

Des anticorps de remplacement *

par le Dr. Steven Sacks

(Laboratoire de biologie moléculaire du Conseil de la recherche médicale, Cambridge).

Une nouvelle technique, très efficace, de production de réactifs purs pourrait permettre d'économiser de vastes quantités de sérum humain utilisé normalement pour la détermination systématique du groupe sanguin. Elle promet d'avoir un effet important sur tous les tests de laboratoire basés sur les anticorps du système immunitaire de l'homme.

En 1975, au cours de travaux effectués dans nos laboratoires avec des cultures de cellules appelées « hybridomes », les Dr. Cesar Milstein et Georges Köhler ont inventé une technique pour faire des quantités pratiquement illimitées d'anticorps purs, protéines de sérum sanguin qui sont les défenses naturelles de l'organisme contre les antigènes, ou envahisseurs. Les cellules hybrides sont créées artificiellement, dans un tube à essais, par fusionnement de cellules de rate de souris produisant l'anticorps, cellules qui ne se développent pas dans une culture de tissu, et de myélomes, cellules cancéreuses de souris, qui peuvent être facilement cultivées. Les cellules ainsi formées produisent le type simple de molécule d'anticorps (ou anticorps monoclonal) des cellules mères de la rate et continuent à croître et à se

diviser en culture comme le font les myélomes mères. Une fois que le clone de cellules produisant l'anticorps spécifié a été choisi, il est possible de le cultiver en une lignée continue dont on peut extraire de grandes quantités d'anticorps purs.

Le fait de disposer d'une source constante d'anticorps uniformes, au lieu du mélange habituel produit par le système immunitaire de l'organisme contre une multitude d'antigènes, nous donne un puissant outil de recherche ainsi qu'un moyen plus rapide, plus précis et moins coûteux d'identifier les virus, bactéries et cellules cancéreuses.

Cette technique est intéressante parce qu'elle permet de préparer un ou plusieurs anticorps spécifiques contre toute cellule ou substance capable de produire une réponse immunitaire chez la souris. Par exemple, si l'on injecte dans une souris des globules rouges de mouton, il est possible de recueillir les anticorps monoclonaux produits par la souris contre les antigènes se trouvant à la surface des globules rouges; c'est encore plus facile si l'on dispose d'antigène pur pour immuniser la souris.

Détermination du groupe sanguin chez l'homme

Le sang humain est classé en quatre groupes selon que ses globules rouges contiennent un antigène (A), un autre antigène (B), ces deux antigènes (AB) ou ni l'un ni l'autre (O). Cela veut dire que les personnes appartenant au groupe A ont des anticorps contre l'antigène du groupe B et ne peuvent pas tolérer une transfusion avec du sang du groupe B ou du groupe AB. De même, les individus du groupe B ont des anticorps anti-A, mais ceux du groupe AB n'ont ni anti-A ni anti-B.

L'identification des groupes sanguins se fait à l'aide de sérums humains spéciaux contenant certains anticorps connus. Si l'on mélange un échantillon de globules rouges à du sérum anti-A (du groupe sanguin B) ou à du sérum anti-B (du groupe sanguin A), les globules rouges ne s'agglutinent visiblement que lorsque l'antigène des globules rouges s'unit à l'anticorps correspondant du sérum. Par exemple, on reconnaît les globules rouges du groupe B

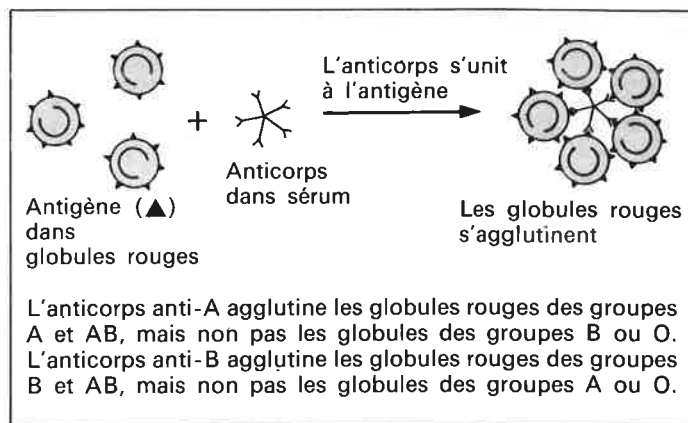
parce qu'ils s'agglutinent avec le sérum anti-B mais pas avec le sérum anti-A, et des globules AB par leur réaction avec les deux types de sérum.

Les laboratoires se reposent presque entièrement sur des donneurs de sang pour obtenir le sérum humain leur fournissant les anticorps réactifs assez purs pour la détermination systématique des groupes sanguins du système ABO. On a essayé d'utiliser comme réactifs d'autres substances ayant des propriétés similaires aux anticorps, mais on a constaté qu'elles étaient inadéquates sous plusieurs rapports. Les œufs de truite, par exemple, donnent un extrait instable qui permet de détecter quelques-uns des types du groupe B, mais pas tous.

Il n'est pas satisfaisant d'avoir à dépendre du sérum humain pour ce travail. Le laboratoire de référence des groupes sanguins du Royaume-Uni utilise, chaque année, pour la détermination des groupes sanguins du système ABO, des réactifs dont

* De Spectrum n° 171.

Le sérum d'une personne contient un anticorps...	... si son groupe sanguin est...	... et si l'antigène présent sur les globules rouges est ...
Anti-A	B	B
Anti-B	A	A
Néant	AB	A + B
Anti-A + anti-B	O	Néant

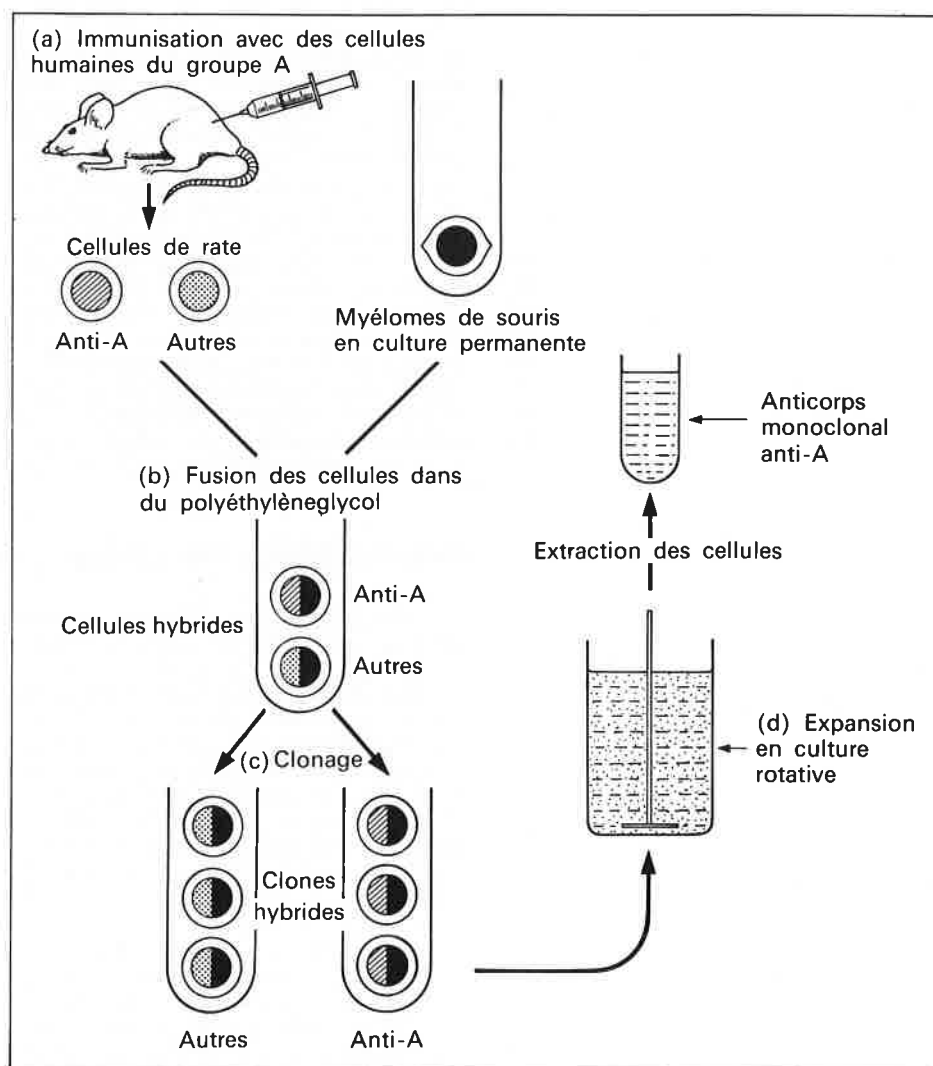


A gauche : Sources de sérum humain anti-A et anti-B. Les réactifs pour la détermination des groupes sanguins sont en général préparés à partir de donations de sérum humain. Les anticorps contre les groupes sanguins A ou B n'apparaissent dans le sérum que lorsque les globules rouges du sang du donneur ne contiennent pas l'antigène correspondant. A droite : Détermination des groupes sanguins du système ABO. On identifie les groupes sanguins en mélangeant un échantillon de globules rouges avec différents sérums contenant chacun un anticorps connu. L'agglutination visible ne se produit que lorsque l'antigène s'unit à l'anticorps correspondant.

la préparation nécessite jusqu'à 1 200 litres de sérum humain, provenant de 6 000 donations, alors que l'on pourrait utiliser ce sérum pour préparer des produits sanguins dont on a grand besoin. Il n'y a pas deux sérums humains qui soient semblables et chacun diffère, en particulier pour ce qui est du degré dans lequel il convient comme réactif pour la détermination des groupes sanguins. Il faut un programme de tri détaillé pour choisir des sérums satisfaisants parmi le grand nombre de petites donations individuelles et ce programme représente la plus grande partie du coût élevé des réactifs, estimé à environ 250 £ le litre. En outre, 30 % de tous les sérums recueillis sont gaspillés parce qu'ils ne répondent pas aux normes requises. Sept pour cent seulement des donneurs ont du sang du groupe B. Il n'y a donc pas assez de sérum anti-A suffisamment efficace; beaucoup de laboratoires d'hôpitaux du Royaume-Uni achètent du sérum commercial fourni par des donneurs hyperimmuns, au prix de 450 £ le litre. Il a par conséquent de bonnes raisons de rechercher une source ne faisant pas appel à l'homme pour les réactifs utilisés pour la détermination des groupes sanguins du système ABO.

Un nouvel anticorps

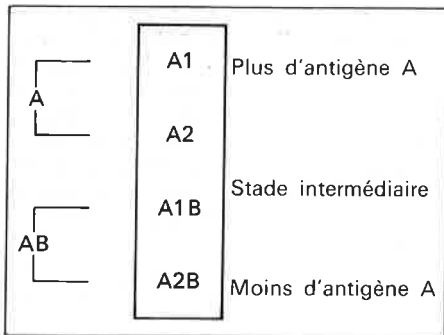
Nous nous sommes intéressés aux anticorps pour la détermination du groupe sanguin à la suite d'une découverte inattendue faite au cours d'autres travaux de recherche. En essayant de faire des anticorps monoclonaux, qui aideraient à identifier des cellules cancéreuses de l'homme, nous avons immunisé une souris avec des cellules de culture provenant d'un cancer de l'intestin humain. En appliquant la technique Köhler-Milstein pour faire fusionner des cellules de rate prélevées sur la souris avec des myélomes, nous avons obtenu des hybridomes qui, comme prévu, ont fait des anticorps contre le cancer. Mais nous avons noté qu'au lieu de réagir seulement avec les cellules cancéreuses, les anticorps ont



Production de l'anticorps monoclonal anti-A. On injecte à une souris des cellules humaines contenant l'antigène A du groupe sanguin A. On prélève des cellules de rate faisant des anticorps et on les fait fusionner avec des myélomes, cellules cancéreuses provenant d'une culture permanente. Le clone des cellules faisant l'anticorps anti-A est alors sélectionné et cultivé en une lignée de cellules continue dans une culture de grand volume. L'anticorps d'un type simple et pur (monoclonal anti-A) est sécrété dans le milieu de culture et on peut le recueillir en enlevant les cellules.

reconnu beaucoup d'autres types de cellules parmi lesquelles des globules rouges de l'homme. Bien que nos anticorps aient été produits contre les cellules cancéreuses, nous avons constaté que leur spécificité était pour l'antigène de type A du sang humain, c'est-à-dire qu'ils ne faisaient agglutiner que des globules rouges du groupe A et non pas ceux des groupes B ou O. Cherchant à comprendre ce résultat étrange, nous avons découvert que les cellules cancéreuses que nous avions choisies pour immuniser la souris étaient du groupe sanguin A, groupe du malade sur lequel elles avaient été prélevées; or, les souris font souvent des anticorps anti-A.

Lorsque les hybridomes croissent et se divisent, ils sécrètent des anticorps dans le

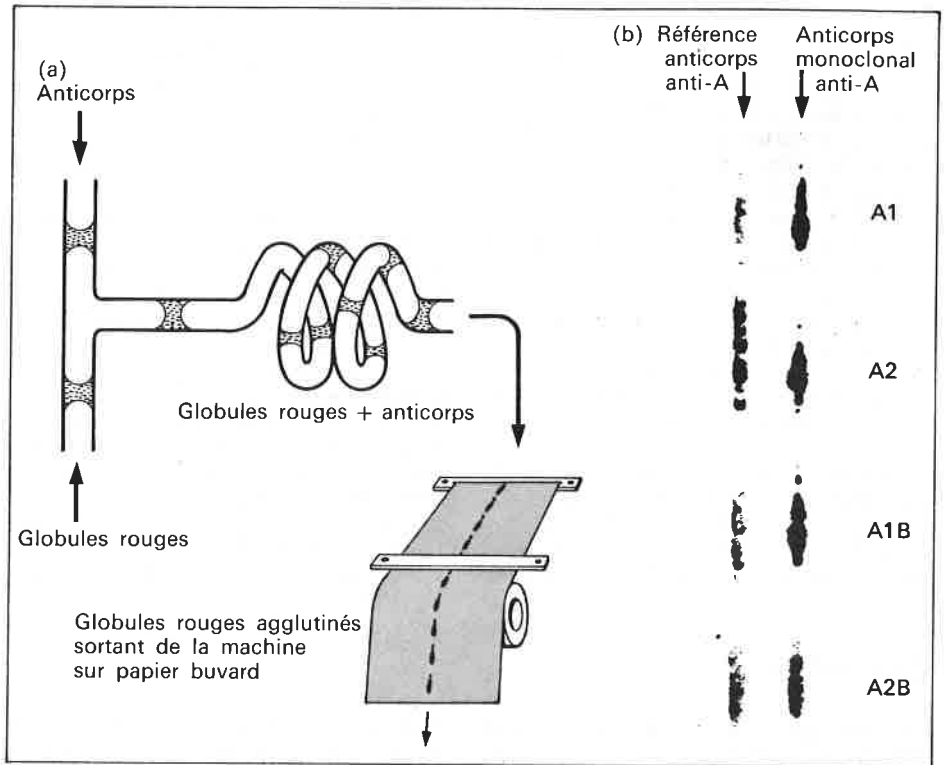


Ci-dessus : Du sang du Groupe A est divisé selon la quantité d'antigènes A contenue dans chaque globule rouge. Des globules rouges de type A₂B contiennent moins d'antigène A et donnent une agglutination médiocre avec l'anticorps humain anti-A. Un bon réactif de la détermination du groupe A doit pouvoir donner des réactions nettes avec les sangs A₂B.

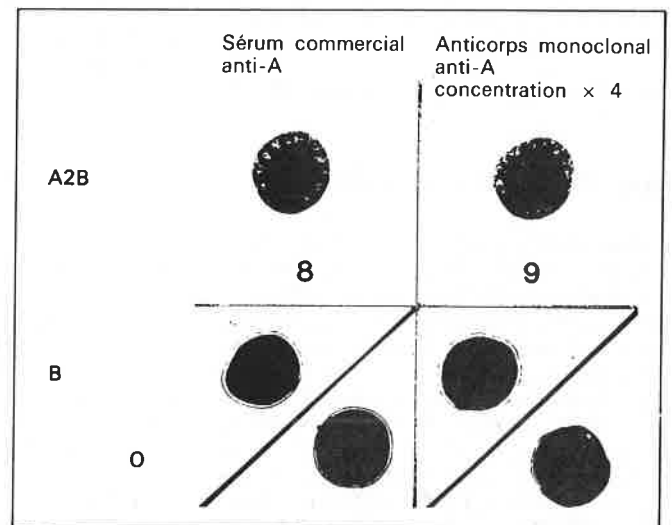
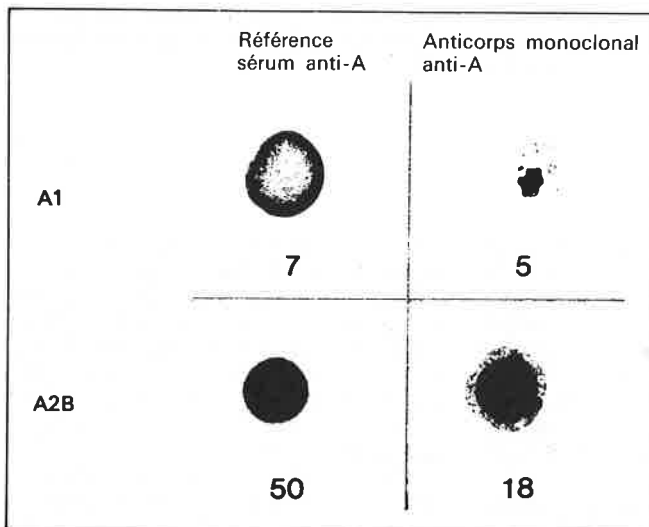
fluide, sans cellules, riche en anticorps pur. culture. Si nous enlevons toutes les cellules du milieu après leur avoir donné le temps de se multiplier suffisamment, il reste un fluide sans cellules riche en anticorps pur.

La question était de savoir si cette nouvelle

préparation d'anticorps anti-A pouvait être efficace comme réactif permettant de déterminer les groupes sanguins dans les laboratoires de transfusion. Les hybridomes qui avaient sécrété des anticorps anti-A pouvaient-ils être une source perpétuelle de réactif standard uniforme ?



Ci-dessus : Machine employée pour la détermination des groupes sanguins. On voit des échantillons de sang agglutinés sur du papier buvard qui sort de la machine. L'anticorps monoclonal anti-A produit des agglutinats plus compacts et plus distincts, qui améliorent notamment la détection des réactions A₂B.



Ci-dessus (à gauche) : Exemples de tests pour la détermination du groupe sanguin en cas d'urgence effectués sur une lamelle de verre. Ici, une goutte de sang a été mélangée à une goutte de réactif et le nombre de secondes nécessaires pour agglutiner les globules rouges a été enregistré. L'agglutination de globules rouges faibles A₂B avec du sérum humain classique anti-A fourni par le Laboratoire de référence des groupes sanguins est lente et à peine visible. Avec l'anticorps monoclonal anti-A, les globules rouges de la même source s'agglutinent rapidement et visiblement, ce qui permet de les identifier de manière définitive. Les globules rouges A sont agglutinés par le réactif monoclonal en une petite boule serrée. Ci-dessus (à droite) : Une préparation concentrée d'anticorps monoclonaux anti-A agglutine les globules rouges A₂B de manière aussi efficace que le sérum hyperimmun humain commercial, mais pour un coût bien moindre. Des échantillons des globules rouges des groupes B et O ne s'agglutinent pas avec l'anticorps anti-A.

Par bonheur, le laboratoire de biologie moléculaire se trouve sur le même terrain que le principal centre de transfusion sanguine de la région où les chercheurs

s'intéressent tout particulièrement à l'antigène du groupe A. Cela nous a permis de nous assurer la collaboration du Dr. Douglas Voak du Centre et d'établir le

potentiel de nos nouveaux réactifs pour la détermination systématique des groupes sanguins.

Un second anticorps

Les résultats obtenus avec nos premiers anticorps monoclonaux anti-A ont été décevants; le liquide décanté, contenant l'anticorps sécrété, s'est révélé être un réactif faible qui présentait peu d'avantages comparé au sérum humain, à moins d'être utilisé en préparation concentrée. Nous avons appris que le groupe du Dr. Milstein avait, lui aussi, produit un anticorps monoclonal anti-A qui a également donné des résultats peu satisfaisants et, pendant une trentaine de jours, notre enthousiasme s'est considérablement refroidi. Néanmoins, en choisissant de nouveaux clones d'hybridomes aux caractéristiques requises, nous avons découvert un second anticorps anti-A aux promesses considérables.

Cette fois, il a présenté plusieurs avantages par rapport au sérum employé normalement pour la détermination des groupes sanguins. La manière dont l'anticorps monoclonal anti-A réagit avec les globules

rouges est clairement visible, ce qui facilite l'identification des globules rouges A et AB. L'avantage le plus évident apparaît avec les types sanguins de A les plus faibles qui sont assez mal détectés par du sérum ordinaire. Par exemple, les globules rouges A₂B forment un sous-groupe de AB et donnent de faibles réactions avec l'anticorps anti-A humain parce qu'ils contiennent moins d'antigène A que d'habitude (et c'est pour cette raison qu'ils sont classés comme A₂ au lieu de A₁). Dans les tests faits en cas d'urgence, pour lesquels on mélange des quantités égales de globules rouges et d'anticorps sur une lamelle de verre, les globules rouges faibles A₂B sont agglutinés rapidement et efficacement par l'anticorps monoclonal anti-A bien que les mêmes globules rouges donnent des réactions faibles ou équivoques avec du sérum humain ordinaire. Notre tout dernier réactif est environ trois fois aussi efficace que le sérum classique. En concentrant

quatre fois l'anticorps monoclonal, de sorte que son efficacité atteigne celle du sérum commercial hyperimmun, nous pouvons faire agglutiner les globules rouges plus rapidement et plus fortement, mais nous considérons que c'est aller un peu trop loin.

Notre réactif est particulièrement bien approprié à une utilisation sur machines pour la détermination des groupes sanguins. Les opérateurs de ces machines préfèrent le réactif monoclonal parce que la configuration plus serrée des groupements de globules rouges leur permet de détecter des sangs A₂B contenant moins d'antigène et qui ne sont pas révélés par des anticorps humains anti-A. Au cours d'une récente analyse de 31 échantillons de sang AB, ils ont tous été identifiés correctement par des anticorps monoclonaux anti-A, tandis que des anticorps humains anti-A n'en ont reconnu que 24.

Les coûts

La production de réactifs monoclonaux anti-A, par culture de tissu, a un bon rapport coût-rendement pour trois raisons. D'abord, une seule série de tests suffit pour un lot d'anticorps réactif de 5 litres produit par une culture de tissu continue, tandis qu'il faut tester séparément 25 donations individuelles de sérum pour faire le même volume de réactif humain. Nous espérons bien arriver à réduire de plus de 90% les tests d'ensemble.

Deuxièmement, le coût estimatif de 30 £

pour produire un litre de réactif monoclonal anti-A n'est qu'environ le 8^e du coût de la préparation d'un sérum humain qui n'est pas aussi efficace. Il n'est pas encore possible de donner des coûts de production exacts, mais nous espérons arriver à faire des économies de plus de 60%.

Enfin, une fois qu'un hybridome sécrétant un anticorps et ayant les propriétés désirables a été formé, il l'est de façon constante. Après des mois de croissance

continue dans des plats de culture, nos hybridomes sont toujours une source stable d'anticorps anti-A aux propriétés uniformes. Il est possible de conserver en toute sûreté dans de l'azote liquide des stocks de cellules congelées et de les récupérer lorsque c'est nécessaire. Les hybridomes pourraient, par conséquent, fournir une nouvelle norme mondiale pour des réactifs bien définis et peu coûteux capable de déterminer les groupes sanguins du système ABO.

De meilleurs réactifs

Maintenant que nous avons découvert un réactif à partir d'un anticorps produit accidentellement, il est important de savoir s'il serait possible de faire des réactifs pour la détermination des groupes sanguins par immunisation délibérée, et en choisissant des anticorps efficaces dès les débuts de l'étude des hybridomes. Nos résultats les plus récents sont encourageants. Ils indiquent qu'il est possible de produire de façon similaire d'autres réactifs au moins aussi efficaces que les anticorps monoclonaux anti-A.

Il est certainement vrai que tous les anticorps monoclonaux ne sont pas de bons réactifs pour la détermination des groupes sanguins, mais la technique employée pour les hybridomes ne permet pas seulement de faire une nouvelle génération de réactifs mieux définis; elle établit, en outre, une source permanente d'anticorps raisonnablement bon marché.

On dispose de nombreux réactifs humains pour la détermination du groupe Rhésus et d'autres groupes sanguins et il est peut-être

temps de songer à les remplacer par de nouveaux réactifs plus évolués.

En outre, les anticorps monoclonaux sont des outils de recherche d'une grande spécificité. L'on étudie actuellement avec des anticorps monoclonaux anti-A des sous-types du groupe A, faibles et peu communs et, en utilisant des anticorps monoclonaux marqués à l'aide d'une substance fluorescente, il est possible de repérer de façon précise des antigènes de groupes sanguins qui apparaissent de manière inattendue sur certaines tumeurs.