiviral antibodies expressed by somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 1510-1514.
- GERHARD W., YEWDALL J., FRANKEL M.E., WEBSTER R., 1981. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature*, **290**, 713-717.
- GOLDSBY R.A., OSBORNE B.A., ENGLEMAN E.G., 1980. Characterization of a human T-cell population identified and isolated by a monoclonal antibody. In: Kennett R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., *Monoclonal Antibodies*, 121-135, Plenum Press, New York.
- GROULADE J., MOREL P., CREYSSSEL R., GROULADE P., 1959. Un cas de paraglobulinémie chez le chien. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, **32**, 353-356.
- HARRIS H., WATKINS J.F., 1965. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature*, **205**, 640-646.
- HURVITZ A.I., KEHOE J.M., CAPRA J.D., 1971. Characterization of three homogeneous canine immunoglobulins. *J. Immunol.*, **107**, 648-654.
- IRVIN A.D., YOUNG E.R., LUTHER P.D., COLLINS A.D., 1977. Interspecific fusion of bovine and other cells with parainfluenza viruses (Sendai and PI 3). *J. Comp. Pathol.*, **87**, 393-404.
- KAPLAN M., KOPROWSKI H., 1980. La rage. *Pour la Science*, **29**, 94-102.
- KAPLAN H.S., OLSSON L., 1981. Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Abs. XXIX Colloquium Protides of the Biological fluids*, May 4-7, 1981, Brussels n° 3.
- KEHOE J.M., HURVITZ A.I., CAPRA J.D., 1972. Characterization of three feline paraproteins. *J. Immunol.*, **109**, 511-516.
- KÖHLER G., MILSTEIN C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- LEMKE H., HÄMMERLING G.J., HÖHMANN C., RAJEWSKY K., 1978. Hybrid cell lines secreting monoclonal antibody specific for major histocompatibility antigens of the mouse. *Nature*, **271**, 249.
- LEVY R., DILLEY J., BROWN S., BERGMAN Y., 1980. Mouse x human hybridomas. In: Kennett R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., *Monoclonal antibodies*, 137-153, Plenum Press, New York.
- LIPINSKI M., HERZENBERG L., 1981. Les hybridomes et leurs applications. *La Recherche*, **12**, 952-961.
- LITTLEFIELD J., 1964. Selection of hybrids from mating of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science*, **145**, 709-710.

- MASON D.W., BRIDEAU R.J., McMASTER W.R., WEBE M., WHITE R.A.H., WILLIAMS A.F., 1980. Monoclonal antibodies that define T-lymphocyte subsets in the rat. In: Kennett R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., *Monoclonal antibodies*, 251-273, Plenum Press, New York.
- McKEARN T.J., SMILEK D.E., FITCH F.W., 1980. Rat-mouse hybridomas and their application to studies of the major histocompatibility complex. In: Kennett R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., *Monoclonal antibodies*, 219-234, Plenum Press, New York.
- MEDRANO L., PHALENTE L., BUTTIN G., 1979. Differential staining and segregation of parental chromosomes in mouse-rabbit hybridomas. *Cell Biol. Int. Reports*, **3**, 503-514.
- MILSTEIN C., 1980. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.*, **243**, 56.
- MILSTEIN C., CLARK M.R., GALTREY G., CUELLO A.C., 1980. Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. In: Fougereau M., Dausset J., *Immunology 80, Progress in Immunology IV*, 17-33, Academic Press, London.
- MITCHELL G.F., 1981. Hybridoma antibodies in immunodiagnosis of parasitic infection. *Immunol. Today*, **2**, 140-142.
- MITCHELL G.F., CRUISE K.M., CHAPMAN C.B., ANDERS R.F., HOWARD M.C., 1979. Hybridoma antibody immunoassays for the detection of parasitic infection: development of a model system using a larval cestode infection in mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **57**, 287-302.
- O'NEILL G.J., 1979. The use of antibodies as drug carriers. In: G. Gregoriadis, *Carriers in Biology and Medicine*, 23, Academic Press, London.
- OKADA Y., 1958. The fusion of Ehrlich's tumor cells caused by HVJ virus *in vitro*. *Biken's J.*, **1**, 103-110.
- OSBORNE C.A., PERMAN V., SAUTTER J.H., STEVENS J.B., HANLON G.F., 1968. Multiple myeloma in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **153**, 1300-1319.
- PASCAL R.R., 1961. Plasma cell myeloma in the brain of a rabbit. *Cornell Vet.*, **51**, 528-535.
- PEARSON T.W., PINDER M., ROELANTS G.E., KAR S.K., LUNDIN L.B., MAYOR-WITHEY K.S., HEWETT R.S., 1980. Methods for derivation and detection of anti-parasite monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.*, **34**, 141-154.
- PEDINI B., ROMANELLI V., 1955. Il plasmocitoma negli animali domestici. Osservazioni e considerazioni su di un caso riscontrato nel vitello. *Arch. Vet. Ital.*, **6**, 193-214.
- PINDER M., MUSOKE A.J., MORRISON W.I., ROELANTS G.E., 1980. The bovine lymphoid system. III. A monoclonal antibody specific for bovine cell surface and serum IgM. *Immunology*, **40**, 359-365.
- POLIN R.A., 1980. Monoclonal antibodies against streptococcal antigens. In: Kennett R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., *Monoclonal antibodies*, 353-359, Plenum Press, New York.
- REINHERZ F.L., HUSSEY R.E., FITZGERALD K., SNOW P., TERHORST C., SCHLOSSMAN S.F., 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. *Nature*, **294**, 168-170.
- RUDDLE F.H., CREAGAN P.P., 1975. Pansexual approaches to the genetics of man. *Ann. Rev. Genet.*, **9**, 407-486.
- SECHER D.S., 1980. Monoclonal antibodies by cell fusion. *Immunol. Today*, **1**, 22-26.
- SECHER D.S., BURKE D.C., 1980. A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. *Nature*, **285**, 446-450.
- SEVIER E.D., DAVID G.S., MARTINIS J., DESMOND W.J., BARTHOLOMEW R.M., WANG R., 1981. Monoclonal antibodies in clinical immunology. *Clin. Chem.*, **27**, 1797-1806.
- STAINES N.A., LEW A.M., 1980. Whither monoclonal antibodies. *Immunology*, **40**, 287-293.
- STUART F.P., McKEARN T.J., FITCH F.W., 1979. Enhancement of rat renal allografts with monoclonal antibody. *Surgery*, **86**, 30.
- THIRY E., PASTORET P.-P., 1981. Les anticorps monoclonaux. *Ann. Méd. Vét.*, **125**, 485-493.
- TOMA B., ANDRAL L., 1977. Epidemiology of fox rabies. *Adv. Virus Res.*, **21**, 1-36.
- URBAIN J., CAZENAVE P.A., WIKLER M., FRANSSSEN J.D., MARIAMÉ B., LEO O., 1980. Idiotypic induction and immune networks. In: Fougereau M., Dausset J., *Immunology 80, Progress in Immunology IV*, 81-93, Academic Press, London.
- URBAIN J., WUJLMART C., CAZENAVE P.A., 1981. Idiotypic regulation in immune networks. In: Inman F.P., Mandy W.J., *Contemporary topics in molecular immunology*, Vol. 8, 113-148, Plenum Press, New York.
- WANG L., HEXTER C.S., INBAR M., 1981. Monoclonal antibodies in clinical diagnosis. Reagents for detecting human hormones and immunoglobulins. Abs. XXIX Colloquium Protids of the Biological Fluids, May 4-7, Brussels, n° 57.
- WIKTOR T.L., FLAMAND A., KOPROWSKI H., 1980. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. *J. Virol. Meth.*, **1**, 33-46.
- WIKTOR T.J., KOPROWSKI H., 1978. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cells hybridization: detection of antigenic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 3938-3942.