

Anticorps monoclonaux anti-IgGs de zébu. Réactivités comparatives

C. Atrax¹ E. Nakounne¹ J. Vincent^{1*}

Mots-clés

Bovin - Zébu - Immunoglobuline - Anticorps monoclonal.

Résumé

En utilisant des anticorps monoclonaux (Amclx) anti-IgGs de zébu, plusieurs sortes d'épitopes ont pu être identifiés : spécifiques du zébu, communs au zébu et au bœuf, au zébu et au mouton ou aux trois espèces. Ces épitopes et leur position sur la molécule d'IgG (de zébu) ont pu être déterminés pour certains d'entre eux.

INTRODUCTION

Au cours d'enquêtes sérologiques sur des zébus en République centrafricaine (1), les auteurs ont constaté que les sérums anti-immunoglobulines G (IgG) de mouton marqués à la peroxydase donnaient en réactions immunoenzymatiques (ELISA) des résultats bien supérieurs (en intensité et en sensibilité) à ceux des conjugués anti-bœuf.

MATERIEL ET METHODES

Pour contrôler le résultat de ces enquêtes sérologiques, les IgGs de deux sérums de zébu ont été concentrées par précipitations au sulfate d'ammonium.

Après plusieurs cycles de dialyse pour éliminer le sulfate d'ammonium, elles ont été soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) et transférées sur membrane de nitrate de cellulose (Sigma ref N-2764). Trois conjugués anti-IgGs de bœuf et un sérum anti-IgGs de mouton d'origine commerciale marqués à la peroxydase ont été dilués au 1/50 et appliqués sur les IgGs transférées.

Après révélation de la réaction, seul le conjugué anti-mouton réagissait très nettement sur la totalité de la zone de migration élec-

trophorétique, les sérums anti-IgGs de bœuf ne révélant que très faiblement une bande très étroite. Ces derniers, produits sur la chèvre, animal zoologiquement proche du bœuf, étaient donc dirigés uniquement contre les épitopes spécifiques de cette espèce. En présence de sérums de zébu, ils ne pouvaient réagir que sur un nombre encore plus limité de déterminants antigéniques, ceux communs au bœuf et au zébu.

A l'inverse, produits sur le lapin, les sérums anti-IgGs de mouton pouvaient réagir sur un plus grand nombre d'épitopes de la molécule d'IgG de zébu : ceux communs au mouton et au zébu et ceux communs aux trois espèces.

Pour tenter d'évaluer les parentés antigéniques entre IgGs de bœuf, de mouton et de zébu, des anticorps monoclonaux (Amclx) ont été produits contre les IgGs de zébu purifiées et leurs réactivités ont été définies vis-à-vis des IgGs de bœuf et de mouton. Les immunoglobulines de bœuf, purifiées, étaient d'origine commerciale. Présentées sous forme de poudre prépesée (Sigma), elles ont également été prises comme référence pondérale pour déterminer les concentrations d'IgGs de zébu et de mouton par dosage spectrophotométrique.

Quant aux IgGs de mouton, elles ont été obtenues à partir d'un mélange de 10 sérums par précipitations au sulfate d'ammonium suivies de dialyses.

Production d'anticorps monoclonaux

Les cellules spléniques d'une souris BalbC immunisée contre les IgGs de zébu purifiées ont été fusionnées avec des cellules myélo-mateuses X63Ag8. Les hybrides ont été sélectionnés, selon le protocole décrit par Galfre et Milstein (2).

1. Institut Pasteur, BP 923, Bangui, République centrafricaine

* Auteur pour la correspondance

Adresse actuelle : 9 rue du Pin, 64000 Pau, France

Détection des clones sécrétants

Les clones producteurs d'immunoglobulines anti-IgGs de zébu ont été détectés par ELISA. Une microplaque a été sensibilisée pendant une nuit à 4 °C avec des IgGs de zébu purifiées (1 mg/ml dans du tampon bicarbonate, pH 9,5, préparé comme recommandé par Terninck et Avrameas (3)). Au bout de ce temps d'incubation, les IgGs non fixées ont été éliminées par trois lavages successifs avec du tampon de lavage (PBS + 1 p. 100 Tween 20). Les surnageants de culture des clones cellulaires à identifier ont été dilués au 1/5 avec du tampon Blotto. Ce dernier était composé de tampon de lavage + 5 p. 100 de lait écrémé en poudre (Difco). Ils ont été distribués ensuite dans la microplaque sensibilisée à raison de 100 µl/puits. Après une incubation d'une heure à 37 °C, la plaque a été lavée trois fois. Ensuite du conjugué peroxydase anti-Ig de souris (Diagnostic Pasteur), dilué dans du tampon Blotto suivant la concentration recommandée par le fabricant, a été remis dans les puits (100 µl). Après une heure d'incubation à 37 °C et trois autres lavages, une solution d'orthophénylène-diamine a été distribuée dans les puits pour révéler la réaction.

■ RESULTATS

Les résultats ont été lus à l'œil nu et par spectrophotométrie.

Dans le mois suivant la fusion, 30 hybridomes ont été détectés dont 10 seulement sont restés producteurs stables au cours des passages. Deux sous-clonages (par dilution limite) ont été nécessaires en moyenne pour obtenir des populations homogènes.

Les isotypes ont été identifiés à ce stade sur des concentrés de surnageants de culture par immuno-diffusion double en milieu gélosé contre des sérums spécifiques (Sigma). Tous les Amclx obtenus appartenaient à l'isotype IgG1.

Spécificités des Amclx

Les spécificités des différents Amclx vis-à-vis des IgGs de zébu, de bœuf et de mouton ont été déterminées par ELISA. Quatre types de réaction ont été identifiés :

- les produits des clones 1.3.E12, 1.4.C3 et 1.4.F2 n'ont réagi qu'avec les IgGs de zébu ;
- l'anticorps monoclonal 1.1.H4 était spécifique d'un épitope présent sur les IgGs de zébu et de bœuf, mais absent chez celles du mouton ;
- les Amclx 1.3.D3, 1.3.F2 et 1.5.C4 n'ont réagi qu'avec les IgGs de zébu et de mouton ;
- les Amclx 1.3.C8, 1.3.F3 et 1.4.C10 ont reconnu des déterminants antigéniques présents sur les IgGs des trois espèces.

Positionnement des épitopes

Pour tenter de situer sur la molécule d'IgG de zébu les épitopes cibles des différents Amclx, les IgGs purifiées ont été soumises à des digestions pepsiques et papainiques selon les protocoles décrits par Terninck et Avrameas (3). Puis, les produits de digestion ont été soumis, en parallèle avec des IgGs non traitées, à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) et transférés sur filtre de nitrocellulose.

Sur le transfert des IgGs complètes, les anticorps 1.3.E12 et 1.4.C3 (du premier groupe), ainsi que ceux du clone 1.3.F2 (du troisième groupe) ont réagi faiblement : le premier sur une zone très limitée, les autres sur une surface plus importante. Seuls les anticorps 1.3.C8, 1.3.F3 et 1.4.C10 ont réagi fortement sur la zone supérieure du transfert.

Les produits de traitement pepsique n'ont donné, après transfert, des réactions qu'avec les Amclx 1.3.C8, 1.3.F3 et 1.4.C10. Avec le traitement des IgGs à la papaine, seuls les Amclx 1.3.F3 et 1.4.C10 ont réagi sur la zone correspondant au F(ab).

La réactivité des différents Amclx vis-à-vis des produits de digestion pepsique a également été déterminée par ELISA dans des microplaques. L'anticorps 1.3.C8 qui a présenté le titre le plus faible vis-à-vis des IgGs complètes (tableau I) a été utilisé au 1/10. Les autres ont été dilués en fonction de leur titre et par rapport à la dilution de l'anticorps 1.3.C8 de façon à ce que tous les Amclx fussent présents dans la réaction en quantités à peu près équimolaires. Seuls les Amclx 1.1.H4, 1.3.C8, 1.3.F3 et 1.4.C10 ont réagi positivement : le premier très fortement (DO > 1), les autres plus faiblement.

Tableau I

Nomenclature et caractéristiques des Amclx

Clone	Sous-clone sélectionné	Isotype	Spécificité (ELISA)	Position Cible	Titre limite ascite sur IgGs de		
					Zébu	Bœuf	Mouton
1.1.H4	PL2D3/G12	IgG1	Z+B	F(ab') ₂	1/50 000	1/50 000	0
1.3.C8	PL2B5/H6	IgG1	Z+B+M	F(ab') ₂	1/12 800	1/3 200	1/6 400
1.3.D3	PL2G11/F5	IgG1	Z+M	ND	1/25 000	0	1/6 400
1.3.E12	PL2A10/H4	IgG1	Z	NDP	1/200 000	0	0
1.3.F2	PL1E1/F10	IgG1	Z+M	ND	1/100 000	0	1/25 000
1.3.F3	PL2F2/D11/H9	IgG1	Z+B+M	F(ab)	1/25 000	1/3 200	1/12 800
1.4.C3	PL2F4/E11	IgG1	Z	NDP	1/100 000	0	0
	PL2G10/B4		Z	NDP	1/100 000	0	0
1.4C10	PL2G7/D3	IgG1	Z+B+M	F(ab)	1/50 000	1/25 000	1/3 200
1.4F2	PL2B3	IgG1	Z	ND	NF	0	0
1.5.C4	PL2G11/F1/F1	IgG1	Z+M	ND	1/100 000	0	1/25 000

Z = zébu ; B = bœuf ; M = mouton

ND = non déterminé ; NDP = non déterminé précisément

NF = non fait

■ DISCUSSION ET CONCLUSION

Les anticorps 1.3.E12, 1.4.C3 et 1.4.F2 spécifiques des seules IgGs de zébu ont réagi de façon différente sur les transferts des IgGs totales après PAGE :

- l'épitope cible de l'anticorps 1.4.F2 n'était plus reconnu : c'était un épitope conformationnel dont la position sur la molécule n'a pu être déterminée ;

- les épitopes correspondant aux anticorps 1.3.E12 et 1.4.C3 étaient non conformationnels puisque toujours reconnus sur les transferts des IgGs complètes après PAGE. Les positions et largeurs de leurs zones de réaction respectives étant différentes, ils pouvaient être considérés comme différents l'un de l'autre.

Sur les transferts des produits de digestion enzymatique, ces anticorps n'ont plus reconnu leurs épitopes respectifs. Ceux-ci étaient probablement situés hors du fragment F(ab')₂ pour l'un et au niveau de la zone d'attaque de la papaïne pour l'autre.

L'anticorps 1.1.H4 correspondait à un épitope présent à la fois sur les IgGs de zébu et sur celles de bœuf et, par conséquent, différent des précédents. Il n'a reconnu son épitope cible sur aucun transfert après PAGE des IgGs complètes ou traitées. Il a réagi uniquement sur les produits de digestion pepsique directement fixés sur microplaques. L'épitope correspondant était donc conformationnel et situé sur le fragment F(ab')₂.

Dans le troisième groupe, seul l'anticorps 1.3.F2 a réagi sur le transfert après PAGE des IgGs complètes. L'épitope correspondant, non conformationnel sur la molécule complète, n'était plus reconnu sur les produits des traitements enzymatiques soumis à électrophorèse et transférés sur nitrocellulose ou directement fixés sur microplaques. Il se situait donc hors du fragment F(ab')₂, sur le fragment Fc.

Les épitopes correspondant aux Amclx 1.3.D3 et 1.5.C4 étaient différents du précédent et conformationnels, mais il était impossible, sur la base des résultats observés, de les différencier ou de les identifier l'un par rapport à l'autre.

Les Amclx 1.3.F3 et 1.4.C10 ont réagi sur les transferts après PAGE des IgGs de zébu complètes ou traitées par les enzymes. Ils étaient dirigés contre des déterminants antigéniques non conformationnels situés sur le fragment F(ab). Si l'on compare les titres des surnageants de culture ou des ascites des Amclx 1.3.F3 et 1.4.C10 vis-à-vis des IgGs de bœuf et de mouton (tableau I), on peut envisager, malgré leurs caractéristiques communes, que leurs épitopes respectifs soient différents. Seules des épreuves de compétition pourraient confirmer cette hypothèse.

L'anticorps 1.3.C8 a reconnu son épitope cible sur les transferts des IgGs complètes de zébu et des produits de traitement pepsique, mais cet épitope n'était plus reconnu après traitement à la papaïne.

Summary

Atrax C., Nakounne E., Vincent J. Monoclonal antibodies against zebu IgGs. Comparative reactivity

Monoclonal antibodies directed against zebu IgGs were used to identify epitopes in zebras, common to zebras and oxen, to zebras and sheep or to all three species. Some of these epitopes have been mapped on the IgG molecule.

Key words: Zebu cattle - Immunoglobulin - Monoclonal antibody.

Non conformationnel, différent des cibles des Amclx 1.3.F3 et 1.4.C10, il était situé sur le fragment F(ab')₂, probablement entre les zones d'attaque de la pepsine et de la papaïne.

Étant donné qu'un anticorps engagé dans une réaction spécifique avec un antigène subit des modifications structurales, les auteurs ont tenté de déterminer lesquels des Amclx pouvaient encore reconnaître leurs épitopes cibles dans ces conditions.

Après fixation sur microplaque d'un antigène de culture cellulaire du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVF), une dilution au 1/50 dans du tampon Blotto d'un mélange de sérums de zébus immuns a été mise en présence de l'antigène viral. Après une heure d'incubation à 37 °C et trois lavages de la microplaque, des dilutions de raison 1/2 de chacun des Amclx (surnageants de culture et ascites) ont été introduites dans la réaction, suivies du conjugué anti-souris et du substrat selon le protocole décrit précédemment.

Seuls les Amclx du 4^e groupe ont donné des réactions positives et les ascites ont atteint des titres au moins égaux au 1/3 600.

Ayant pour cibles des épitopes conservés dans les trois espèces non conformationnels, non modifiés lors de la fixation spécifique de l'anticorps sur l'antigène, ces Amclx pourraient être des réactifs utiles dans des techniques sérologiques appliquées aux trois espèces considérées, en particulier dans les réactions d'immuno-capture où l'anticorps de capture est une ascite immune de souris. Il reste à déterminer si les épitopes correspondants sont également présents chez d'autres espèces du groupe zoologique.

Parmi les autres Amclx obtenus, d'un moindre intérêt, certains permettent cependant d'établir un diagnostic d'espèce pour des IgGs non engagées dans une réaction spécifique avec un antigène.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr Mazie, de l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu nous confier des cellules X63 Ag8, ainsi que notre collègue J.M. Diemer pour sa collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

1. GUILHERME J.M., GONELLA-LEGALL F., LEGALL F., NAKOUNNE E., VINCENT J., 1996. Seroprevalence of five arboviruses in Zebu cattle in the Central African Republic. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **90**: 31-33.
2. GALFRE G., MILSTEIN C., 1981. Preparation of monoclonal antibodies; strategies and procedures. *Methods Enzymol.*, **73**: 3-46.
3. TERNINCK TH., AVRAMEAS S., 1987. Techniques immuno-enzymatiques. Paris, France, INSERM.

Reçu le 21.8.95, accepté le 1.4.98

Resumen

Atrax C., Nakounne E., Vincent J. Anticuerpos monoclonales anti IgG de cebú. Reactividades comparativas

Se identificaron varios tipos de epítomos, gracias al uso de anticuerpos monoclonales (Amclx) anti IgG de cebú: específicos de cebú, comunes a cebú y taurus, al cebú y al ovino o a las tres especies. En algunos casos, se pudo determinar el epítomo y su posición sobre la molécula de IgG (de cebú).

Palabras clave: Ganado bovino - Cebú - Inmunoglobulina - Anticuerpo monoclonal.