

Université de Sherbrooke

Propriétés d'anticorps monoclonaux dirigés contre
un récepteur de la PHA chez les splénocytes porcins.

par

Sylvie Faucher, B.Sc.

Département de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de
médecine en vue de l'obtention du
grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Novembre 1988

LIVRES
RARES

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-47662-1

TABLE DES MATIERES

	Page
Table des matières	I
Liste des tableaux et figures	V
Liste des abréviations	VII
Résumé	VIII
1. INTRODUCTION	1
1.1 Les lectines	1
1.1.1 La phytohémagglutinine (PHA)	2
1.1.2 Récepteurs de PHA	7
1.2 Les anticorps monoclonaux	7
1.3 But du travail	12
2. MATERIEL	14
3. METHODES	15
3.1 Dosage des protéines	15
3.1.1 Méthode de Lowry	15
3.1.2 Méthode de Lowry adaptée aux solutions contenant du Nonidet P-40	15

3.2	Technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	16
3.2.1	Préparation du gel	16
3.2.2	Préparation du gel à gradient de concentration de polyacrylamide	18
3.2.3	Préparation des échantillons	18
3.2.4	Conditions d'électrophorèse	20
3.2.5	Coloration des gels	20
3.2.6	Etalonnage des gels pour la détermination des masses moléculaires relatives (Mr)	21
3.3	Production des anticorps monoclonaux	21
3.3.1	Immunsation des souris et production des hybridomes	21
3.3.2	Production d'anticorps monoclonaux en ascite chez la souris	22
3.3.3	Purification des anticorps monoclonaux	23
3.4	Test ELISA	24
3.4.1	Détermination de la classe des anticorps monoclonaux	25
3.5	Immunodétection de l'antigène après transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose	25
3.5.1	Transfert électrophorétique des protéines sur membrane de nitrocellulose	25
3.5.2	Immunodétection de l'antigène par les anticorps marqués à l'iode-125	26
3.5.3	Oxydation <u>in situ</u> des unités oligosaccharidiques des glycoprotéines liant la PHA	27

3.6 Essai de liaison des anticorps monoclonaux à de la thyroglobuline insolubilisée	28
3.7 Marquage à l'iode-125 des lymphocytes porcins	28
3.7.1 Isolement des lymphocytes	28
3.7.2 Comptage des cellules et détermination de la viabilité cellulaire	30
3.7.3 Marquage à l'iode-125 des lymphocytes	30
3.7.4 Solubilisation des lymphocytes	31
3.8 Etudes de liaison des [¹²⁵ I]-anticorps monoclonaux aux lymphocytes porcins	32
3.8.1 Isolement des lymphocytes porcins	32
3.8.2 Purification des lymphocytes T	32
3.8.3 Marquage à l'iode-125 des anticorps monoclonaux et de la PHA	33
3.8.4 Liaison des [¹²⁵ I]-anticorps monoclonaux aux lymphocytes porcins	34
3.9 Culture des lymphocytes porcins	35
3.9.1 Isolement des lymphocytes porcins	35
3.9.2 Culture des lymphocytes	35
3.9.3 Réticulation des anticorps monoclonaux	36
4. RESULTATS	37
4.1 Production et caractérisation préliminaire des anticorps monoclonaux	37
4.2 Purification des anticorps monoclonaux	37
4.3 Spécificité des anticorps monoclonaux A7, B1 et H3	39

4.4 Liaison des [125 I]-anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 aux splénocytes porcins	49
4.5 Liaison des [125 I]-anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 aux lymphocytes T porcins	54
4.6 Analyses par graphique de Scatchard de la liaison des [125 I]-anticorps monoclonaux aux splénocytes et lymphocytes T porcins	58
4.7 Propriétés mitogéniques des anticorps monoclonaux	68
5. DISCUSSION	72
6. CONCLUSION	79
Remerciements	80
Références	81

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

	page
TABLEAU 1. Description des solutions utilisées pour la préparation des gels de polyacrylamide en présence de SDS.	17
TABLEAU 2. Description des solutions utilisées pour la préparation des gels à gradient de concentration de polyacrylamide.	19
TABLEAU 3. Propriétés physiques des anticorps monoclonaux dirigés contre un récepteur de la PHA (gp80) chez les lymphocytes porcins.	38
TABLEAU 4. Compétition de la PHA pour les sites reconnus par les anticorps monoclonaux anti-gp80 évaluée par test ELISA.	48
TABLEAU 5. Paramètres cinétiques de la liaison des anticorps monoclonaux aux splénocytes porcins.	63
TABLEAU 6. Paramètres cinétiques de la liaison des anticorps monoclonaux aux lymphocytes T porcins.	67
TABLEAU 7. Réponse (indice de stimulation) des splénocytes porcins cultivés en présence d'anticorps monoclonaux (monomériques et réticulés) dirigés contre un récepteur de la PHA (gp80).	69
TABLEAU 8. Réponse (indice de stimulation) des splénocytes porcins cultivés en présence d'anticorps monoclonaux anti-gp80 (monomériques et réticulés) et de concentration sous-optimale de PHA.	71

- FIGURE 1. Schéma du protocole pour la production d'anticorps monoclonaux. 11
- FIGURE 2. Profil d'éluion sur colonne de DEAE-Séphacel et électrophorétogramme de l'anticorps monoclonal A7. 40
- FIGURE 3. Immunodétection de l'antigène reconnu par les [125 I]-anticorps monoclonaux après transfert électrophorétique des glycoprotéines liant la PHA sur une membrane de nitrocellulose et électrophorétogramme des [125 I]-protéines de surface de splénocytes porcins. 43
- FIGURE 4. Immunodétection de l'antigène reconnu par les anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 après oxidation in situ des sucres des glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA. 46
- FIGURE 5. Liaison des anticorps monoclonaux (A7, B1 et H3) marqués à l'iode-125 aux splénocytes porcins. 51
- FIGURE 6. Liaison des anticorps monoclonaux (A7, B1 et H3) marqués à l'iode-125 aux lymphocytes T porcins. 55
- FIGURE 7. Graphique de Scatchard de la liaison des [125 I]-anticorps monoclonaux (A7, B1 et H3) aux splénocytes porcins. 59
- FIGURE 8. Graphique de Scatchard de la liaison des [125 I]-anticorps monoclonaux (A7, B1 et H3) aux lymphocytes T porcins. 64

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac. mon.	anticorps monoclonal
CEA	antigène carcino-embryonnaire
Con A	concanavalline A
D-GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
D-Man	D-mannose
DMEM	"Dulbecco's modified essential medium"
D-Gal	D-galactose
DTT	DL-dithiotréitol
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
FCS	sérum de veau foetal
HAT	hypoxanthine, aminoptérine et thymidine
³ H-TdR	thymidine tritiée
i.p.	intrapéritonéale
L-Fuc	L-fucose
MEM	milieu essentiel minimal
NEAA	"non essential amino acids"
PBS	tampon phosphate de Dulbecco
PHA	phytohémagglutinine de <u>Phaseolus vulgaris</u>
PNA	agglutinine des arachides
POPOP	1,4-bis [2-(5-phényloxazoly)] benzène
PPO	2,5-diphényloxazole
PWM	"pokeweed mitogen"
Sia	acide sialique
TBS	saline tamponnée par Tris
TPA	12- <u>0</u> -tétradécanoyl 13- <u>0</u> -phorbol acétate
Tris	tris [hydroxyméthyl] aminométhane

RESUME

Une préparation purifiée de glycoprotéines réceptrices (lymphocytes porcins) de la phytohémmagglutinine (PHA) a été utilisée comme source d'antigène, chez des souris Balb/c, afin de produire des anticorps monoclonaux anti-récepteur de la PHA. Trois hybridomes stables et sécréteurs d'anticorps ont été obtenus par dilution limitante et maintenus en culture dans la cavité péritonéale de souris Balb/c. Les anticorps purifiés ont été désignés A7, B1 et H3, et appartiennent à la sous-classe IgG2. Chaque anticorps marqué à l'iode-125 se lie aux splénocytes et aux lymphocytes T porcins avec une constante (apparente) d'association de l'ordre de 10^8 M^{-1} . Chez les splénocytes, le nombre (apparent) de sites récepteurs mesuré par analyse de Scatchard est approximativement 5×10^4 sites/cellule dans le cas des anticorps B1 et H3, et approximativement 15×10^4 sites/cellule dans le cas de l'anticorps A7. Chez les lymphocytes T, les anticorps possèdent un nombre (apparent) de sites variant entre 7 et 10×10^4 sites/cellule. Les résultats présentés suggèrent que chaque anticorps monoclonal reconnaît un épitope distinct d'une glycoprotéine membranaire de Mr 80 kD (gp80) comprise dans la famille de glycoprotéines reconnues par la PHA. Des essais de compétition entre les anticorps et la PHA démontrent que les anticorps reconnaissent des sites distincts de la PHA. Les anticorps possèdent peu ou pas d'activité mitogénique chez les splénocytes porcins. De plus, seul l'anticorps B1 réticulé acquiert un pouvoir mitogénique. Par contre, les trois anticorps potentialisent la réponse des splénocytes cultivés en présence d'une concentration sous-optimale de PHA. Un mécanisme probable pour expliquer ces résultats est discuté.

1. INTRODUCTION

1.1 LES LECTINES

Les lectines (Goldstein et coll. 1980) sont des protéines, pour la plupart d'origine végétale, qui ont la propriété de se lier spécifiquement à des résidus saccharidiques. Bien que leur rôle chez les plantes ne soit pas encore défini (Etzler, 1986), les lectines sont devenues des outils de recherche très utiles qui ont trouvé des applications, entre autres, en sérologie, immunologie, biochimie et chimie des sucres (Goldstein et Hayes, 1978; Lis et Sharon, 1986a).

Etant donné que toutes les cellules vivantes possèdent des composants membranaires glycosylés, il n'est pas surprenant que les lectines soit capables de se fixer à leur surface (Lis et Sharon, 1986). D'ailleurs, la première propriété biologique reconnue des lectines a été leur capacité à agglutiner les érythrocytes de différentes espèces animales (Goldstein et Poretz, 1986). Chez l'humain, quelques lectines reconnaissent de manière spécifique les unités saccharidiques de certains groupes sanguins, ce qui leur a valu le nom lectine, du latin legere (i.e. sélectionner, choisir), un terme proposé par Boyd et Sharpleigh (1954).

Parmi les nombreux effets biologiques (Lis et Sharon, 1986) engendrés par l'interaction des lectines avec certains composants de la surface cellulaire, celui de la stimulation des lymphocytes est un des plus remarquables (Sharon, 1976). Cette activité mitogénique est rencontrée chez plusieurs lectines (PHA, Con A, PWM, PNA, etc.) (Lis et Sharon, 1977). De plus, les changements morphologiques et

biochimiques du lymphocyte stimulé par les lectines in vitro s'apparentent à plusieurs des évènements survenant lors de la stimulation des lymphocytes par les antigènes (Greaves et Janossy, 1972). Cependant, contrairement à l'activation des lymphocytes par des antigènes, où seulement les clones spécifiques sont stimulés, les lectines sont des agents d'activation polyclonale et peuvent stimuler 70% à 80% des lymphocytes d'une population donnée (Lis et Sharon, 1986).

L'identité des composants membranaires responsables de l'étape initiale conduisant à la transformation et à la division du lymphocyte n'a pas été fermement établie. Cependant, la majorité des auteurs s'entendent sur le rôle déterminant joué par les glycoprotéines membranaires dans le phénomène de reconnaissance initiale (Dupuis et coll., 1985; Edelman, 1976; O'Brien et coll., 1979; Sitkovsky et coll., 1984). Bien que, dans certains cas, quelques auteurs aient rapporté que les glycolipides de la membrane pouvaient aussi être impliqués (Lengle et coll., 1979; Spiegel et Wilchek, 1981).

1.1.1 La phytohémagglutinine (PHA)

La phytohémagglutinine (PHA) a été la première lectine mitogénique découverte (Nowell, 1960). Elle est extraite des haricots rouges ("red kidney bean") Phaseolus vulgaris sous forme d'un mélange de 5 isolectines résultant de la combinaison aléatoire de deux types (E et L) de sous-unités, en association tétramérique (Yachnin et Svenson, 1972; Felsted et coll., 1975) (L_4 , L_3E_1 , L_2E_2 ,

L_1E_3 , E_4). La masse moléculaire relative de chaque tétramère est 126-150 kD (Goldstein et Poretz, 1986). Les deux types de sous-unité ont été désignées L et E à cause de leur propriété respective de leucoagglutination et d'érythroagglutination (Egorin et coll., 1979; Leavitt et coll., 1977; Miller et coll., 1973).

De fait, jusqu'en 1984, l'activité mitogénique de la PHA était généralement associée à la sous-unité L. Ainsi, la L_4 -PHA s'avérait être au moins 30 fois plus mitogénique que la E_4 -PHA (Egorin et coll., 1977). Cependant, Glad et Borrebaeck (1984) ont démontré que la E_4 -PHA possédait une activité mitogénique comparable à celle de la L_4 -PHA envers les lymphocytes humains. Cependant, cette activité est masquée par une forte interaction de la E_4 -PHA avec les composants glycosylés du sérum utilisé dans les cultures.

La spécificité de la L_4 -PHA et de la E_4 -PHA pour les sucres a été étudiée au moyen de diverses techniques. Hammarström et coll. (1982) ont étudié la spécificité de la L_4 -PHA à l'aide d'essais d'inhibition de précipitation du complexe L_4 -PHA-CEA. Ils ont démontré que la structure oligosaccharidique minimum requise pour la liaison de la L_4 -PHA était le disaccharide D-GlcNAc-(β 1- \rightarrow 2)-D-Man. De plus, la présence des résidus D-Gal-(β 1- \rightarrow 4)- ou Sia-(α 2- \rightarrow 3)-D-Gal-(β 1- \rightarrow 4) liés au D-GlcNAc du disaccharide ne modifie pas (ou même favorise) la liaison de la L_4 -PHA. Cependant, parmi les oligosaccharides testés, le meilleur inhibiteur de la formation du précipité est le pentasaccharide (penta 2-6):

D-Gal-(β 1- \rightarrow 4)-D-GlcNAc-(β 1- \rightarrow 2)-D-Man-(α 1- \rightarrow 6)-D-Man ainsi que l'unité D-GlcNAc liée en (β 1- \rightarrow 2) au D-Man-(α 1- \rightarrow 3)-D-Man sont particulièrement importantes pour la liaison de la E₄-PHA.

Green et Baenziger (1987) ont aussi étudié la rétention de diverses structures oligosaccharidiques sur des colonnes de E₄-PHA-Agarose et de L₄-PHA-Agarose. Ils ont utilisé une série d'oligosaccharides libres purifiés par chromatographie liquide à haute performance qui ont été obtenus par digestion de différentes glycoprotéines à la N-glycanase.

Les auteurs ont conclu que les deux isolectines possèdent la même spécificité pour les oligosaccharides libres et, de plus, cette spécificité diffère de celle rapportée dans le cas des glycopeptides.

La plupart des observations de Green et Baenziger (1987) ne font que reconfirmer celles des groupes précédents. La présence du résidu D-GlcNAc bisectant et des résidus D-Gal terminaux favorise la liaison de la L₄-PHA et de la E₄-PHA. La chaîne du résidu D-Man-(α 1- \rightarrow 6) liée à la chaîne centrale est plus importante que la chaîne du résidu D-Man-(α 1- \rightarrow 3) pour la liaison des deux isolectines. La présence de résidus Sia-(α 2- \rightarrow 6)-D-Gal terminaux a un effet inhibiteur sur la liaison, contrairement aux résidus Sia-(α 2- \rightarrow 3)-D-Gal qui favorisent l'attachement de chaque isolectine.

Le cDNA correspondant aux gènes de la E-PHA et de la L-PHA (variété Tendergreen) a été séquencé par Hoffman et Donaldson (1985). Les deux séquences ont une homologie de 90% dans leur région transcrite. La L-PHA est une protéine de 252 résidus d'acides aminés contenant 2 sites de glycosylation (Asn-12, Asn-60) tandis que la E-PHA possède 254 acides aminés et 3 sites de glycosylation (Asn-12, Asn-60, Asn-80)(Hsu et coll., 1979; Sturm et Chrispeck, 1986).

De plus, Dupuis et coll. (1980) ont démontré, par modification chimique de la PHA, que les résidus acide aspartique, acide glutamique et tyrosine pourraient être impliqués dans l'activité mitogénique de la lectine.

1.1.2 Récepteurs de PHA

Bien que la stimulation des lymphocytes par la PHA ait été rapportée depuis plus de vingt ans (Nowell, 1960), son mécanisme demeure encore inconnu. Cependant, il est généralement admis que l'étape initiale est la liaison de la PHA aux composants glycosylés de la surface cellulaire (Lis et Sharon, 1986). Ces derniers, communément appelés récepteurs de PHA, ont été partiellement caractérisés par différents groupes (Alexander et coll., 1978; Allan et Crumpton, 1973; Dillner-Centerlind et coll., 1980; Dupuis et coll., 1985; Henkart et Fisher, 1975; Skoog et coll., 1980). La plupart des auteurs ont rapporté une population hétérogène de glycoprotéines dont le patron électrophorétique est complexe et les masses moléculaires relatives varient considérablement (de 20 kD à 250 kD).

1.2 LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps, en plus de leur fonction biologique dans la réponse immunitaire, sont des outils importants pour l'identification, le marquage ou la purification de certaines molécules et cellules. Cependant, la production d'anticorps hautement

spécifiques in vivo offre certains désavantages. Entre autres, l'antigène servant à l'immunisation doit être très pur, la quantité d'anti-sérum est généralement limitée et sa qualité peut varier d'un échantillon à un autre (Goding, 1986).

Köhler et Milstein (1975) ont rapporté la première fusion entre un lymphocyte B producteur d'un anticorps défini et une cellule myélomateuse. La cellule hybride, ayant conservé, d'une part, le pouvoir sécréteur d'anticorps et d'autre part, la capacité à se multiplier indéfiniment, assurait ainsi la production de quantités illimitées d'anticorps de spécificité déterminée. Cette publication a été le début des anticorps monoclonaux.

Cette technique, bien que conçue par Köhler et Milstein, est empreinte des travaux de plusieurs groupes.

Nossal et Lederberg (1958) ont observé, chez des cellules de nodules lymphatiques de rat, qu'une même cellule ne produisait qu'un seul anticorps. Cette observation venait appuyer la théorie de la sélection clonale proposée par Burnet (1957), Jerne (1955), Hood et Talmage (1970).

La même année, Okada (1958) a décrit la fusion in vitro de cellules tumorales d'Ehrlich à l'aide du virus de Sendai. Potter et Boyce (1962) ont rapporté le développement d'ascites chez des souris Balb/c suite à l'injection intrapéritonéale d'huile minérale ou d'adjuvant complet de Freund et la présence d'anticorps spécifiques tels que ceux dirigés contre la phosphorylcholine et l'haptène dinitrophényl.

Littlefield (1964) a mis en évidence la présence de cellules hybrides, in vitro, grâce à un milieu de sélection. Dans un tel milieu, seules les cellules provenant de la fusion entre les deux lignées de fibroblastes murins peuvent croître. Ce mode de sélection, est, encore aujourd'hui, le plus utilisé. Brièvement, le milieu qui contient de l'hypoxanthine (H), de l'aminoptérine (A) et de la thymidine (T), agit en bloquant la principale voie métabolique menant à la synthèse du GTP à l'aide d'un antagoniste de l'acide folique: l'aminoptérine. Dans ces conditions, une cellule normale produit le GTP via une voie métabolique alternative qui implique l'action des enzymes hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT ou HPRT) et thymidine kinase (TK).

Cependant, on retrouve dans la nature des cellules mutantes (HGPRT⁻) dont la voie alternative n'est pas fonctionnelle. Ces mutants HGPRT⁻ ne peuvent donc pas survivre en présence d'aminoptérine faute de GTP. De tels mutants ont pu être isolés à l'aide d'analogues toxiques de la guanine, soit le 6-thioguanine ou le 8-azaguanine. Lorsque cultivée en présence de ces analogues, une cellule normale les intègre à son ADN via l'enzyme HGPRT, ce qui entraîne sa mort. Ainsi, seule la croissance des mutants HGPRT⁻ est favorisée.

En présence d'aminoptérine, une cellule mutante HGPRT⁻ ne peut survivre qu'à condition d'être fusionnée avec une cellule normale HGPRT⁺.

Horibata et Harris (1970) ont établi et caractérisé plusieurs lignées de myélome et de lymphome murins en culture continue.

En 1973, Cotton et Milstein ont démontré que des cellules hybrides, provenant de la fusion entre deux lignées cellulaires produisant des anticorps, conservaient la capacité à sécréter à la fois, les anticorps des deux cellules parentales.

Le protocole décrit par Galfre et Milstein (1981) pour la production d'anticorps monoclonaux est illustré à la figure 1.

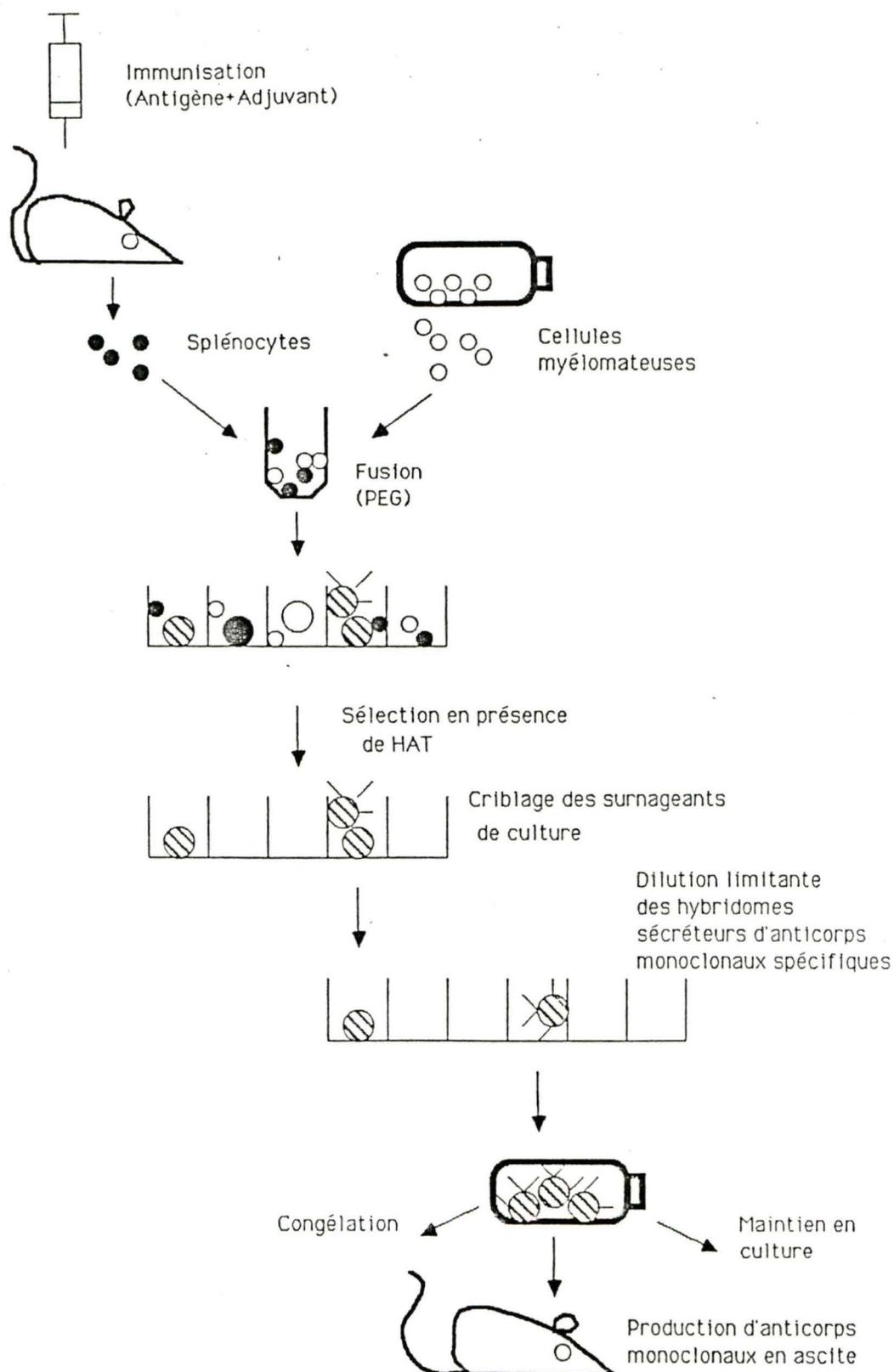
Une souris, le plus souvent de type Balb/c, est immunisée contre l'antigène désiré par injection i.p. avec un mélange (1:1) d'antigène (purifié ou non) et d'adjuvant de Freund complet. Deux à quatre jours après le dernier rappel, la rate est prélevée et les splénocytes sont fusionnés avec des cellules myéломateuses HGPRT⁻. Les lignées les plus couramment utilisées étant: NS-1, NS0/1 et Sp2, toutes d'origine murine Balb/c.

La fusion a lieu en incubant les deux populations cellulaires dans une solution de polyéthylène glycol (PEG) 40% à 50% (p/v) pendant environ 2 minutes (le temps d'exposition au PEG ainsi que la concentration de PEG varient selon les auteurs).

Les cellules hybrides sont mises en culture dans un milieu de sélection contenant du HAT. Dans ces conditions, seules les cellules provenant de la fusion entre un splénocyte et une cellule myéломateuse peuvent survivre. Les hybrides provenant d'une fusion entre deux cellules myéломateuses (HGPRT⁻) ainsi que les cellules myéломateuses non-fusionnées sont incapables de se diviser, faute de GTP, tandis que les splénocytes non-fusionnés et les fusions entre splénocytes ne sont viables seulement que quelques jours en culture.



Fig. 1 Schéma du protocole pour la production d'anticorps monoclonaux



Les cellules sont réparties dans des plateaux et lorsque la croissance des clones est suffisante, le surnageant de culture est testé pour la présence de l'anticorps monoclonal désiré. Le plus souvent, le criblage est effectué par test ELISA (Engvall et coll., 1972). Les hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux spécifiques sont ensuite clonés par dilution limitante afin d'assurer l'homogénéité de la population cellulaire.

La production massive d'anticorps monoclonaux murins est le plus souvent faite in vivo en implantant les hybridomes dans le péritoine de souris Balb\c chez laquelle la formation d'une ascite (épanchement péritonéal) a été induite à l'aide de pristane. Le liquide d'ascite, récolté environ une dizaine de jours après l'inoculation, peut contenir jusqu'à 10 mg/mL d'anticorps monoclonal, soit environ 1000 fois la concentration retrouvée dans le surnageant de culture (Goding, 1986). A cette étape, l'anticorps est généralement purifié afin d'éliminer, entre autres, l'albumine et les enzymes protéolytiques (Galfre et Milstein, 1981) présentes dans le liquide d'ascite.

1.3 BUT DU TRAVAIL

Ce travail décrit une série d'études visant à caractériser les récepteurs membranaires de la PHA chez les lymphocytes porcins. L'avènement des anticorps monoclonaux a permis d'accéder à une nouvelle technique pour l'étude de tels récepteurs. Ainsi, des anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs de la PHA ont été produits en utilisant comme antigène une préparation purifiée de

glycoprotéines liant la PHA (Dupuis et coll., 1985) et isolée à partir de lymphocytes spléniques porcins. Trois anticorps monoclonaux anti-récepteur de la PHA ont fait l'objet de la présente étude.

La première partie de ce travail a consisté à produire les anticorps monoclonaux sous forme de liquide d'ascite, à les purifier, à en déterminer la classe et à les caractériser par analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

La seconde partie du travail a été axée sur la caractérisation de l'antigène et de la nature (protéique ou saccharidique) de l'épitope reconnu par les anticorps monoclonaux.

La troisième partie de ce mémoire a consisté en la détermination des propriétés cinétiques et du pouvoir mitogénique des anticorps monoclonaux envers les splénocytes porcins.

2. MATERIEL

L'albumine de sérum bovin, le réactif de Folin-Ciocalteu, la thyroglobuline, le Tris, le Tween-20, l'Amido Black, la pénicilline-G, le sulfate de streptomycine et le diméthylsuberimide ont été obtenus chez Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Le Bleu de Bromophénoï et le pristane ont été achetés chez Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwaukee, WI).

Le Biogel P-2, le Bleu de Coomassie et les autres réactifs pour l'électrophorèse ont été obtenus chez Bio-Rad Lab. (Richmond, CA). Le Nonidet P-40 a été acheté chez Particle Data (Elmhurst, IL) et les membranes de nitrocellulose, chez Mandel Scientific (Montréal, Qc).

Les souris Balb/c ont été obtenues de Charles River Canada Inc. (St-Constant, Qc) et la lignée cellulaire NS-1, de American Type Culture Collection (Rockville, MD). Les adjuvants de Freund complet et incomplet ont été achetés chez Difco Lab. (Détroit, MI).

Le sérum de veau fœtal et le DMEM ont été obtenus chez Flow Lab. Inc. (Montréal, Qc). Le DEAE-Séphacel et le Ficoll 400 ont été achetés chez Pharmacia Fine Chemicals (Montréal, Qc). Le Diatrizoate de sodium 50% (Sodium Hypaque) a été obtenu chez Winthrop Lab. (Montréal, Qc).

Le phtalate de dinonyle et de di-n-butyle ont été achetés chez BDH Chemicals Ltd. (Montréal, Qc). Le [125 I]-Na et la [3 H]-TdR ont été obtenus chez Amersham (Montréal, Qc). Les autres réactifs ont été achetés chez Fisher Scientific ou Canlab (Montréal, Qc).

3. METHODES

3.1 DOSAGE DES PROTEINES

3.1.1 Méthode de Lowry

La détermination des protéines a été faite selon la méthode décrite par Lowry et coll. (1951). A chaque échantillon, (contenant 10 à 100 µg de protéines) ont été ajoutés, 2 mL d'une solution de carbonate de sodium 2% (p/v) dans du NaOH 0,1 N contenant 1% (v/v) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v) et 1% (v/v) de tartrate de K^+ et Na^+ 1% (p/v). Après une incubation de 20 minutes, 0,2 mL de réactif Folin-Ciocalteu 1N a été ajouté et le tout a été mélangé vigoureusement. La densité optique a été lue à 750 nm, après 30 minutes, à l'aide d'un spectrophotomètre Cary (modèle 118, Varian Associates, Ville St-Laurent, Qc). La courbe étalon a été établie à l'aide d'une solution d'albumine bovine sérique.

3.1.2 Méthode de Lowry adaptée aux solutions contenant du Nonidet P-40

Dans le cas des fractions contenant du détergent Nonidet P-40, la détermination des protéines a été faite selon la méthode de Wang et Smith (1975). A des échantillons de 0,5 mL contenant 1% (v/v) de Nonidet P-40, ont été ajoutés 5 mL de solution cuivre-tartrate (section 3.1.1). Après 15 minutes, 0,5 mL d'une solution de SDS 10% (p/v) et 0,5 mL de réactif Folin-Ciocalteu 1N ont été ajoutés en

prenant soin d'agiter après chaque addition. La densité optique a été lue, après 30 minutes, à 700 nm.

3.2 TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

L'analyse électrophorétique a été faite telle que décrite par Laemmli (1970).

3.2.1 Préparation du gel

Le gel séparateur (7,5% (p/v) acrylamide) a été préparé à partir des solutions décrites au tableau 1. Le mélange a été déaéré avant d'être versé entre deux plaques de verre espacées de 1,5 mm. Les dimensions finales du gel étaient 9x14 cm. Avant la polymérisation, une fine couche d'eau a été déposée à la surface pour assurer la linéarité de la partie supérieure du gel.

Le gel concentrateur (4% (p/v) acrylamide) a été préparé tel qu'indiqué au tableau 1 et versé au-dessus du gel séparateur après avoir retiré l'eau. Le gel a été conservé une nuit à 4⁰ C avant utilisation.

TABLEAU 1. Description des solutions utilisées pour la préparation des gels de polyacrylamide en présence de SDS.

SOLUTIONS	GEL SEPARATEUR	GEL CONCENTRATEUR
	7,5% (p/v) acrylamide (30 mL)	4% (p/v) acrylamide (10 mL)
acrylamide 30% (p/v) bis-acrylamide 0,8% (p/v)	7,5 mL	-
acrylamide 40% (p/v) DADT 3,6% (p/v)	-	1,0 mL
Tris 1,5 M pH 8,8 (HCl)	7,5 mL	-
Tris 0,5 M pH 6,8 (HCl)	-	2,5 mL
H ₂ O	10,1 mL	4,38 mL
SDS 10% (p/v)	0,3 mL	0,1 mL
persulfate d'ammonium	15 mg/4 mL H ₂ O	5 mg/2 mL H ₂ O
TEMED 10% (v/v)	60 µL	20 µL

3.2.2 Préparation du gel à gradient de concentration de polyacrylamide.

Ce gel a été préparé à partir d'une solution d'acrylamide de 5% (p/v) et une de 12% (p/v) qui ont été mélangées à l'aide d'un appareil pour former les gradients (modèle SG 30, Hoefer, Pointe-Claire, Qc). Les solutions ont été préparées tel que décrites au tableau 2 et refroidies à 4⁰ C. Le gel (9x14x0,15 cm) a été versé entre deux plaques de verre à l'aide d'une pompe péristaltique afin de maintenir un débit constant de 1 à 2 mL/min. Le gel concentrateur a été préparé tel que décrit à la section 3.2.1.

3.2.3 Préparation des échantillons

En conditions réductrices: A chaque échantillon (volume final, 200 µL), ont été ajoutés, dans l'ordre, 20 µL d'une solution de SDS 10% (p/v) et 8 µL d'une solution de DTT 0,125 M. Dans le cas des échantillons de glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA, 1% (v/v) de Nonidet P-40 a été ajouté en plus du SDS. Les échantillons ont été chauffés pendant 2 minutes dans de l'eau bouillante. Une fois refroidis, 10 µL d'une solution d'iodoacétamide 0,24 M ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés à 50⁰ C pendant 15 minutes. Ensuite, ont été ajoutés, 20 µL d'une solution contenant 1% (p/v) de SDS, 25% (p/v) de sucrose, 0,005% (p/v) de bleu de Bromophénoï et 0,3 M Tris, pH 6,8 (solution A). Les échantillons ont été centrifugés à 7000xg pendant 5 minutes avant d'être déposés dans les puits.

TABLEAU 2. Description des solutions utilisées pour la préparation des gels à gradient de concentration de polyacrylamide.

SOLUTIONS	GEL SEPARATEUR	
	5% (p/v) acrylamide (11 mL)	12% (p/v) acrylamide (11 mL)
acrylamide 30% (p/v) bis-acrylamide 0,8% (p/v)	1,83 mL	4,4 mL
Tris 1,5 M, pH 8,8 (HCl)	2,75 mL	2,75 mL
H ₂ O	4,62 mL	1,05 mL
glycérol	-	1,0 mL
SDS 10% (p/v)	0,11 mL	0,11 mL
persulfate d'ammonium	5,5 mg/ 1,47 mL H ₂ O	5,5 mg/ 1,47 mL H ₂ O
TEMED 10% (v/v)	22 µL	22 µL

En conditions non-réductrices: A chaque échantillon (volume final, 200 µL) ont été ajoutés, 20 µL de SDS 10% (p/v). Le tout a été chauffé pendant 2 minutes dans de l'eau bouillante. Vingt microlitres de solution A ont été ajoutés et les échantillons ont été centrifugés à 7000xg pendant 5 minutes avant d'être déposés dans les puits.

3.2.4 Conditions d'électrophorèse

L'électrophorèse a été effectuée avec un appareil SE 500 de Hoefer Scientific (Pointe-Claire, Qc). Le tampon d'électrophorèse contenait 0,38 M glycine, 0,1% (p/v) SDS et 0,05 M Tris pH 8,3. Le courant appliqué était de 20 mA pour la migration dans le gel concentrateur et de 30 mA dans le gel séparateur. Le système a été refroidi à 4⁰ C et la migration a été arrêtée lorsque le colorant arriva à 0,5 cm du bas du gel.

Dans le cas des protéines marquées à l'iode-125, le gel a ensuite été séché sous vide poussé par déposition sur papier Whatman 3MM, à l'aide d'un séchoir de gel SE 540 de Hoefer (Pointe-Claire, Qc) L'autoradiographie a été faite à l'aide d'un film Kodak (film XAR-5, Eastman Kodak Co., Montréal, Qc) exposé à -50⁰ C, pendant 3 à 4 jours.

3.2.5 Coloration des gels

Le gel a été agité dans une solution de bleu de Coomassie (isopropanol 25% (v/v), acide acétique 10% (v/v), bleu de Coomassie 0,05% (p/v)) pendant 16 heures. L'excédant de colorant a été éliminé

par des lavages successifs dans une solution contenant 25% (v/v) d'isopropanol et 10% (v/v) d'acide acétique.

3.2.6 Etalonnage des gels pour la détermination des masses moléculaires relatives (Mr)

Les protéines utilisées pour la détermination des masses moléculaires relatives étaient: la lactalbumine- α (14 kD), l'anhydrase carbonique (30 kD), la lactate déshydrogénase (36 kD), l'ovalbumine (43 kD), la catalase (60 kD), l'albumine bovine sérique (67 kD), et la phosphorylase b (94 kD). Les masses moléculaires indiquées correspondent aux protéines analysées en conditions réductrices.

Ces marqueurs étaient à des concentrations de 1 à 2 mg/mL dans une solution de NaCl (6 mg/mL) et de sucrose (600 mg/mL). Le traitement des protéines avant électrophorèse a été fait tel que décrit à la section 3.2.3.

La détermination des masses moléculaires relatives a été faite selon la méthode de Weber et Osborn (1969).

3.3 PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

3.3.1 Immunisation des souris et production des hybridomes

Des souris Balb/c ont été immunisées i.p. avec 100 μ g chacune d'un mélange de glycoprotéines liant la PHA, en solution dans un tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,2. Le tout a été injecté en

émulsion dans un volume égal d'adjuvant de Freund complet. Les glycoprotéines ont été isolées à partir de lymphocytes spléniques porcins tel que décrit par Dupuis et coll. (1985). Aux jours 10 et 20, les souris ont reçu une injection de rappel avec la même quantité de protéines émulsifiées dans de l'adjuvant de Freund incomplet. Quatre jours plus tard, les splénocytes ont été isolés et fusionnés avec les cellules du myélome murin NS/1 selon la technique décrite par Galfre et Milstein (1981). Les hybridomes ont été sélectionnés en présence d'hypoxanthine (10^{-4} M), d'aminoptérine ($2,3 \times 10^{-5}$ M) et de thymidine ($1,6 \times 10^{-5}$ M) dans du milieu DMEM suppléé avec 2% (v/v) NCTC 135, 0,005% (p/v) de pyruvate, 1% (v/v) de tampon Hépès 1M, pH 7,2, 0,37% (p/v) de NaHCO_3 , 1% (v/v) de NEAA, 0,05 mM de β -mercaptoéthanol, 100 U/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycine, 20% (v/v) FCS, 2 mM glutamine. La détection des anticorps spécifiques aux glycoprotéines liant la PHA a été faite par test ELISA tel que décrit à la section 3.4. Les hybridomes sécréteurs d'anticorps ont été clonés à deux reprises par dilution limitante dans le milieu de sélection.

3.3.2 Production d'anticorps monoclonaux en ascite chez la souris

Les anticorps monoclonaux spécifiques aux glycoprotéines liant la PHA ont été produits en ascite chez des souris Balb/c. Les hybridomes ont été injectés (10^6 cellules/1 mL PBS/souris) dans la cavité péritonéale de souris traitées avec 0,5 mL de pristane, 8 à 10 jours auparavant. Les ponctions ont été effectuées à l'aide d'une aiguille hypodermique 18G. Le liquide d'ascite a été centrifugé à 400xg

pendant 10 minutes afin d'enlever les cellules et a été conservé à 4⁰ C en présence de 0,02% (p/v) d'azoture de sodium. Dans certains cas, 1% (v/v) d'héparine (5000 U/mL) a été ajouté afin de prévenir la coagulation.

3.3.3 Purification des anticorps monoclonaux

Le liquide d'ascite a été clarifié par une centrifugation à 13 000xg, pendant 30 minutes, à 4⁰ C. Les anticorps ont ensuite été précipités en ajoutant un volume égal d'une solution de sulfate d'ammonium 3,5 M dissout dans du tampon PBS, pH 7,2. Cette solution (à 4⁰ C) a été ajoutée goutte à goutte au liquide d'ascite (à 4⁰ C) en agitant constamment. La suspension a ensuite été incubée sur glace, sans agitation, pendant 20 minutes et centrifugée à 13 000xg pendant 20 minutes (4⁰ C). Le culot a été dissout dans 10 à 20 mL de tampon phosphate de sodium 17,5 mM, pH 6,8 et dialysé pendant 16 heures à 4⁰ C contre 2 L du même tampon.

Les anticorps ont ensuite été purifiés sur une colonne de DEAE-Séphacel (dimension 2,0x24 cm) équilibrée avec le tampon phosphate de sodium 17,5 mM, pH 6,8. Les anticorps ont été élués avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,6. La colonne a été régénérée par lavages avec un tampon phosphate de sodium 0,5 M, pH 6,8 et rééquilibrée avec le tampon initial de chromatographie.

3.4 TEST ELISA

Le mélange de glycoprotéines lymphocytaires ayant servi à l'immunisation des souris (voir section 3.3.1) a été utilisé comme antigène pour la préparation des essais ELISA. Cinquante microlitres de cette solution diluée à 5 µg/mL dans du tampon PBS ont été déposés dans les puits d'un plateau de PCV flexible (96 puits, Falcon #3912) et le tout a été incubé, pendant 16 heures, à la température de la pièce. Les puits ont ensuite été remplis avec une solution d'albumine bovine sérique 1% (p/v) dissoute dans du tampon PBS, pH 7,3 et le plateau a été incubé pendant 2 heures à la température de la pièce. Les puits ont été vidés et lavés à trois reprises avec de tampon PBS contenant 0,05% (p/v) d'albumine bovine sérique (tampon A).

Lors de l'essai, 50 µL de la solution d'anticorps (surnageant de culture) ont été ajoutés à chaque puits et le plateau a été incubé, pendant 2 heures, à la température de la pièce. Les puits ont ensuite été vidés et lavés 3 fois avec le tampon A. Puis ont été ajoutés, 50 µL d'une solution d'anti-immunoglobulines de souris conjuguées à la biotine (HyBRL, Bethesda Research Lab., Bethesda, MD) diluée 1/1000 dans le tampon A. Après 1 heure d'incubation à la température de la pièce, les puits ont été vidés et lavés à quatre reprises avec le tampon A. Cinquante microlitres d'une solution de streptavidine conjuguée à la peroxidase (HyBRL, Bethesda Research Lab., Bethesda, MD) diluée 1/1000 dans le tampon A ont alors été ajoutés et le plateau a été incubé pendant 30 minutes. Les puits ont été lavés six fois avec le tampon A, puis ont été ajoutés, 100 µL d'une solution

d'ortho-phénylènediamine (1 mg/mL) dans de l'acide citrique 0,1 M, pH 4,5, contenant 0,012% (v/v) de peroxyde d'hydrogène. Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, la densité optique a été lue à 450 nm (lecteur de plateau à ELISA, modèle EL 310, Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, USA).

3.4.1 Détermination de la classe des anticorps monoclonaux

La détermination de la classe des anticorps a été faite par test ELISA (section 3.4), en utilisant, comme source d'antigène, des antiséras spécifiques à chaque type d'immunoglobuline (Boehringer Mannheim, Dorval, Qc).

3.5 IMMUNODETECTION DE L'ANTIGÈNE APRES TRANSFERT ELECTROPHORETIQUE SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE

3.5.1 Transfert électrophorétique des protéines sur membrane de nitrocellulose

Le transfert électrophorétique a été fait tel que décrit par Towbin et coll. (1979). Après l'électrophorèse, le gel a été équilibré pendant 30 minutes dans le tampon de transfert (glycine 192 mM, Tris 25 mM, méthanol 20% (v/v), pH 8,3). La membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Mandel Scientific Co. Ltd, Ville St-Pierre, Qc) préalablement mouillée dans le tampon de transfert, a été déposée sur le gel en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Le tout a été placé entre deux papiers filtres épais (modèle 224, Bio-Rad,

Richmond, Californie) imbibés de tampon de transfert. Ce montage a ensuite été inséré dans une cassette rigide et placé dans la cuve à transfert de façon à ce que le gel soit du côté de la cathode. Le transfert a été effectué avec l'appareil Trans-Blot Cell (Bio-Rad) en appliquant une différence de potentiel de 50 à 60 V pendant 3 heures (ou 15 V pendant 16 heures et 25 V pendant la dernière heure). Le système a été refroidi à 4⁰ C au moyen d'un bain de circulation refroidissant.

3.5.2 Immunodétection de l'antigène par les anticorps marqués à l'iode-125

Après le transfert, la membrane de nitrocellulose a été lavée dans du tampon TBS (0,15 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5) pendant 15 minutes.

La piste contenant les marqueurs de masse moléculaire a été colorée à l'Amido-black. La membrane de nitrocellulose a été incubée pendant 5 minutes dans une solution contenant 0,1% (p/v) d'Amido-black, 45% (v/v) de méthanol et 10% (v/v) d'acide acétique. L'excès de colorant a été éliminé par des lavages successifs dans une solution contenant 45% (v/v) méthanol et 10% (v/v) d'acide acétique.

L'autre partie de la membrane de nitrocellulose a été incubée pendant 16 heures dans le tampon TBS contenant 3% (p/v) d'albumine bovine sérique. La membrane a ensuite été lavée à trois reprises dans le tampon TBS contenant 0,05% (v/v) de Tween-20 et incubée pendant 2 heures dans 10 à 12 mL de tampon TBS contenant 0,05% (v/v) de Tween-20, 1% (p/v) d'albumine bovine sérique et 4 à 8 µg d'anticorps monoclonal marqué à l'iode-125.

Pour les essais de compétition, la membrane a d'abord été incubée pendant 1,5 heure en présence de l'anticorps non-marqué (150 à 400 µg) dans 10 mL de tampon TBS contenant 1% (p/v) d'albumine bovine sérique et 0,05% (v/v) de Tween-20.

La membrane a ensuite été lavée dans le tampon TBS contenant 0,05% (v/v) de Tween-20 jusqu'à ce que le contenu en radioactivité dans les eaux de lavage soit constant. La membrane a été séchée entre deux papiers filtres et exposée à un film sensible à la radioactivité, à -70°C , pendant 4 à 6 jours.

3.5.3 Oxydation in situ des unités oligosaccharidiques des glycoprotéines liant la PHA

L'oxydation in situ des unités oligosaccharidiques des glycoprotéines a été fait tel que décrit par Woodward et coll. (1985). Après le transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose a été lavée pendant 30 minutes dans le tampon PBS contenant 0,05% (v/v) de Tween-20. Puis, la membrane a été lavée à deux reprises, pendant 10 minutes, dans un tampon 50 mM d'acétate de sodium, pH 4,5 et incubée pendant 1 heure, à l'obscurité, dans le même tampon contenant 10 mM de périodate de sodium. La membrane a ensuite été lavée deux fois, pendant 10 minutes, dans le tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 4,5 et incubée, pendant 30 minutes, dans une solution de borohydrure de sodium 50 mM. Puis, deux autres lavages ont été effectués dans du tampon PBS contenant 0,05% (v/v) de Tween-20. L'immunodétection des glycoprotéines liant la PHA a été faite tel que décrit à la section 3.5.2.

3.6 ESSAI DE LIAISON DES ANTICORPS MONOCLONAUX A DE LA THYROGLOBULINE INSOLUBILISEE

Un volume de 1 mL d'une solution d'anticorps (0,15 mg/mL) a été déposé sur une colonne de Sépharose-thyroglobuline (8 x 0,5 cm) préparée tel que décrit par Felsted et coll. (1975) et équilibrée dans du tampon PBS, pH 7,3.

La colonne a été incubée pendant 15 minutes avant d'être éluée avec 2 mL de tampon PBS, pH 7,3. La densité optique a été mesurée à 280 nm.

3.7 MARQUAGE A L'IODE-125 DES LYMPHOCYTES PORCINS

3.7.1 Isolement des lymphocytes

Les lymphocytes ont été isolés à partir de rates de porc fraîchement prélevées. Les rates ont été rincées dans de la saline après avoir été débarassées du tissu adipeux. Le tissu a été haché à l'aide d'un hachoir à viande manuel et recueilli dans du tampon de Gey (NaCl 0,12 M; KH_2PO_4 2,2 mM; KCl 5 mM; MgCl_2 1 mM; MgSO_4 0,3 mM; Na_2HPO_4 0,8 mM; glucose 55,5 mM; Hépès 39,2 mM) contenant 1% (v/v) de FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine.

La suspension a été filtrée à travers une double épaisseur de mousseline et l'extrait a été dilué (300 mL/rate) avec du tampon de Gey contenant 1% (v/v) de FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. La suspension a été centrifugée à 250xg pendant 8

minutes dans des tubes de 50 mL à fond conique. Les cellules ont été lavées à deux reprises avec du tampon de Gey contenant 1% (v/v) de FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine.

Les culots ont été resuspendus dans ce même tampon (160 mL/rate) et les cellules ont été distribuées à raison de 20 mL/tube. Un volume de 10 à 12 mL d'une solution contenant 2.5 parties de Ficoll 400 9% (p/v) pour 1 partie de diatrizoate de sodium 50% (p/v) a été introduit dans chaque tube, sous la suspension de cellules. Le tout a été centrifugé à 200xg pendant 20 minutes. La couche de cellules flottant à l'interface, ainsi que le tampon se trouvant au-dessus, ont été récoltés délicatement. Les cellules ont été centrifugées à 200xg, pendant 8 minutes, et lavées à deux reprises avec du tampon de Gey contenant 1% (v/v) de FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine.

Les érythrocytes contaminants ont été lysés dans un tampon hypotonique de chlorure d'ammonium. Les cellules ont été suspendues dans du tampon de Gey contenant 1% (v/v) de FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine (40 mL/rate, 10 mL/tube conique de 50 mL) et elles ont été centrifugées à 200xg pendant 8 minutes. A chaque culot, ont été ajoutés 10 mL de tampon de lyse (NH_4Cl 140 mM, Tris 17 mM, pH 7,2) à 37⁰ C. Les cellules ont été resuspendues rapidement et incubées pendant 6 minutes, à 37⁰ C, avec agitation. Les suspensions ont été diluées jusqu'à 50 mL avec le tampon de Gey contenant 1% (v/v) de FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine et ont ensuite été centrifugées à 200xg pendant 8 minutes. Les cellules ont été lavées à une reprise et une deuxième centrifugation sur le gradient de Ficoll-diatrizoate de sodium a été effectuée.

3.7.2 Comptage des cellules et détermination de la viabilité cellulaire.

La suspension cellulaire a été diluée 1/100 ou 1/200 dans une solution de Crystal violet 0,1% (p/v) et d'acide citrique 0,1 M à l'aide d'une pipette à dilution (Fisherbrand, Fisher Scientific Co., Montréal, Qc). Les cellules ont été mélangées à l'aide d'un agitateur à pipette (Yankee blood pipet shaker, Becton Dickinson Co., Montréal, Qc) et comptées avec un hématimètre (Spencer, American Optical Co., Buffalo, N.Y.).

La viabilité a été déterminée en diluant les cellules dans une solution de bleu de Trypan 0,4% (p/v), NaCl 0,85% (p/v).

3.7.3 Marquage à l'iode-125 des lymphocytes

Les lymphocytes ont été marqués selon la méthode décrite par Chen et coll. (1978) en apportant quelques modifications.

Quatre à 5×10^7 lymphocytes (viabilité > 90%) ont été lavés à deux reprises dans un tampon phosphate contenant 0,01 M de phosphate de sodium et 0,15 M de NaCl, pH 7,3. Le culot a été resuspendu dans 150 μ L de ce même tampon à 30⁰ C, puis ont été ajoutés dans l'ordre: 100 μ L d'une solution de lactoperoxydase à 2 mg/mL, 10 μ L de tampon phosphate de sodium 0,5 M, pH 7,0, 1 mCi de [¹²⁵I]-Na (10 μ L d'une solution de 100 mCi/mL) et 30 μ L de H₂O₂ 0,03% (v/v) fraîchement diluée dans le tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,3.

Après une agitation vigoureuse, les cellules ont été incubées à 30⁰ C, pendant 4 minutes. Trente microlitres de H₂O₂ 0,03% (v/v) ont été ajoutés puis les cellules ont été incubées, pendant 10 minutes, à la température de la pièce. La suspension a été diluée avec 5 mL de tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,3 froid et centrifugée à 800xg pendant 7 minutes. Les cellules ont été lavées 2 fois avec 10 mL de tampon froid.

Le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,3 et centrifugé sur un gradient de Ficoll-diatrizoate de sodium (section 3.7.1), pendant 20 minutes, à 200xg. Les lymphocytes ont été lavés à deux reprises avec le tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,3.

3.7.4 Solubilisation des lymphocytes

Les lymphocytes ont été suspendus dans 2 mL de tampon NaCl 0,15 M, Tris 25 mM, PMSF 0,2 mM, pH 7,2 et incubés sur glace pendant 5 minutes. Deux millilitres de ce même tampon contenant 1% (v/v) de Nonidet P-40 ont été ajoutés à la suspension de cellules et le tout a été incubé sur glace pendant 20 minutes. La suspension a été agitée périodiquement pendant l'incubation. L'extrait a ensuite été centrifugé à 16 000xg pendant 20 minutes et le surnageant a été conservé à 4⁰ C jusqu'au moment de l'analyse sur gel d'acrylamide en présence de SDS.

3.8 ETUDES DE LIAISON DES [125 I]-ANTICORPS MONOCLONAUX AUX LYMPHOCYTES PORCINS

3.8.1 Isolement des lymphocytes porcins

Les lymphocytes ont été isolés selon la méthode décrite à la section 3.7.1 et resuspendus à 10×10^6 cellules/mL dans du milieu De Luca (NaCl 0,12 M, KCl 6 mM, Na_2HPO_4 5 mM, Tris 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgSO_4 1 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,3) (De Luca et coll., 1974).

3.8.2 Purification des lymphocytes T

Les splénocytes ont été conservés pendant toute la nuit à 4°C dans du tampon de Gey contenant 5% (v/v) de FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. Les lymphocytes T ont été purifiés sur colonne de nylon (type 200, Fenwal Lab., Deerfield, Illinois) tel que décrit par Henry et coll. (1980).

Le nylon a été lavé dans une solution de HCl 0,2 N et rincé à l'eau jusqu'à neutralité. Il a ensuite été séché à l'air chaud et inséré dans des seringues de 30 mL (2,4 g de nylon/seringue) munies d'un robinet à trois sorties. Le nylon a alors été lavé avec du tampon PBS puis, avec 50 à 100 mL de tampon de Gey contenant 5% (v/v) de FCS. Les colonnes ont été incubées à 37°C pendant 1 heure. Le tampon de Gey a complètement été élué et à chaque colonne ont été ajoutés, 8 mL de suspension cellulaire (5×10^7 cellules/mL). Le nylon a alors été couvert avec 0,5 mL de tampon de Gey contenant 5% (v/v) de FCS et les colonnes ont été incubées à 37°C pendant 45

minutes. Les lymphocytes T ont été élués avec 60 à 80 mL de tampon de Gey contenant 5% (v/v) de FCS, à 37⁰ C (débit de 1 goutte/seconde). Les cellules ont été resuspendues à une concentration de 10x10⁶ cellules/mL dans le milieu de De Luca.

3.8.3 Marquage à l'iode-125 des anticorps monoclonaux et de la PHA

Le marquage des protéines à l'iode-125 a été fait tel que décrit par Majerus et Brodie (1972).

A 3 mg d'anticorps (3 à 5 mg/mL dans du tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,6) ou à 10 mg de PHA (3 mg/mL dans du tampon PBS, pH 7,3) ont été ajoutés, 150 à 300 µCi d'une solution de [¹²⁵I]-Na (100 mCi/mL) et 45 µL d'une solution de chloramine T 3,2% (p/v). Le mélange a été incubé pendant 1 à 2 minutes à la température de la pièce et agité périodiquement. La réaction a été arrêtée avec l'addition de 70 µL d'une solution de métabisulfite de sodium 1,9% (p/v).

Les protéines ont été séparées des réactifs radioactifs par chromatographie sur colonne de Bio-Gel P-2 (1x70 cm) équilibrée avec du tampon PBS, pH 7,3. Des échantillons de 10 µL ont été prélevés à chaque fraction recueillie et comptés à l'aide d'un compteur gamma LKB 1282 (Bromma, Suède). Les fractions du premier pic possédant les comptes les plus élevés, ont été rassemblées et conservées à 4⁰ C.

3.8.4 Liaison des [^{125}I]-anticorps monoclonaux aux lymphocytes porcins.

Les lymphocytes (splénocytes ou lymphocytes T purifiés), à une concentration de 10×10^6 cellules/mL dans le milieu de De Luca, ont été incubés en présence de différentes concentrations d' [^{125}I]-anticorps monoclonaux, pendant 1 heure, à 37°C avec agitation constante. Chaque essai a été fait en triplicata.

Les cellules ont été récoltées par centrifugation à travers une couche d'huile. La suspension cellulaire (300 μL) a été délicatement déposée dans des tubes coniques de polystyrène (1,5 mL, Sarstedt, Ville St-Laurent, Qc) contenant déjà 100 μL d'une solution de sucrose 0,27 M sur laquelle reposait 300 μL du mélange phtalate de dinonyle et phtalate de di-n-butyle dans un rapport volumétrique de 1:2. Les cellules ont été centrifugées à 15 000 rpm, pendant 1 minute, à l'aide d'une microcentrifugeuse Eppendorf 5414 (Brinkman Instruments Co., Toronto, ON). Le surnageant a été aspiré et les tubes ont été maintenus en position inversée pendant la nuit afin d'assècher les culots. L'extrémité conique de chaque tube a été coupée et comptée à l'aide d'un compteur gamma LKB.

3.9 CULTURE DES LYMPHOCYTES PORCINS

3.9.1 Isolement des lymphocytes porcins

Les lymphocytes ont été isolés en conditions stériles, tel que décrit à la section 3.7.1.

3.9.2 Culture des lymphocytes

Les lymphocytes ont été dilués à une concentration de 2×10^6 cellules/mL dans du milieu MEM-Joklik (Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y.) contenant 5% FCS et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. La suspension cellulaire a été distribuée dans des tubes (1 mL/tube) contenant déjà les anticorps monoclonaux et/ou la PHA aux concentrations désirées. Quatre aliquottes de 200 μ L ont été prélevées dans chaque tube et réparties dans des plateaux à culture de 96 puits (Linbro, Flow Lab., Mc Lean, VA).

Les cellules ont été maintenues à 37⁰ C, sous atmosphère humide (5% CO₂/95% air), pendant 3 jours. Vingt quatre heures avant la récolte, 0,4 μ Ci de [³H]-TdR a été ajouté à chaque puits.

Les cellules ont été récoltées sur des filtres de microfibre de verre (Whatman Ltd, Maidstone, England) à l'aide d'un récolteur de cellules (Brandel, Gaithersburg, MD). Les filtres ont été lavés avec du tampon PBS ne contenant pas d'ions Ca⁺² et Mg⁺², pH 7,3 et ont été comptés en présence de 6 mL de liquide à scintillation de Bray (1,4 L xylènes, 1,4 L 1,4-dioxane, 840 mL éthanol, 295,2 g naphthalène, 18,4 g PPO, 184 mg POPOP) ou de liquide à scintillation "Ready-solv"

(Beckman, Montréal, Qc) à l'aide d'un compteur à scintillation Beckman LS 8000 (Montréal, Qc).

3.9.3 Réticulation des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont été réticulés tel que décrit par Munske et coll. (1981) en apportant quelques modifications. Cinq milligrammes d'anticorps (solution de 2 mg/mL) ont été dialysés pendant 16 heures, à 4⁰ C, contre 500 mL d'un tampon triéthanolamine-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,5. Puis, ont été ajoutés, 125 µL d'une solution de diméthylsuberimidate (21 mg/mL dans de l'éthanol) en aliquottes de 25 µL, à des intervalles de 90 minutes, à 4⁰ C. Le mélange a été agité, à 4⁰ C, pendant 16 heures et dialysé contre 2 L de tampon PBS ne contenant pas d'ions Ca⁺² et Mg⁺², pH 7,3, pendant 24 heures. La solution d'anticorps a ensuite été stérilisée par filtration (filtre 0,22 µm).

4. RESULTATS

4.1 PRODUCTION ET CARACTERISATION PRELIMINAIRE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les hybridomes ont été produits par la fusion de splénocytes de souris Balb/c, immunisées avec une préparation de glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA (Dupuis et coll., 1985), avec des cellules du myélome murin NS-1 tel que décrit à la section 3.3.1.

Parmi une dizaine d'anticorps monoclonaux obtenus à la suite de deux fusions, trois (A7, B1 et H3) ont été caractérisés au cours de la présente étude.

La classe et sous-classe de chaque anticorps monoclonal sont résumées au tableau 3. La détermination des classes a été faite tel que décrit à la section 3.4.1. A7 est de type G2a tandis que B1 et H3 sont de type G2 (Les antiséras contre les IgG2a et les IgG2b employés dans l'essai ELISA ont donné une réactivité croisée envers ces deux anticorps). Les trois anticorps monoclonaux possèdent des chaînes légères de type kappa.

4.2 PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

De 50 à 100 mL de liquide d'ascite de chaque anticorps ont été produits chez des souris Balb/c (10 à 14 souris/anticorps) tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.3.2.

Les anticorps monoclonaux ont été purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'ions, tel que décrit à la section 3.3.3. De 40 à 150 mg d'anticorps monoclonaux

Tableau 3. Propriétés physiques des anticorps monoclonaux dirigés contre un récepteur de la PHA (gp80) chez les lymphocytes porcins.

Anticorps monoclonaux	Classe et sous-classe	Chaîne légère	Mr (kD)	
			Chaîne lourde	Chaîne légère
A7	IgG2 _A	kappa	56.5	26
B1	IgG2 (1)	kappa	57-60	25.5
H3	IgG2 (1)	kappa	56.5-60	26

Les anticorps monoclonaux ont été produits selon la méthode décrite par Galfre et Milstein (1981). Les anticorps purifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (Laemmli 1970). Les classes ont été déterminées par test ELISA en utilisant des antisera spécifiques à chaque type d'immunoglobuline.

(1) La sous-classe de ces anticorps n'a pas été clairement déterminée.

ont été purifiés (rendements de 5 à 10% par rapport au contenu en protéines du liquide d'ascite). Le profil d'élution de l'anticorps monoclonal A7 sur la colonne de DEAE-Séphacel est représenté à la figure 2a. Les trois anticorps monoclonaux ont démontré un profil d'élution similaire et ont tous été élués avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,6 (figure 2a).

Les anticorps purifiés (40 à 50 μ g) ont été analysés, en conditions réductrices, par électrophorèse sur un gel de 5 à 12% (p/v) de polyacrylamide en présence de SDS (Matériel et Méthodes, section 3.2). L'électrophorétogramme observé pour l'anticorps monoclonal A7 est présenté à la figure 2b. La coloration au Bleu de Coomassie n'a révélé que très peu de protéines contaminantes et le même degré de pureté a été observé lors de l'analyse des trois anticorps monoclonaux. Les masses moléculaires relatives (M_r) calculées à partir des patrons électrophorétiques de chaque anticorps sont résumées au tableau 3. A7 possède une chaîne lourde de 56.5 kD tandis que les patrons électrophorétiques des anticorps B1 et H3 ont démontrés deux bandes dans la région des chaînes lourdes, l'une à 57 kD et l'autre à 60 kD. Les trois anticorps possèdent des chaînes légères de M_r de 26 kD.

4.3 SPECIFICITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX A7, B1 ET H3

Dans le but d'identifier le récepteur de la PHA reconnu par chaque anticorps monoclonal, la préparation de glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA (Dupuis et coll., 1985) a été séparée, en conditions réductrices, par électrophorèse sur un gel à gradient de concentration de polyacrylamide en présence de SDS (Matériel et

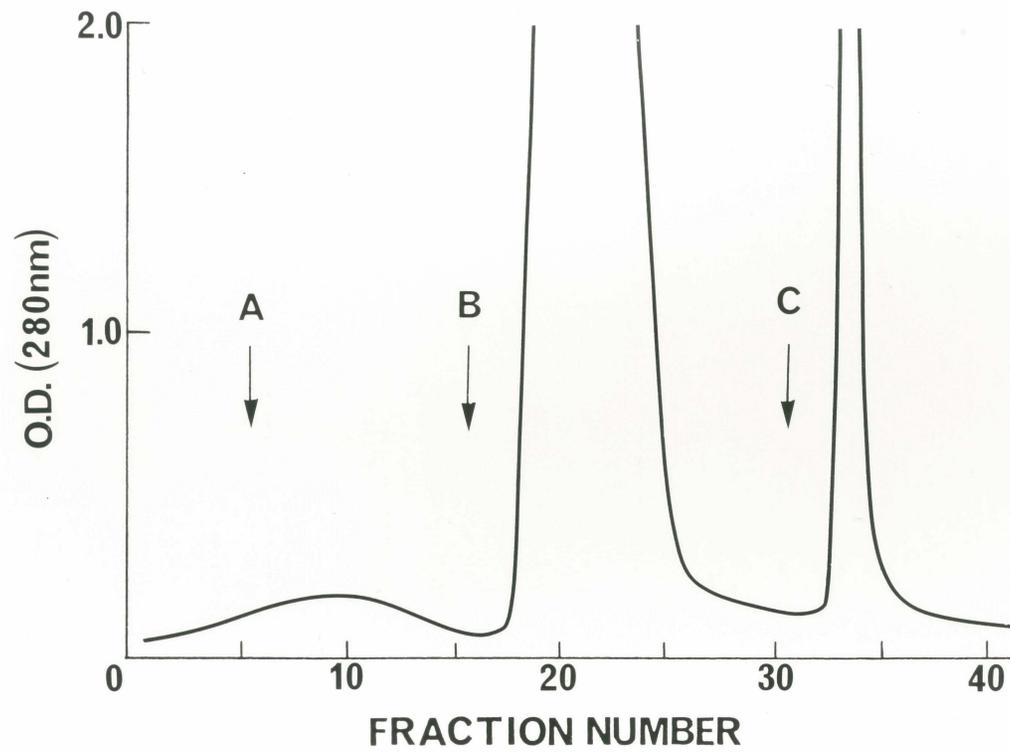
Figure 2. Profil d'élution sur colonne de DEAE-Séphacel et électrophorétogramme de l'anticorps monoclonal A7.

L'anticorps monoclonal A7 a été purifié par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur colonne de DEAE-Séphacel tel que décrit à la section 3.3.3 (page 23).

a) La colonne de DEAE-Séphacel a été équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 17,5 mM, pH 6,8 (A). L'anticorps a été élué avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,6 (B) (environ 4 mL/fraction).

b) Quarante microgrammes d'anticorps monoclonal A7 purifié ont été analysés, en conditions réductrices, par électrophorèse sur un gel à gradient de concentration de polyacrylamide en présence de SDS tel que décrit à la section 3.2. Le début du gel et le front de migration sont indiqués par les flèches. Les protéines ont été colorées au Bleu de Coomassie. Les masses moléculaires relatives des bandes observées sont de 56.5 kD et de 26 kD.

a



b



Méthodes, section 3.2). Les protéines (65 µg/piste) ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose et l'antigène reconnu par les anticorps monoclonaux a été révélé en incubant la membrane en présence de 4 à 8 µg d'anticorps monoclonal marqué à l'iode-125 (approximativement 25 000 CPM/µg)(Matériel et Méthodes, sections 3.5.1 et 3.5.2). Tel qu'illustré à la figure 3a, les trois anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 sont dirigés contre une glycoprotéine de 80 kD (gp80). La [¹²⁵I]-PHA (10 µg) a aussi reconnu la gp80 ainsi que toute une famille de glycoprotéines dont les masses moléculaires relatives varient de 35 kD à 180 kD (figure 3a).

La gp80 est aussi l'une des composantes majeures retrouvées lors du marquage en surface, à l'iode-125, des splénocytes porcins. Le marquage a été fait avec la méthode de la lactoperoxidase tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.7. Les cellules ont ensuite été solubilisées dans 0,5% (v/v) de Nonidet P-40 et l'extrait a été analysé sur un gel de polyacrylamide (8,5%, p/v) en présence de SDS, à raison de (A) 50 µL (572 000 CPM), (B) 100 µL (806 000 CPM) et (C) 150 µL (1 018 000 CPM) par piste (figure 3b). Sept bandes majeures ont été observées ayant des Mr de 153,4 kD; 89,1 kD; 80 kD; 46,1 kD; 41 kD; 34,5 kD; et 25 kD.

Des essais de compétition entre les trois anticorps monoclonaux pour la liaison de la gp80 insolubilisée sur une membrane de nitrocellulose (Matériel et Méthodes, section 3.5) ont démontré que les anticorps reconnaissent des épitopes distincts (résultats non-illustrés).

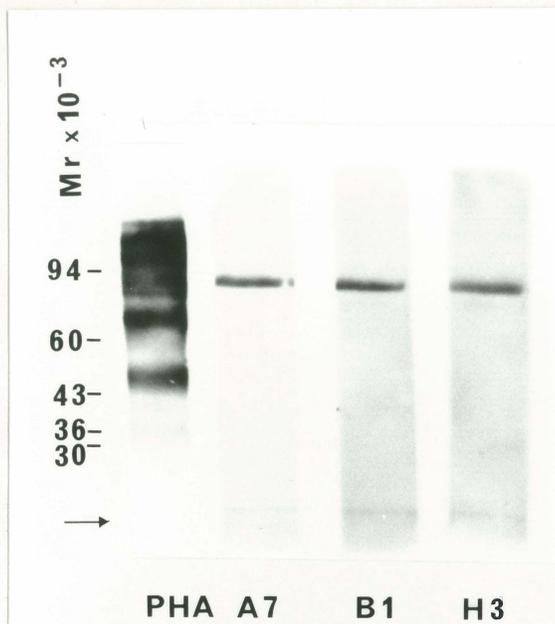
Figure 3. Immunodétection de l'antigène reconnu par les [^{125}I]-anticorps monoclonaux après transfert électrophorétique des glycoprotéines liant la PHA sur une membrane de nitrocellulose et électrophorégramme des [^{125}I]-protéines de surface de splénocytes porcins.

a) Les glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA purifiées à partir de splénocytes porcins (Dupuis et coll., 1985) ont été séparées par électrophorèse sur un gel à gradient de concentration de polyacrylamide (65 $\mu\text{g}/\text{piste}$) et transférées sur une membrane de nitrocellulose tel que décrit dans Matériel et Méthodes (section 3.2 et 3.5.1). Les protéines reconnues par les anticorps monoclonaux A7, B1, H3 et la PHA ont été révélées en incubant la membrane de nitrocellulose avec 4 à 8 μg [^{125}I]-anticorps monoclonal ou 10 μg de [^{125}I]-PHA (Matériel et Méthodes, section 3.5.2).

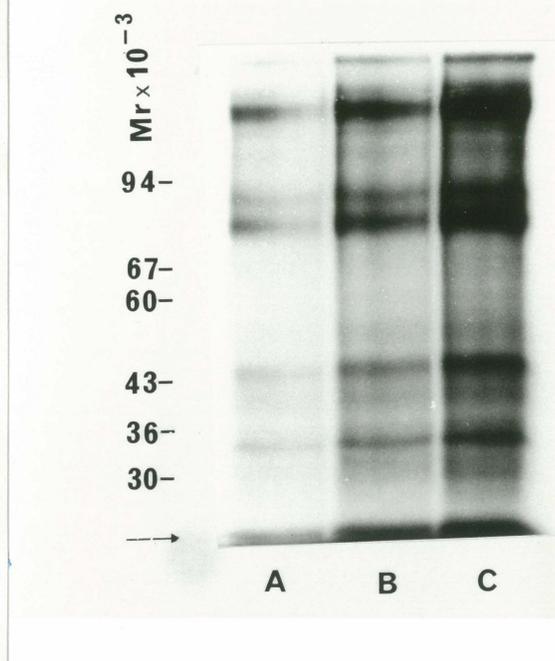
b) Quatre à 5×10^7 splénocytes porcins ont été marqués en surface à l'iode-125 avec la lactoperoxidase et solubilisés dans 0,5% (v/v) de Nonidet P-40 tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.7. Les [^{125}I]-protéines de surface solubilisées ont été analysés sur un gel de polyacrylamide (8,5%, p/v) en présence de SDS (Matériel et Méthodes, section 3.2) en utilisant (A) 50 μL d'extrait (572 000 CPM ou $5,6 \times 10^5$ splénocytes), (B) 100 μL d'extrait (806 000 CPM ou $1,1 \times 10^6$ splénocytes) et (C) 150 μL d'extrait (1 018 000 CPM ou $1,7 \times 10^6$ splénocytes).

Note: Le front de migration est indiqué par des flèches.

a)



b)



Afin de déterminer la nature (saccharidique ou protéique) de l'épitope reconnu par chaque anticorps monoclonal, les glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA (Dupuis et coll., 1985) insolubilisées sur une membrane de nitrocellulose (sections 3.2 et 3.5.1) ont été oxydées in situ par traitement avec le périodate de sodium tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.5.3. La membrane de nitrocellulose a ensuite été incubée en présence de 4 à 8 µg d' [¹²⁵I]-anticorps monoclonal. Les résultats, illustrés à la figure 4, ont démontré que l'oxydation des unités oligosaccharidiques de la gp80 n'affectait pas la liaison des trois anticorps monoclonaux. Dans les mêmes conditions, la liaison de la [¹²⁵I]-PHA (10 µg) a été diminuée de plus de 50% (résultats non-illustrés).

De plus, des essais de compétition entre la PHA et les anticorps monoclonaux pour la liaison de la gp80 ont démontré que les sites reconnus par la PHA et les anticorps monoclonaux étaient différents. Ces études de compétition ont été faites par essais ELISA (Matériel et Méthodes, section 3.4) en incubant d'abord les plateaux, contenant les glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA, avec une solution de PHA à 1 mg/mL (100 µL/puits) et ensuite avec les solutions d'anticorps monoclonal A7, B1 et H3 à 0,01 mg/mL (100 µg/puits). Les valeurs de densité optique (mesures de la quantité d'anticorps monoclonal lié à la gp80) rapportées au tableau 4 démontrent que la liaison de la PHA n'inhibe pas l'attachement des anticorps A7, B1 et H3 à la gp80.

Figure 4. Immunodétection de l'antigène reconnu par les anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 après oxydation in situ des sucres des glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA.

Les glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA purifiées à partir de splénocytes porcins ont été séparées par électrophorèse sur un gel à gradient de concentration de polyacrylamide (5 à 12%, p/v) et transférées sur une membrane de nitrocellulose tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.2 et 3.5.1. Les unités oligosaccharidiques ont été oxydées in situ en incubant la membrane de nitrocellulose en présence de periodate de sodium (10mM) pendant 1 heure (Matériel et Méthodes, section 3.5.3). L'immunodétection de l'antigène reconnu par les anticorps monoclonaux a été faite avec 4 à 8 µg d'anticorps marqués à l'iode-125 tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.5.2.

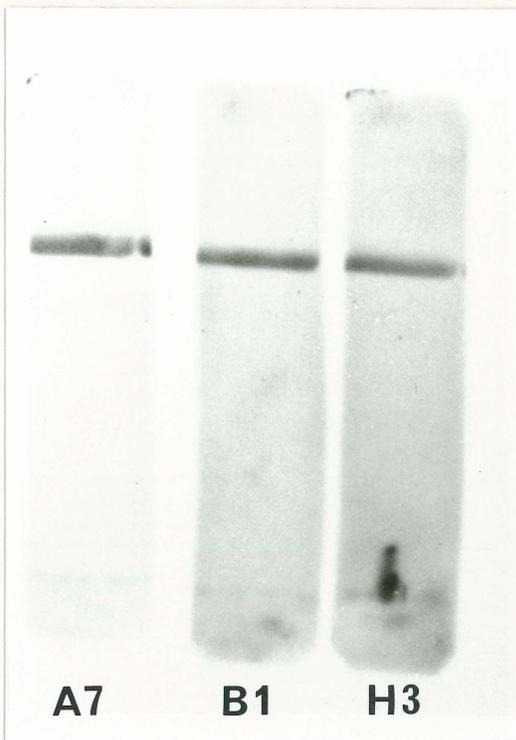


Tableau 4. Compétition de la PHA pour les sites reconnus par les anticorps monoclonaux anti-gp80 évaluée par test ELISA.

Anticorps monoclonaux	Densité optique (450 nm)	
	sans PHA	avec PHA
A7	.239 (.005)	.240 (.059)
B1	.136 (.012)	.167 (.016)
H3	.135 (.009)	.148 (.004)

Le test ELISA a été fait tel que décrit dans Matériels et Méthodes, section 3.4. Les puits contenaient 0,25 µg chacun d'antigène (mélange de glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA). Après avoir été vidés et lavés, les puits ont été incubés avec une solution de PHA (5 µg/puits) ou un volume équivalent de tampon. Les puits ont ensuite été incubés avec les différents anticorps monoclonaux (0,5 µg/puits). La quantité d'anticorps liée a été révélée à l'aide d'anti-immunoglobulines de souris biotinylées suivis d'une réaction colorimétrique (streptavidine-peroxidase/ 1,2-phénylènediamine). Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart type.

De plus, l'anticorps monoclonal A7 n'a pas été retenu sur une colonne de Sépharose-thyroglobuline, un ligand utilisé pour la purification de la PHA par chromatographie d'affinité. L'essai a été fait tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.6. Après 15 minutes d'incubation de l'anticorps A7 en présence de Sépharose-thyroglobuline, la colonne (1,6 mL) a été éluée avec 2 mL de tampon phosphate de sodium, pH 7,3. La densité optique (280 nm) de la fraction recueillie (2 mL) a révélée que 85% de la quantité d'anticorps appliquée sur la colonne avait été récupérée lors de l'élué.

4.4 LIAISON DES [¹²⁵I]-ANTICORPS MONOCLONAUX A7, B1 ET H3 AUX SPLENOCYTES PORCINS

Les anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 ont été marqués à l'iode-125 par la méthode de la chloramine-T (Majerus et Brodie, 1972) tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.8.3. Des activités respectives de 8800, 7300 et 10 500 CPM/pmol ont été obtenues en assumant la masse moléculaire des anticorps à 160 kD (Goding, 1986).

Les études de liaison des [¹²⁵I]-anticorps monoclonaux aux splénocytes porcins ont été faites tel que décrit à la section 3.8. Les cellules (10×10^6) ont été incubées pendant 1 heure, à 37° C, en présence de différentes concentrations d'anticorps monoclonal dans un volume final de 1 mL.

La séparation du [^{125}I]-ligand lié aux cellules du [^{125}I]-ligand libre représente un problème majeur dans la mesure de la liaison d'un [^{125}I]-ligand à des cellules ou des préparations membranaires (Bennett et Cuatrecasas, 1976). Ici, les anticorps liés ont été séparés des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile. Cette technique est très rapide et s'effectue en une seule étape, ce qui prévient la dissociation du [^{125}I]-ligand parfois occasionnée lors du lavage des cellules. Les molécules liées sont séparées des molécules libres par centrifugation des cellules à travers une couche d'huile de densité inférieure à celle des cellules mais supérieure à celle du milieu d'incubation.

A la figure 5 sont représentées les courbes de liaison des [^{125}I]-anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 aux splénocytes porcins en fonction de la quantité d' [^{125}I]-anticorps monoclonal ajoutée. Les trois courbes possèdent une allure biphasique. A de faibles quantités d'anticorps ajoutées, la vitesse de liaison est rapide tandis qu'à des quantités de 100 et 200 μg , la vitesse de liaison est diminuée. Dans le cas des anticorps A7 et H3, la pente observée à de grandes quantités d'anticorps tend vers zéro.

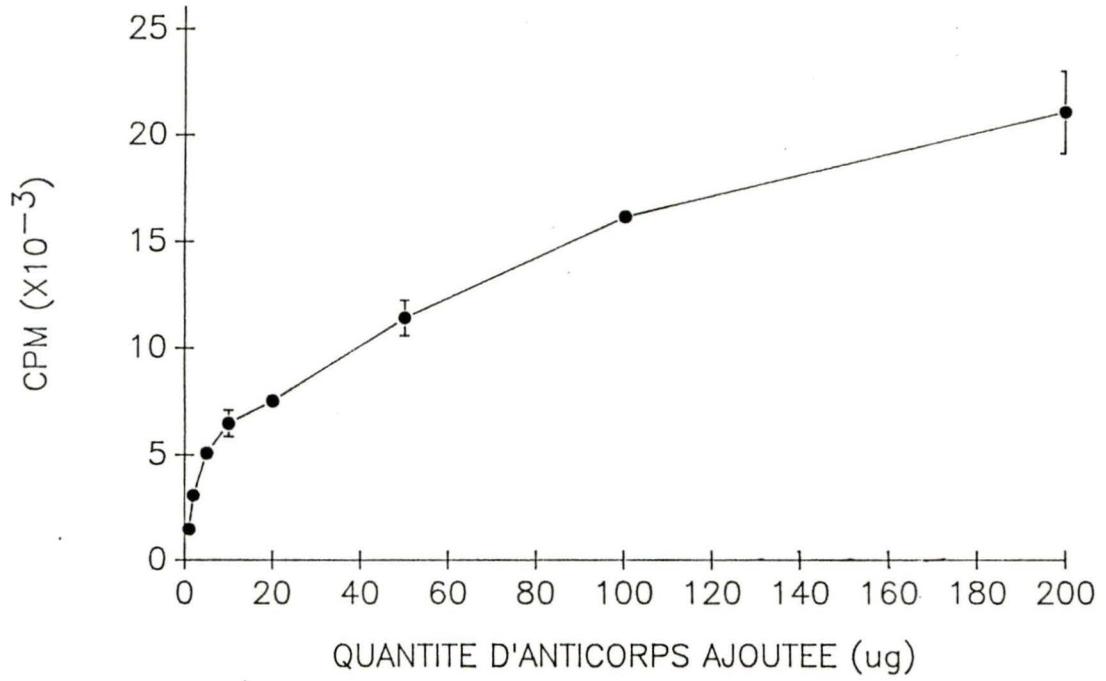
La quantité maximale d' [^{125}I]-anticorps monoclonal liée à 10^7 splénocytes a été estimée pour chaque anticorps (tableau 5). Dans les trois cas, approximativement 1 μg d'anticorps se lie aux splénocytes.

Figure 5. Courbes de liaison des anticorps monoclonaux (A7, B1, H3) marqués à l'iode-125 aux splénocytes porcins.

Les splénocytes porcins (10×10^6 cellules) ont été incubés pendant 1 heure, à 37° C, avec différentes quantités d' $[^{125}\text{I}]$ -anticorps monoclonaux. Les anticorps liés ont été séparés des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile (Matériel et Méthodes, section 3.8). Les surnageants ont été prélevés par aspiration et la radioactivité associée au culot de cellules a été mesurée.

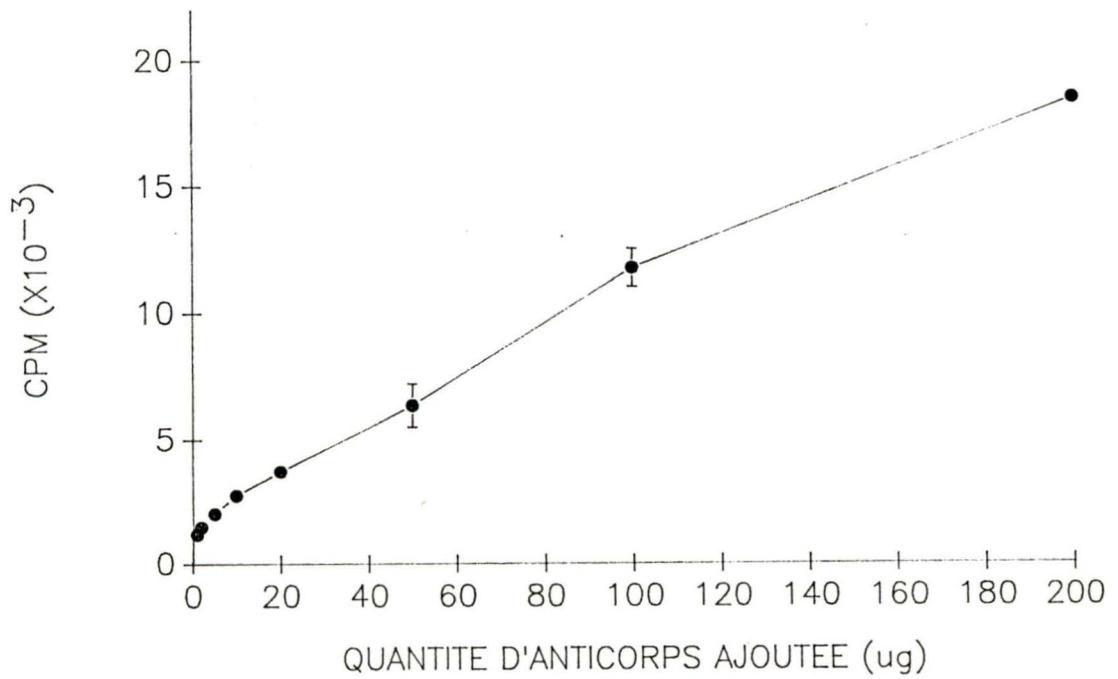
LIAISON DE L'ANTICORPS A7

SPLENOCYTES PORCINS

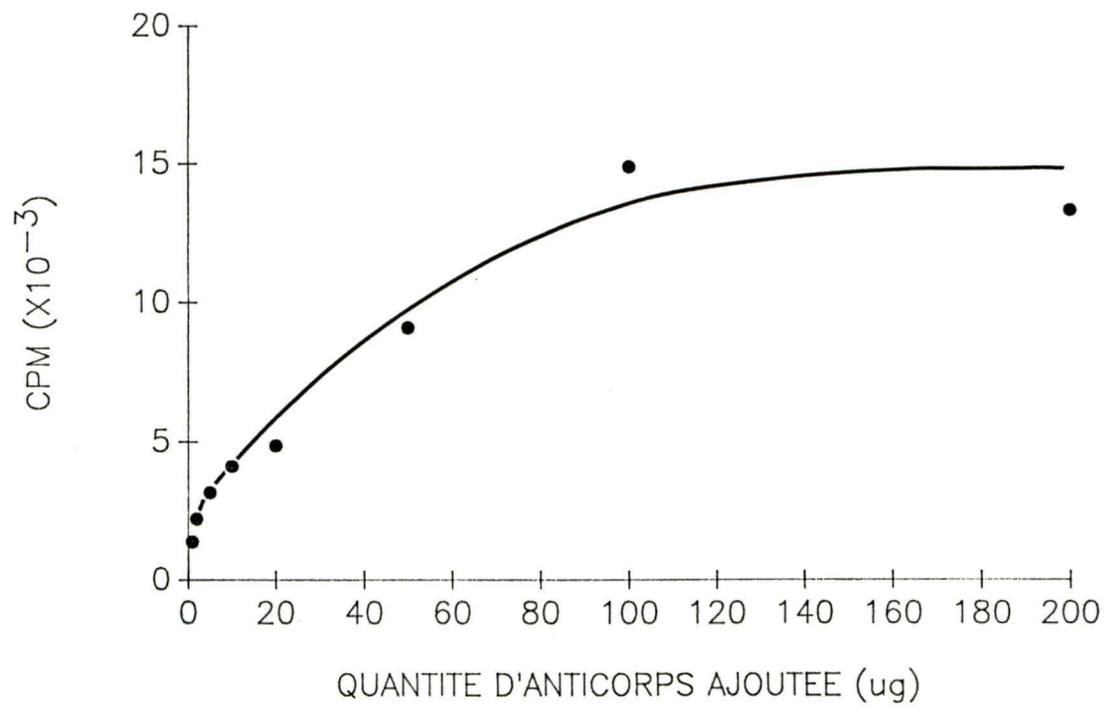


LIAISON DE L'ANTICORPS B1

SPLENOCYTES PORCINS



LIAISON DE L'ANTICORPS H3
SPLENOCYTES PORCINS



4.5 LIAISON DES [125 I]-ANTICORPS MONOCLONAUX A7, B1 ET H3 AUX LYMPHOCYTES T PORCINS

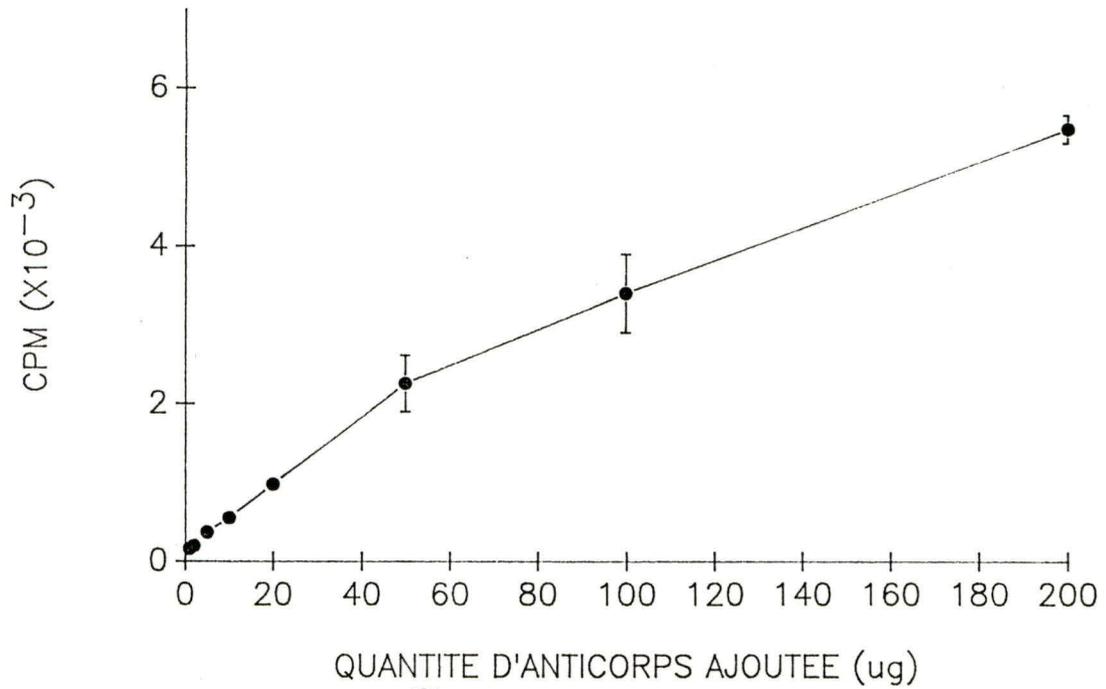
Les lymphocytes T porcins ont été purifiés sur des colonnes de nylon avec un rendement de 10 à 15%. La liaison des [125 I]-anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 aux lymphocytes T porcins a été faite tel que décrit à la section 3.8 en utilisant les mêmes solutions d'anticorps monoclonaux utilisées lors de la liaison aux splénocytes porcins (pour les activités spécifiques voir section 4.4). Les lymphocytes T (10×10^6 cellules) ont été incubés pendant 1 heure à 37° C en présence de différentes concentrations d'anticorps monoclonaux (en triplicata) dans un volume final de 1 mL. Les anticorps liés aux lymphocytes T ont été séparés des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile.

Tel qu'illustré à la figure 6, les anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 se lient aux lymphocytes T porcins. La quantité d'anticorps lié (CPM) y est exprimée en fonction de la quantité totale d'anticorps ajouté. Les trois courbes ont un profil biphasique démontrant une tendance vers la saturation à 100 et 200 μ g d'anticorps monoclonal. Les quantités approximatives d'anticorps monoclonal pouvant se lier à 10^7 lymphocytes T ont été estimées à 0,33 μ g pour l'anticorps A7, 0,66 μ g pour l'anticorps B1 et 0,64 μ g pour l'anticorps H3 (tableau 6).

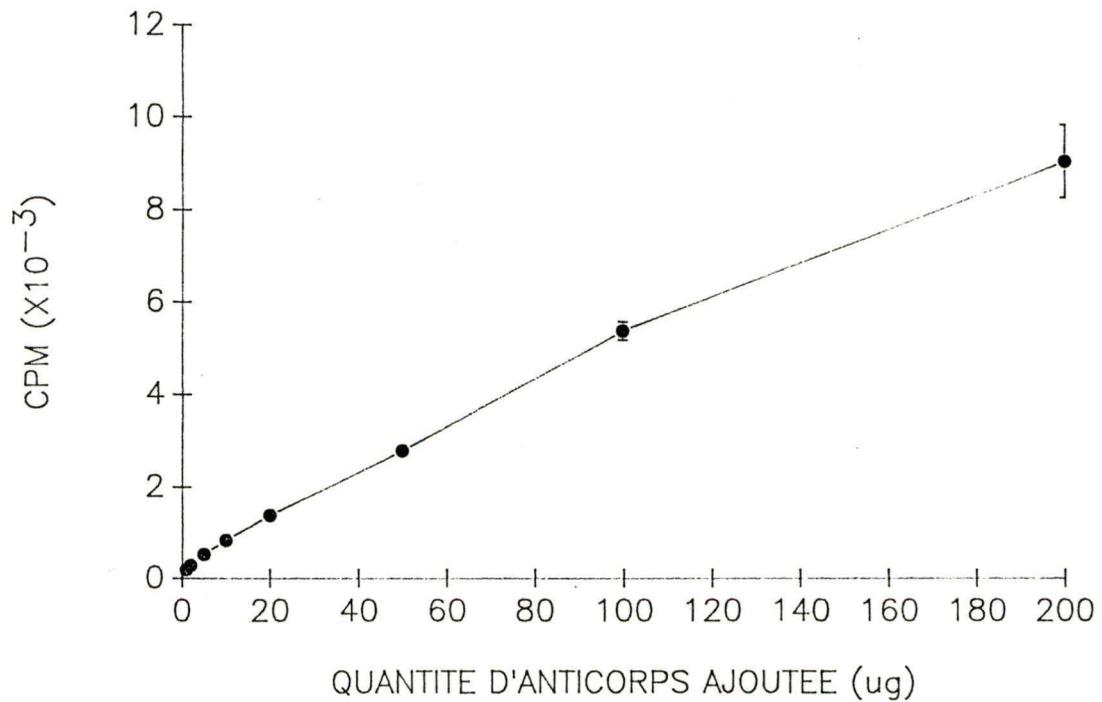
Figure 6. Courbes de liaison des anticorps monoclonaux (A7, B1, H3) marqués à l'iode-125 aux lymphocytes T porcins.

Les lymphocytes T porcins (10×10^6 cellules/mL) ont été purifiés à partir de splénocytes porcins tel que décrit dans Matériel et Méthodes, section 3.8.2. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure, à 37° C, en présence de différentes concentrations d' $[^{125}\text{I}]$ -anticorps monoclonaux dans un volume final de 1 mL. Les anticorps liés ont été séparés des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile (Matériel et Méthodes, sections 3.8.3 et 3.8.4). La radioactivité associée au culot de cellules a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma LKB.

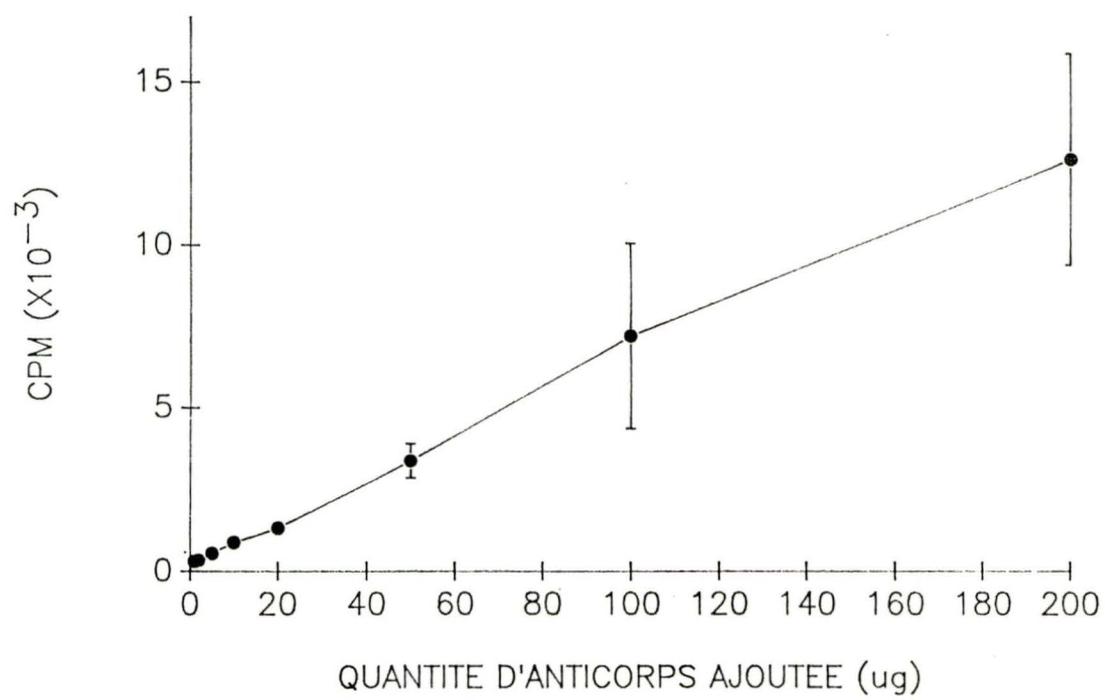
LIAISON DE L'ANTICORPS A7
LYMPHOCYTES T PORCINS



LIAISON DE L'ANTICORPS B1
LYMPHOCYTES T PORCINS



LIAISON DE L'ANTICORPS H3
LYMPHOCYTES T PORCINS



4.6 ANALYSES PAR GRAPHIQUE DE SCATCHARD DE LA LIAISON DES $[^{125}\text{I}]$ -ANTICORPS MONOCLONAUX (A7, B1, H3) AUX SPLENOCYTES ET LYMPHOCYTES T PORCINS

Les résultats de la liaison des $[^{125}\text{I}]$ -anticorps monoclonaux aux splénocytes et lymphocytes T porcins ont été analysés selon la méthode décrite par Scatchard (1949). Les graphiques ont été tracés à l'aide du logiciel LIGAND (Munson et Rodbard, 1980) adapté par McPherson (1983) pour le micro-ordinateur IBM-PC (logiciel EBDA/SCAFIT, Elsevier BioSoft, Cambridge, Angleterre). Les courbes de Scatchard ont été corrigées pour la non-spécificité tel que décrit par Chamness et McGuire (1975).

Les graphiques de Scatchard de la liaison des $[^{125}\text{I}]$ -anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 aux splénocytes porcins sont représentés à la figure 7. La concentration d'anticorps lié aux splénocytes sur la concentration d'anticorps libre y est exprimée en fonction de la concentration d'anticorps lié (molaire). La pente d'un tel graphique est définie comme étant égale au négatif de la constante apparente d'association ($-K_a$) tandis que l'abscisse à l'origine représente le nombre (apparent) de sites de liaison (molaire).

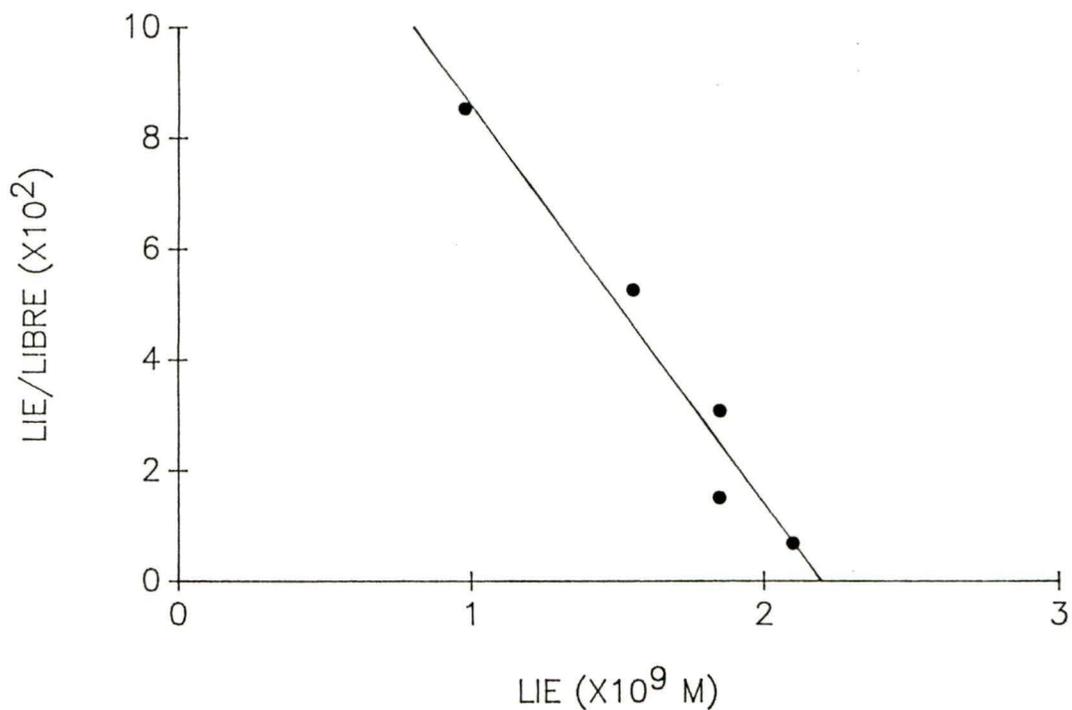
Les anticorps A7, B1 et H3 ont tous démontré des graphiques de Scatchard linéaires caractéristiques du modèle de liaison à un type de site. Ces résultats suggèrent que les sites de liaison des anticorps monoclonaux sur les splénocytes porcins sont homogènes par rapport à leur affinité pour les $[^{125}\text{I}]$ -anticorps monoclonaux.

Figure 7. Graphique de Scatchard de la liaison des [125 I]-anticorps monoclonaux (A7, B1 et H3) aux splénocytes porcins.

Les splénocytes (10×10^6) ont été incubés pendant 1 heure, à 37° C, avec différentes quantités d' [125 I]-anticorps monoclonaux dans un volume final de 1 mL. Les anticorps liés ont été séparés des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile (Matériel et Méthodes, section 3.8). Les incubations ont été faites en triplicata. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel EBDA/SCAFIT développé par McPherson (1983). La concentration d'anticorps lié (M) divisée par la concentration d'anticorps libre (M) est exprimée en fonction de la concentration d'anticorps lié (M).

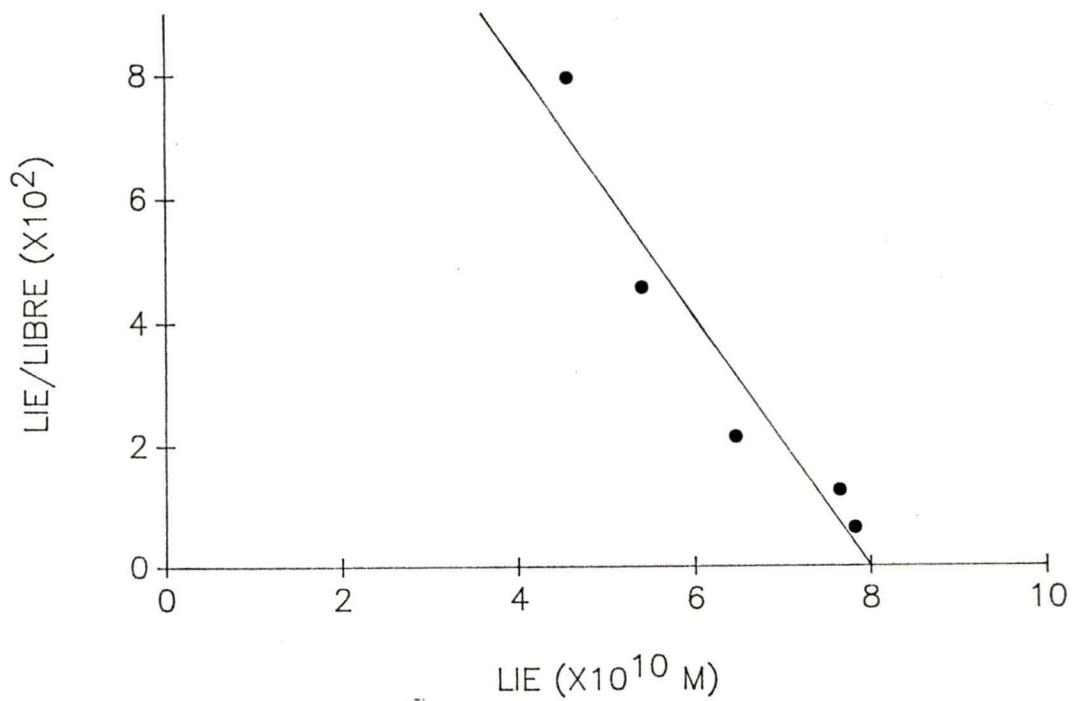
GRAPHIQUE DE SCATCHARD

LIAISON DE L'ANTICORPS A7 AUX SPLENOCYTES PORCINS



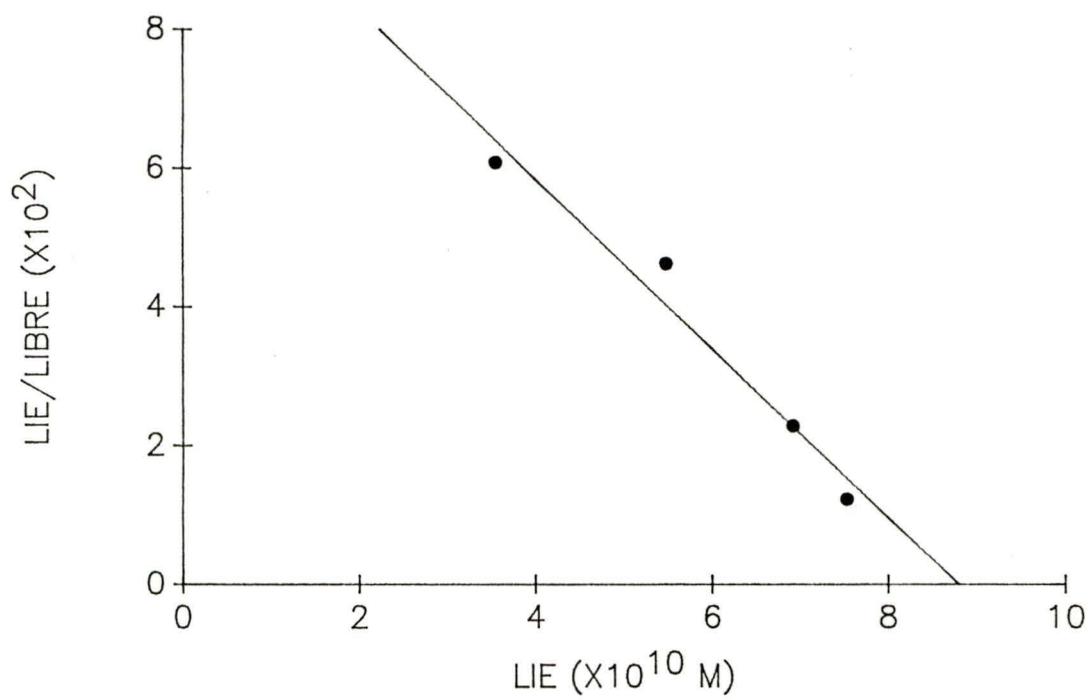
GRAPHIQUE DE SCATCHARD

LIAISON DE L'ANTICORPS B1 AUX SPLENOCYTES PORCINS



GRAPHIQUE DE SCATCHARD

LIAISON DE L'ANTICORPS H3 AUX SPLENOCYTES PORCINS



Deux paramètres cinétiques ont été déduits des analyses de Scatchard de la liaison des [^{125}I]-anticorps monoclonaux aux splénocytes porcins, l'affinité apparente des anticorps ainsi que le nombre (apparent) de sites de liaison par cellule (tableau 5). L'anticorps monoclonal B1 possède la plus grande affinité apparente envers les splénocytes porcins avec une constante d'association apparente de $20,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ soit, presque trois fois celle de l'anticorps A7 ($7,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) et deux fois celle de l'anticorps H3 ($12,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Par contre, les splénocytes porcins semblent posséder environ trois fois plus de sites de liaison pour l'anticorps monoclonal A7 ($13,2 \times 10^4$ sites/cellule) en comparaison aux anticorps B1 ($4,8 \times 10^4$ sites/cellule) et H3 ($5,3 \times 10^4$ sites/cellule). Le coefficient de corrélation linéaire (r) respectif à chaque graphique de Scatchard est aussi présenté au tableau 5. Dans les trois cas, le coefficient s'est avéré égal ou supérieur à 0.96.

Les graphiques de Scatchard de la liaison des [^{125}I]-anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 aux lymphocytes T porcins sont illustrés à la figure 8. Dans les trois cas, la liaison s'est avérée homogène par rapport à la constante apparente d'association. Les coefficients de corrélation linéaire (r) correspondant varient entre 0.84 et 0.96 (tableau 6). Les paramètres cinétiques calculés à partir des graphiques de Scatchard sont présentés au tableau 6. Les anticorps A7, B1 et H3 possèdent une constante apparente d'association similaire, soit $9,3$, $6,9$ et $9,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ respectivement. Le nombre (apparent) de sites de liaison par cellule est légèrement supérieur dans le cas de B1 ($11,2 \times 10^4$) en comparaison à A7 et H3 ($6,5$ et $8,1 \times 10^4$ respectivement).

Tableau 5. Paramètres cinétiques de la liaison des anticorps monoclonaux aux splénocytes porcins.

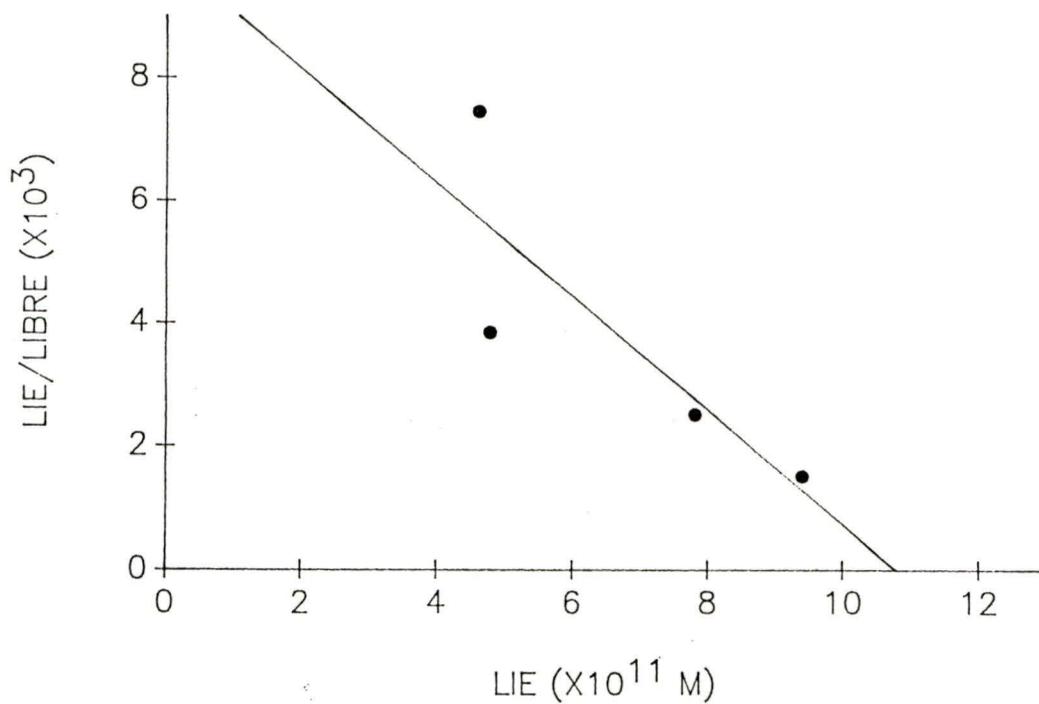
Anticorps monoclonaux	Quantité liée $\times 10^6$ g	Paramètres cinétiques		
		K_a $\times 10^{-7}$ M	n $\times 10^{-4}$	r
A7	1.27	7.2 (0.9)	13.2 (1.6)	.98
B1	1.35	20.5 (0.3)	4.8 (0.7)	.96
H3	0.72	12.2 (1.7)	5.3 (1.2)	.98

Trois anticorps monoclonaux dirigés contre un récepteur de la PHA (80 kD) chez les splénocytes porcins ont été marqués à l'iode-125 et incubés pendant 1 heure à 37° C avec 10^7 lymphocytes. Les cellules ayant fixé l'anticorps radioactif ont été séparées des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile (voir Matériels et Méthodes, section 3.8). K_a est la constante apparente d'association, n est le nombre apparent de sites par cellule et r est le coefficient de corrélation de la droite du rapport anticorps lié/libre en fonction de la quantité d'anticorps lié [M]. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel EBDA/SCAFIT développé par McPherson (1983). Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart à la moyenne.

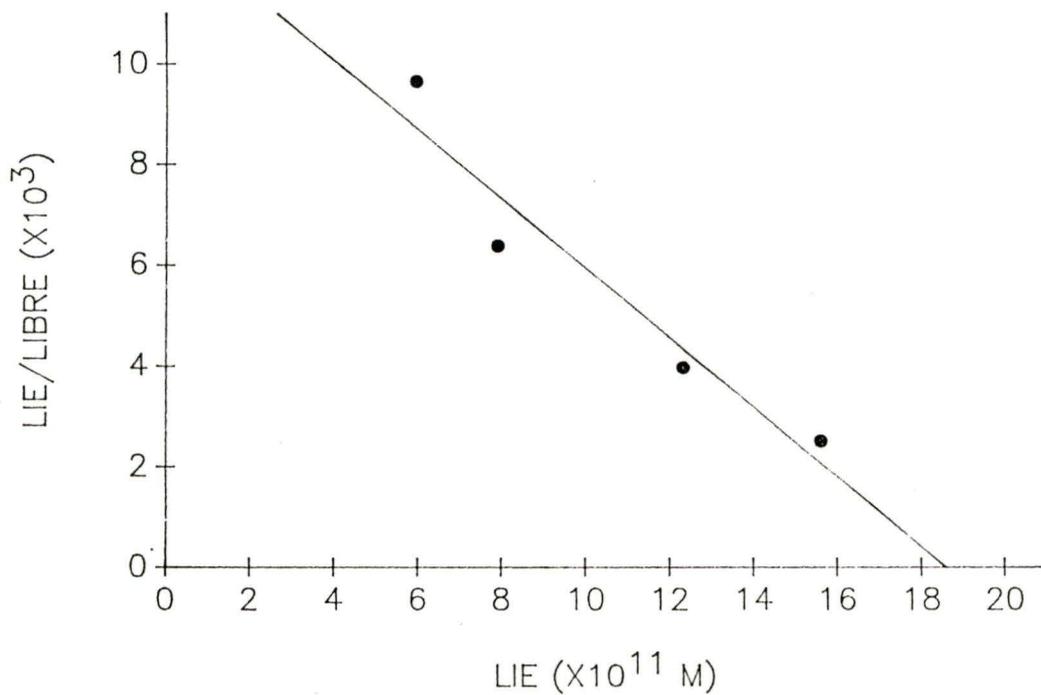
Figure 8. Graphique de Scatchard de la liaison des [^{125}I]-anticorps monoclonaux (A7, B1, H3) aux lymphocytes T porcins.

Les lymphocytes T porcins, purifiés à partir de splénocytes porcins (section 3.8.2), ont été incubés (10×10^6 cellules/mL) pendant 1 heure, à 37°C , avec différentes quantités d' [^{125}I]-anticorps monoclonaux dans un volume final de 1 mL. Les anticorps liés ont été séparés des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile tel que décrit dans Matériel et Méthodes, sections 3.8.3 et 3.8.4. Chaque essai a été fait en triplicata. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel EBDA/SCAFIT développé par McPherson (1983). La concentration d'anticorps lié divisée par la concentration d'anticorps libre est exprimée en fonction de la concentration d'anticorps lié (en molaire).

GRAPHIQUE DE SCATCHARD
LIAISON DE L'ANTICORPS A7 AUX LYMPHOCYTES T PORCINS



GRAPHIQUE DE SCATCHARD
LIAISON DE L'ANTICORPS B1 AUX LYMPHOCYTES T PORCINS



GRAPHIQUE DE SCATCHARD

LIAISON DE L'ANTICORPS H3 AUX LYMPHOCYTES T PORCINS

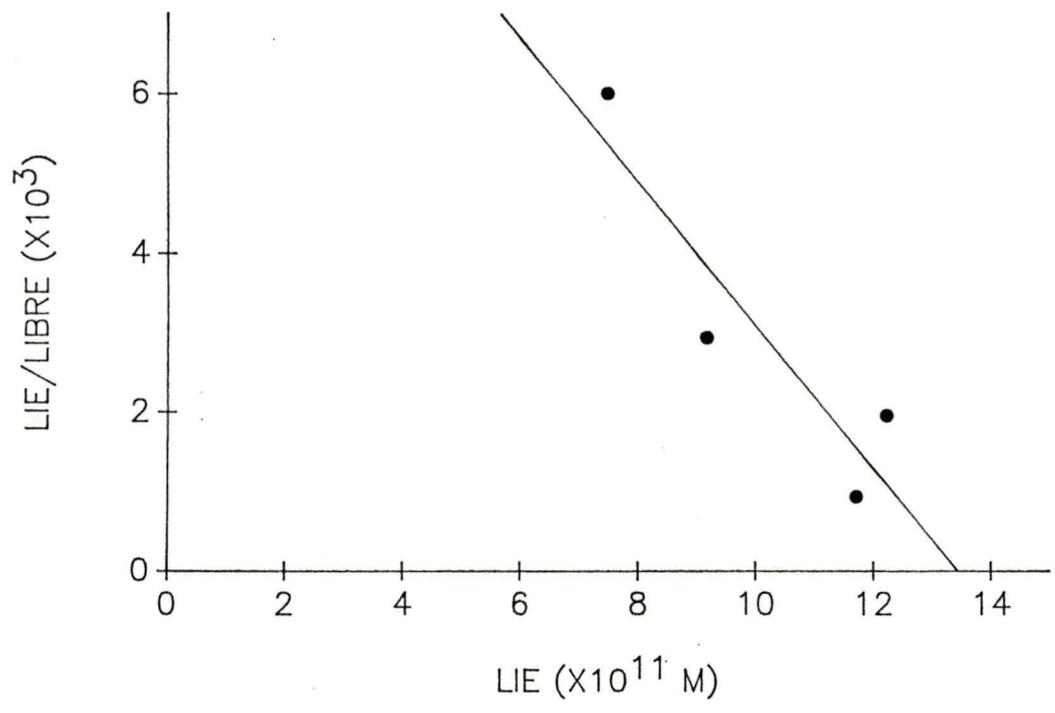


Tableau 6. Paramètres cinétiques de la liaison des anticorps monoclonaux aux lymphocytes T porcins.

Anticorps monoclonaux	Quantité liée $\times 10^6$ g	Paramètres cinétiques		
		K_a $\times 10^{-7}$ M	n $\times 10^{-4}$	r
A7	0.33	9.3 (4.3)	6.5 (1.3)	.84
B1	0.66	6.9 (1.4)	11.2 (1.1)	.96
H3	0.64	9.0 (2.8)	8.1 (0.7)	.92

Trois anticorps monoclonaux dirigés contre un récepteur de PHA (80 kD) chez les splénocytes porcins ont été marqués à l'iode-125 et incubés pendant 1 heure à 37° C avec 10^7 lymphocytes T. Les cellules ayant fixé l'anticorps radioactif ont été séparées des anticorps libres par centrifugation à travers une couche d'huile (voir Matériels et Méthodes, section 3.8). K_a est la constante apparente d'association, n est le nombre apparent de sites par cellule et r est le coefficient de corrélation de la droite du rapport anticorps lié/libre en fonction de la quantité d'anticorps lié [M]. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel EBDA/SCAFIT développé par McPherson (1983). Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart à la moyenne.

4.7 PROPRIETES MITOGENIQUES DES ANTICORPS MONOCLONAUX (A7, B1 ET H3)

Les lymphocytes peuvent être activés dans certains cas par des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface (Fleischer, 1987; Meuer et al., 1984). Dans le but de déterminer si les anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 possédaient une telle propriété, des essais de mitogénicité ont été faits chez des splénocytes porcins. De plus, comme le phénomène d'aggrégation est un élément essentiel dans le processus d'activation (Munske et coll., 1981; Wands et coll., 1976), les essais ont aussi été effectués avec les anticorps traités au diméthylsuberimide, un agent réticulant.

Les splénocytes (2×10^6 /mL) ont été mis en culture en présence de différentes concentrations d'anticorps monoclonal monomérique ou réticulé (1 à 200 μ g) pendant 72 heures (Matériel et Méthodes, section 3.9) et l'incorporation de [3 H]-TdR a été mesurée. Les indices de stimulation sont présentés au tableau 7.

Les trois anticorps monoclonaux ont démontré peu ou pas de pouvoir mitogénique. Les anticorps A7 et B1 ont induit une légère prolifération des splénocytes à des concentrations de 50 à 200 μ g/mL, soit environ deux fois plus que les cellules cultivées en absence d'anticorps. Les splénocytes cultivés en présence d'anticorps H3 n'ont pas démontré une prolifération supérieure aux cultures témoins. Parmi les anticorps sous forme réticulée, seulement B1_n (de 50 à 200 μ g/mL) a induit une prolifération significative des splénocytes, soit de 3 à 6 fois le niveau basal.

Tableau 7. Réponse (indice de stimulation) des splénocytes porcins cultivés en présence d'anticorps monoclonaux (monomériques et réticulés) dirigés contre un récepteur de la PHA (gp80) .

		INDICE DE STIMULATION							
		Concentration (µg/mL)							
Ac.mon.		1	2	5	10	20	50	100	200
A7		1.9 (.8)	1.7 (.6)	1.7 (.5)	1.5 (.5)	1.6 (.5)	2.0 (.4)	2.0 (.5)	2.1 (.4)
A7 _n		1.2 (.2)	1.1 (.1)	1.1 (.2)	1.2 (.2)	1.0 (.2)	1.3 (.2)	1.3 (.1)	1.2 (.2)
B1		1.0 (.2)	1.0 (.1)	1.1 (.1)	1.2 (.1)	1.4 (.1)	2.0 (.4)	2.3 (.3)	2.3 (.6)
B1 _n		1.4 (.2)	1.5 (.6)	1.6 (.4)	1.7 (.7)	1.8 (.2)	2.8 (.4)	3.7 (.3)	5.8 (.2)
H3		1.1 (.3)	1.3 (.2)	1.2 (.4)	1.3 (.2)	1.3 (.3)	1.5 (.4)	1.4 (.3)	1.3 (.3)
H3 _n		1.2 (.2)	0.9 (.2)	1.1 (.2)	1.1 (.1)	1.3 (.2)	1.2 (.2)	1.1 (.4)	1.0 (.4)

Les splénocytes porcins purifiés (2×10^6 cellules/mL) ont été mis en culture dans du milieu MEM-Joklik contenant différentes concentrations d'anticorps monoclonal (Ac. mon.) pendant 72 heures, à 37° C (voir Méthodes, section 3.9). La thymidine tritiée a été ajoutée 16 heures avant la récolte des cellules. L'indice de stimulation représente le rapport de l'incorporation de thymidine tritiée (cpm) des cellules en présence d'anticorps monoclonal (moins l'incorporation de thymidine tritiée basale) sur l'incorporation de thymidine tritiée (cpm) des cellules en absence d'anticorps (incorporation basale). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois expériences.

Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart type.

Ac_n: anticorps monoclonaux réticulés par traitement au diméthylsuberimidate (voir Méthodes section 3.9.3).

Les anticorps monoclonaux ont aussi été testés pour leur capacité à inhiber l'activation des splénocytes par la PHA. Aucun des anticorps n'a démontré un inhibiton de la réponse engendrée par la PHA, par contre, une tendance au synergisme a plutôt été observée. Afin de mieux définir l'effet des anticorps monoclonaux A7, B1 et H3 en présence de PHA, des essais d'incorporation de [³H]-TdR ont été faits chez des splénocytes cultivés en présence d'anticorps monomérique et réticulé (0,5 à 200 µg/mL) et de concentration sous-optimale de PHA (0,2 µg/mL). A cette concentration de PHA, la réponse des splénocytes est d'environ 3000 CPM. Les résultats sont présentés au tableau 8. Les anticorps A7, B1 et H3 monomériques et réticulés ont démontré un pouvoir de co-mitogénicité donnant lieu à des indices de stimulation variant de 4 à 10.

L'anticorps A7 et A7_n s'est avéré un co-mitogène efficace à toutes les concentrations utilisées. L'anticorps B1 sous forme monomérique ou réticulée a démontré des indices de stimulation similaires sauf à 200 µg/mL d'anticorps B1 monomérique où l'indice de stimulation est très faible (2.3). De faibles indices de stimulation ont aussi été observé à 0,5 µg/mL et 200 µg/mL d'anticorps H3 réticulé. L'anticorps H3 réticulé a démontré un pouvoir co-mitogène inférieur à celui de l'anticorps monomérique (sauf à 50 µg/mL). Notons cependant que l'interprétation de ces résultats n'est qu'à titre indicatif puisque l'écart entre les indices de stimulation respectifs à chaque expérience présentée est parfois très important.

Tableau 8. Réponse (indice de stimulation) des splénocytes porcins cultivés en présence d'anticorps monoclonaux anti-gp80 (monomériques et réticulés) et de concentration sous-optimale de PHA .

		INDICE DE STIMULATION								
Concentration (µg/mL)		0.5	1	2	5	10	20	50	100	200
Ac.mon.										
A7		4.7 (4.6-4.8)	5.2 (4.9-5.4)	7.3 (6.0-9.5)	6.7 (6.6-6.8)	7.7 (6.5-8.8)	7.7 (5.8-9.5)	8.1 (5.2-10.9)	7.2 (6.4-8.0)	6.8 (4.8-8.8)
A7 _n		6.8 (4.5-9.0)	5.7 (4.3-7.0)	8.5 (4.3-12.6)	6.5 (3.3-9.7)	6.5 (4.8-8.2)	6.3 (3.7-8.9)	5.9 (4.1-7.7)	5.9 (4.1-7.6)	5.9 (3.3-8.4)
B1		N.D.	5.8 (4.8-6.8)	7.3 (5.9-8.7)	8.2 (7.5-8.9)	7.6 (5.2-10.0)	8.5 (6.6-10.3)	6.3 (5.2-7.4)	4.2 (3.7-4.6)	2.3 (1.8-2.8)
B1 _n		5.3 (5.2-5.4)	5.1 (4.1-6.1)	5.5 (4.9-6.1)	5.9 (4.9-6.9)	8.2 (6.3-10.1)	8.3 (4.9-11.6)	7.5 (5.2-9.8)	9.5 (6.3-12.8)	6.4 (4.9-7.9)
H3		4.5 (3.9-5.1)	5.6 (5.2-5.9)	7.4 (6.5-8.2)	7.1 (6.8-7.3)	10.5 (7.5-13.4)	10.1 (8.3-11.9)	4.5 (0.9-8.1)	7.9 (6.1-9.7)	5.0 (4.6-5.4)
H3 _n		2.1 (1.1-3.1)	3.9 (3.5-4.2)	7.0 (2.8-11.1)	4.5 (2.9-6.0)	4.7 (3.0-6.4)	7.6 (4.7-10.5)	7.0 (3.8-10.1)	6.2 (4.7-7.6)	2.5 (1.0-4.0)

Les splénocytes porcins purifiés (2×10^6 cellules/mL) ont été mis en culture dans du milieu MEM-Joklik contenant 0,2 µg/mL de PHA et/ou différentes concentrations d'anticorps monoclonal (Ac. mon.) (voir Méthodes, section 3.9). La thymidine tritiée a été ajoutée 16 heures avant la récolte des cellules. L'indice de stimulation a été calculé comme suit:

$$[\text{CPM (cell.+PHA+Ac)} - \text{CPM (B)}]$$

$$\frac{[\text{CPM (cell.+Ac.)} - \text{CPM (B)}] + [\text{CPM (cell.+PHA)} - \text{CPM (B)}]}{2}$$

où CPM (B) représente l'incorporation de thymidine tritiée (cpm) des cellules en absence d'anticorps monoclonal et de PHA. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de deux expériences tandis que les nombres entre parenthèses sont les indices de stimulation respectifs à chacune d'elle.

Ac_n: anticorps monoclonaux réticulés par traitement au diméthylsuberimidate (voir Méthodes, section 3.9.3)

N.D.: Non déterminé.

5. DISCUSSION

L'activation des lymphocytes par la PHA s'opère via l'interaction de la lectine avec les composants glycosylés de la surface cellulaire. Plusieurs auteurs ont rapporté que les glycoprotéines membranaires étaient responsables de l'étape initiale de reconnaissance menant à l'activation des lymphocytes (Dupuis et coll., 1985; Edelman, 1976; O'Brien et coll., 1979; Sitkovsky et coll., 1984). Cependant, les glycolipides pourraient aussi être impliqués dans ce phénomène d'activation (Lengle et coll., 1979; Spiegel et coll., 1981).

Dans le but de caractériser davantage les récepteurs de la PHA chez les lymphocytes porcins, une série d'anticorps monoclonaux, anti-récepteurs de la PHA, ont été produits en utilisant pour antigène, une préparation de glycoprotéines membranaires, liant la PHA, isolée à partir de lymphocytes spléniques porcins et purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'Affi-Gel-PHA (Dupuis et coll., 1985). Dans la présente étude, trois anticorps monoclonaux, spécifiques à une glycoprotéine liant la PHA, ont été purifiés et caractérisés.

Les anticorps monoclonaux, nommés A7, B1 et H3 ont été produits en ascite chez des souris Balb/c et purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'ions. Ils ont tous démontré un degré d'homogénéité égal ou supérieur à 95% tel qu'évalué par l'analyse électrophorétique en conditions dénaturantes. Les anticorps ont été purifiés avec un rendement de 5 à 10% (p/p) par rapport au contenu en protéines du liquide d'ascite.

Les antiséras utilisés pour la détermination des classes et sous-classes des anticorps ont clairement révélé la sous-classe IgG2a de l'anticorps A7, par contre, les antiséras contre les IgG2a et les IgG2b ont démontré une réactivité croisée pour les anticorps B1 et H3, limitant ainsi la détermination de la sous-classe. Cependant, le profil électrophorétique de ces anticorps sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (tableau 3) semble confirmer la présence de deux anticorps de sous-classes IgG2b. Dans les deux cas, la chaîne lourde migre en une double bande, caractéristique des chaînes lourdes gamma 2b (Parham, 1983; Köhler et coll., 1978). Ce phénomène est expliqué par la plus haute teneur en galactose de la bande supérieure. Les trois anticorps possèdent des chaînes légères de types kappa.

Les trois anticorps A7, B1 et H3 sont dirigés contre une glycoprotéine de masse moléculaire relative de 80 kD (gp80) figurant parmi la famille de glycoprotéines reconnues par la PHA (figure 3a). Tout en considérant le mode de sélection des hybridomes, la gp80 semble être le récepteur de la PHA (des splénocytes porcins) le plus immunogénique chez la souris. Parmi la dizaine de clones produits à partir de la préparation de glycoprotéines liant la PHA (Dupuis et coll., 1985), au moins trois (A7, B1, H3) se sont avérés spécifiques à la gp80.

De plus, chaque anticorps semble reconnaître un épitope distinct sur la gp80 puisque, des essais de compétition pour la liaison de la gp80, insolubilisée sur une membrane de nitrocellulose, ont démontré qu'aucun anticorps ne peut déplacer ses deux homologues. Notons qu'il existe la possibilité que plus d'une protéine migre au même endroit sur le gel. Cependant des expériences additionnelles seraient

nécessaire afin de clarifier ce point, entre autres, mentionnons l'immunodétection de l'antigène séparé par électrophorèse bidimensionnelle (O'Farrell, 1975; Towbin et coll., 1979) ou la digestion peptidique de l'antigène marqué après immunoprécipitation par l'anticorps (Meuer et coll., 1984).

La gp80 est exprimée à la surface des splénocytes porcins puisqu'elle peut être mise en évidence lors du marquage (iode-125) en surface des splénocytes porcins. Des 7 bandes majeures observées, la bande de 80 kD est une des plus intenses.

Les résultats obtenus pour la caractérisation de la nature de l'épitope supportent l'existence d'épitopes distincts pour la PHA et les anticorps. L'oxydation in situ des sucres des glycoprotéines lymphocytaires liant la PHA par le périodate n'a pas affecté l'attachement des anticorps monoclonaux. Ceci suggère que les sucres modifiés par le périodate sont, soit absents ou non-essentiels dans l'épitope reconnu. Cependant, bien que le périodate n'altère pas toutes les unités saccharidiques (Woodward et coll., 1985), la liaison de la PHA, réduite de 50% après l'oxydation, démontre qu'environ la moitié des sites reconnus par la PHA sont sensibles à ce traitement. Les essais de compétition de la PHA pour les sites reconnus par les anticorps monoclonaux ont démontré que la liaison de la PHA à ses récepteurs n'inhibe pas l'attachement des anticorps à la gp80. En considérant les Mr respectives de la PHA (126-150 kD) et des anticorps monoclonaux (150 kD), ces résultats suggèrent que les épitopes, en plus d'être distincts, sont aussi assez éloignés pour qu'il n'y ait pas d'empêchement stérique. De plus, l'absence d'affinité de l'anticorps A7 pour la thyroglobuline, un ligand

utilisé pour la purification de la PHA, témoigne aussi en faveur de sites de liaison distincts.

Les trois anticorps A7, B1 et H3 se fixent aux splénocytes ainsi qu'aux lymphocytes T porcins. Les courbes de liaison ont toutes démontré le même profil: à de faibles concentrations d'anticorps, la pente est élevée et diminue (jusqu'à tendre vers zero) à mesure que la concentration d'anticorps augmente. Les courbes de liaison des anticorps aux lymphocytes T ne semblent pas atteindre la saturation, cependant ce phénomène peut être dû à la présence de liaison non-spécifique s'accroissant avec la concentration d'anticorps. Soos et coll. (1986) ont aussi rapporté des difficultés à rencontrer les conditions de saturation dans le cas de la liaison d'anticorps monoclonaux (anti-récepteur de l'insuline) à la lignée lymphocytaire humaine IM-9. Notons que l'utilisation d'anticorps monoclonaux marqués à l'iode-125 prévient la non-spécificité rencontrée dans les études de liaison indirectes où on a recours à des immunoglobulines polyvalentes marquées pour quantifier la liaison du premier anticorps (Mason et Williams, 1980).

Les quantités maximales d'anticorps lié aux splénocytes (10^7 cellules), estimées à partir des courbes de liaison, démontrent qu'environ 1 μg d'anticorps A7, B1 et H3 se lie aux splénocytes tandis que pour la même quantité de lymphocytes T, les anticorps se retrouvent en quantité deux fois moins importante (environ 0,5 μg).

Deux paramètres importants dans la caractérisation des anticorps ont été déterminés à partir des études de liaison des [^{125}I]-anticorps aux splénocytes et lymphocytes T, soit l'affinité apparente et le nombre apparent de sites par cellule. Les résultats

ont été analysés par le modèle de Scatchard (1949) et les graphiques ont ensuite été corrigés pour la non-specificité tel que décrit par Chamness et McGuire (1975).

Les constantes (apparentes) d'affinité des anticorps pour les splénocytes et les lymphocytes T sont de l'ordre 10^8 M^{-1} (les K_a variant entre $0.69 \pm 0.14 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ et $2.05 \pm 0.03 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$). L'anticorps B1 ($K_a: 2.05 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) a démontré de 2 à 3 fois plus d'affinité que les anticorps A7 ($K_a: 0.72 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) et H3 ($K_a: 1.22 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) envers les splénocytes. Les trois anticorps ont démontré, en considérant l'erreur expérimentale, la même affinité pour les lymphocytes T.

Comme les anticorps semblent être dirigés contre la même glycoprotéine, le nombre de sites devrait être le même pour chacun des anticorps. Cependant, chez les splénocytes, l'anticorps A7 possède un plus grand nombre (apparent) de sites par cellule ($13.2 \pm 1.6 \times 10^4$) soit, environ 2 fois plus que B1 ($4.8 \pm 0.7 \times 10^4$) et H3 ($5.3 \pm 1.2 \times 10^4$). Chez les lymphocytes T, les anticorps possèdent un nombre (apparent) de sites variant entre $6.5 \pm 1.3 \times 10^4$ et $11.2 \pm 1.1 \times 10^4$. Jain et White (1977) ont proposé que les composants des membranes biologiques possédaient toute une variété de conformations et en ce sens, il est possible de supposer que l'accessibilité des différents épitopes soit la cause des différences observées dans le nombre de sites apparents.

Ajoutons qu'il est plus juste de parler de valeurs relatives du nombre (apparent) de sites puisque la valence des anticorps n'a pas été considérée lors de l'analyse de la liaison des anticorps. Ainsi, le nombre (apparent) de sites par cellule est probablement sous-estimé.

Afin de déterminer le rôle de la gp80 dans l'activation des lymphocytes de porc, des essais d'incorporation de thymidine tritiée ont été faits chez des splénocytes porcins cultivés en présence des anticorps monoclonaux A7, B1 et H3. Les résultats démontrent que les anticorps sont très peu ou pas mitogéniques. Le traitement des anticorps avec le diméthylsuberimide, un agent réticulant, a eu un effet seulement sur l'anticorps B1. Ce dernier, à des concentrations de 50 à 200 µg/mL, a provoqué une incorporation de thymidine tritiée de 3 à 6 fois le niveau basal. Ces résultats suggèrent que la gp80 n'est pas impliquée dans le phénomène d'activation, du moins dans l'étape initiale de reconnaissance des lymphocytes par la PHA. Précisons cependant que ces résultats nous indiquent seulement que les épitopes reconnus par ces anticorps ne sont pas impliqués dans l'étape initiale menant à l'activation des lymphocytes. Meuer et coll. (1984) ont démontré différents degrés de mitogénicité chez des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes distincts du récepteur-E des globules de mouton (T11, CD2) chez les lymphocytes humains.

Les anticorps monoclonaux décrits ici n'ont pas la capacité d'inhiber l'activation des lymphocytes par la PHA. Cependant, en présence de concentration sous-optimale de PHA (0,2 µg/mL), ils augmentent la réponse des lymphocytes de plusieurs fois le niveau observé en présence de PHA seulement. Les indices de stimulation varient de 4 à 10, indépendamment de la concentration ou de la valence des anticorps. D'autres auteurs ont aussi rapporté ce phénomène de synergisme lors de la combinaison de plusieurs stimulants. Ainsi, Hersey et coll. (1986) ont démontré une

augmentation de la réponse des lymphocytes du sang périphérique humain lorsque cultivés en présence de PHA et d'anticorps monoclonal anti-G_{D3} (ganglioside G_{D3}). Meuer et coll. (1984) ont rapporté l'apparition de mitogénicité, sur des lymphocytes du sang périphérique humain, seulement lors de la combinaison de deux anticorps monoclonaux (anti-T11₂ + anti-T11₃). Il est donc possible de penser que la liaison simultanée de la PHA et de l'anticorps à la gp80, favorise le signal menant à l'activation des lymphocytes de porc.

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium libre ($[Ca^{+2}]_i$) et l'activation de la protéine kinase C semblent jouer un rôle prédominant dans l'initiation de la réponse des lymphocytes (Imboden, 1988). De plus, ces deux signaux doivent être présents simultanément pour qu'il y ait prolifération (Linch, 1987). Certains anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de la surface des lymphocytes peuvent induire une augmentation du $[Ca^{+2}]_i$ sans pour autant être mitogéniques. Cependant, la combinaison de ces anticorps monoclonaux et de phorbol ester (TPA), un ligand de haute affinité pour la protéine kinase C, est mitogénique pour les lymphocytes (Hara et coll., 1985; Higgs et coll., 1988; Leo et coll., 1987). Afin de vérifier un tel phénomène avec les anticorps A7, B1 et H3, des splénocytes porcins ont été cultivés en présence de concentration non-mitogénique (chez les lymphocytes humains) de TPA et d'anticorps monoclonal. Cependant, aucun synergisme n'a pu être mis en évidence parce que le phorbol ester seul, stimule ces lymphocytes.

6. CONCLUSION

Trois anticorps monoclonaux désignés A7 (IgG2a), B1 (IgG2b) et H3 (IgG2b) reconnaissent une glycoprotéine d'environ 80 kD (gp80) avec une constante d'affinité apparente de l'ordre de 10^8 M^{-1} . La protéine gp80 est exprimée à la surface des splénocytes et des lymphocytes T porcins et fait partie de la famille de glycoprotéines reconnues par la PHA. Lorsque stimulée par les anticorps seuls, on n'observe pas l'activation des lymphocytes. Cependant, en présence d'une concentration sous-optimale de PHA (0,2 $\mu\text{g/mL}$) et d'anticorps, il y a réponse des lymphocytes tel que mesuré par une incorporation de thymidine tritiée. Ces résultats suggèrent que la protéine gp80 pourrait avoir un rôle dans l'activation des splénocytes de porc par la PHA.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement le Dr Gilles Dupuis pour la chance qu'il m'a donné de travailler au sein de son équipe. Je lui suis très reconnaissante pour sa très grande disponibilité, ses conseils judicieux et la formation scientifique exceptionnelle reçue.

Je remercie tout particulièrement, Daniel Coulombe qui m'a apporté son appui et son soutien au cours de la rédaction de ce mémoire, ainsi que Mme Hélène Ammann, Mme Banû Bastin et M. Marc Letellier pour leur collaboration et les bons moments passés ensemble.

Je remercie également le Dr Jean-Guy Lehoux et les autres professeurs du département de biochimie pour l'appui apporté tout au long de mon séjour au département. Merci également aux membres du jury, le Dr David Gibson et le Dr Brian Talbot ainsi qu'aux autorités de la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke pour l'aide financière apportée.

Je tiens à remercier en particulier le Dr Brian Talbot qui a effectué l'hybridation cellulaire et rendu possible la production des anticorps monoclonaux ainsi que le Dr Marek Rola-Pleszczynski pour sa collaboration lors des essais de cytofluorimétrie.

Je remercie tous les étudiants et le personnel du département de biochimie qui ont contribué à l'ambiance agréable et stimulante de l'étage.

REFERENCES

- Alexander, Jr., S.S.; Livingston, L.R.; Yates, L.D. et Sage, H.J. (1978). The Binding of Lectins to Components of Plasma Membranes from Porcine Submaxillary Lymph Node Lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 512, pp. 350-364.
- Allan, D. et Crumpton, M.J. (1973). Phytohemagglutinin-Lymphocyte Interaction. *Exp. Cell Res.*, 78, pp. 271-278.
- Bennett, V. et Cuatrecasas, P. Cholera Toxin Receptor. Dans Melvin Blecher (Ed): *Methods in Receptor Research. Part I.* Marcel Dekker, Inc., New York. (1976), pp. 74-98.
- Boyd, W.C. et Sharpleigh, E. (1954). Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectin). *Science*, 119, p. 419.
- Burnet, F.M. (1957). A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production Using the Concept of Clonal Selection. *Australian J. Sci.*, 20, pp. 67-69.
- Catt, K.J.; Kerelslegers, J.-M. et Dufau, M.L. Receptors for Gonadotropic Hormones. Dans Melvin Blecher (Ed): *Methods in Receptor Research. Part I.* Marcel Dekker, Inc., New York (1976), pp. 175-250.

- Chamness, G.C. et McGuire, W.L. (1975). Scatchard Plots: Common Errors in Correction and Interpretation. *Steroids*, 26, pp. 538-542.
- Chen, K.Y.; Kramer, R.H. et Canellakis, E.S. (1978). Isolation and Characterization of Surface Glycoproteins from L-1210, P-388 and HeLa Cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 507, pp. 107-118.
- Cotton, R.G.H. et Milstein, C. (1973). Fusion of Two Immunoglobulin-Producing Myeloma Cells. *Nature*, 244, pp. 42-43.
- Cummings, R.D. et Kornfeld, S. (1982). Characterization of the Structural Determinants Required for the High Affinity Interaction of Asparagine-linked Oligosaccharides with Immobilized Phaseolus vulgaris Leucoagglutinating and Erythroagglutinating Lectins. *J. Biol. Chem.*, 257, pp. 11230-11234.
- De Luca, D.; Decker, J.; Miller, A. et Sercarz, E. (1974). Antigen Binding to Lymphoid Cells from Unimmunized Mice: High Frequency of Beta-Galactosidase Binding Cells at Optimal Conditions. *Cellular Immunol.*, 10, pp. 1-18.
- Dillner-Centerlind, M.L.; Axelsson, B.; Hammarström, S.; Hellström, U. et Perlmann, P. (1980). Interaction of Lectins with Human T Lymphocytes. Mitogenic Properties, Inhibitory Effects, Binding to the Cell Membrane and to Isolated Surface Glycopeptides. *Eur. J. Immunol.*, 10, pp. 434-442.

- Dupuis, G.; Clairoux-Moreau, S.; Chevrier, P. (1980). Impairment by Covalent Modification of the Ability of Phaseolus vulgaris Phytohemagglutinin to Stimulate Cultured Human Lymphocytes: A Comparison of Different Forms of Covalent Modification. *Can. J. Biochem.*, 58, pp. 137-142.
- Dupuis, G.; Doucet, J.P.; Bastin, B.; Cardin, J. (1985). Affinity chromatography purification and partial characterization of phytohemagglutinin-receptor glycoproteins from porcine splenic lymphocytes. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 63, pp. 932-940.
- Edelman, G.M. (1976). Surface Modulation in Cell Recognition and Cell Growth. *Science*, 192, pp. 218-226.
- Egorin, M.J.; Felsted, R.L.; Bachur, N.R. (1977). Phytohemagglutinin Isolectin Stimulation of Glucose Utilization by Lymphocytes. *Life Sci.*, 20, pp. 351-358.
- Egorin, M.J.; Bachur, S.M.; Felsted, R.L.; Leavitt, R.D. et Bachur, N.R. (1979). Phaseolus vulgaris Isolectin Binding to Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 254, pp. 894-898.
- Engvall, E. et Perlmann, P. (1972). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA. *J. Immunol.*, 109, pp. 129-135.

- Etzler, M.E. Distribution and Function of Plant Lectins. Dans I.E. Leiner, N. Sharon, I.J. Goldstein (Ed): The Lectins. Academic Press, Inc., Florida (1986), pp. 371-435.
- Felsted, R.L.; Leavitt, R.D. et Bachur, N.R. (1975). Purification of the Phytohemagglutinin Family of Proteins from Red Kidney Beans (Phaseolus vulgaris) by Affinity Chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 405, pp. 72-81.
- Fleischer, B. (1987). A Novel Pathway of Human T Cell Activation Via a 103 kD T Cell Activation Antigen. *J. Immunol.*, 138, pp. 1346-1350.
- Galfre, G. et Milstein, C. (1981). Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. *Methods Enzymol.*, 73, pp. 3-46.
- Glad, C. et Borrebaeck, C.A.K. (1984). Affinity of Phytohemagglutinin (PHA) Isolectins for Serum Proteins and Regulation of the Lectin-induced Lymphocyte Transformation. *J. Immunol.*, 133, pp. 2126-2132.
- Goding, J.W. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Second Edition. Academic Press, London (1986), pp. 1-315.

- Goldstein, I.J. et Hayes, C.E. (1978). The Lectins: Carbohydrate-Binding Proteins of Plants and Animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35, pp. 127-340.
- Goldstein, I.J.; Hughes, R.C.; Monsigny, M.; Osawa, T. et Sharon, N. (1980). What Should Be Called a Lectin? *Nature*, 285, p. 66.
- Goldstein, I.J. et Poretz, R.D. Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins. Dans I.E. Liener, N. Sharon, I.J. Goldstein (Ed): *The Lectins*. Academic Press, Inc., Florida (1986), pp. 33-247.
- Greaves, M. et Janossy, G. (1972). Elicitation of Selective T and B Lymphocyte Responses by Cell Surface Binding Ligands. *Transplant. Rev.*, 11, pp. 87-130.
- Green, E.D. et Baenziger, J.U. (1987). Oligosaccharide Specificities of Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin and Erythroagglutinating Phytohemagglutinins. *J. Biol. Chem.*, 262, pp. 12018-12029.
- Hammarström, S.; Hammarström, M.L.; Sundblad, G.; Arnarp, J. et Lönngren, J. (1982). Mitogenic Leukoagglutinin from Phaseolus vulgaris Binds to a Pentasaccharide Unit in N-acetyllactosamine-type Glycoprotein Glycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, pp. 1611-1615.

- Hara, T.; Fu, S.M. et Hansen, J.A. (1985). Human T Cell Activation. II. A New Activation Pathway Used by a Major T Cell Population Via a Disulfide-Bonded Dimer of a 44 Kilodalton Polypeptide (9.3 Antigen). *J. Exp. Med.*, 161, pp. 1513-1524.
- Henkart, P.A. et Fisher, R.I. (1975). Characterization of the Lymphocyte Surface Receptors for Con A and PHA. *J. Immunol.*, 114, pp. 710-714.
- Henry, C.; Chen, Y.U.; Stout, R. et Swain, S.L. Cell Separation. Dans B.B. Mishell et S.M. Shiigi (Ed): Selected Methods in Cellular Immunology. W.H. Freeman and Co., San Francisco (1980), pp. 182-185.
- Hersey, P.; Schibeci, S.D.; Townsend, P.; Burns, C. et Cheresch, D.A. (1986). Potentiation of Lymphocyte Responses by Monoclonal Antibodies to the Ganglioside G_{D3}. *Cancer Res.*, 46, pp. 6083-6090.
- Higgs, J.B.; Zeldes, W.; Kozarsky, K.; Schteingart, M.; Kan, L.; Bohlke, P.; Krieger, K.; Davis, W. et Fox, D.A. (1988). A Novel Pathway of Human T Lymphocyte Activation. *J. Immunol.*, 140, pp.3758-3765.
- Hoffman, L.M. et Donaldson, D.D. (1985). Characterization of two Phaseolus vulgaris Phytohemagglutinin Genes Closely Linked on the Chromosome. *EMBO J.*, 4, pp. 883-889.

- Hood, L. et Talmage, D.W. (1970). Mechanism of Antibody Diversity: Germ Line Basis for Variability. *Science*, 168, pp. 325-334.
- Horibata, K. et Harris, A.W. (1970). Mouse Myelomas and Lymphomas in Culture. *Exp. Cell Res.*, 60, pp. 61-77.
- Hsu, R.; Miller, J.B.; Yachnin, S. et Dawson, G. (1979). Purification and Characterization of a Glycopeptide Derived from Phaseolus vulgaris Leukoagglutinating Phytohemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta*, 579, pp. 386-395.
- Imboden, J.B. (1988). The Regulation of Intracellular Signals During Lymphocyte Activation. *Immunol. Today*, 9, pp. 17-18.
- Jain, M.K. et White, H.B. (1977). Long-range order in biomembranes. *Adv. Lipid Res.*, 15, pp. 1-60.
- Jerne, N.K. (1955). The Natural-Selection Theory of Antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 41, pp. 849-857.
- Kaifu, R. et Osawa, T. (1976). Synthesis of O- β -D-Galactopyranosyl-(1- \rightarrow 4)-O-(2-Acetamido-2-Deoxy- β -D-Glucopyranosyl)-(1- \rightarrow 2)-D-Mannose and its Interaction with Various Lectins. *Carbohydr. Res.*, 52, pp. 179-185.

- Köhler, G., Hengartner, H. et Shulman, M.J. (1978). Immunoglobulin Production by Lymphocyte Hybridomas. *Eur. J. Immunol.*, 8, pp. 82-88.
- Köhler, G. et Milstein, C. (1975). Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, 256, pp. 495-497.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, pp. 680-685.
- Leavitt, R.D.; Felsted, R.L. et Bachur, N.R. (1977). Biological and Biochemical Properties of Phaseolus vulgaris Isolectins. *J. Biol. Chem.*, 252, pp. 2961-2966.
- Lengle, E.E.; Krishnaraj, R. et Kemp, R.G. (1979). Inhibition of the Lectin-induced Mitogenic Response of Thymocytes by Glycolipids. *Cancer Res.*, 39, pp. 817-822.
- Leo, O.; Foo, M.; Segal, M.; Shevach, E. et Bluestone, J.A. (1987). Activation of Murine T Lymphocytes With Monoclonal Antibodies: Detection on Lyt-2+ Cells of an Antigen Not Associated With the T Cell Receptor Complex But Involved in T Cell Activation. *J. Immunol.*, 139, pp. 1214-1222.

- Linch, D.C.; Wallace, D.L. et O'Flynn, K. (1987). Signal Transduction in Human T Lymphocytes. *Immunol. Rev.*, 95, pp. 137-159.
- Lis, H. et Sharon, N. (1986a). Applications of Lectins. Dans I.E. Leiner, N. Sharon, I.J. Goldstein (Ed): *The Lectins*. Academic Press, Inc., Florida, pp. 294-370.
- Lis, H. et Sharon, N. (1986b). Biological Properties of Lectins. Dans I. E. Liener, N. Sharon, I.J. Goldstein (Ed): *The Lectins*. Academic Press, Inc., Florida, pp. 265-291.
- Lis, H. et Sharon, N. (1977). Lectins: Their Chemistry and Applications to Immunology. Dans M. Sela (Ed): *The Antigens IV*. Academic Press, New York, pp. 432-434.
- Littlefield, J.W. (1964). Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. *Science*, 145, pp. 709-710.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. et Randall, R.J. (1951). Protein Assessment With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-275.
- Majerus, P.W. et Brodie, G.N. (1972). The Binding of Phytohemagglutinin to Human Platelet Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.*, 247, pp. 4253-4257.

- McPherson, G.A. (1983). A Practical Computer-Based Approach to the Analysis of Radioligand Binding Experiments. *Comput. Programs Biomed.*, 17, p.107.
- Meuer, S.C.; Hussey, R.E.; Fabbi, M.; Fox, D.; Acuto, O.; Fitzgerald, K.A.; Hodgdon, J.C.; Protentis, J.P.; Schlossman, S.F. et Reinherz, E.L. (1984). An Alternative Pathway of T-Cell Activation: A Functional Role for the 50 kD T11 Sheep Erythrocyte Receptor Protein. *Cell*, 36, pp. 897-906.
- Miller, J.B.; Noyes, C.; Henrikson, R.; Kingdon, H.S. et Yachnin, S. (1973). Phytohemagglutinin Mitogenic Proteins. *J. Exp. Med.*, 138, pp. 939-951.
- Montreuil, J. (1980). Primary Structure of Glycoprotein Glycans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37, pp. 157-223.
- Munske, G.R.; Pandolfino, R.R. et Magnuson, J.A. (1981). A Comparison of the Interactions of the Mitogenic and Nonmitogenic Lima Bean Lectins with Human Lymphocytes. *J. Immunol.*, 127, pp. 1607-1610.
- Munson, P.J. et Rodbard, D. (1980). Ligand: A Versatile Computerized Approach for Characterization of Ligand-Binding Systems. *Anal. Biochem.*, 107, pp. 220-239.

- Narasimhan, S.; Freed, J.C. et Schachter, H. (1986). The Effect of a "Bisecting" N-acetylglucosaminyl Group on the Binding of Biantennary, Complex Oligosaccharides to Concanavalin A, Phaseolus vulgaris Erythro-agglutinin (E-PHA), and Ricinus communis Agglutinin (RCA-120) Immobilized on Agarose. Carbohydr. Res., 149, pp.65-83.
- Nossal, G.J.V. et Lederberg, J. (1958). Antibody Production by Single Cells. Nature, 181, pp. 1419-1420.
- Nowell, P.C. (1960). Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Leukocytes. Cancer Res., 20, pp. 462-466.
- O'Brien, K.J.; Condie, R.M.; Prody, C.A. et Edstrom, R.D. (1979). Mitogenic Response of Lymphocytes. Biol. Chem., 254, pp. 168-175.
- O'Farrell, P.H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. J. Biol. Chem., 250, pp. 4007-4021.
- Okada, Y. (1958). The Fusion of Ehrlich's Tumor Cells Caused by HVJ Virus in vitro. Biken's J., 1, pp. 103-110.
- Parham, P. (1983). On the Fragmentation of Monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from Balb\c Mice. J. Immunol., 131, pp. 2895-2902.

- Potter, M. et Boyce, C.R. (1962). Induction of Plasma-Cell Neoplasms in Strain Balb\c Mice with Mineral Oil and Mineral Oil Adjuvants. *Nature*, 193, pp.1086-1087.
- Scatchard, G. (1949). The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51, pp. 660-672.
- Sharon, N. (1976). Lectins as Mitogens. Dans J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich (Ed): *Mitogens in Immunobiology*. Academic Press, Inc., New York, pp. 31-41.
- Sitkovsky, M.V.; Pasternack, M.S.; Lugo, J.P.; Klein, J.R. et Eisen, H.N. (1984). Isolation and Partial Characterization of Concanavalin A Receptors on Cloned Cytotoxic T Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 81, pp. 1519-1523.
- Skoog, V.T.; Nilsson, S.F. et Weber, T.H. (1980). Characterization of Human Lymphocyte Surface Receptors for Mitogenic and Non-Mitogenic Substances. *Scand. J. Immunol.*, 11, pp. 369-376.
- Soos, M.A.; Siddle, K.; Baron, M.D.; Heward, J.M.; Luzio, J.P.; Bellatin, J. et Lennox, E.S. (1986). Monoclonal Antibodies Reacting with Multiple Epitopes on the Human Insulin Receptor. *Biochem. J.*, 235, pp. 199-208.

- Spiegel, S. et Wilchek, M. (1981). Membrane Sialoglycolipids Emerging as Possible Signal Transducers for Lymphocyte Stimulation. *J. Immunol.*, 127, pp. 572-575.
- Sturn, A. et Chrispeck, M.J. (1986). The High Mannose Oligosaccharide of Phytohemagglutinin is Attached to Asparagine 12 and the Modified Oligosaccharide to Asparagine 60. *Plant Physiol.*, 80, pp. 320-322.
- Towbin, H.; Staehelin, T. et Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76, pp. 4350-4354.
- Wands, J.R.; Podolsky, D.K. et Isselbacher, K.J. (1976). Mechanism of Human Lymphocyte Stimulation by Concanavalin A: Role of Valence and Surface Binding Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 73, pp. 2118-2122.
- Wang, C.-S. et Smith, R.L. (1975). Lowry Determination of Protein in the Presence of Triton X-100. *Anal. Biochem.*, 63, pp. 414-417.
- Weber, K. et Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, pp. 4406-4412.

Woodward, M.P.; Young, W.W. et Bloodgood, R.A. (1985). Detection of Monoclonal Antibodies Specific for Carbohydrate Epitopes Using Periodate Oxidation. *J. Immunol. Methods*, 78, pp. 143-153.

Yachnin, S. et Svenson, R.H. (1972). The Immunological and Physicochemical Properties of Mitogenic Proteins Derived from Phaseolus vulgaris. *Immunology*, 22, pp. 871-883.

Yamashita, K.; Hitoi, A. et Kobata, A. (1983). Structural Determinants of Phaseolus vulgaris Erythroagglutinating Lectin for Oligosaccharides. *Biol. Chem.*, 258, pp. 14753-14755.