

Production d'antisérum anti-IgG. Application au typage par immunofixation d'une gammopathie monoclonale.

Messarah-Boumendjel A.*, Bouzerna N.* et Tridon A.**

(*) Département de biochimie – Faculté des sciences. Université d'Annaba (Algérie)

(**) Laboratoire d'immunologie – Faculté de pharmacie. Clermont-Ferrand (France)

Résumé

Dans le but de diagnostiquer le type immunologique d'une gammopathie monoclonale, nous avons utilisé comme technique l'immunofixation, et comme réactif un antisérum produit à partir de l'immunisation par des IgG, elles-mêmes purifiées par nos soins.

Notre démarche a été, d'abord, d'obtenir ces IgG dont la pureté a été déterminée par un ensemble de méthodes biochimiques et immunologiques basées sur la réaction antigène-anticorps telles que: l'électrophorèse et l'immunoblotting.

Pour cela, nous avons donc élaboré un protocole de purification des IgG à partir d'un pool de sang humain normal. La mise au point de techniques chromatographiques et électrophorétiques adéquates donnent un facteur de pureté de 87.82 %, et un rendement de 49.58 %.

Par la suite, nous avons démontré l'efficacité des anti-IgG, obtenus par immunisation, pour la révélation du type de la protéine monoclonale chez un sujet cliniquement suspecté atteint de myélome multiple.

Mots clés: gammopathie monoclonale – IgG – Antisérum – Diagnostic – Immunofixation.

Abstract

In attempt to determine the immunological kind of monoclonal gammopathy, we've used the immunofixation as technic and an antiserum as reactif produced by immunization with our purified IgG.

Our approach was, at first, to obtain these IgG which the purity was determined by biochemical methods and immunological ones based on the Ag-Ac reaction: electrophoresis and immunoblotting.

For this purpose, we have elaborate an IgG purification protocol from a normal human blood pool. The finalization of appropriate chromatographic and electrophoretic technics give a purity factor of 87.82% and an efficiency of 49.58%.

Afterwards, we have demonstrate the efficiency of the purified anti-IgG to revelate the kind of monoclonal protein on a patient clinicly suspected by this pathology.

Introduction

Les anticorps sont des protéines produites par les cellules lymphoïdes en réponse à la présence de substances étrangères, les antigènes. Une des propriétés les plus frappantes des anticorps, et qui fait leur grande utilité pour les chercheurs en biologie, est leur remarquable *spécificité* (les anticorps étant capables de distinguer entre deux antigènes qui ne diffèrent que par un seul acide aminé).

Il existe fondamentalement deux méthodes pour préparer des molécules d'anticorps capables d'interagir avec un antigène donné. Il y a la méthode mise au point en 1975 par Cesar Milstein et Georges Kohler (techniques des hybridomes) et par laquelle on obtient une préparation de molécules d'anticorps (dits anticorps monoclonaux) produits par une seule colonie (ou clone) de cellules [1]. Mais, il y a, également la méthode traditionnelle, encore utilisée, dans laquelle on injecte de façon répétée l'antigène à un animal (habituellement un lapin ou une chèvre) et,

après quelques semaines, on prélève du sang qui contient les anticorps souhaités que l'on récupère sous forme d'*antisérum polyvalent* [2].

Une fois que l'on dispose d'une préparation de molécules d'anticorps, qu'elle soit obtenue par l'utilisation d'hybridomes ou par les techniques immunologiques conventionnelles, on peut les utiliser comme *sondes* très spécifiques pour rechercher la présence de l'antigène correspondant dans diverses méthodes analytiques [3].

L'objectif de ce travail est donc de typer par immunofixation une gammopathie monoclonale à immunoglobuline G (IgG) en utilisant comme réactif une anti-IgG produite par nos soins.

I - Matériel et méthodes

I-1 - Préparation de l'échantillon

Les protéines (dont les IgG) sont sélectivement isolées des autres composants sériques par déshydratation et précipitation au sulfate de sodium à raison de 0.18g/ml de sérum humain. Des étapes d'incubation de 30 min et de centrifugation à 3000g pendant 30 min sont répétées. Le précipité final est dialysé contre un tampon de NaH_2PO_4 , H_2O (0.02 M, pH 8).

I-2- Séparation des IgG par chromatographie d'échange d'ions

Le gel utilisé est la DEAE Cellulose DE 52 (Whatman) activé par une solution d'HCl (0.5 N) [4]. La résine est coulée dans une colonne (1.6 x 30 cm) équilibrée avec le tampon précédent. L'élution est effectuée par le même tampon à un débit de 2 ml / min.

I-3-Détermination des IgG

Les IgG obtenues sont lyophilisées, et leur pureté est déterminée par les techniques biochimiques et immunologiques suivantes:

a / Dosage des protéines totales: La concentration en protéines est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin - Ciocalteu [5]. La densité optique est lu à 578 nm, et la concentration est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage standard.

b / Dosage immunonéphélométrique: La concentration en IgG est déterminée grâce au Behring Nephelometer 100 Analyser.

c / Electrophorèse sur acétate de cellulose: Les éluats de la chromatographie d'échange d'ions sont analysés par électrophorèse de zone réalisée sur des plaques d'acétate de cellulose (6 x 7.6 cm) Titan III, Helena. Le pH du tampon utilisé se situant entre 8 et 9, les protéines se comportent comme des anions et se déplacent vers l'anode. La migration dure 13 minutes pour un voltage de 180 volts dans un tampon Tris-Véronal à pH 8.6 [6].

Les plaques sont colorées au rouge ponceau, puis décolorées dans de l'acide acétique à 5 %, puis dans du méthanol. Les plaques sont finalement trempées dans la solution de transparisation puis séchées dans une étuve à 120°C.

d / Western blot: Cette technique s'inspire du principe général du buvardage permettant d'absorber sur un support spécial (Nylon) des antigènes, en pratique des protéines, préalablement séparées par électrophorèse sur agarose [7].

Ainsi la détection des IgG par cette méthode se fait en trois étapes:

- résolution de l'extrait protéique par migration électrophorétique à 20°C à raison de 40 mA/plaque et ce sur indubiose A37 (Biosepra) à 1% dans un tampon véronal (pH 8.4), coulé sur une plaque en verre (10 x 8.5 cm).
- transfert par contact sur une membrane de Nylon (immobilon-P, millipore) pendant 15 minutes sous une pression de 2 Kg.
- révélation des protéines transférées: La membrane de nylon est découpée en trois bandelettes et chacune d'entre elles est incubée 1 heure avec 1 ml d'antisérum respectif anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA marqués à la peroxydase. Ensuite, elles sont mises à tremper dans la solution du substrat chromogène 3,3' Diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) (Sigma) préparée extemporanément. La réaction est ensuite stoppée avec du HCl 1N dilué au 1/10^{ème}.

I-4 - Production d'anticorps anti-IgG

a / Immunisation: Un lot de 2 lapins est immunisé, en intramusculaire avec des rappels en intraveineuse, avec les IgG purifiées (1 mg/ml) en émulsion et à volumes égaux avec un gel à base d'hydroxyde d'aluminium [8]. Au bout de 75 jours, la présence d'anticorps étant révélée par ring-test, les animaux sont sacrifiés et 40 ml de sang sont recueillis par individu.

b / Chromatographie d'affinité sur Sépharose CL 6B: L'immunoabsorbant est lavé et repris avec du dioxane puis activé avec du carbonyldiimidazole [9]. Le ligand est ajouté au gel (7.5 mg d'IgG par ml de gel) préalablement traité avec une solution de N butylamine (0.16 g/ml). Le sérum des lapins est précipité au sulfate de sodium puis passé et recyclé au minimum 7 fois à travers la colonne chromatographique (1.6 x 4.8 cm). Les anti-IgG sont élués par un tampon glycine (0.2 M, pH 2.8) et récupérées dans un tampon basique afin d'éviter leur dénaturation.

I-5-Typage d'une gammapathie monoclonale

Du sérum appartenant à un patient chez lequel a été dépisté un pic monoclonal étroit et homogène migrant dans la zone des gamma-bêta en électrophorèse sur acétate de cellulose est testé par immunofixation en utilisant l'anti-IgG purifié [10,11].

Cette dernière technique consiste d'abord en une électrophorèse sur gel d'agarose L (Behring) à 1 % dans le tampon véronal pH 8.4) sur une plaque en verre (8.5 x 10 cm). La migration dans ce même tampon dure 25 minutes à 25°C à raison de 40 mA/plaque. Puis sur chacune des cinq pistes disponibles, sont répartis, respectivement, 100 µl des solutions suivantes: la solution de fixation; l'anti-chaîne lourde gamma (Sebia); l'anti-chaîne lourde alpha (Sebia); l'anti-chaîne lourde mu (Sebia) et enfin l'anti-IgG purifiée et concentrée dans les cellules d'un concentrateur minicon-B dont la membrane a une perméabilité sélective de PM 15000. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 25 minutes. La plaque est colorée avec l'amidoblack.

II - Résultats et discussion

Le profil chromatographique obtenu sur DEAE Cellulose est donné dans la figure 1. Comme la majorité des IgG ont une tendance cathodique, et que l'élution est réalisée avec un tampon à faible force ionique, la totalité des protéines ainsi qu'une partie des IgG étant fixées au niveau des échangeurs d'anions grâce à des liaisons électrostatiques, le premier pic correspond à la fraction d'IgG non fixée de migration électrophorétique lente.

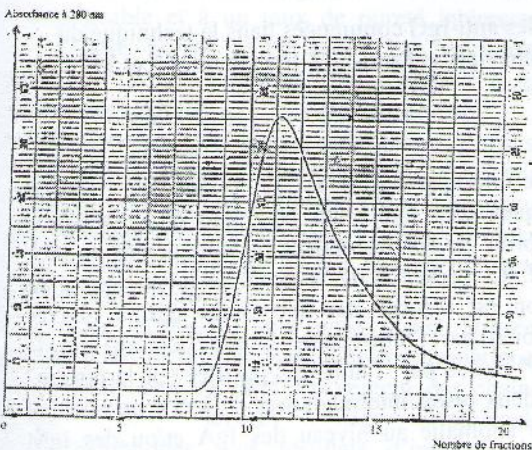


Figure 1:Premier pic chromatographique donné par DEAE cellulose

Ainsi, les immunoglobulines G sont éluées à un temps de rétention 2' 43'', en donnant un pic asymétrique avec une branche ascendante abrupte correspondant aux concentrations les plus élevées, et une branche descendante plus étalée correspondant aux fractions les moins riches.

Ces résultats nous ont poussé à utiliser l'acétate de cellulose comme support pour une électrophorèse de zone afin de confirmer d'une façon globale les produits obtenus dans le pic du chromatogramme précédent.

Ainsi, l'examen du cliché d'électrophorèse sur acétate de cellulose, voir la figure 2, montre que l'échantillon de départ conserve un ensemble de protéines dont on distingue essentiellement l'albumine du côté anodique et les gammaglobulines du côté cathodique. Par ailleurs, la fraction obtenue par le procédé chromatographique est représentée par une bande se situant dans la zone de mobilité cathodique des gammaglobulines. Cet emplacement concorde avec la mobilité électrophorétique connue des IgG [12].

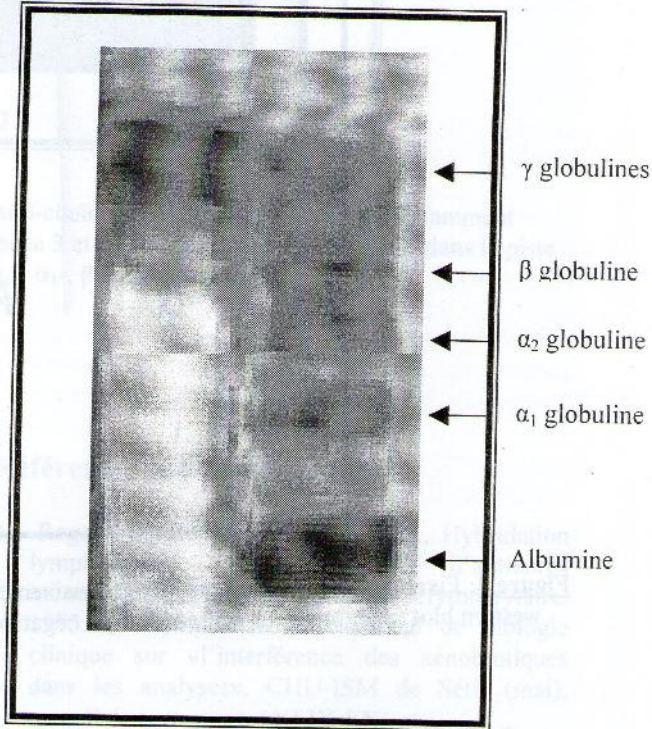


Figure 2: L'électrophorèse sur acétate de cellulose de la fraction purifiée (échantillon 1) ne révèle qu'une seule bande dont l'emplacement concorde avec la mobilité cathodique des γ-globulines. L'échantillon 2 montre l'ensemble des protéines avant chromatographie.

Ce protocole a permis un traitement aisé et rapide de l'échantillon, tout en permettant de préparer 22 mg d'IgG à partir de 10 ml d'échantillon de départ. Ce procédé est suivi par la mesure de la concentration en immunoglobuline G par néphélémétrie et en protéines totales par la méthode de Folin Ciocalteu. Ce qui a permis de constater que le facteur de purification (87.82 %) ainsi que le rendement (49.58 %) obtenus se situent en moyenne parmi les plus importants cités dans la littérature [13].

La suite de notre démarche se veut d'apporter plus d'arguments en faveur de cette pureté qui est un atout important pour la fabrication des anti-immunoglobulines G spécifiques. Nous avons, alors, utilisé pour caractériser plus précisément la fraction protéique purifiée, la méthode d'immunoblotting, particulièrement adaptée à des molécules protéiques telles que les immunoglobulines. Suite à la migration sur le gel d'agarose, l'IgG est transférée par buvardage sur une membrane de Nylon et enfin identifiée par des anticorps marqués à la peroxydase. En utilisant trois Ac lesquels sont: l'anti-IgG, l'anti-

IgA, et l'anti-IgM, seule la fixation des anti-IgG conjuguées à la peroxydase avec la fraction purifiée donne une empreinte brune intensément colorée, voir la figure 3. Cette zone large et diffuse indique la présence de molécules d'immunoglobulines G polyclonales. Notons, par ailleurs, qu'avec les anti-IgA et anti-IgM la réaction est négative; ce qui prouve, avec cette technique dont la limite de sensibilité est très appréciable, que notre préparation ne contient ni l'IgA, ni l'IgM.

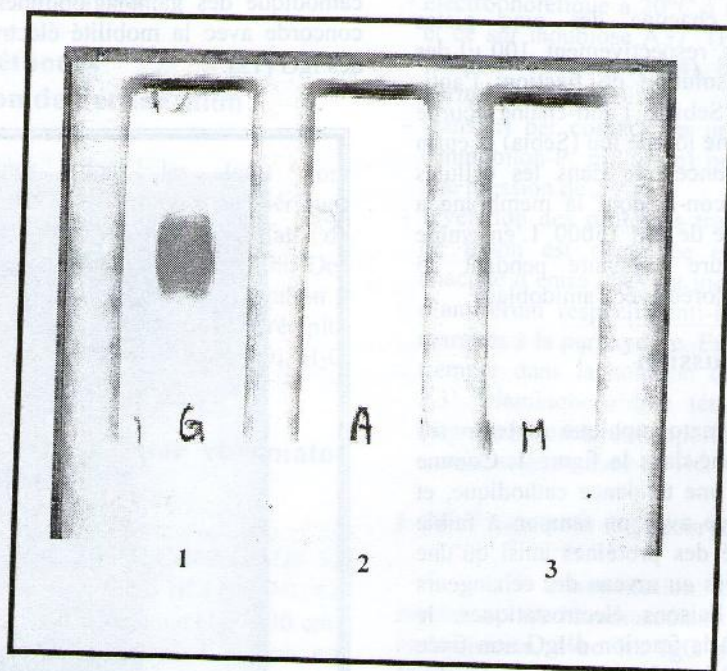


Figure 3: Fixation de la fraction purifiée exclusivement avec les anti-IgG conjuguées dans la technique du western blot (membrane 1). La réaction est négative avec l'anti-IgA et l'anti-IgM (membranes 2 et 3).

Ces IgG quasi pures ont, par la suite, servi à sensibiliser les lapins par des injections répétées successives ayant pour but la production d'anti-IgG spécifiques.

L'activité anticorps de l'anti-IgG est mise en évidence par sa capacité à précipiter spécifiquement avec une immunoglobuline monoclonale de type IgG (sérum d'un patient suspecté atteint d'une gammapathie monoclonale).

Pour cela, nous avons choisi la technique d'immunofixation pour sa simplicité, rapidité et grande précision [14]. Le complexe Ag-Ac formé (IgG monoclonale - anti-IgG purifiée) est révélé en déposant directement les antisérums sur la gélose, et cela, après migration électrophorétique de l'échantillon sérique (Figure 4). Avec la solution

d'acide picrique (piste n° 1), toutes les fractions protéiques sont fixées sur la gélose et apparaissent sous forme de bandes étalées du pôle positif au pôle négatif. La présence de la protéine monoclonale en question est repérée par une bande étroite révélée aussi bien par l'anti-chaîne lourde (témoin) sur la piste n° 2, que par l'anti-IgG purifiée sur la piste n° 5; les deux pistes intermédiaires n° 3 et 4 ne révèlent aucune anomalie au niveau des IgA et/ou des IgM chez ce sujet qui est donc porteur d'une gammapathie monoclonale de type IgG.

Cette réaction positive, parfaitement claire et interprétable, nous permet de conclure que la molécule isolée (anti-IgG) est tout à fait valable pour servir à un typage de ce genre.

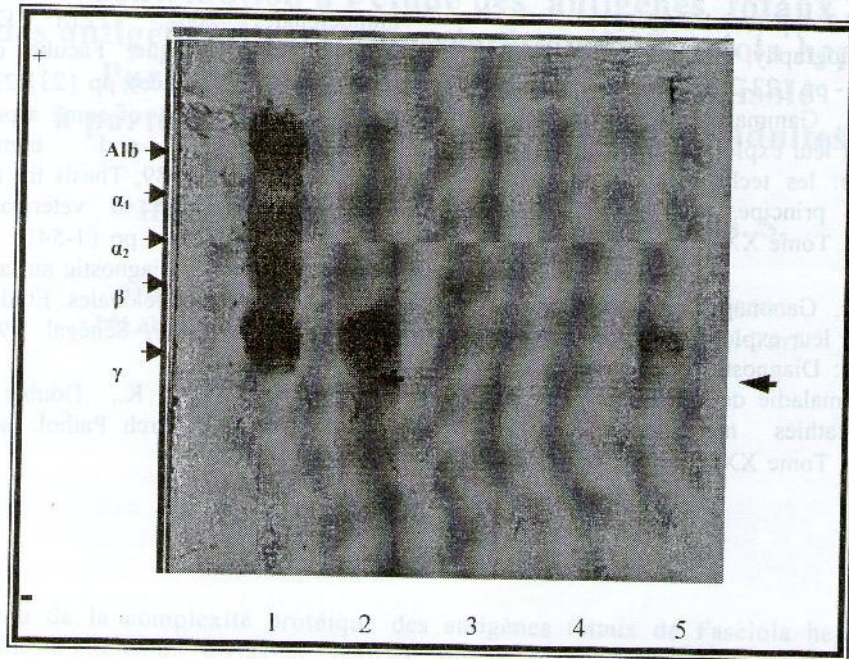


Figure 4: L'immunofixation révèle l'Ig monoclonale avec l'anti-chaîne lourde témoin (piste 2) et notamment avec l'anti-IgG purifiée (piste 5). Les anti-IgA et anti-IgM (piste 3 et 4) donnant un résultat négatif; dans la piste 1 le picrate fixe toutes les fractions protéiques (Albumine, α_1 , α_2 , β - et γ - globulines

Conclusion

Ainsi, l'élaboration d'un protocole adéquat par la mise au point de techniques de purification nous a permis de séparer les immunoglobulines G à partir d'un échantillon sanguin avec un rendement non négligeable et à un taux de pureté intéressant.

Cette pureté a été jugée par un certain nombre de méthodes telles que l'immunonéphélométrie, l'électrophorèse et l'immunotransfert. Ceci nous a enfin permis d'utiliser ces immunoglobulines G pour la fabrication d'anticorps pouvant servir comme réactifs au typage d'une gammapathie monoclonale. Le résultat obtenu avec l'immunofixation est en fait très encourageant quant à l'usage de ces Ac.

Les techniques que nous avons utilisées, associées à des méthodes chimiques et enzymatiques peuvent également servir à l'isolement des chaînes lourdes et légères des molécules d'immunoglobulines. Les résultats d'immunisation avec ces différentes fractions ont un grand champ d'application dans le domaine du diagnostic biologique d'un certain nombre de pathologies parmi lesquelles la protéinurie de Bence Jones [15]. Nous souhaitons que cette perspective d'élargissement de la recherche dans ce domaine puisse compléter notre autonomie quant à la production des kits de diagnostic.

Références bibliographiques

- 1 - Regaya F., Boukaf K., Khelass B., Hybridation lymphocytaire et utilisation d'anticorps monoclonaux pour le groupage érythrocytaire. 1993, 1^{er} symposium international de biologie clinique sur «l'interférence des xénobiotiques dans les analyses», CHU-ISM de Sétif (mai), recueil de textes - pp [XLIX-LX].
- 2 - Karp G., Biologie cellulaire et moléculaire. 1999. Traduction de la 1^{re} édition américaine par Bouharmont J., DeBoeck Université. pp[771-77]
- 3 - Travers J. traduit de l'anglais par Depelchin A., Immunobiologie. 1997, DeBoeck Université. P 560.
- 4 - Rizk H., Introduction à l'immunologie moléculaire. 1993, Publication en langue arabe de l'université de Damas - pp [156-158].
- 5 - Thorne C.J.R., Techniques for determining protein concentration. Techniques in protein and enzyme biochemistry. 1978, Elsevier / North Holland Biomedical Press. B 104 - pp [1-18].
- 6 - Abbadi M.Ch., Attal N., Chelah A., Dali F., Techniques de base en immunologie. 1995, Service d'immunologie Institut Pasteur d'Algérie, service informatique IPA - pp [1-67].
- 7 - Immunoblotting. 1992, Fiche technique Promega - pp [13-19].

- 8 - Weir D.M., Application of immunological methods. 1978, Third edition Blackwell Scientific Publications, Vol 3 - pp [A3.1 - A3.15].
- 9 - Affinity chromatography, Principles & methods. 1986, Pharmacia - pp [22-23].
- 10 - Le Carrer D., Gammopathies monoclonales: Mise au point sur leur exploration biochimique en 1991. 1^{ère} partie: les techniques du diagnostic protéinologique/ principes et limites. 1991, L'Eurobiologiste, Tome XXV, n° 194 - pp [203-212].
- 11 - Le Carrer D., Gammopathies monoclonales: Mise au point sur leur exploration biochimique en 1991- 2^{ème} partie: Diagnostic protéinologique du myélome, de la maladie de Waldenstrom et des autres gammopathies monoclonales. 1991, L'Eurobiologiste, Tome XXV, n° 195 - pp [283-295].
- 12 - Korganow A.S., Martin T., Pasquali J.L., Diagnostiquer une immunoglobuline monoclonale. 2002, ITEM 126, service d'immunologie clinique, Faculté de médecine ULP Strasbourg (France); pp [231-237].
- 13 - Nouicer F., A study of some aspects of feline immunoglobulins and immunoglobulins producing cells. 1989, Thesis for the degree of master of science in veterinary sciences. University of Bristol - pp [1-54].
- 14 - Diop P.A. et al., Diagnostic au laboratoire des gammopathies monoclonales. Etude prospective de 14 cas à Dakar, Sénégal. 1998, Biologie médicale; pp [1-5].
- 15 - Kanoh T., Yago K., Double bence Jones proteinuria. 1990, Arch. Pathol. Lab. Med., 114 (9) - pp [991-994].