Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Production d'anticorps dirigés contre un précurseur de l'acide chrysanthémique

Royaux, Ines

Award date:
1992

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 03. Jul. 2025

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Production d'anticorps dirigés contre un précurseur de l'acide chrysanthémique, composant acide des pyréthrinoïdes.

ROYAUX Inès

Résumé.

Seul l'énantiomère (1R,3S) de l'acide chrysanthémique possède une activité biologique importante. Cette sélectivité optique constitue le point critique de la synthèse de ce composé.

Nous avons envisagé d'utiliser l'énantiosélectivité potentielle des anticorps pour purifier un seul des stéréoisomères d'un précurseur de l'acide chrysanthémique : la 4-hydroxy 3,3,6,6-tétraméthyl bicyclo[3.1.0]hexane-2-one (alcool EXO). Ce composé de par sa nature et sa masse moléculaire (284 Da) est un haptène et doit être lié à une protéine pour induire la production d'anticorps.

La structure de l'alcool EXO a été aménagée pour permettre ce couplage : la fonction cétone du carbone C2 a été transformée en oxime sur lequel un bras à cinq carbones terminé par un groupe thiol a été fixé. Le thioalcool ainsi formé a été couplé de manière covalente au moyen d'un réactif hétérobifonctionnel (SPDP) à un couple de protéines porteuses ; l'une servant à l'immunisation, l'autre au système de détection immunologique par ELISA. L'immunisation répétée en intramusculaire de souris avec le thioalcool couplé à la KLH en adjuvant Quil A n'a pas permis de mettre en évidence des anticorps anti-alcool EXO. Par contre le thioalcool couplé à l'ovalbumine et injecté en sous-cutané avec de l'adjuvant de Freund a induit une forte réponse spécifique de l'alcool EXO.

La caractérisation fine des polyséra est en cours et une fusion cellulaire visant à produire des anticorps monoclonaux est planifiée.

Cette reconnaissance de forme pourrait être à la base d'un projet visant la production d'anticorps catalytiques capables de réduction énantiosélective.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1992

Promoteur : J.-J. Letesson

Au terme de ce mémoire, je tiens particulièrement à remercier Messieurs les Professeurs J.J. Letesson et A. Krief ainsi que le Docteur P. Pasau qui ont inspiré le thème de ce mémoire.

Je remercie Monsieur le Professeur J.J. Letesson pour avoir accepté de promouvoir ce mémoire et pour tout l'intérêt dont il a témoigné pour celui-ci.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire d'immunologie pour leur bonne humeur quotidienne et leur dévouement. C'est plus particulièrement à Anne Mager qui m'a guidée et conseillée que va mon merci de même qu'à Christian Didembourg qui a réalisé la fusion.

Mes plus vifs remerciements vont aux chercheurs du laboratoire de chimie organique pour m'avoir acceptée parmi eux durant deux mois. Je remercie plus particulièrement le chef de travaux, le Docteur W. Dumont pour ses conseils judicieux.

Mais à c'est Thierry que je dois le plus de gratitude pour la confiance, la persévérance et l'esprit de rigueur qu'il m'a communiquée. A chaque étape de ce travail en effet, son aide se montra des plus efficaces tant pour la synthèse organique et les explications théoriques que pour le perfectionnisme accordé à la rédaction !

Enfin, c'est à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans toutes mes épreuves que je dédie ce travail ainsi qu'à ma marraîne à qui je dois beaucoup.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION 4
- A. LA MOLECULE D'ANTICORPS 5
- B. INTERACTION ANTIGENE-ANTICORPS 6
- C. LES ANTICORPS CONTRE LES HAPTENES 8
- D. LES ANTICORPS CATALYTIQUES 13
- E. L'ACIDE CHRYSANTHEMIQUE 20
- F. BUT DU TRAVAIL 25

MATERIEL ET METHODES 27
- A. CONCEPTION ET SYNTHESE DE L'HHAPTENE 27
- B. COUPLAGES AU SPDP 40
- C. IMMUNISATIONS 44
- D. TESTS DE CRIBLAGE DES ANTICORPS 48
- E. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX 53

RESULTATS ET DISCUSSION
- A. DETECTION DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-HAPTENE NON COUPLE 64
- B. PRODUCTION ET CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX 67
- C. COUPLAGES PREMIERE PARTIE 70
- D. SYNTHESE DU THIOALCOOL 72
- E. COUPLAGES TROISIEME PARTIE 81
- F..CRIBLAGES DES ANTICORPS POLYCLONAUX ISSUS DES IMMUNISATIONS AVEC L'ALCOOL EXO COUPLE A LA KLH 85
- G CRIBLAGES DES ANTICORPS POLYCLONAUX ISSUS DES IMMUNISATIONS AVEC L'ALCOOL EXO COUPLE A L'OVALBUMINE 87

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 88

REFERENCES 91

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac = anticorps
AcMo = anticorps monoclonal
AcCa = anticorps catalytique
AE = alcool EXO
AESH = thioalcool
Ag = antigène
BSA = bovine serum albumin (albumine sérique bovine)
DAB = diaminobenzidine
DMF = diméthylformamide
DMSO = diméthylsulfoxyde
DNP = 2,4-dinitrophénol
DNBS = sel sodique de l'acide 2,4-dinitrobenzènesulfonique
DNFB = 2,4-dinitrofluorobenzène
DTT = dithiothréitol
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
GC = gas chromatography (chromatographie en phase gazeuse)
HAT = hypoxanthine-aminoptérine-thymidine
HC = hydrolysat de caséine
Hp = haptène
Ig = immunoglobuline
IR = spectroscopie infra-rouge
KLH = keyhole limpet hemocyanin (hémocyanine de patelle)
OctSH = octanethiol
OctSOct = dioctylsulfure
OctSSOct = dioctyldisulfure
OPD = o-phénylènediamine
OVA = ovalbumine
PBS = phosphate buffer saline
PEG = polyéthylèneglycol
PLC = preparative layer chromatography (chromatographie sur plaque préparative)
PLE = pig liver esterase (estérase de foie de porc)
PM = poids moléculaire
RMN = spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
RT = temps de rétention (minutes)
SAM-POD = sheep anti mouse-peroxidase
SPDP = 3-(2-pyridildithiopropionate) de N-succinimidyle
SSI = sérum de souris immunisée
SSNI = sérum de souris non immunisée
THF = tétrahydrofuranne
TLC = thin layer chromatography (chromatographie analytique sur couche mince)
δ = déplacement chimique (en ppm)

AVANT-PROPOS

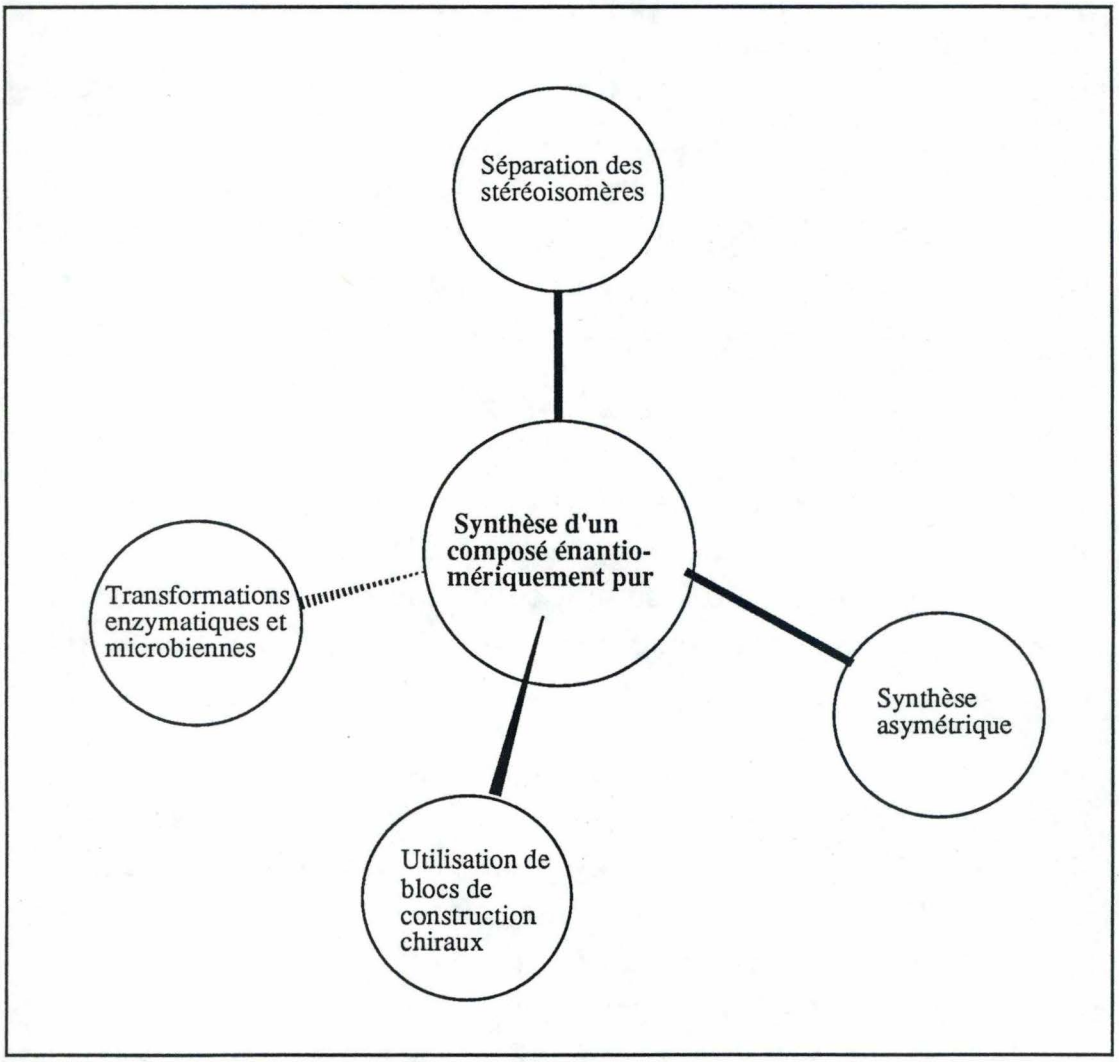
L'obtention de composés chiraux ou énantiomères (molécules images l'une de l'autre dans un miroir mais non superposables) possédant une grande pureté est une préoccupation majeure des chimistes organiciens (Schéma 1). En effet, deux énantiomères peuvent présenter une différence d'activité biologique telle qu'un énantiomère est actif tandis que l'autre est inactif, voire toxique (ex : Thalidomide).

Jusqu'il y a 20 ans, les réactions chimiques aboutissaient à des mélanges racémiques (ou racémates), c'est-à-dire un mélange de deux énantiomères en proportion égale. Ceux-ci étaient alors séparés par **dédoublement** du racémate. Bien que les méthodes de séparation soient connues, elles sont longues, coûteuses et conduisent toujours à la perte de la moitié du réactif engagé.

Dès les années 1960, la synthèse asymétrique [1] fit d'énormes progrès et deux stratégies furent élaborées pour obtenir la stéréospécificité désirée. La première consiste à lier temporairement un **auxiliaire chiral** au substrat qui permet d'induire une réaction asymétrique et permet d'obtenir un large excès de l'un des deux énantiomères. Cette approche nécessite l'utilisation en quantités stœchiométriques de l'entité portant la chiralité. La seconde approche, initiée par Kagan, est moins onéreuse. Elle implique l'utilisation de **catalyseurs chiraux**, souvent des métaux de transition, coordinés à des entités organiques chirales. Cette stratégie permet actuellement la synthèse de la L-Dopa, un neurotransmetteur, à l'échelle industrielle.[2]

Schéma 1 :

Stratégies dont dispose le chimiste pour l'obtention de produits énantiomériquement purs



Plus récemment, c'est aux **enzymes** que le chimiste a fait appel comme catalyseurs.[3] Les enzymes ont pour principale propriété une grande sélectivité et ce, non seulement pour le type de réaction catalysée mais aussi pour leur point d'attaque sur une molécule. Elles sont capables de transformer un composé prochiral en un produit énantiomériquement pur. Si les enzymes assurent cette tâche, c'est parce qu'elles sont elles-mêmes asymétriques : leurs chaînes d'acides aminés L sont repliées sans symétrie dans l'espace. Certaines enzymes n'ont qu'une très faible sélectivité et acceptent toute une série de molécules apparentées. Les enzymes sont ainsi exploitées pour la synthèse asymétrique à partir de molécules achirales qui ne sont pas leurs substrats naturels (ex : hydrolyse par l'estérase de foie de porc [4]).

De nombreux efforts ont visé à modifier la spécificité d'enzymes existantes par mutagenèse dirigée et par des modifications chimiques.[5,6] Cependant les enzymes présentent quelques inconvénients : elles sont coûteuses et peuvent se dénaturer en cours de réaction.

Les chimistes ont tenté de mimer les enzymes en créant des **enzymes artificielles** [7,8] (ex : cyclodextrines et éthers couronnes). Elles ne sont pas de nature protéique mais elles possèdent des groupes catalytiques typiques des enzymes naturelles. Cependant, bien qu'elles soient douées d'une grande sélectivité, les vitesses de réactions sont encore loin d'égaler celles atteintes avec les enzymes naturelles. De plus, la construction de ces catalyseurs est un travail laborieux.

Depuis 1986, des chimistes en collaboration avec des biologistes ont tenté d'utiliser le système immunitaire pour effectuer des réactions extrêmement efficaces. L'introduction d'une activité catalytique dans le site combinant des anticorps a donné naissance à une nouvelle classe de catalyseurs : les **abzymes** ou **anticorps catalytiques**.[9-11] L'intérêt de cette approche est de pouvoir disposer en quelques mois seulement de molécules catalytiques spécifiques, alors que la spécificité des enzymes évolue sur des millénaires.

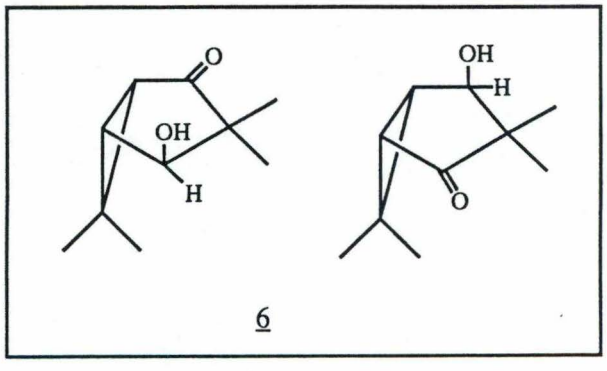
Si les vitesses des réactions catalysées par les abzymes sont encore faibles par rapport à celles des enzymes, l'avantage non négligeable est de pouvoir disposer rapidement de ces catalyseurs construits sur mesure.

Notre travail s'inscrit précisément dans ce cadre ; il touche plus particulièrement à la synthèse stéréosélective et énantiosélective de l'acide chrysanthémique, constituant des insecticides de la nouvelle génération : les pyréthrinoïdes. Ceux-ci sont extrêmement actifs, peu toxiques pour les mammifères et biodégradables. Ce sont des produits naturels ou dérivés synthétiques. La synthèse de l'acide chrysanthémique racémique, partie acide de l'insecticide, a déjà été effectuée avec succès au laboratoire de chimie organique des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur [12-14] et la version conduisant au seul énantiomère actif utilise une hydrolyse énantiosélective par une estérase de foie de porc (PLE).[14,15]

Nous avons pensé que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre un intermédiaire de la transformation pouvait grandement simplifier le schéma réactionnel en introduisant plus précocement l'énantiosélectivité.

Avant d'entamer un tel projet, nous avons voulu tester la méthode en produisant des anticorps susceptibles de reconnaître un des deux alcools EXO 6 énantiomères représentés au schéma 2 et qui est un intermédiaire clé dans la synthèse décrite au laboratoire.

Schéma 2 : Formes énantiomères de l'alcool EXO



6

I. INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

INTRODUCTION

A. LA MOLECULE D'ANTICORPS.

Le rôle du système immunitaire est de défendre l'organisme contre toute forme d'agression extérieure. A cette fin, il génère des **anticorps** capables de se combiner aux molécules étrangères, les **antigènes**, pour former un complexe antigène-anticorps qui sera ensuite éliminé par le système phagocytaire.

Schéma 3 :
Représentation de base d'une molécule d'anticorps

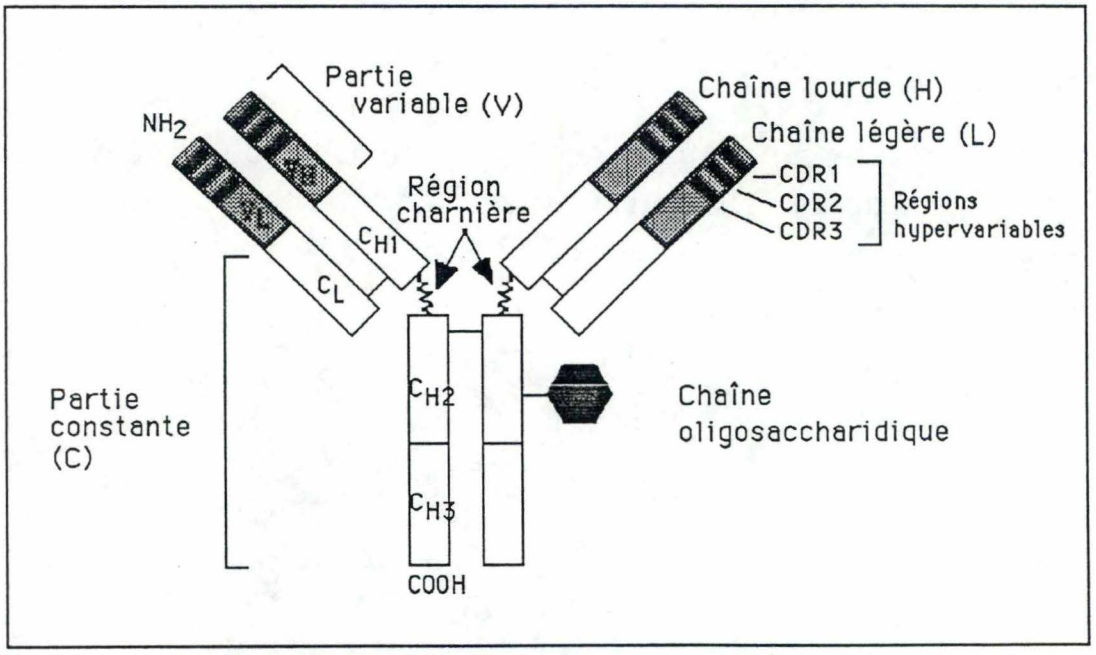


Schéma 4 :

Représentation d'un domaine variable d'immunoglobuline[16]

La chaîne polypeptidique est compactée en 9 feuillets β organisés en deux feuillets. Les loops entre les feuillets contiennent les CDRs.

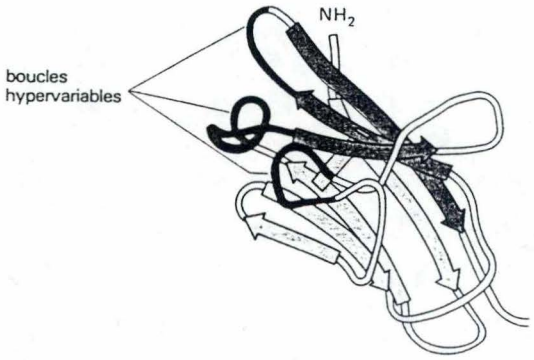
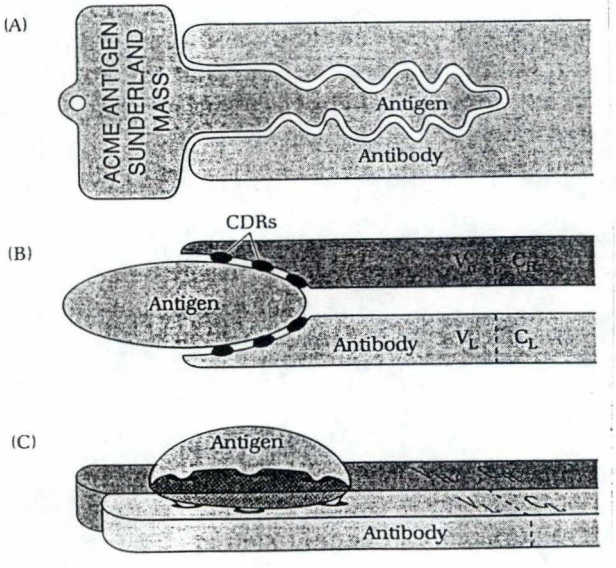


Schéma 5 :

Nature de la combinaison antigène-anticorps [16]

a) La première vision de l'interaction Ag-Ac proposée par Ehrlich était une adaptation de la théorie "lock-and-key"de l'interaction enzyme-substrat.

b) Depuis la découverte de la nature du site combinant, ce dernier est toujours représenté comme une poche pouvant accueillir un Ag complémentaire ou c) comme une surface étendue pour lier de gros antigènes.



Les anticorps ou immunoglobulines [16,17] (schéma 3) sont des glycoprotéines composées de deux chaînes légères (L) et de deux chaînes lourdes (H) identiques reliées par des ponts disulfures et par des interactions non covalentes. Chaque chaîne est constituée d'une partie constante et d'une partie variable renfermant 3 régions hypervariables (CDR = **C**omplementarity **D**etermining **R**egions).

Les deux chaînes L et H sont repliées en domaines similaires et répétés composés. D'après des études de diffraction aux rayons X, la structure de ces domaines consiste en deux feuillets β composés de brins β. Les CDRs sont positionnés au niveau des loops connectant les brins β des domaines variables V_H et V_L (Schéma 4).

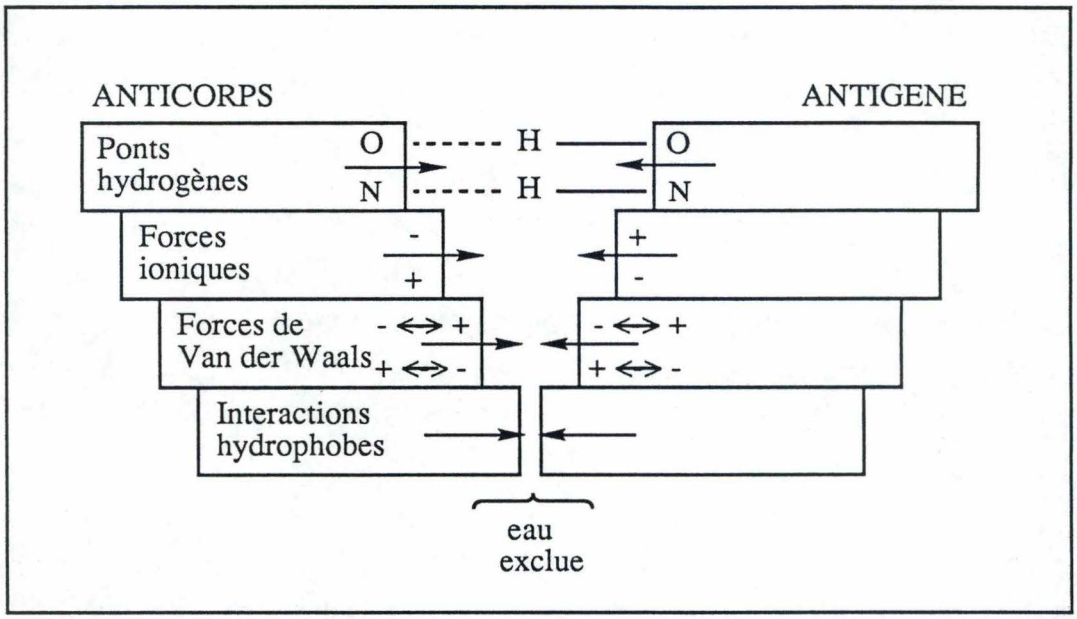
L'arrangement dans l'espace de ces CDR crée des surfaces étendues de liaison ou des cavités profondes pour lier de petites molécules (Schéma 5). Ces régions capables de se lier au même déterminant antigénique ou **épitope** constituent le **site combinant** de l'anticorps. Ce site partage de nombreuses similitudes avec le site actif des enzymes. Mais comparés aux enzymes, les anticorps sont une acquisition tardive de l'évolution, présents uniquement chez les vertébrés et synthétisés par un seul type de cellule, les **lymphocytes B**.

Il existe chez les mammifères 5 classes d'immunoglobulines (IgM, G, A, E, D) caractérisées par le type de chaîne lourde (μ, γ, α, ε, δ). Ces différentes classes diffèrent par leurs propriétés et structure. Elles déterminent l'**isotype** de l'immunoglobuline.

B. INTERACTION ANTIGENE-ANTICORPS.

La principale caractéristique des anticorps est leur grande **spécificité,** c'est-à-dire leur aptitude à se combiner de façon non covalente avec certaines structures mais pas avec d'autres relativement proches.[17,18]

Schéma 6 :
Forces attractives intermoléculaires impliquées dans la liaison entre antigène et anticorps [17]



Ponts hydrogènes :

La liaison hydrogène résulte de l'attraction d'un atome d'hydrogène attaché à un atome électronégatif par la paire électronique libre d'un autre atome.

Forces ioniques :

Les interactions ioniques sont dues à l'attraction de groupes chargés de façon opposée.

Forces de Van der Waals :

Ces forces résultent de la polarisation de deux atomes qui se rapprochent.

Interaction hydrophobe :

Elle consiste en l'association de groupes non polaires en milieu aqueux avec exclusion des molécules d'eau entre eux.

Leur liaison avec l'antigène s'effectue avec une énergie de liaison plus ou moins forte, déterminant leur **affinité** pour l'antigène. La réaction antigène-anticorps [17] résulte d'une interaction physico-chimique entre certaines parties réactives des deux molécules. L'énergie de liaison provient de deux sources :

- forces extérieures par lesquelles l'interaction entre molécules de solvant permet d'associer antigène et anticorps,
- forces attractives faibles et non-spécifiques existant entre les atomes, les ions et les molécules (Schéma 6) :
    1. ponts hydrogènes,
    2. interactions ioniques,
    3. forces de Van der Waals,
    4. interactions hydrophobes.

Ces forces n'agissent que sur de faibles distances. Dès lors pour que ces forces interatomiques soient effectives, il faut que les atomes du site combinant viennent à proximité des atomes correspondant de l'antigène. Ce n'est que lorsque les nuages électroniques et l'environnement stérique du déterminant antigénique et du site de liaison de l'anticorps sont complémentaires que la répulsion sera minimale et les forces attractives maximales, donnant un anticorps de haute affinité (Schéma 7).

Schéma 7 :
Représentation schématique des facteurs impliqués dans la spécificité antigène-anticorps

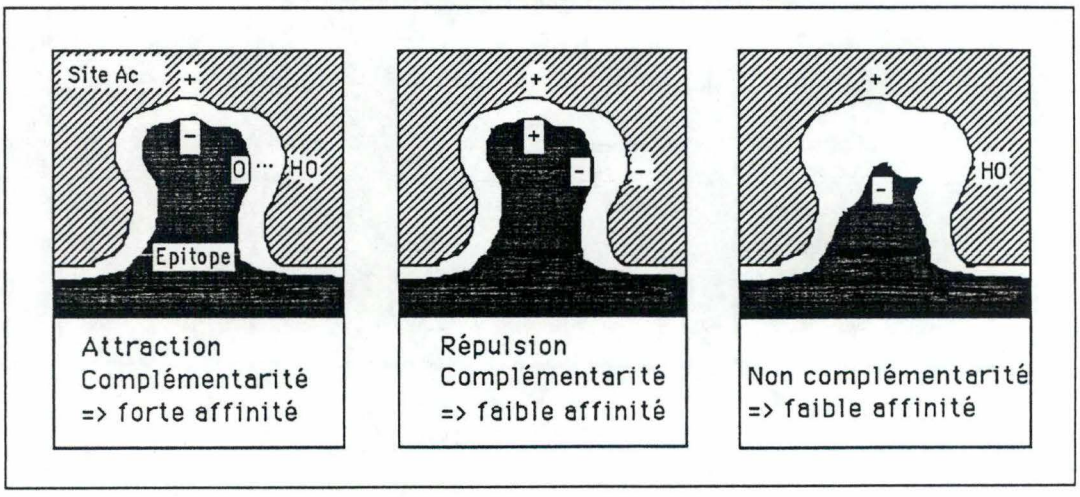
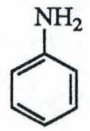
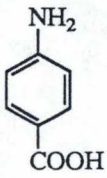
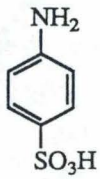
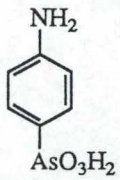
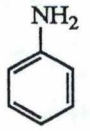
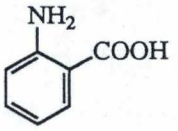
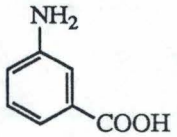
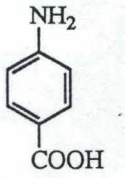
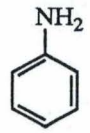
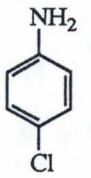
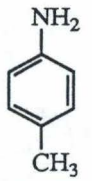
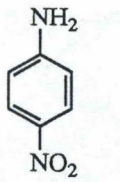


Schéma 8 :
Effets de variations de la structure d'un haptène sur la force de liaison avec des anticorps [17]

Haptènes

Antisérum contre	 Aminobenzène	 Acide p-aminobenzoïque	 Acide p-aminobenzène sulfonique	 Acide p-aminobenzène arsénique
Aminobenzène	+++			
Acide p-aminobenzoïque		++++		
Acide p-aminobenzène sulfonique			++++	
Acide p-aminobenzène arsénique				++++

Antisérum contre	 Aminobenzène	 Acide o-aminobenzoïque	 Acide m-aminobenzoïque	 Acide p-aminobenzoïque
Aminobenzène	+++			
Acide o-aminobenzoïque		+++		
Acide m-aminobenzoïque			++++	
Acide p-aminoboïque				++++

Antisérum contre	 Aminobenzène	 p-Chloroamino-benzène	 p-Toluidine	 p-Nitroamino-benzène
Aminobenzène	+++	+	++	+
p-Chloroaminobenzène	++++	++++	++	++
p-Toluidine	++	++	++	++
p-Nitroaminobenzène	+	++	++	++

\+ = Réaction positive
++++ = Réaction très forte

AFFINITÉ = Σ forces attractives et forces répulsives

Cette association entre antigène et anticorps est réversible. Elle est caractérisée par une constante d'équilibre K :

$$Ig + Ag \rightleftharpoons Ig - Ag$$

$$K = \frac{[Ig - Ag]}{[Ig]\,[Ag]}$$

C. LES ANTICORPS CONTRE LES HAPTENES.

1. Landsteiner et l'étude des lois de l'antigénicité.

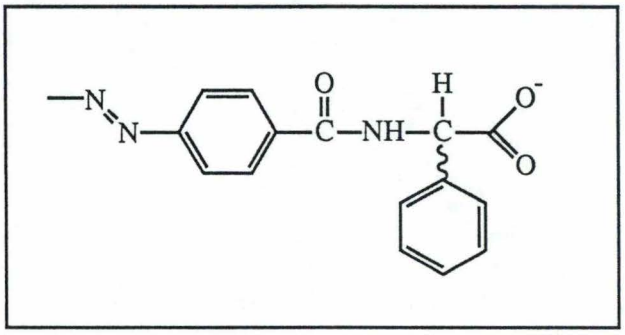
La plupart des informations concernant l'adaptation complémentaire entre anticorps et antigènes provient de l'étude d'anticorps dirigés contre des substances simples de composition chimique connue. Ces études ont été initiées par *Landsteiner* en 1917. En couplant une substance de structure chimique connue à une protéine et en utilisant ce conjugué comme immunogène, ils obtinrent des anticorps spécifiques du groupe chimiquement défini. Le nom d'**haptène** a été attribué à de tels groupes chimiques et la protéine est appelée protéine porteuse ou **carrier**.

Landsteiner a utilisé des systèmes haptène-carrier afin de déterminer les lois de l'antigénicité (Schéma 8). Selon ses travaux, la spécificité d'interaction haptène-anticorps dépend des groupes fonctionnels présents dans l'haptène et de leur arrangement dans la molécule.

C'est la configuration électronique de l'haptène plutôt que sa nature chimique qui est importante.

Pauling, Pressman, Grossberg [18] et d'autres chercheurs ont poursuivi ces travaux. Les anticorps se sont révélés capables de reconnaître des configurations optiques. *Karush* [19] montra que des anticorps dirigés contre la forme dextrogyre d'un haptène (Schéma 9) optiquement actif ne reconnaissaient pas la forme lévogyre et inversement.

Schéma 9 :
Structure du groupe acétate de phényl p-azobenzolamine racémique[19]

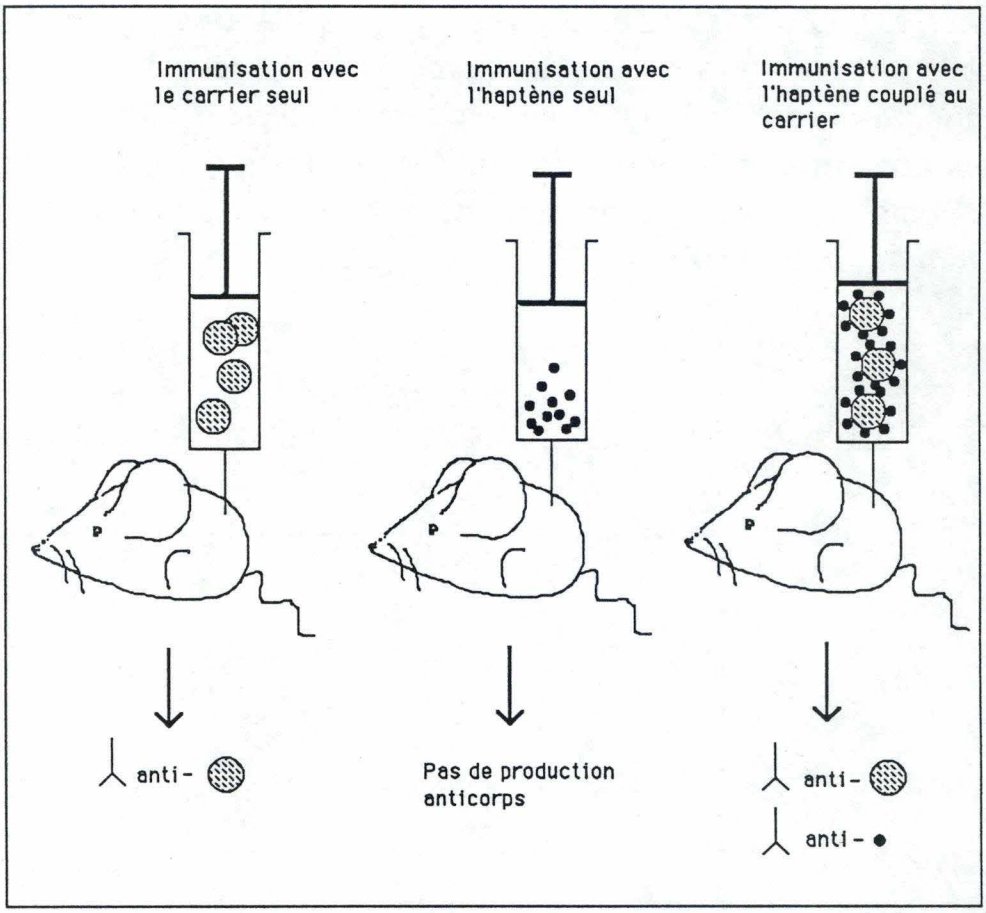


2. Haptène : définition.

L'introduction d'un antigène dans un organisme déclenche une série d'événements aboutissant à la formation d'anticorps. La propriété d'induire une réponse immunitaire est appelée **immunogénicité** et celle qui permet à une molécule de réagir avec des anticorps est l'**antigénicité**.

La définition du terme **haptène** a quelque peu été modifiée depuis Landsteiner :[20,21] un haptène est une petite molécule qui n'induit pas par elle-même la production d'anticorps mais qui est capable de réagir avec des anticorps.

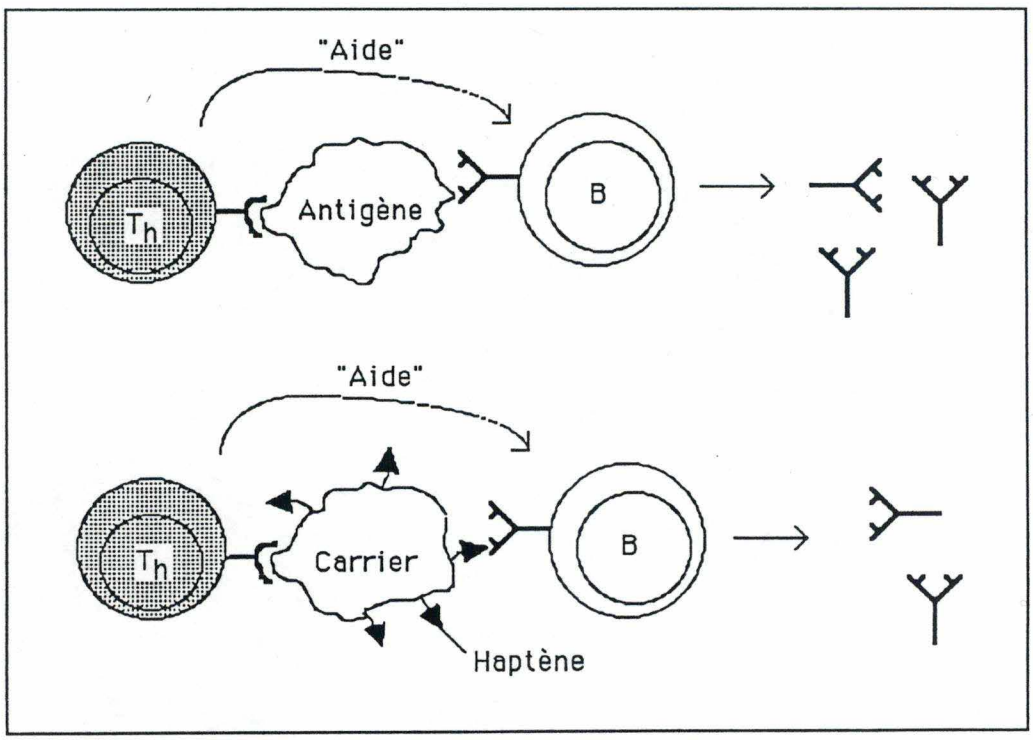
Schéma 10 :
Réponse anticorps aux antigènes et haptènes



Si elle est couplée à une protéine porteuse (ou carrier) qui est une grosse molécule immunogène, l'individu pourra produire des anticorps contre l'haptène, d'autres contre le carrier (Schéma 10). Les anticorps anti-haptène sont capables de réagir avec l'haptène libre. Ainsi, dans le complexe carrier-haptène, l'haptène peut être considéré comme un épitope supplémentaire sur une molécule déjà immunogénique. L'épitope réel peut cependant inclure l'haptène plus une région adjacente de la protéine porteuse.

Le mécanisme de formation de ces anticorps est désormais connu : le lymphocyte T auxiliaire (T_h) interagit avec des épitopes du carrier (ou épitopes T) tandis que le lymphocyte B réagit avec le déterminant hapténique ou avec le carrier (ou épitope B) (Schéma 11). Le lymphocyte B prolifère et se différencie en plasmocytes producteurs et sécréteurs d'anticorps.

Schéma 11 :
Coopération cellulaire simplifiée pour la production d'anticorps contre un antigène ou un haptène



Cette coopération lymphocyte T-lymphocyte B est aussi appelée **effet carrier**.

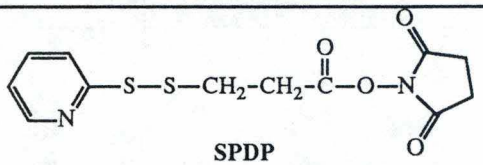
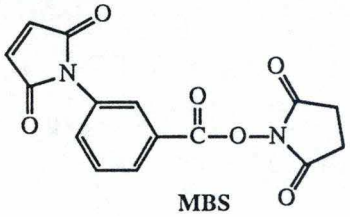
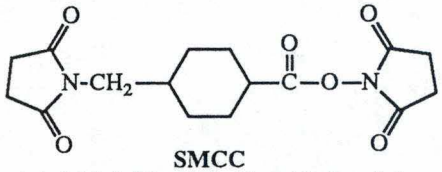
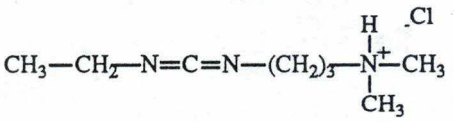
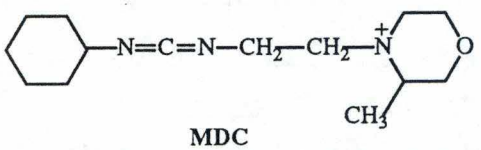
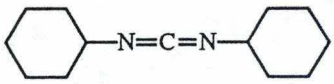
3. Préparation du conjugué immunogène.

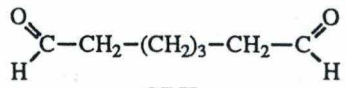
Le couplage d'haptènes à des carriers [22-24] peut se produire spontanément si l'haptène est une molécule chimiquement réactive comme par exemple la pénicilline et ses dérivés.[25] Autrement, le couplage se réalise à l'aide d'un agent bifonctionnel ou un réactif chimique. Il existe de nombreuses méthodes de couplage en fonction des groupes fonctionnels de l'haptène (Schéma 12).

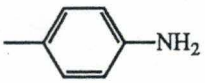
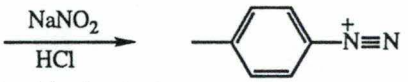
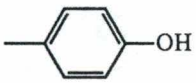
Une question importante concerne le nombre optimal d'haptènes liés par molécule de carrier, autrement dit, la densité optimale d'épitopes. Pour une bonne réponse anticorps, un conjugué doit avoir plus d'un haptène par carrier. Mais si la densité de couplage est trop forte, l'antigénicité est diminuée. La densité optimale semble être comprise entre 6 à 30 molécules d'haptène par protéine porteuse de 100000 daltons.

L'influence du type de carrier sur la réponse immunitaire est assez mal connue (Schéma 13). Il est néanmoins reconnu que plus une protéine est étrangère à l'espèce immunisée, plus elle est immunogène. Il semble que la KLH (hémocyanine de la fissurelle Megathura crenulata) soit la protéine de choix pour l'immunisation avec un haptène. En effet, avec une masse moléculaire de plusieurs millions et le fait qu'elle soit étrangère au système immunitaire des mammifères, la KLH est hautement immunogène. De plus, elle contient de nombreux groupes amines disponibles pour le couplage.

Schéma 12 :
Quelques méthodes couramment utilisées pour le couplage d'haptène à des carriers

GROUPE FONCTIONNEL HAPTENE	AGENTS DE COUPLAGE HETEROBIFONCTIONNEL	GROUPE FONCTIONNEL PROTEINE
—SH ex: Peptide du canal sodium de l'anguille électrique (a)	 **SPDP** 3-(2-pyridyldithio)propionate de N-succinimidyle	—NH_2
—SH ex: Peptides synthétiques (b)	 **MBS** m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester	—NH_2
—SH ex: Peptides synthétiques (c)	 **SMCC** succinimidyl 4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate	—NH_2
—COOH ex: Bradykinine Angiotensine (d)	 **EDC** 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide	—NH_2
—COOH ex: Bradykinine Angiotensine (d)	 **MDC** 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-éthyl) carbodiimide méthо-p-toluènesulfonate	—NH_2
—COOH ex: Aspirine (e)	 **DCC** N,N'-dicyclohexylcarbodiimide	—NH_2

GROUPE FONCTIONNEL HAPTENE	AGENTS DE COUPLAGE HOMOBIFONCTIONNELS	GROUPE FONCTIONNEL PROTEINE
—NH_2 ex: Glucagon (f)	 **GDH** Glutaraldéhyde	—NH_2
—NH_2 ex: Bradykinine (g)	 **DFDNB** (1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzène)	—NH_2

GROUPE FONCTIONNEL HAPTENE	PROCEDES CHIMIQUES DE COUPLAGE	GROUPE FONCTIONNEL PROTEINE
—COOH ex: Prostaglandines (h)	**Méthodes aux anhydrides mixtes**  anhydride d'acide	—NH_2
 ex: Chloramphénicol (i)	**Diazotation**  acide nitreux Sel de diazonium	 tyrosine histidine tryptophane

[a]Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, *84*, 308

[b]Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, *77*, 5483

[c]Synthetic peptides as antigens, John Wiley and sons : Chichester, 1986

[d]Science, 1964, *144*, 1344

[e]J. Immunol., 1963, *90*, 788

[f]Eur. J. Biochem., 1972, *26*, 191

[g]Anal. Biochem., 1976, *71*, 367

[h]Science, 1971, *171*, 494

[i]Science, 1966, *152*, 203

Schéma 14 :
Différentes orientations d'un groupe hapténique (p-azobenzoate) par rapport à la surface du carrier : (a) étendu, (b) couché sur le côté, (c) couché de face [18]

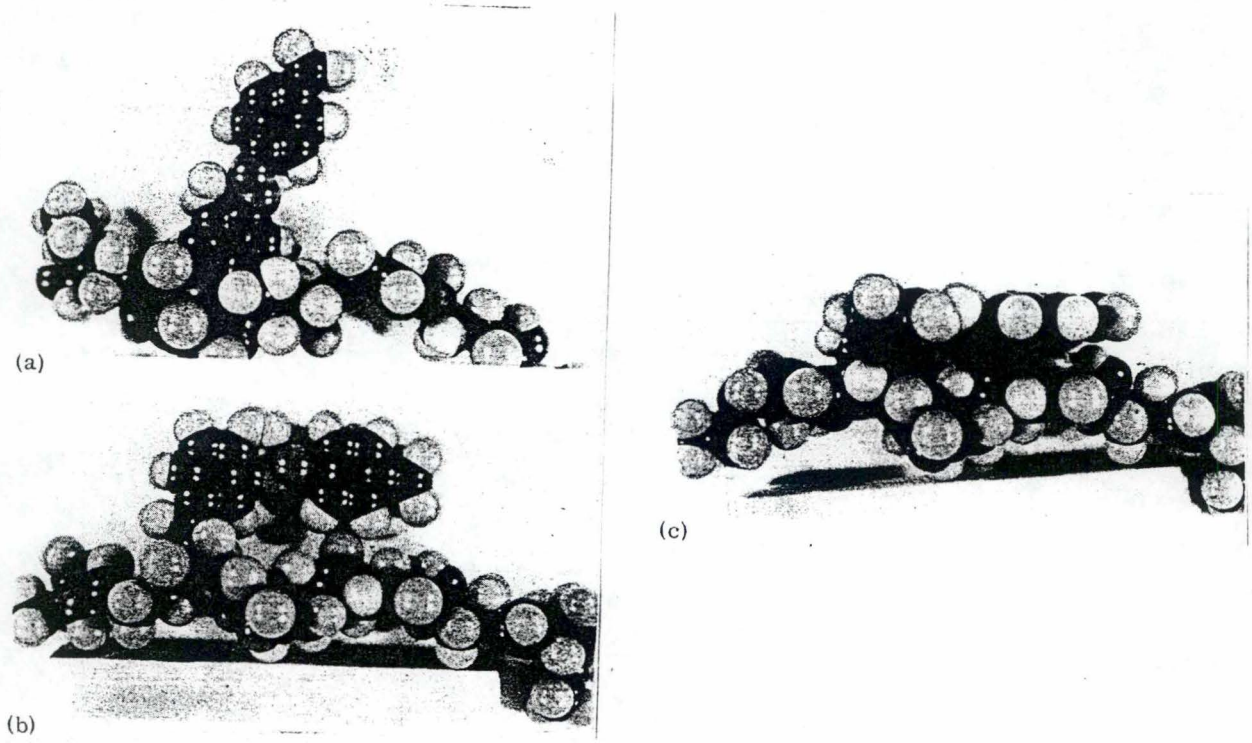


Schéma 15 :
Différentes portions d'un groupe hapténique (p-azobenzoate) contre lesquelles des sites anticorps peuvent être dirigés [18]

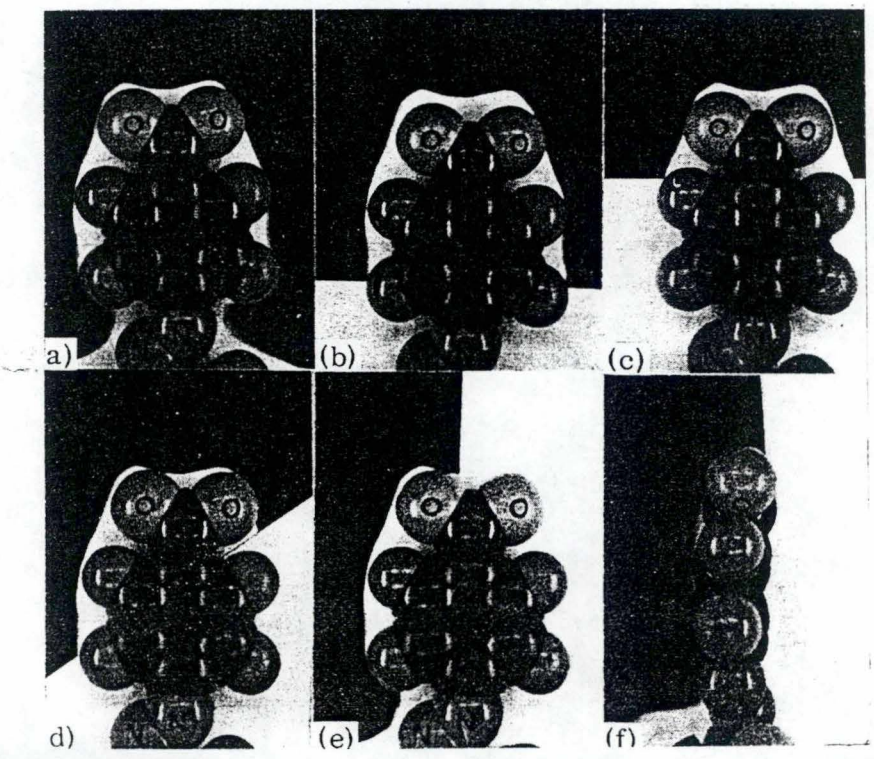


Schéma 13 :
Quelques carriers (P.M. en kilodaltons)

Albumine sérique bovine (BSA)	67
Albumine sérique humaine (HSA)	69
Ovalbumine (OVA)	44
Hémocyanine de fissurelle (KLH)	3000 à 6000
Toxoïde tétanique (TT)	150
Gamma globuline bovine (BGG)	150
Gamma gloguline humaine (HGG)	150
Protéine dérivée tuberculine (PPD)	10
Ficoll	400
Poly-L-lysine (PLL) (20 unités)	2,6
Thyroglobuline	650

Afin d'optimiser la reconnaissance de l'haptène par le système immunitaire, on peut fixer l'haptène au carrier via un **spacer.** Il s'agit d'une chaîne hydrocarbonée de l'ordre de 6 à 8 Å (soit 4 à 8 carbones) ayant pour rôle de diminuer les interférences stériques entre les chaînes latérales du carrier et l'anticorps, ce qui permet à ce dernier de mieux interagir avec l'haptène.

4. Hétérogénéité des anticorps anti-haptène.

Les anticorps produits contre l'haptène sont différents [18] et ce, pour plusieurs raisons :

1. attachement de l'haptène en des zones différentes de la protéine porteuse => environnement différent d'un haptène à un autre,
2. orientation variable de l'haptène par rapport à la surface de la protéine (Schéma 14),
3. reconnaissance par les anticorps de portions différentes de l'haptène (Schéma 15),
4. affinités et classes différentes des anticorps.

Schéma 16 :
Réactions catalysées par des anticorps catalytiques

- Hydrolyse de carbonates
- Hydrolyse d'esters
- Hydrolyse d'amides
- Hydrolyse d'éthers
- Formation de liaison amide
- Formation de liaison imine
- Réarrangement de Diels-Alder
- Réarrangement de Claisen
- Lactonisation
- Transestérification
- Réaction photochimique
- β-élimination
- Epoxydation
- Isomérisation cis-trans
- Décarboxylation
- Oxydation
- Oxydo-réduction

Même dans le cas où des anticorps sont dirigés contre la même partie du groupement hapténique, il peut y avoir hétérogénéité en ce qui concerne la constante d'affinité et la composition en acides aminés du site combinant. La solution pour obtenir des anticorps de spécificité homogène est la production d'anticorps monoclonaux.[26]

D. LES ANTICORPS CATALYTIQUES.

1. Anticorps et enzymes.

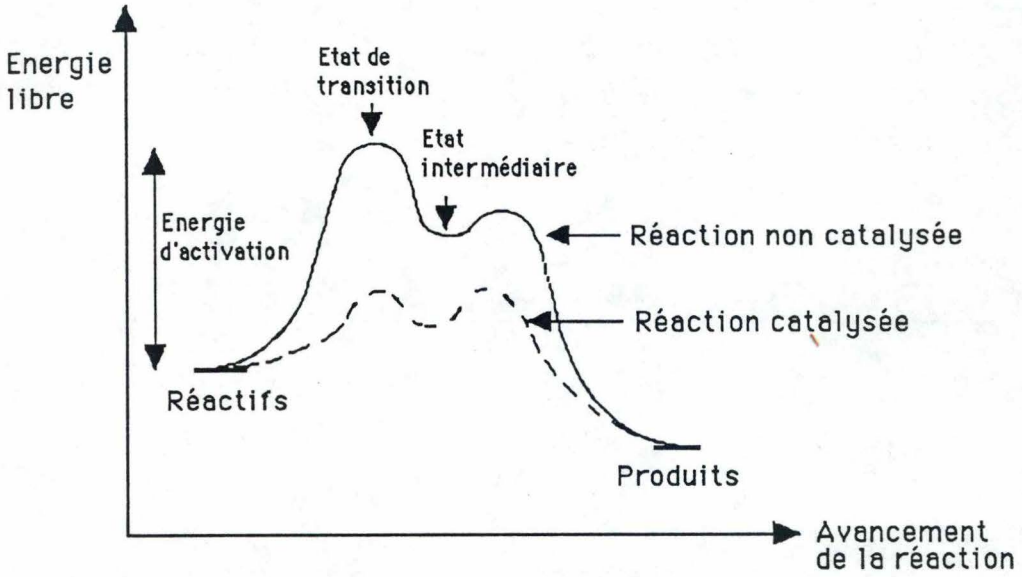
La reconnaissance moléculaire par l'interaction de sites de liaisons spécifiques est une propriété caractéristique des anticorps et des enzymes. Ces deux types de protéines lient des ligands et discriminent des composés structurellement proches. Cependant, alors que les enzymes sont capables d'utiliser leur énergie de liaison pour stabiliser un état de transition et promouvoir une réaction chimique, il est généralement reconnu que les anticorps n'ont pas cette propriété. Un grand défi était de trouver des stratégies pour introduire une activité catalytique dans ces anticorps.

Depuis 1986, plusieurs laboratoires ont réussi à exploiter le système immunitaire pour produire des catalyseurs sélectifs : les anticorps catalytiques ou ABZYMES (**anti**body en**zymes**).[27,28]

Ces abzymes sont caractérisées par une grande spécificité de substrat et partagent plusieurs aspects de la catalyse enzymatique (stabilisation de l'état de transition, catalyse générale acide-base, cofacteurs et effets de proximité). Elles sont capables de catalyser une vaste gamme de réactions chimiques (Schéma 16). Leur efficacité est importante (vitesses de réaction 10^2 à 10^6 fois plus élevées que celles des réactions non catalysées) mais est encore loin d'égaler celle des enzymes.

Schéma 17 :

Demande en énergie d'une réaction chimique hypothétique



Cependant, la diversité des anticorps offre un réservoir quasi illimité d'anticorps potentiellement catalytiques construits sur mesure pour des applications en chimie, biologie et médecine.

L'idée d'anticorps catalytiques n'est pas récente : *Pauling*, dans les années 40, suggéra qu'une enzyme est capable d'abaisser la barrière énergétique de la réaction (Schéma 17) en se liant de façon préférentielle à l'état de transition plutôt qu'à la molécule de substrat. Beaucoup d'enzymes ont en effet une meilleure affinité pour le substrat dans son état de transition que pour le substrat dans son état fondamental. Une molécule stable mimant la structure du substrat dans l'état de transition a une plus grande affinité pour le site actif de l'enzyme que le substrat à l'état fondamental. Les analogues d'état de transition sont d'ailleurs de puissants inhibiteurs d'enzymes. Pauling imagina qu'un anticorps dirigé contre l'état de transition de la réaction plutôt que contre la molécule de départ devait être porteur d'une activité catalytique. Or un état de transition est instable et ne peut être isolé.

Vingt ans plus tard, *Jenks* proposa une stratégie pour obtenir de nouvelles activités enzymatiques, stratégie basée sur la production d'anticorps dirigés contre un haptène mimant l'état de transition. Le site combinant d'un tel anticorps, complémentaire à l'état de transition, devrait accélérer la réaction en forçant les substrats liés à ressembler à cet état.

Au cours des vingt dernières années, de nombreux travaux ont tenté de démontrer l'activité catalytique d'anticorps mais sans succès, vraisemblablement à cause de la difficulté de manier des séra polyclonaux. Mais, dès 1975, la méthode des anticorps monoclonaux permet l'étude d'anticorps de structure homogène et, en 1986, les premiers exemples de catalyse par anticorps sont décrits séparément par deux groupes de recherche : ceux de *Schultz* et de *Lerner*.

Ils montrèrent que des anticorps pouvaient catalyser l'hydrolyse d'esters ou de carbonates.

2. Exemples de réactions catalysées par des abzymes : hydrolyses d'esters et de carbonates.

Ce type de réaction est bien connu et possède son équivalent enzymatique. Une molécule d'eau attaque l'ester ou le carbonate et il y a formation d'une molécule d'acide et d'une molécule d'alcool. L'état de transition de cette réaction (durée de vie de seulement 10^{-12} seconde) est tétraédrique et polarisé. Cette structure peut être mimée par des analogues stables, les **organophosphonates** (Schéma 18) dont la forme est identique à celle de l'état de transition et la répartition des charges est très voisine.

Schéma 18 :
Réaction d'hydrolyse d'un ester dont l'état de transition peut être mimé par un ester phosphonique

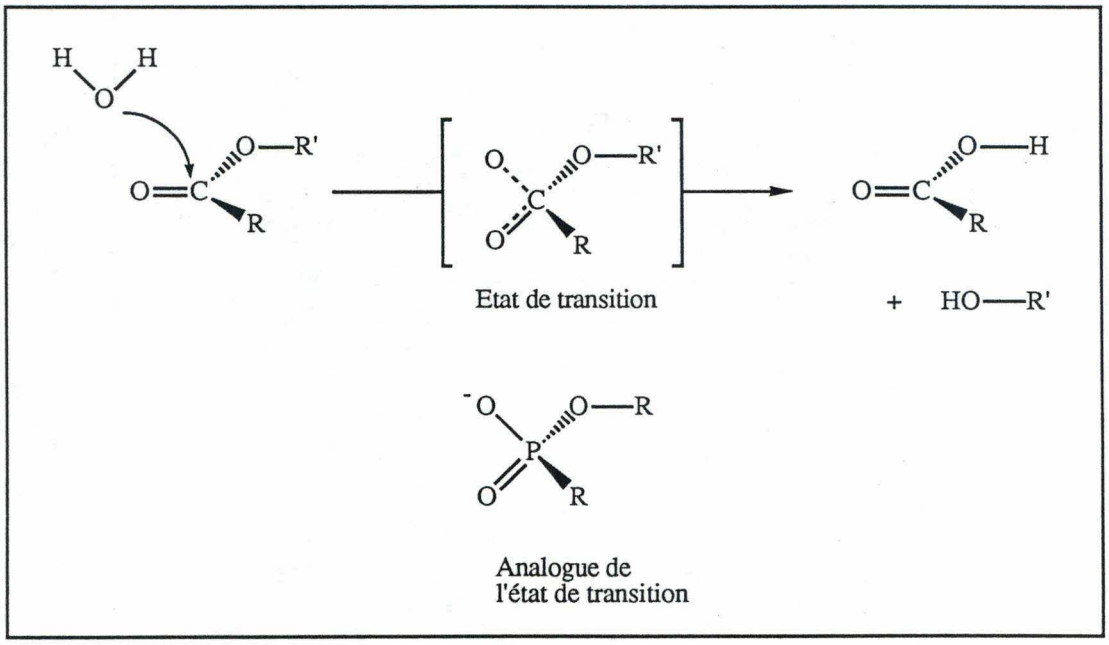
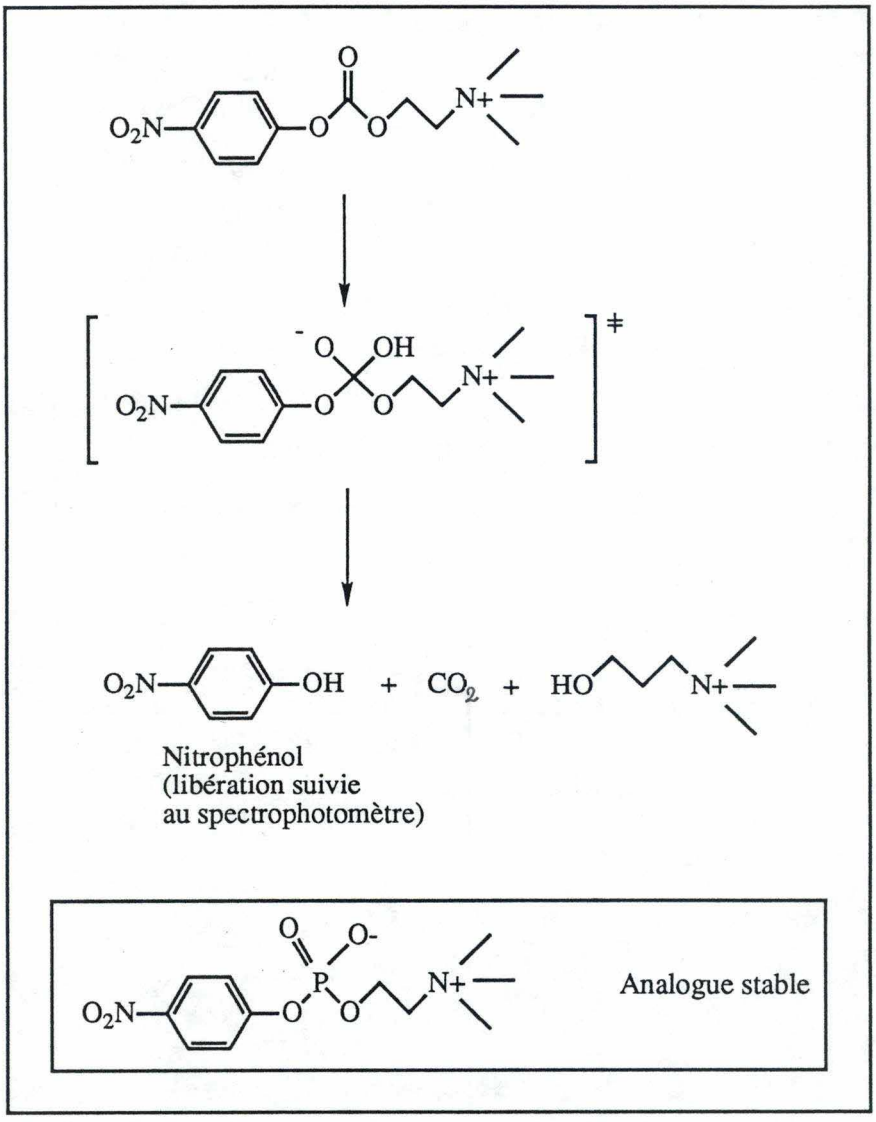


Schéma 19 :
Hydrolyse de la p-nitrophénylphosphorylcholine catalysée par MOPC 167



Le groupe de *Schultz* [29] a produit un anticorps monoclonal, nommé MOPC 167, capable d'hydrolyser la p-nitrophényl-phosphorylcholine (Schéma 19).

L'abzyme catalyse l'hydrolyse de ce composé avec une cinétique de type Michaëlis-Menten :

$$Ig + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Ig.S \xrightarrow{k_{cat}} Ig + P$$

$$v = \frac{k_{cat}\ [Ig]\ [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

Pour caractériser l'hydrolyse, on calcule un facteur d'accélération qui est le rapport de la constante de la réaction catalysée (k_{cat}) et de la constante de la réaction non catalysée (k_{uncat}) :

$$k_{cat}/k_{uncat}$$

Ce rapport reflète le rapport des affinités de l'enzyme pour l'analogue de transition (K_T) et le substrat (K_S) c'est-à-dire le rapport des constantes de dissociation :

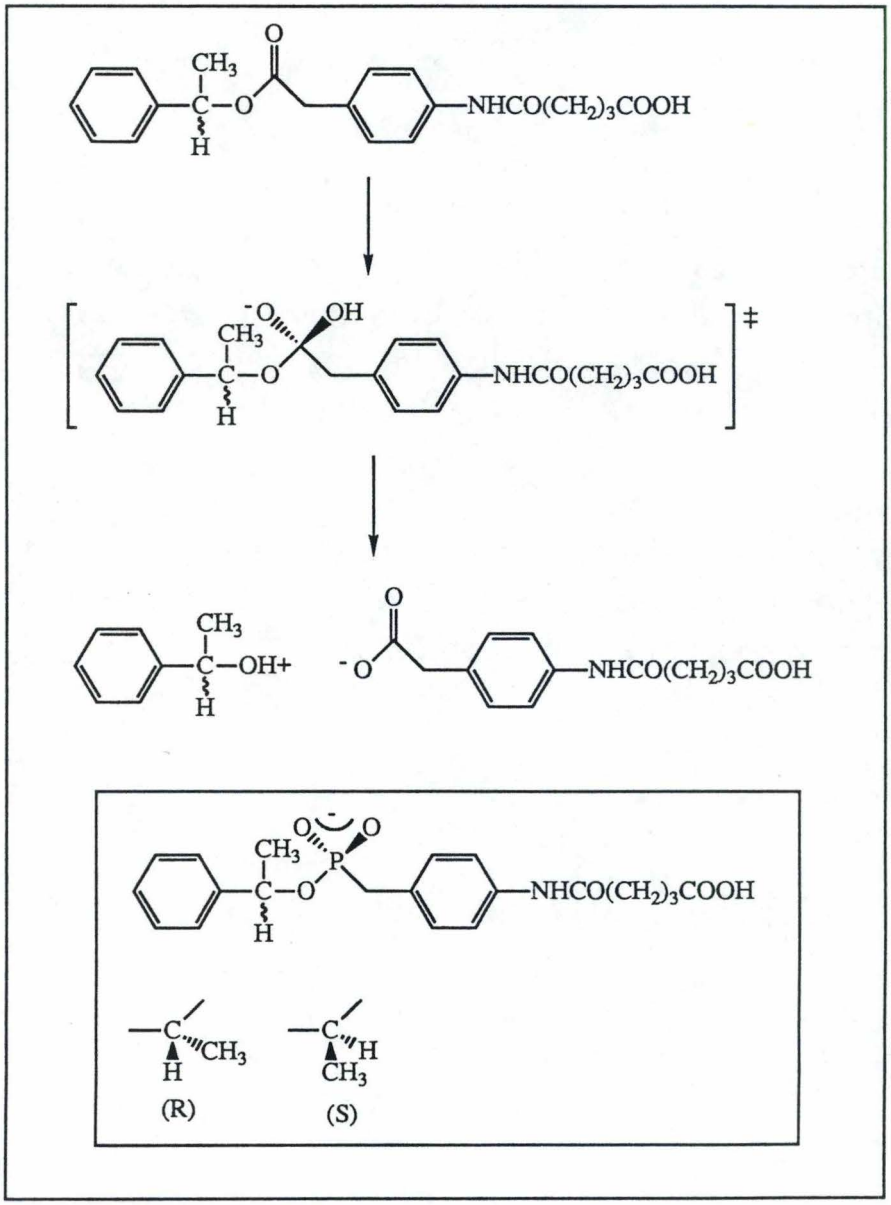
$$\begin{array}{ccccc} Ig + S & \rightleftharpoons & Ig + S & \xrightarrow{k_{uncat}} & Ig + P \\ K_S \Big\uparrow\Big\downarrow & & \Big\uparrow\Big\downarrow K_T & & \\ Ig.S & \rightleftharpoons & Ig.S & \longrightarrow Ig.P \xrightarrow{k_{cat}} & Ig + P \end{array}$$

$$\frac{k_{cat}}{k_{uncat}} = \frac{K_S}{K_T}$$

Schéma 20 :
Caractéristiques de MOPC 167

$k_{cat} = 0{,}4\ min^{-1}$
$K_m = 208\ \mu M$
$K_i = 5\ \mu M$ à 30°C
(inhibition par la p-nitrophénylphosphorylcholine)
$\frac{k_{cat}}{k_{uncat}} = 770$

Schéma 21 :
Hydrolyse stéréosélective de l'ester de l'alcool α-méthylbenzylique



MOPC 167 (Schéma 20) accélère la réaction environ 1000 fois par rapport à la réaction non catalysée mais cette accélération reste 5000 fois plus faible que celle obtenue avec l'enzyme catalysant la même réaction, l'α-chymotrypsine.

Mais comment être sûr d'avoir affaire à une catalyse au niveau du site combinant et non pas à une enzyme contaminante ?

Preuves :

- Activité hydrolytique inhibée par l'analogue de l'état de transition (l'haptène).
- Etude de la structure cristalline aux rayons X : site combinant complémentaire à la phosphorylcholine.
- Mutagenèse dirigée : rôle d'un résidu tyrosine du site combinant.
- Modification chimique : perte de l'activité catalytique après fixation irréversible d'un ligand.
- Spécificité de substrat : des modifications trop importantes dans la structure du substrat par rapport à celle de l'haptène correspondant entraînent une diminution d'activité.

Les anticorps sont également capables de catalyser des réactions énantiosélectives avec des excès énantiomériques élevés comme l'ont montré les travaux de *Lerner*.[30] En immunisant des souris avec le mélange racémique d'un analogue phosphonate (Schéma 21), Lerner a obtenu plusieurs anticorps monoclonaux chacun hydrolysant de façon sélective l'un ou l'autre des deux énantiomères.

3. Anticorps catalytiques *in vivo.*

L'activité catalytique n'est pas la fonction naturelle des molécules d'anticorps. Cependant, de telles immunoglobulines apparaîtraient *in vivo* seulement dans quelques rares circonstances.

Un autoanticorps catalytique humain a été découvert chez des patients asthmatiques.[31] Il s'agit d'un anticorps catalysant l'hydrolyse d'un lien peptidique du VIP (**V**asoactive **I**ntestinal **P**eptide), un neuropeptide de 28 acides aminés relaxateur de la musculature lisse. La déficience en VIP étant un des facteurs responsables de l'asthme, l'autoanticorps contribue ainsi indirectement à la maladie. La découverte de ce type d'anticorps dans les maladies auto-immunes laisse supposer l'existence de mécanismes naturels producteurs d'autoanticorps catalytiques.

4. Anticorps catalytiques : perspectives et applications.

Depuis 1986 de nombreux progrès ont été réalisés dans la conception des anticorps catalytiques : réactions de plus en plus complexes, sites actifs de plus en plus sophistiqués. Les deux approches générales existant actuellement pour le design d'anticorps catalytiques sont les suivantes :

1) Méthodes exploitant la complémentarité stérique et électronique d'un anticorps pour son haptène afin de générer un site combinant :

   - contenant des acides aminés correctement positionnés,
   - stabilisant les états de transition hauts en énergie,
   - orientant les partenaires dans des conformations réactives,
   - possédant des cofacteurs dans le site combinant.

2) Introduction directe de groupes catalytiques dans le site combinant de l'anticorps par :

   - mutagenèse dirigée,
   - modification chimique.

Schéma 22 :
Avantages et désavantages de la technologie des anticorps catalytiques

AVANTAGES	DESAVANTAGES
- Catalyseurs sur mesure conçus en quelques mois - Homogénéité de structure - Grande spécificité - Stabilité plus grande que celle des enzymes - Possibilité de fonctionnement : * en milieu organique * in vivo - Etude de l'évolution des sites actifs	- Technologie très complexe - Faible nombre de turn-over - Vitesse de réaction la plus souvent inférieure à celle atteinte avec les enzymes - Trop grande spécificité - Procédé inapplicable aux réactions dont le mécanisme est inconnu

Les applications potentielles des abzymes couvrent la transformation de substrats qui ne sont pas reconnus par des enzymes et la production d'agents thérapeutiques. A cela s'ajoute la compréhension de l'évolution des sites actifs enzymatiques vers leur structure parfaitement adaptée à la fonction qu'ils remplissent.

En principe, la catalyse par les abzymes est envisageable pour toute réaction dont le mécanisme est connu et pour autant que la réaction soit compatible à un environnement aqueux et non nuisible aux immunoglobulines. Ceci restreint l'usage des abzymes à un milieu biologique. Mais de récents travaux ont montré qu'il était possible d'étendre l'utilisation des abzymes dans des solvants organiques [32] par des techniques de micelles inverses [33] ou d'immobilisation des anticorps sur supports. De tels procédés sont applicables à l'échelle industrielle.

Les abzymes se révèlent de plus aussi efficaces in vivo qu'in vitro. Récemment, une souche de levure déficiente en l'enzyme chorismate mutase (impliquée dans la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine) a été enrichie du gène codant pour un anticorps qui catalyse la même fonction.[34] Cette expérience montre donc qu'un anticorps avec une activité catalytique peut fonctionner in vivo pour compléter une voie métabolique défectueuse.

De nouvelles fonctions catalytiques peuvent aussi être créées dans des cellules eucaryotes, fonctions incluant des transformations sans équivalents biologiques.

Des progrès sont à attendre pour augmenter l'efficacité des abzymes car leur plus grosse limitation est leur faible nombre de turn-over (Schéma 22). Il faudra déterminer comment en changeant la structure d'un immunogène, il est possible de changer les paramètres cinétiques dans un sens favorable.

Schéma 23 :

Comparaison des différentes classes d'insecticides [38]

	Ventes en millions de $ (1974)	Toxicité sur rat en mg/kg	Dose de traitement en kg/hectare
Organochlorés	320	230	0,5 à 3
Organophosphorés	1002	67	0,6
Carbamates	445	45	0,7
Pyréthrinoïdes	1200 (1989)	700	0,01 à 0,2

La technologie des anticorps catalytiques est un exemple intéressant des opportunités qui se présentent lorsque chimie et biologie travaillent conjointement pour exploiter la richesse des molécules disponibles dans la nature.

E. L'ACIDE CHRYSANTHEMIQUE.

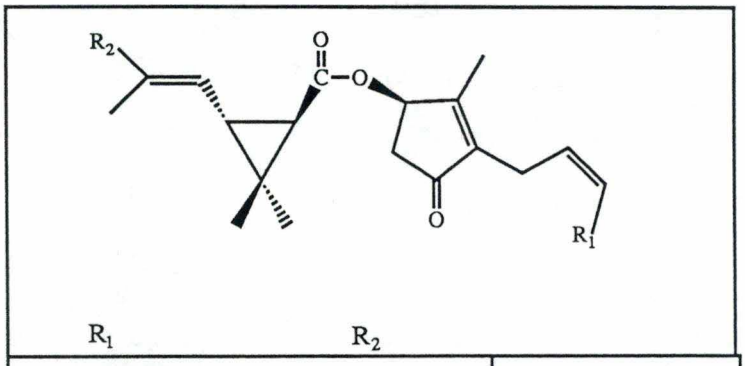
L'acide chrysanthémique est un composé naturel dont l'ester dérivé d'une jasmolone est un insecticide naturel puissant de la famille des pyréthrinoïdes. Après une brève description de ces insecticides, nous présenterons la voie de synthèse de l'acide chrysanthémique et nous insisterons sur l'intérêt de disposer de catalyseurs énantiosélectifs pour une telle synthèse.

1. Les pyréthrinoïdes.

Depuis l'apparition des premiers phénomènes de résistance des insectes au 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthane ou DTT, le développement de nouveaux insecticides a été très rapide au cours des dernières décennies. Les insecticides les plus utilisés actuellement sont des insecticides organiques [35] (Schéma 23) dont il existe plusieurs grandes familles :

- Organochlorés (ex. : DDT)
- Organophosphorés
- Carbamates
- **Pyréthrinoïdes** : - naturels (ex. : Pyréthrine)
  - synthétiques (ex. : Deltaméthrine)

Schéma 24 :
Composants de la poudre de pyrèthre



R_1	R_2	
$CH_2=CH$	CH_3	Pyréthrine I
CH_3	CH_3	Cinérine I
C_2H_5	CH_3	Jasmoline I
$CH_2=CH$	CO_2CH_3	Pyréthrine II
CH_3	CO_2CH_3	Cinérine II
C_2H_5	CO_2CH_3	Jasmoline II

Schéma 25 :
Stéréochimie de l'acide chrysanthémique

Les pyréthrinoïdes naturels sont composés d'acide chrysanthémique (1R, 3R)-*trans*

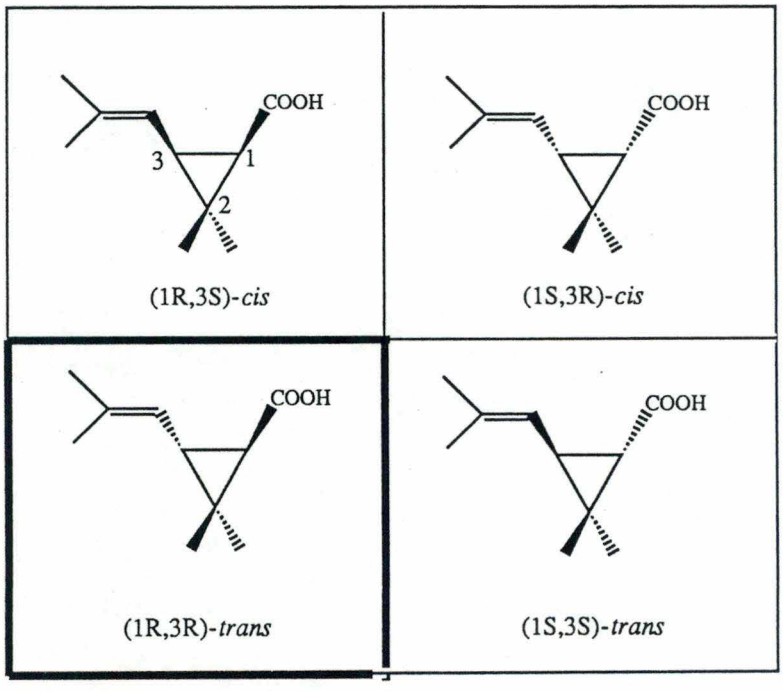


Schéma 26 :
Mode d'action de la pyréthrine [36]

La pyréthrine est un insecticide de contact c'est-à-dire qu'elle traverse le tégument avant d'atteindre sa cible. Etant très liposoluble, elle franchit rapidement la cuticule cireuse des insectes pour atteindre sa cible.

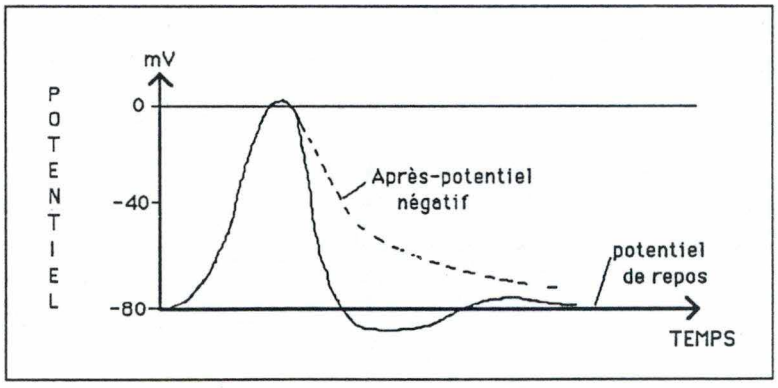
- Combinaison avec le récepteur.

La puissance insecticide des pyréthrinoïdes dépend fortement de la stéréochimie des carbones adjacents au lien ester. Ce sont certains esters dérivés de l'acide chrysanthémique 1(R)-*cis* qui sont les insecticides les plus toxiques. Un centre d'insaturation doit être présent dans la partie alcool servant de donneur d'électrons dans la formation du complexe avec le site récepteur.

L'interaction entre la pyréthrine et le récepteur biologique est conditionnée par une reconnaissance de forme mutuelle. Pour la combinaison avec le récepteur, un modèle "zipper" a été proposé : une partie après l'autre de la molécule de pyréthrinoïde se lierait à son complémentaire au niveau du récepteur.

- Toxicité des pyréthrinoïdes.

Les pyréthrinoïdes ont une action élective sur les centres nerveux. Ils interagissent avec une fraction des canaux permettant le transfert des ions sodium à travers la membrane neuronale. La modification de ces canaux conduit au prolongement du courant sodium et l'on observe par la technique du voltage imposé un après-potentiel dépolarisant faisant suite au potentiel d'action (en traits continus, évolution du potentiel d'une membrane neuronale saine suite à une stimulation; en pointillé, potentiel d'une membrane nerveuse traitée aux pyréthrinoïdes) :



A de fortes concentrations en pyréthrinoïdes, les perméabilités Na^+ et K^+ sont toutes les deux supprimées et il y a blocage du potentiel d'action.

En raison de leurs faibles toxicités pour les animaux à sang chaud et de leurs effets rapides sur les insectes (effet "knock down"), les pyréthrinoïdes demeurent parmi les insecticides les plus puissants.

a) Pyréthrinoïdes naturels.

Les pyréthrinoïdes naturels sont extraits du pyrèthre de Dalmatie ou chrysanthème insecticide (*Pyrethrum cinerariaefolium*).

Ce sont les capitules (disque jaune et ligules blanches) qui, séchés et pulvérisés, constituent la poudre de pyrèthre. La teneur en principes actifs dans les capitules varie de 0,6 à 2 % du poids sec. Il s'agit d'un mélange de 6 esters [14] (Schéma 24) provenant de l'union d'un des deux acides (**acide chrysanthémique** ou acide pyréthrique) avec un des trois alcools (pyréthrolone, cinérolone et jasmolone).

Les pyréthrines naturelles dérivent du stéréoisomère 1(R)-*trans* de l'acide chrysanthémique (Schéma 25). La pyréthrine I est la plus abondante (70 %) et aussi la plus active de la série.

Les pyréthrinoïdes sont typiquement des poisons du système nerveux,[36] causant successivement excitation, convulsions, paralysie et mort des insectes et des animaux à sang froid (voir mode d'action au schéma 26). Ils sont par contre peu toxiques par ingestion pour les animaux à sang chaud car ils sont rapidement dégradés par des estérases et oxydases.

Les pyréthrines, outre leur emploi comme insecticides, sont également utilisées contre les parasites externes des animaux et par voie interne contre les helminthes.

b) Pyréthrinoïdes synthétiques.

Les pyréthrinoïdes synthétiques (Schéma 27) sont plus stables à la lumière et à l'air que les pyréthrinoïdes naturels qui sont sensibles à la photooxydation.[37]

Schéma 27 :
Pyréthrinoïdes synthétiques

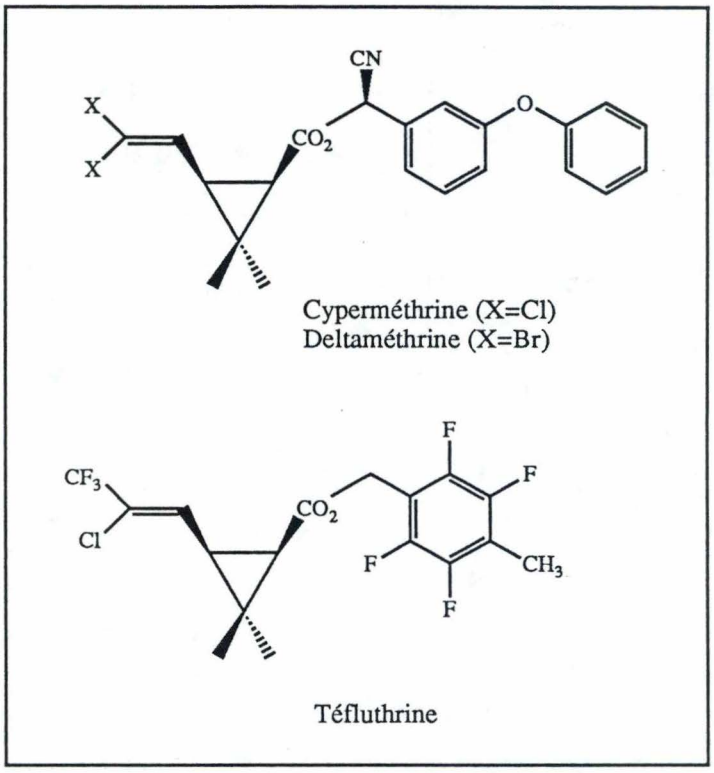
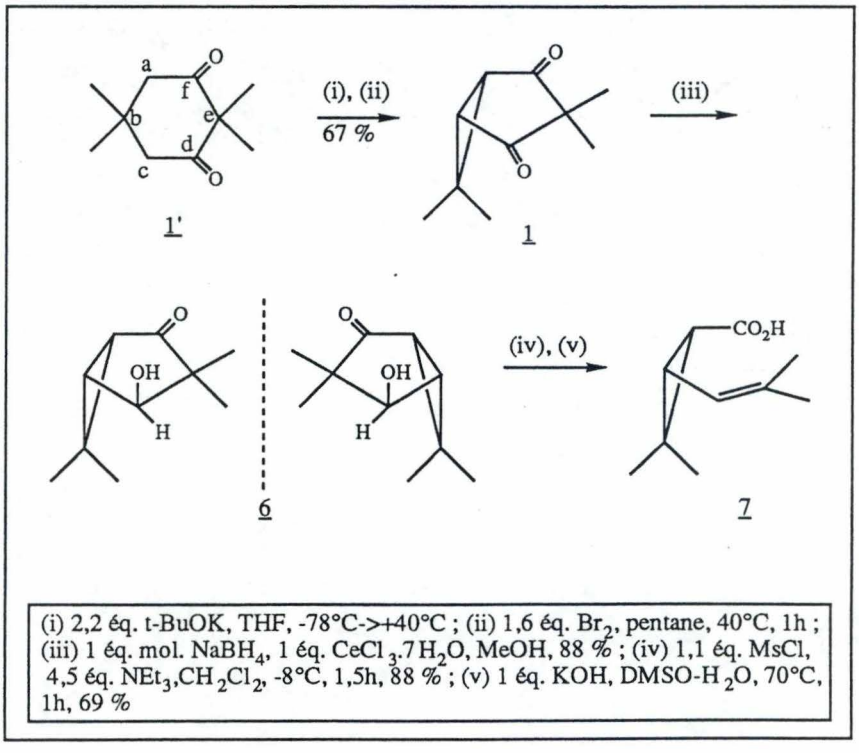


Schéma 28 :
Synthèse diastéréosélective de l'acide *cis*-chrysanthémique



(i) 2,2 éq. t-BuOK, THF, -78°C->+40°C ; (ii) 1,6 éq. Br_2, pentane, 40°C, 1h ; (iii) 1 éq. mol. $NaBH_4$, 1 éq. $CeCl_3.7H_2O$, MeOH, 88 % ; (iv) 1,1 éq. MsCl, 4,5 éq. NEt_3,CH_2Cl_2, -8°C, 1,5h, 88 % ; (v) 1 éq. KOH, DMSO-H_2O, 70°C, 1h, 69 %

Le remplacement des deux méthyles de la double liaison par des halogènes est responsable de cette plus grande stabilité, ce qui confère aux dérivés qui les portent un effet insecticide plus puissant.[38] Leur mode d'action est cependant identique à celui des pyréthrines naturelles.

Ce sont les stéréoisomères 1(R)-*cis* possédant deux halogènes en lieu et place des méthyles qui sont les insecticides les plus puissants.

2. Synthèse de l'acide chrysanthémique.

a) Synthèse diastéréosélective.

Le Laboratoire de Chimie Organique des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur a mis au point une méthode de synthèse stéréosélective de l'acide (d,l)-*cis*-chrysanthémique reprise au schéma 28.[12,13] Cette méthode utilise des réactifs bon marché compatibles avec un développement industriel.

La 2,2,5,5-tétraméthyl cyclohexane-1,3-dione 1' est le produit de départ. Elle possède non seulement la même formule que l'acide chrysanthémique mais aussi le squelette carboné et les groupes fonctionnels correctement positionnés pour permettre la synthèse en un minimum d'étapes (Schéma 28).

Les étapes clés sont :

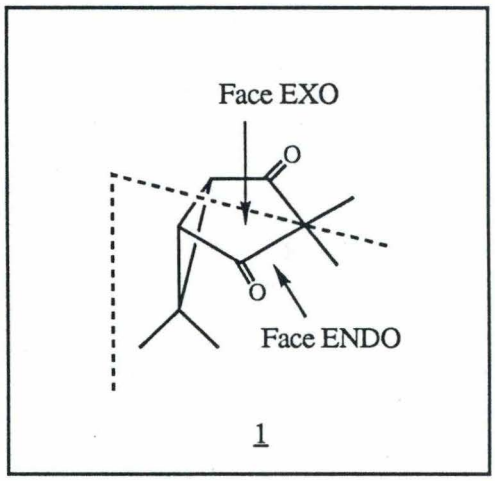
(i),(ii) : la cyclopropanation = formation d'un lien carbone-carbone entre C_a et C_c (la tension de cycle impose la jonction cis entre les deux cycles),

(iii) : la réduction d'une des fonctions carbonyles,

(iv),(v) : la fragmentation de Grob = rupture du cyclopentane avec formation concomittante des groupes carboxylique et vinyle.

La réduction de la dicétone 1 par le borohydrure de sodium fournit majoritairement le cétoalcool **ENDO**, l'attaque de l'hydrure se faisant par la face EXO convexe moins encombrée. Or il a été montré que seul le cétoalcool **EXO** (4-hydroxy 3,3,6,6-tétraméthyl bicyclo[3.1.0]hexane-2-one) pouvait conduire à l'acide chrysanthémique souhaité.

Schéma 29 :
Structure de la dicétone achirale

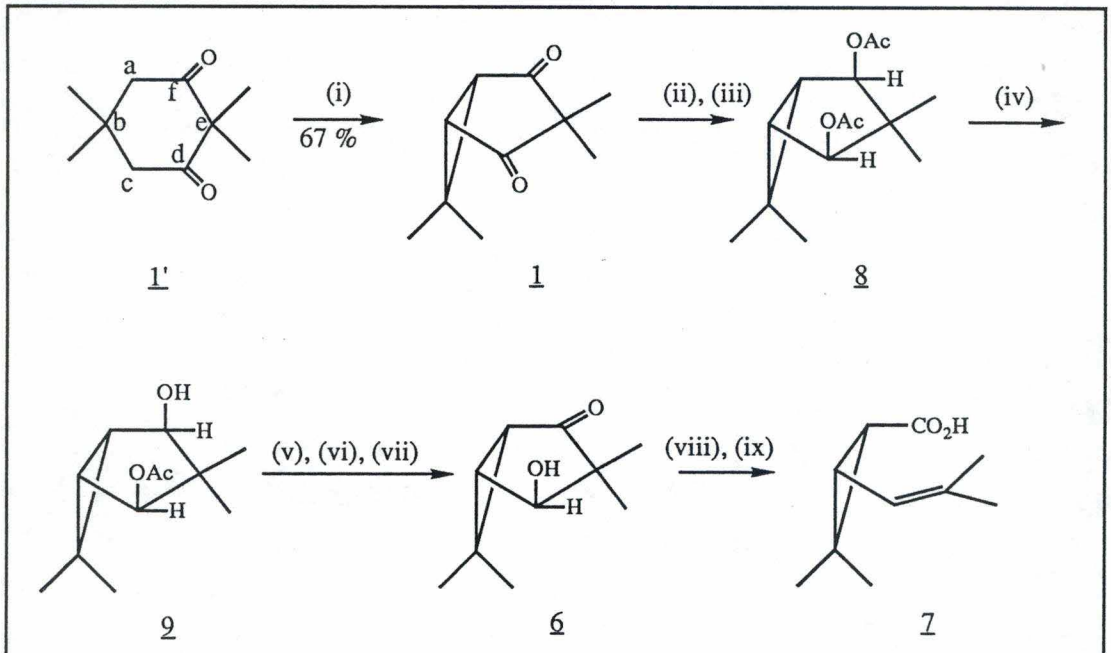


1

L'utilisation du mélange trichlorure de cérium ($CeCl_3.7\ H_2O$) et borohydrure de sodium ($NaBH_4$) à basse température (-78°C) a permis la synthèse du racémate des alcools EXO. Dans ces conditions, le rapport EXO/ENDO atteint 96/4. Cette stéréosélectivité pourrait être due à la complexation de la face EXO la moins encombrée de la dicétone. La présence du groupe méthyle en ENDO est en effet cruciale pour la réduction stéréosélective.[13] Son rôle pourrait être d'encombrer la face ENDO et par conséquent favoriser la complexation de l'autre face par le $CeCl_3$ (Schéma 30) qui favoriserait l'approche de l'hydrure par la face ENDO.

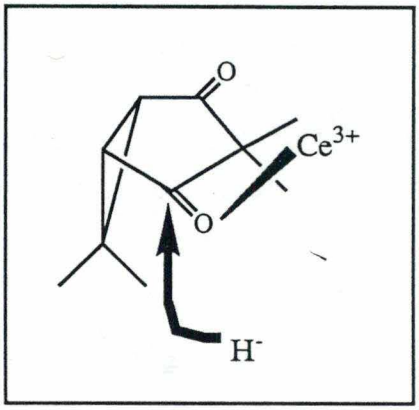
Schéma 31 :

Synthèse énantiosélective de l'acide *cis*-chrysanthémique



(i) 2,2 éq. t-BuOK, THF, -78°C -> 40°C ; 1,6 éq. Br_2, pentane, 40°C, 1h ;
(ii) 2,4 éq. $NaBH_4$, 2,0 éq. $CeCl_3.7H_2O$, MeOH, -78°C, 84 % ; (iii) 2,2 éq. Ac_2O, pyridine, DMAP, CH_2Cl_2, 20°C, 2 h, 86 % ; (iv) PLE, pH = 6,9-7,0, 32°C, 92 %, ee > 98 % ; (v) 1,5 éq. PCC, CH_2Cl_2, 25°C, 1 h, 82 % ; (vi) 1,2 éq. K_2CO_3, MeOH, 25°C, 0,7 h, 88 %; (vii) 1,2 éq. MsCl, 4,5 éq. NEt_3, CH_2Cl_2, -8°C, 0,5 h, 86 % ; (viii) 6 éq. KOH, DMSO-H_2O, 70°C, 0,5 h, 69 % ; (ix) HCl 10 %, 81 %

Schéma 30 :
Rôle du trichlorure de cérium



Bien que ce schéma réactionnel permet d'obtenir l'acide chrysanthémique en peu d'étapes, il demeure le problème de stéréochimie liée au cétoalcool.

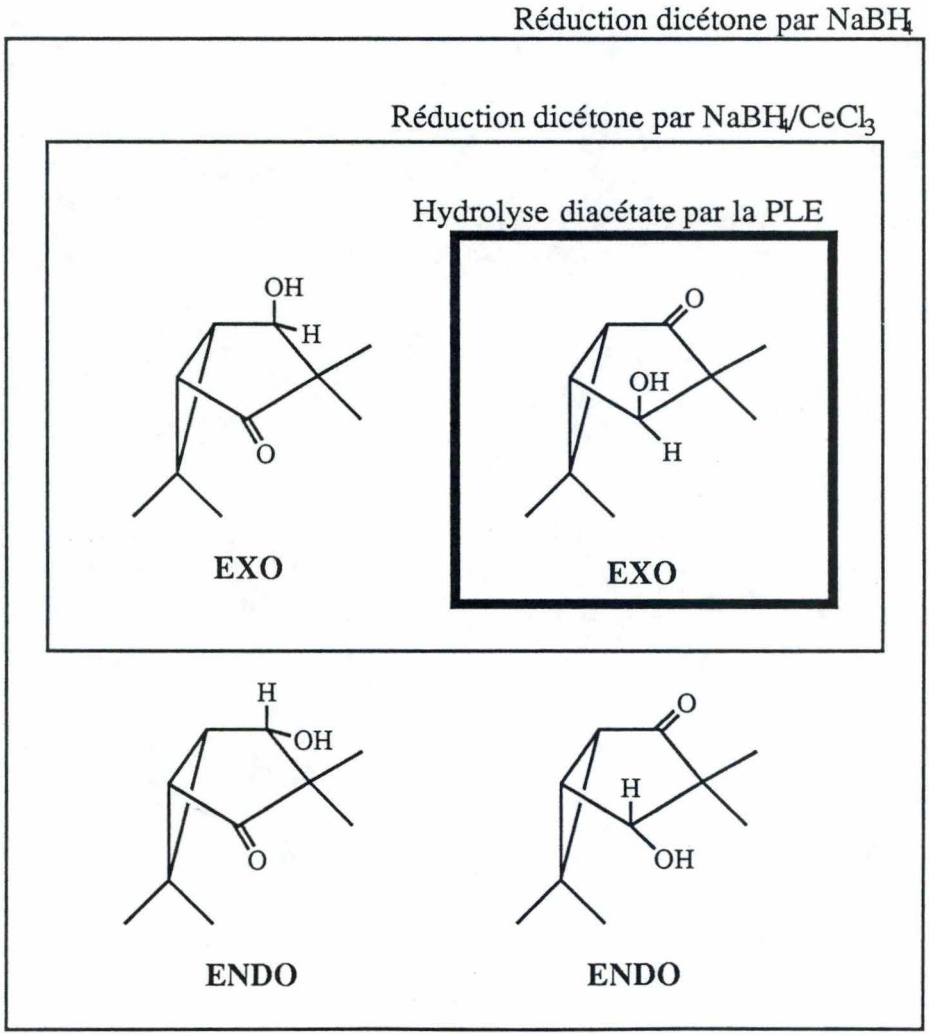
b) Synthèse énantiosélective.

Une autre approche fait appel à une enzyme, l'estérase de foie de porc (PLE). La dicétone est réduite en diol bis EXO. La di-acétylation de celui-ci, suivie de son hydrolyse énantiosélective en hydroxyacétate conduit en quelques étapes au cétoalcool optiquement actif. L'acide chrysanthémique *cis* optiquement actif est obtenu après mésylation de ce cétoalcool et fragmentation de Grob du mésylate correspondant (Schéma 31).[12]

Schéma 32 :

Obtention du alcool EXO

La réduction de la dicétone par le $NaBH_4$ conduit au mélange des diastéréoisomères ENDO et EXO, la forme ENDO étant majoritaire. L'emploi de $CeCl_3$ permet l'obtention du mélange racémique EXO. L'autre approche fait appel à une enzyme et aboutit à l'énantiomère EXO désiré.



F. BUT DU TRAVAIL.

Nous venons donc de voir que l'étape critique de la synthèse de l'acide chrysanthémique optiquement pur est l'obtention par transformation de la dicétone d'un seul énantiomère du cétoalcool EXO (Schéma 32).

Notre travail se situe dans le cadre d'un vaste projet visant à la production d'une abzyme capable de catalyser la réduction énantiosélective de la dicétone en alcool EXO.

Avant d'entamer un tel projet, nous avons voulu en jeter les bases durant ce mémoire. Il s'agit pour nous de mettre au point l'ensemble des techniques de synthèse d'haptènes, de couplage, d'immunisation et de détection d'anticorps anti-haptène. Connaissant l'énantiosélectivité potentielle des anticorps, nous comptons immuniser des souris avec le mélange racémique de l'alcool EXO couplé à une protéine porteuse.

La réactivité des anticorps avec le racémate immunisant sera évaluée. Des anticorps monoclonaux seront ensuite produits et leur spécificité sera définie.

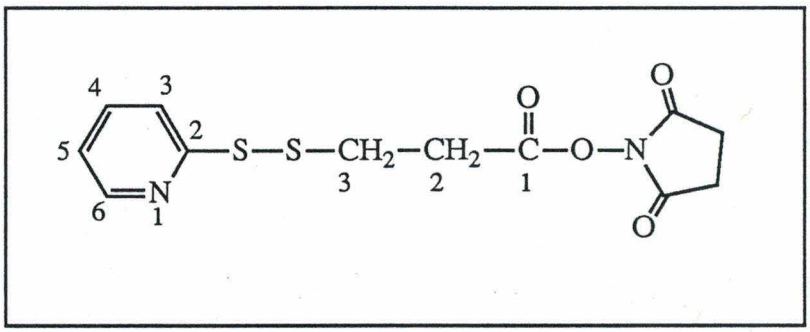
II. MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

A. CONCEPTION ET SYNTHESE DE L'HAPTENE.

Pour coupler l'alcool EXO à une protéine porteuse, nous avons choisi d'utiliser un agent hétérobifonctionnel bien connu au laboratoire, le 3-(2-pyridyldithio)propionate de succinimidyle ou **SPDP** (Schéma 33).[39] Le SPDP permet de lier un groupe thiol et un groupe amine primaire. Ce couplage peut être suivi par spectrophotométrie grâce à l'absorbance à 343 nm de la thiopyridine libérée.

Schéma 33 :
Structure du 3-(2-pyridyldithio)propionate de succinimidyle



Pour utiliser cet agent bifonctionnel, nous devons modifier le cétoalcool EXO afin qu'il possède un groupe thiol susceptible de réagir avec le SPDP. Dans le but de prévenir les répulsions stériques éventuelles entre anticorps anti-haptène et la protéine porteuse, le groupe thiol ne sera pas porté directement par la struture bicyclique mais terminera un spacer greffé en C2, pour des raisons de simplicité de synthèse (Schéma 34). La structure d'un tel haptène est celle d'un thioalcool 5.

Schéma 35 :

Voie de synthèse du thioalcool (P. Pasau et T. Ollevier)

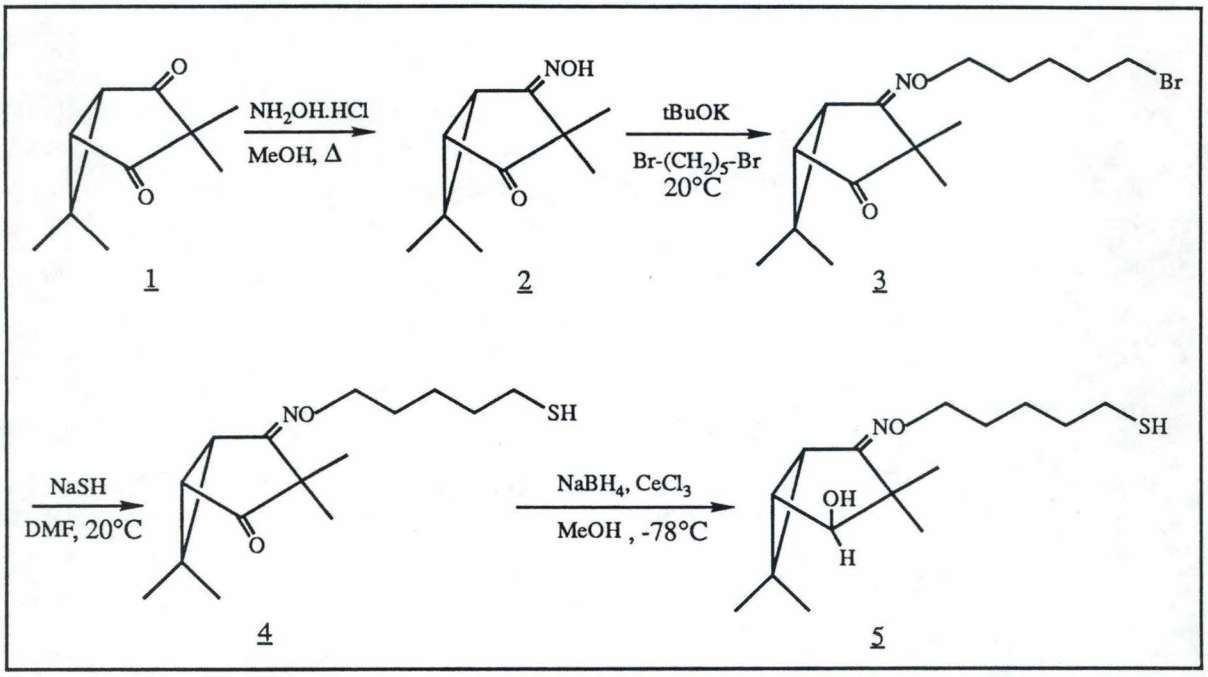
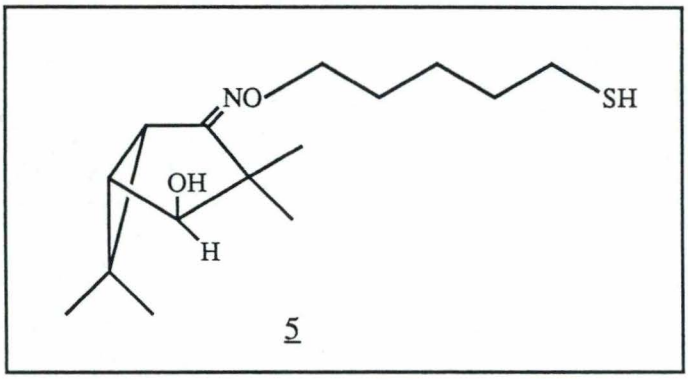


Schéma 34 :
Structure de l'hatène modifié en vue de son couplage à un carrier via le SPDP



5

Les travaux préliminaires de synthèse de cet haptène ont été effectués au laboratoire de chimie organique des FUNDP par le Dr. D. Surleraux. La synthèse de cet haptène a été proposée par le Dr. P. Pasau et T. Ollevier. Elle comporte 4 étapes à partir de la dicétone 1 . Celle-ci est tout d'abord convertie en mono-oxime 2 qui est ensuite alkylée pour conduire en trois étapes successives au thioalcool 5 désiré (Schéma 35).

1. Considérations techniques.

a) Techniques spectroscopiques.

1. *Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire* (RMN ^{1}H).

Principe : Le proton ^{1}H est un petit noyau chargé qui crée en tournant sur lui-même un champ magnétique. On dit que le ^{1}H possède un spin. Placé entre les pôles d'un aimant, le noyau peut prendre 2 orientations différentes d'un point de vue énergétique (Schéma 36) :

- alignement avec le champ appliqué (énergie plus faible).
- alignement contre le champ appliqué (énergie plus élevée).

Schéma 36:
Séparation des niveaux énergétiques de spin

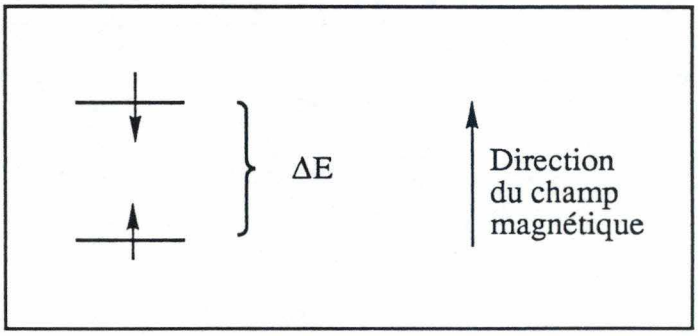
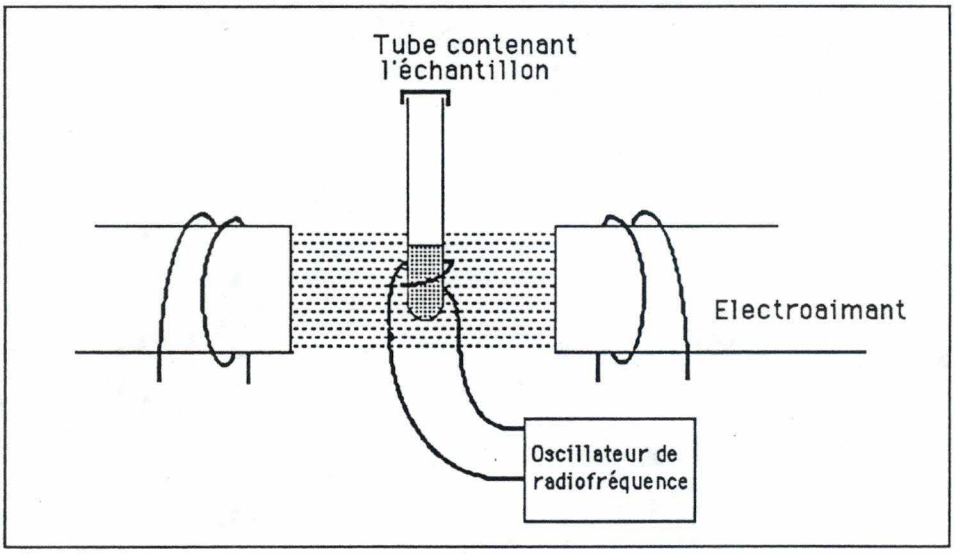


Schéma 37 :
Spectromètre de résonance magnétique nucléaire



En faisant varier la fréquence de l'oscillateur de radiofréquence, on atteindra celle dont l'énergie correspond précisément à la différence d'énergie entre les 2 orientations du spin. Cette énergie est absorbée par les noyaux qui sont dits en résonance magnétique nucléaire.[40]

La fréquence à laquelle résonne un proton dépend de son environnement dans la molécule. Plus un proton est protégé du champ magnétique par le mouvement des électrons (plus il est "blindé"), plus le champ magnétique pour le faire résonner sera élévé (Schéma 37). Le tétraméthylsilane (TMS) est le composé de référence. Ses protons sont tous identiques et très blindés et ils donnent un signal unique dans les basses fréquences. Les différents pics sont situés par rapport au TMS en unités δ (déplacement chimique en ppm).

Appareil : Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)^{1}H sont enregistrés, à température ambiante, sur un spectromètre JEOL CFX 90Q. Les produits sont analysés en solution dans le chloroforme deutéré ($CDCl_3$).

2. *Spectroscopie infrarouge (IR).*

Principe : Les énergies du domaine infrarouge permettent aux liaisons chimiques d'entrer en vibration.[41] L'appareil envoie de l'énergie lumineuse sur l'échantillon et puis mesure le pourcentage d'énergie transmise. Chaque bande du spectre correspond à l'absorption d'une radiation.

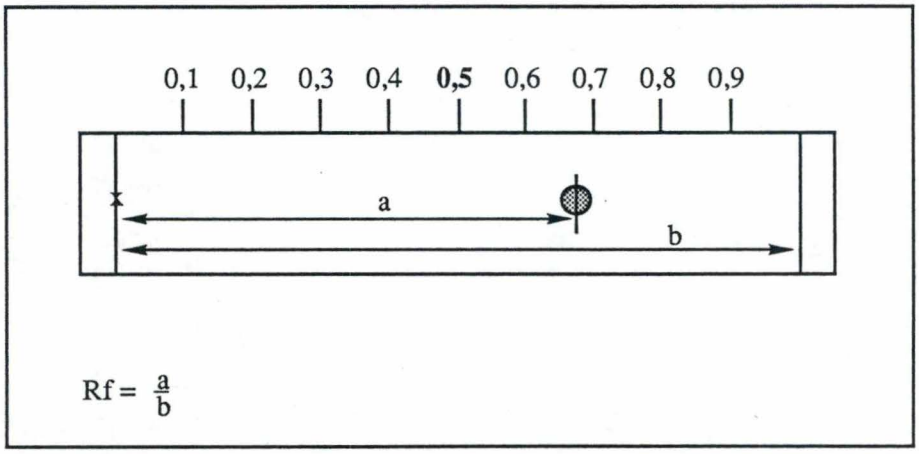
Appareil : Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur spectromètre PERKIN ELMER 933. Les fréquences d'absorption sont exprimées en cm^{-1} dans une gamme de 4000 cm^{-1} à 600 cm^{-1}. Les liquides sont analysés à l'état pur sous forme de film sur des cellules de chlorure de sodium. Les solides sont, quant à eux, dispersés dans du bromure de potassium anhydre et analysés sous forme de pastilles.

b) Techniques chromatographiques.

1. *Chromatographie analytique sur couche mince (TLC (Thin Layer Chromatography)).*

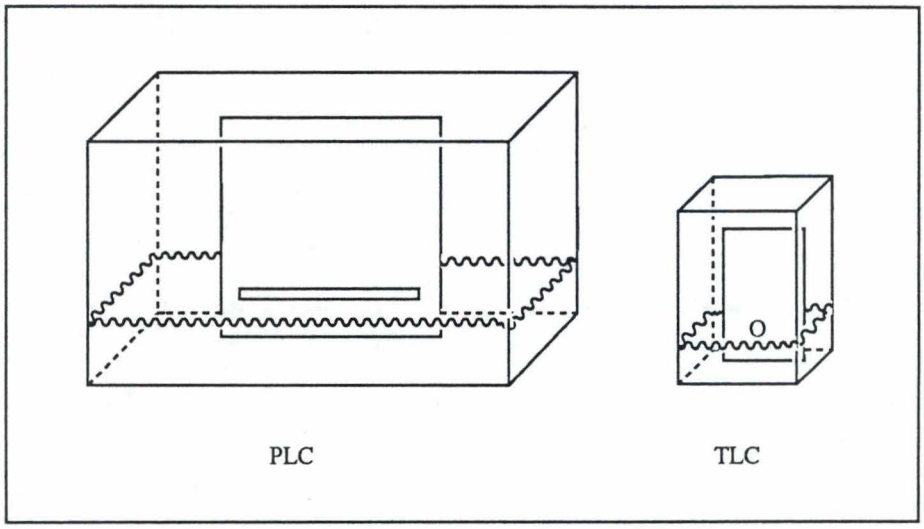
Principe : Cette technique analytique utilise des plaques recouvertes d'une couche de phase stationnaire solide (silice). La plaque est placée dans une cuve saturée avec les vapeurs du solvant (Schéma 38). Après migration du solvant, les spots des différents composants de l'échantillon sont mis en évidence par un spray d'acide phosphomolybdique (10 %) dans l'éthanol ou par UV. Chaque spot est caractérisé par une valeur de Rf (Schéma 38).

Schéma 38 :
Signification du Rf



Matériel : Les chromatographies analytiques sur couche mince ont été réalisées sur plaques MERCK (Silicagel gel 60PF254 ; 0,25 µm) et ont été révélées par aspersion d'acide phosphomolybdique 10% dans l'éthanol suivi d'un chauffage de la plaque à 110°C.

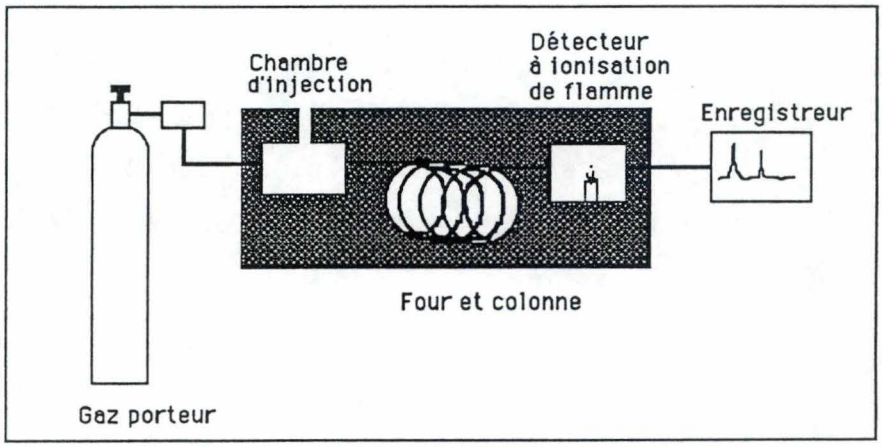
Schéma 39:
Cuves de chromatographie et plaques (préparative et analytique)



Préparation des plaques préparatives :

Une masse de 440 g de gel de silice est mise en suspension dans 880 ml d'eau distillée. A l'aide d'un appareil, les plaques de verre sont couvertes d'une épaisseur de 1,5 mm de gel de silice. Après avoir été maintenues pendant une heure dans une atmosphère saturée en eau, les plaques sont séchées à température ambiante. Les plaques sèches sont alors activées avant utilisation par chauffage à 140°C pendant 10 heures au minimum.

Schéma 40 :
Chromatographe en phase gazeuse



2. *Chromatographie préparative sur couche mince (PLC (Preparative Layer Chromatography)).*

Principe : le principe est identique à la TLC mais la technique est préparative (Schéma 39).

Matériel : Les chromatographies préparatives sur couche mince (PLC) ont été effectuées sur des plaques préparées au laboratoire.

3. *Chromatographie en phase gazeuse (GC (Gas Chromatography)).*

Principe : Un gaz porteur (phase mobile) entraîne l'échantillon le long d'une colonne couverte d'un polymère. Plus un composant du mélange injecté a de l'affinité pour le polymère, plus tard il sortira de la colonne. Le détecteur à ionisation de flamme renseigne la sortie d'un composant sous forme d'un pic caractérisé par son temps de rétention (RT) et son aire (Schéma 40).

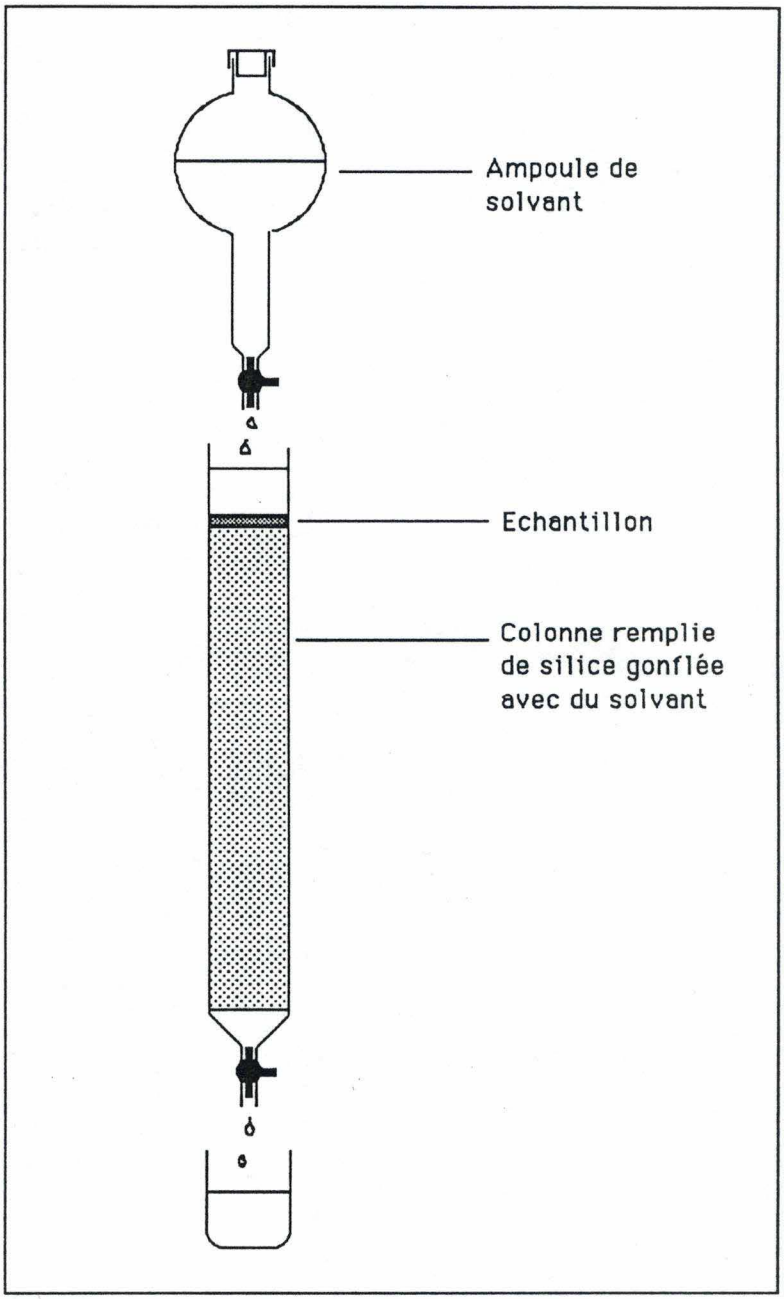
Appareil : Les chromatographies en phase gazeuse ont été réalisées sur un appareil HEWLETT-PACKARD 5890 dans les conditions suivantes :

- pression du gaz porteur (hélium) : 4 bars
- pression d'hydrogène : 2 bars
- pression d'air : 2 bars
- colonne Superox : diamètre = 0,25 mm
  longueur = 25 m
- température de l'injecteur et du détecteur : 250°C

4. *Chromatographie sur colonne humide* .

Principe : L'échantillon est déposé sur une colonne cylindrique remplie de silice préalablement gonflée avec l'éluant (Schéma 41).

Schéma 41 :
Chromatographie sur colonne humide



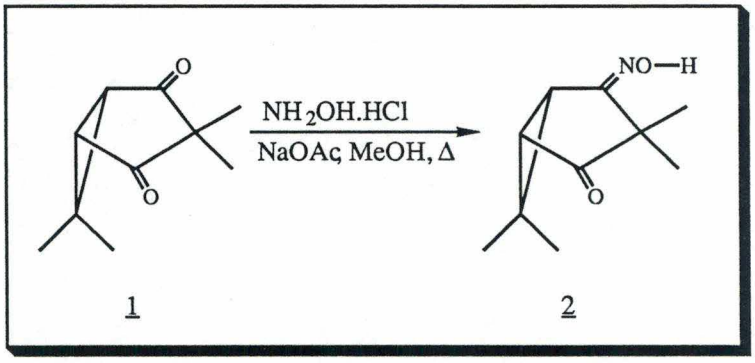
Une ampoule de solvant est placée au-dessus de la colonne. Des fractions (± 25 ml) sont récoltées et analysées par TLC.

Matériel : Les chromatographies sur colonne humide ont été réalisées avec de la silice MERCK 7734 (granulométrie = 63-200 µm, pH = 7). Les solvants utilisés seront décrits dans chaque expérience.

2. Modes opératoires.

1. Synthèse de l'oxime 2.

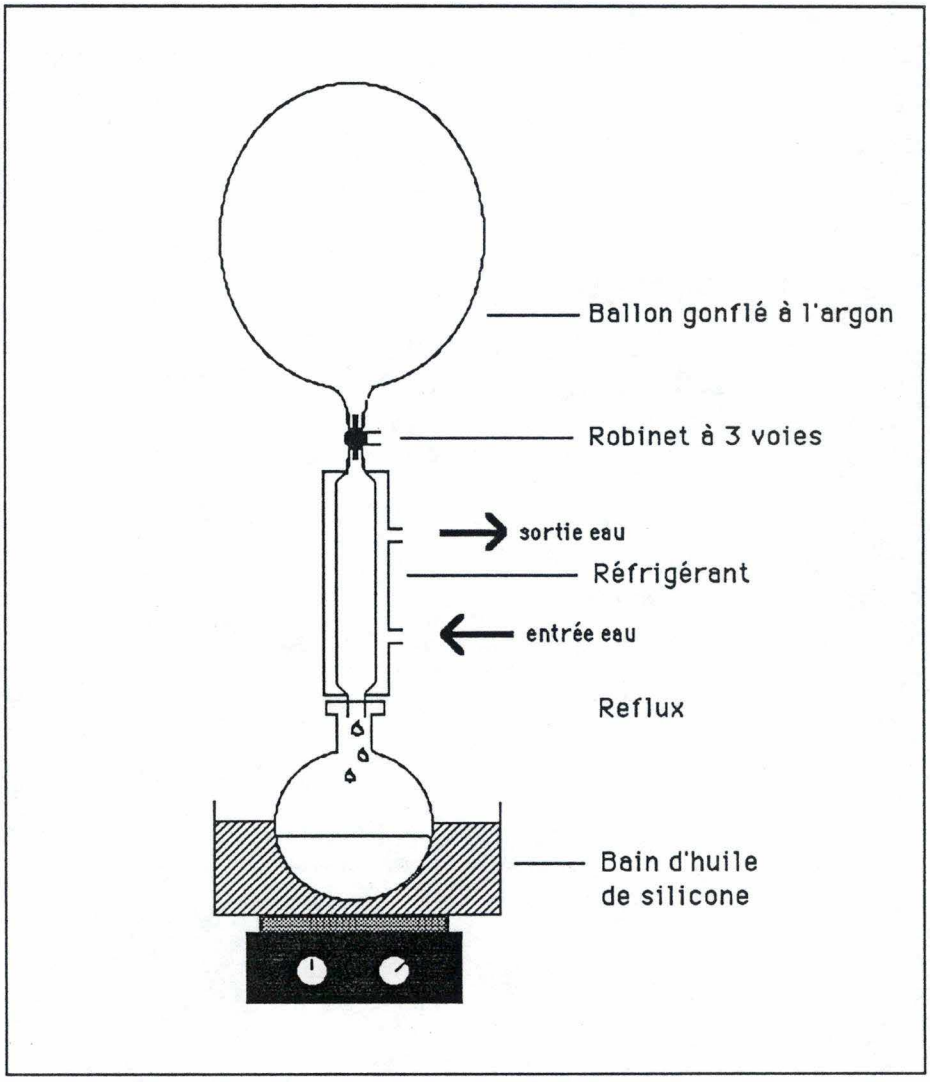
Schéma 42



Protocole :

Dans un monocol de 50 ml (Schéma 43), on porte à reflux pendant 15 heures sous atmosphère d'argon une solution de méthanol contenant la dicétone 1 (1 g, 6 mmoles), le chlorhydrate d'hydroxylamine (630 mg, 9 mmoles) et l'acétate de sodium (750 mg, 9 mmoles). Le milieu réactionnel est hydrolysé avec 10 ml d'une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium. Après avoir éliminé une partie du méthanol par évaporation sous vide (évaporateur rotatif), le mélange est extrait à l'éther (4 fois). La phase organique récupérée est lavée 3 fois à l'eau et puis séchée sur sulfate de magnésium.

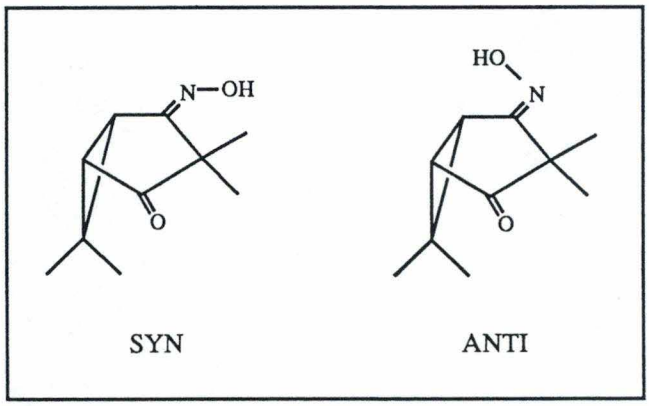
Schéma 43 :
étape 1



Après filtration et évaporation des solvants à l'aide d'un évaporateur rotatif, on récupère le brut réactionnel B1 (1,052 g) sous forme d'un solide brun.

Le mélange réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice (pentane/éther (75/25)). Trois fractions sont récupérées, l'oxime 2a pure (785 mg, rendement = 48 %), l'oxime 2b et la dioxime.

Schéma 44 :
Stéréoisomères de l'oxime



Caractéristiques de l'oxime 2a :

- TLC (éther/pentane (50/50) (v:v)) : Rf = 0,59

- GC (colonne Superox, température initiale = 140°C puis augmentation de 10°C par minute, température finale = 220°C) : RT = 7,7 minutes

- RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ = 0,92-1,48 (massif, 12H, 4 C$\underline{H}_3$)
  δ = 2,16 (d, J = 4,4 Hz, 1H, C$\underline{H}$ cycl.)
  δ = 2,82 (d, J = 4,7 Hz, 1H, C$\underline{H}$ cycl.)
  δ = 8,96 (bs, 1H, NO$\underline{H}$)

- IR (film) : 3371, 2967, 2929, 1714, 1660, 1378, 1296

Caractéristiques de l'oxime 2b :

- TLC (éther/pentane (50/50) (v/v)) : Rf = 0,43

- GC (colonne Superox, température initiale = 140°C puis augmentation de 10°C par minute, température finale = 220°C) : RT = 8,7 minutes

- RMN^{1}H ($CDCl_3$) : δ = 1,14 (s, 3H, 1 C$\underline{H}_3$)
  δ = 1,21 (s, 3H, 1 C$\underline{H}_3$)
  δ = 1,37 (s, 3H, 1 C$\underline{H}_3$)
  δ = 1,14 (s, 3H, 1 C$\underline{H}_3$)
  δ = 2,22 (d, J = 5 Hz, 1H, C$\underline{H}$ cycl.)
  δ = 2,45 (d, J = 5 Hz, 1H, C$\underline{H}$ cycl.)
  δ = 9,44 (bs, 1H, NO$\underline{H}$)

- IR (film) : 3252, 2925, 1734, 1671, 1460, 1379, 1281

Nous avons choisi l'oxime 2a (quantitativement plus abondante) pour l'étape suivante. Notons cependant que sa stéréochimie n'a pas été déterminée.

2. Synthèse de la bromocétone 3.

Schéma 45

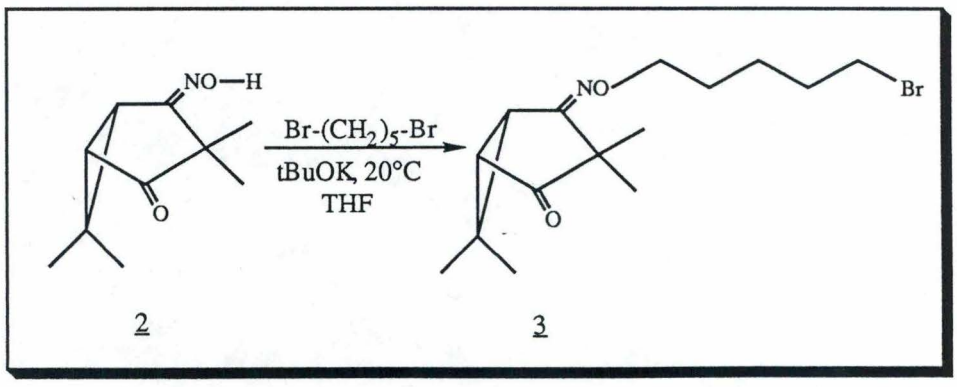
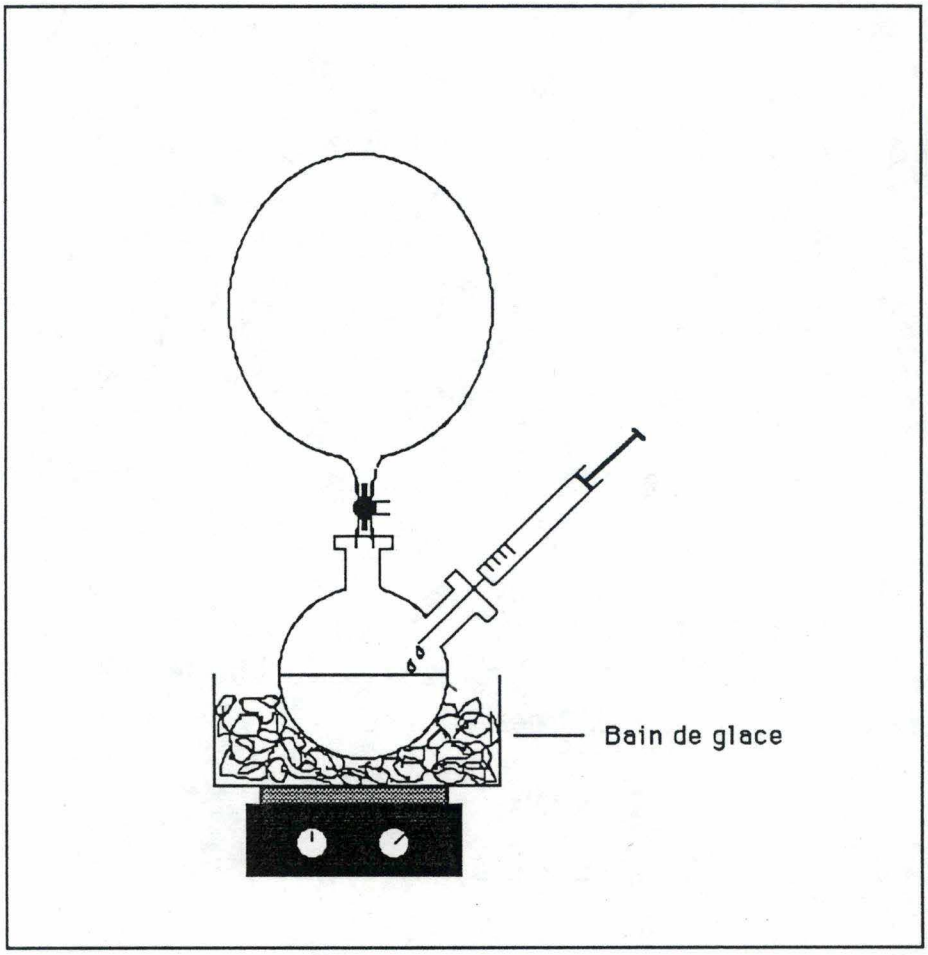


Schéma 46 :
étape 2



Protocole :

L'oxime 2a (546 mg, 3 mmole) est dissoute dans 5 ml de tétrahydrofuranne (THF) sec dans un bicol de 50 ml sous atmosphère d'argon (Schéma 46). La solution est alors thermostatisée à 0°C (bain eau/glace). On y additionne ensuite goutte à goutte une solution de tertiobutylate de potassium (382 mg, 3,3 mmole) dissous dans 5 ml de THF sec. Après 15 minutes, une solution de dibromopentane (2,76 g, 12 mmole) dissous dans 2 ml de THF sec est ajoutée à la seringue dans le bicol. Le bain froid est alors retiré. Le mélange est laissé 2 heures à température ambiante sous agitation magnétique avant d'être extrait à l'éther, lavé à l'eau et filtré. Le brut B2 (3,11 g) est recueilli après évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif.

La bromocétone 3 (825 mg) est obtenue avec un rendement de 83 % après purification sur colonne de silice (éluant : pentane/éther (90/10)).

Caractéristiques du produit purifié :

- TLC (pentane/éther (90/10) (v/v)) : Rf = 0,38

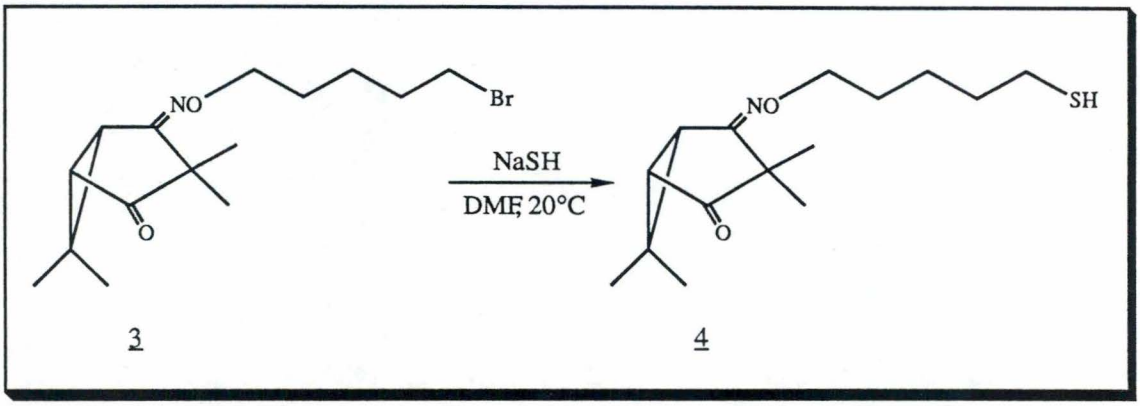
- GC (colonne Superox, température initiale = 160°C puis augmentation de 10°C par minute, température finale = 220°C) : RT = 8,5 minutes

- RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ = 0,86-1,36 (4 s, 12 H, 4 CH_3)
  δ = 1,36-2,12 (massif, 7 H, 3 CH_3 et CH cycl.)
  δ = 2,70 (d, J = 4,8 Hz, 1 H, CH cycl.)
  δ = 3,43 (t, J'= 6,5 Hz, 2 H, CH_2-Br)
  δ = 4,07 (t, J"= 6,0 Hz, 2 H, CH_2-ON)

- IR (film) : 2933, 2867, 1734, 1653, 1460, 1379

3. Synthèse du cétothiol 4.

Schéma 47



3 4

Protocole :

Dans un bicol de 50 ml, à 0°C sous argon, l'hydrogénosulfure de sodium (2 g, 36 mmole) est solubilisé sans 8 ml de diméthylformamide (DMF). La bromocétone 3 (666 mg, 2 mmole) diluée dans 5 ml de DMF est additionnée goutte à goutte à température ambiante. Après une heure sous agitation magnétique, 500 mg d'hydrogénosulfure de sodium sont ajoutés. Après deux heures supplémentaires, le mélange réactionnel est hydrolysé par 10 ml d'eau puis il est extrait 3 fois à l'éther, lavé 2 fois à l'eau, séché sur sulfate de magnésium et filtré. Le solvant est évaporé sous vide et le brut B3 est recueilli (527 mg).

Le cétothiol 4 (415 mg) est isolé avec un rendement de 73 % après purification sur colonne humide de silice (éluant : pentane/éther (60/40) (v/v)).

Caractéristiques du produit purifié :

- TLC (pentane/éther (60/40) (v/v)) : Rf = 0,52

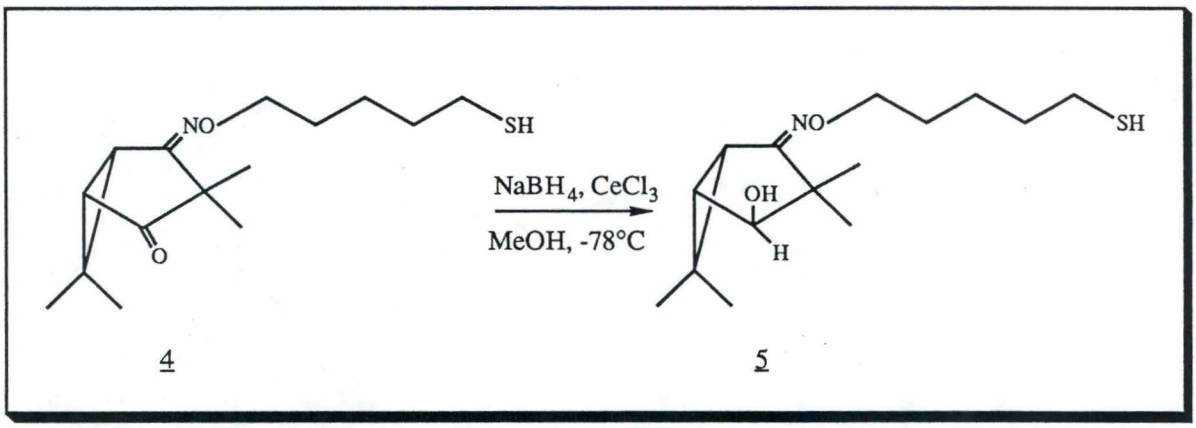
- GC (colonne Superox, température initiale = 140°C puis augmentation de 10°C par minute, température finale = 220°C) : RT = 10,0 minutes

- RMN^{1}H ($CDCl_3$) : δ = 0,80-1,90 (massif, 18 H, 4 CH_3 + 3 CH_2)
δ = 2,04 (d, J = 5,0 Hz, 1 H, C<u>H</u> cycl.)
δ = 2,40-2,80 (massif, 3 H, C<u>H</u> cycl. + C<u>H</u>$_2$SH)
δ = 2,88 (d, J = 5,0 Hz, 1 H, C<u>H</u> cycl.)
δ = 4,00 (t, J' = 6,0 Hz, 2 H, C<u>H</u>$_2$ON)

- IR (film) : 2931, 2867, 1735, 1681, 1653, 1458, 1379

4. <u>Synthèse du thioalcool 5.</u>

<u>Schéma 48</u>



<u>4</u> <u>5</u>

<u>Protocole :</u>

Dans un monocol de 250 ml, le cétothiol <u>4</u> (400 mg, 1,4 mmole) est dissous sous argon dans 15 ml de méthanol . Le trichlorure de cérium (520 mg, 1,4 mmole) est ajouté et la solution est agitée à température ambiante pendant 0,25 heure. La solution est ensuite thermostatisée à -78°C (bain acétone/carboglace). Le borohydrure de sodium, $NaBH_4$ (60 mg, 1,4 mmole) est alors additionné par petites portions. L'évolution de la réaction est suivie par TLC (éluant éther/pentane (60/40)).

Après deux heures, le milieu réactionnel est hydrolysé à température ambiante par addition de 5 ml d'une solution saturée en chlorure d'ammonium et puis de 10 ml d'eau. Après extraction à l'éther (4 fois) et lavage à l'eau (2 fois), la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et filtrée. Après évaporation du solvant sous vide (évaporateur rotatif), 450 mg de brut B4 sont récupérés.

Le brut B4 est purifié sur plaque de silice (éluant : éther/pentane (70/30) (v/v)). On recueille deux produits :

- Produit α : 95 mg (Rf = 0,63)
- Produit β : 285 mg (rendement de 72 %) (Rf = 0,39)

Caractéristiques du produit α :

- TLC (pentane/éther (60/40) (v/v)) : Rf = 0,63

- RMN ^1H ($CDCl_3$) : δ = 0,80-1,30 (massif, 25 H, 8 CH_3 + 6 + OH)
  δ = 1,30-1,80 (massif, 12 H, 6 CH_2)
  δ = 1,88-2,08 (massif, 4 H, 2 CH-CH cycl.)
  δ = 2,50-2,80 (massif, 4 H, 2 CH_2)
  δ = 3,60 (bs, 1 H, CH-OH)
  δ = 3,80-4,16 (massif, 4 H, 2 CH_2-ON)

- IR : 3443, 2929, 2865, 1734, 1648, 1460, 1378, 1282

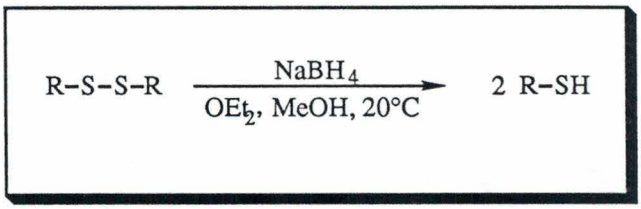
Caractéristiques du Produit β :

- TLC (pentane/éther (60/40) (v:v)) : Rf = 0,39

- RMN ^1H ($CDCl_3$) : δ = 0,92 (s, 6 H, 2 CH_3)
  δ = 1,00-1,20 (massif, 18 H, 6 CH_3)
  δ = 1,28-1,88 (massif, 16 H, 6 CH_2 + 2 CH cycl. + 2 OH))
  δ = 2,04 (d, J = 5 Hz, 2 H, 2 CH cycl.)
  δ = 2,40-2,80 (t, J' = 6 Hz, 4 H, 2 CH_2-S)
  δ = 3,60 (bs, 2 H, 2 CH-OH)
  δ = 3,92 (t, J" = 6 Hz, 4 H, 2 CH_2-ON)

- IR (film) : 3422, 2927, 2865, 1646, 1460, 1376, 1285

5. Réduction d'un disulfure au $NaBH_4$.[42]



Protocole :

Dans un tube à essai de 25 ml, on dissout dans 7 ml d'un mélange méthanol-éther (1 pour 6) le disulfure (1 équivalent molaire) que l'on place sous agitation magnétique à température ambiante, sous argon. Le borohydrure de sodium (3 équivalents molaires) est ajouté par petites portions. Après une heure de réaction, on arrête la réaction avec 2 ml d'eau et 1 ml d'HCl 10%. On décante la phase aqueuse acidifiée. La phase organique est quant à elle séchée sur sulfate de magnésium et filtrée sur ouate. Après évaporation du solvant, on récupère le brut réactionnel B5. Afin d'éviter tout risque éventuel d'oxydation, le brut n'est pas purifié (rendement 96 %).

Caractéristiques du thioalcool 5 :

- TLC (pentane/éther (60/40) (v/v)) : Rf = 0,63

- RMN ^1H ($CDCl_3$) : δ = 0,80-1,88 (massif, 37 H, 8 CH_3 + 6 CH_2 + OH)
δ = 1,88-2,12 (massif, 4 H, 2 CH-CH cycl.)
δ = 2,50-2,80 (massif, 4 H, 2 CH_2-S)
δ = 3,60 (bs, 1 H, CH-OH)
δ = 3,80-4,16 (massif, 4 H, 2 CH_2-ON)

B. COUPLAGES AU SPDP.

1. Matériel.

- Lecteur de plaque ELISA EL 340 (Bio-Tek Instruments)
- Colonne de chromatographie PD-10 (Pharmacia)
- Membrane de dialyse de cut-off (CO) = 10000 daltons (medicell International LTD)
- Spectrophotomètre UV-visible Ultrospec II (Pharmacia)

2. Préparation des protéines porteuses.

a) Solubilisation.

La BSA et l'**ovalbumine** sont solubles en solution aqueuse. Par contre à cause de son importante masse moléculaire, la KLH est très peu soluble dans l'eau (20 à 50 % en masse).

Solubilisation de la KLH :

- Peser 8 mg de protéine et ajouter 1 ml de PBS.
- Bien agiter au vortex (éventuellement laisser quelques heures dans un bain à 37°C).
- Centrifuger 2 fois 2 minutes à 13000 tours (récupérer le surnageant).

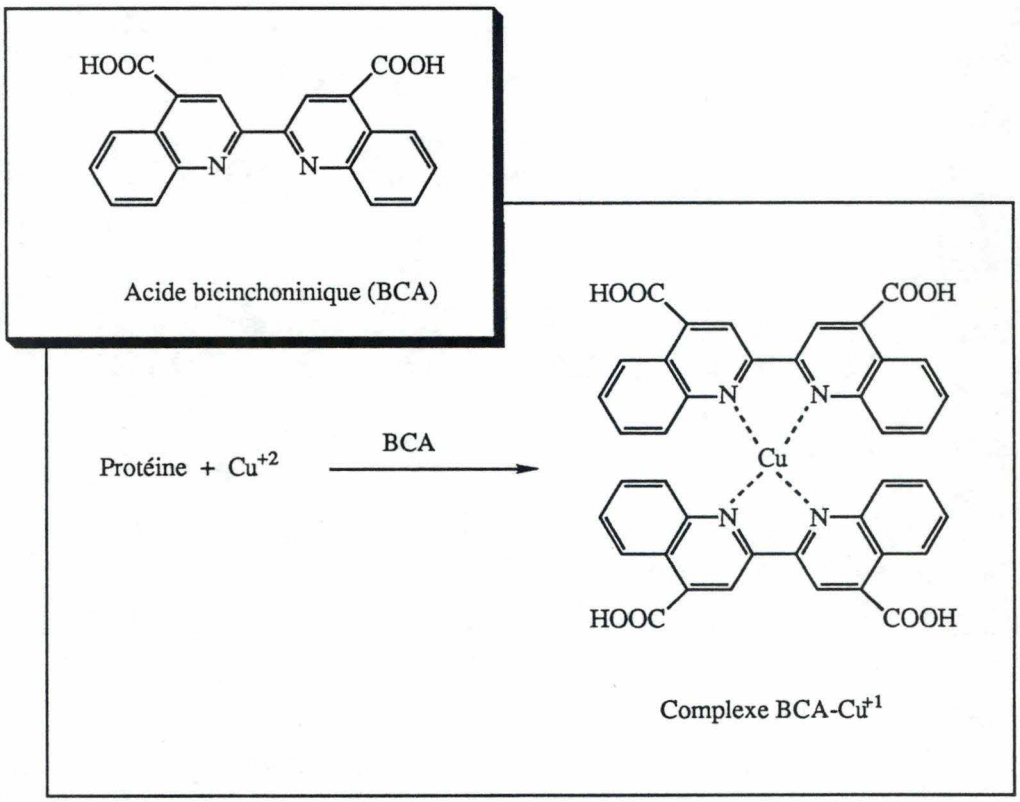
b) Dosage.

Pour déterminer avec exactitude la quantité de protéine dissoute, un dosage de protéine à l'acide bicinchoninique est effectué (kit de dosage BCA, Pierce).

Principe :

La solution de BCA du test contient des ions cuivre (Cu^{+2}) dans une solution alcaline avec de l'acide bicinchoninique. En présence de protéines, le cuivre se réduit en Cu^{+1}. Deux BCA peuvent chélater un ion Cu^{+1} ce qui forme un complexe très

Schéma 49 :
Réaction BCA pour le dosage des protéines



Composition réactif A :
- $NaHCO_3$
- Bicarbonate de sodium NaH_2CO_3
- BCA
- Tatrate de sodium dans NaOH 0,2 N

Composition réactif B :
Solution 4% de sulfate de cuivre.

Protocole :

- Diluer la protéine étalon de concentration connue (1 mg BSA /ml eau) dans le même tampon dans lequel se trouve la protéine à doser. Déposer ces dilutions sur une plaque Maxisorp (NUNC) à raison de 10 µl/puits .

Dilution	-	20	10	5	2,5	1,67	1,25	1
Concentration (µg/ml)	0	50	100	200	400	600	800	1000

- Diluer la solution protéique de concentration inconnue (5, 2,5 et 1,25 fois par exemple). Déposer 10 µl/puits.
- Ajouter 200 µl/puits du mélange réactionnel : 50 part de réactif A pour 1 part de réactif B.
- Mettre 30 minutes à 37°C.
- Mesurer l'absorbance à 550 nm.

3. Solubilisation du thioalcool au moyen de Tween ® 80.

le Tween 80 (ou Polysorbate 80) est un détergent non ionique, soluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques (alcool, méthanol,...). Son caractère hydrophile est dû à ses chaînes de polyoxyéthylène tandis que sa portion lipophile consiste en de longues chaînes d'acide oléique (Schéma 50).

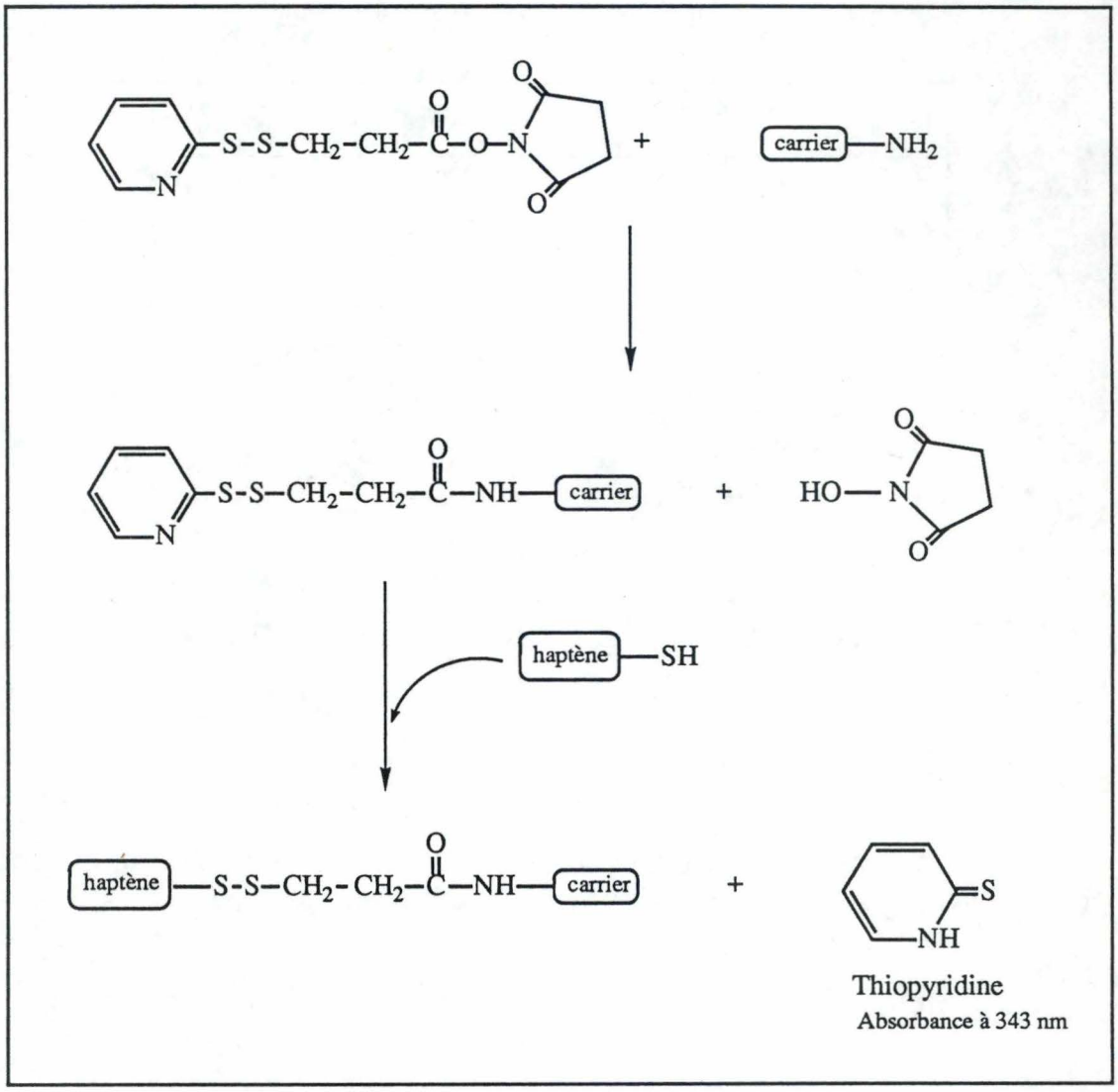
Protocole :

- Peser 5 mg de thioalcool
- Ajouter 5 ml d'acétone + 125 ml de Tween 80 et agiter fortement au vortex
- Evaporer l'acétone sous atmosphère s'argon
- Ajouter 1 ml d'eau bidistillée et mélanger vigoureusement au vortex

4. Couplages du thioalcool au moyen du SPDP.

Le SPDP [43,43'] est un réactif hétérobifonctionnel qui réagit via son groupe ester de N-hydroxysuccinimidile avec les groupes

Schéma 50 :
Réaction de couplage au SPDP



amines de la protéine porteuse (principalement les NH_2 des lysines). Le disulfure de 2-pyridyle réagit ensuite avec des thiols aliphatiques par une réaction d'échange thiol-disulfure.

Propriétés du SPDP :

- Le SPDP permet une méthode de couplage covalent simple tout en évitant des réactions secondaires (homopolymérisation, liaisons intramoléculaires).
- Le SPDP convient aux substances labiles car les réactions ont lieu en solution aqueuse dans des conditions douces (l'intégrité des protéines est conservée).
- Le SPDP a une bonne stabilité (conservation en solution dans d'éthanol pendant plusieurs semaines).
- Les conjugués peuvent être clivés par réduction.
- Le degré de substitution des groupes thiols protégés est contrôlable et peut être déterminé facilement par réduction au dithiothréitol (DTT).

Schéma 51 :
Réduction au DTT

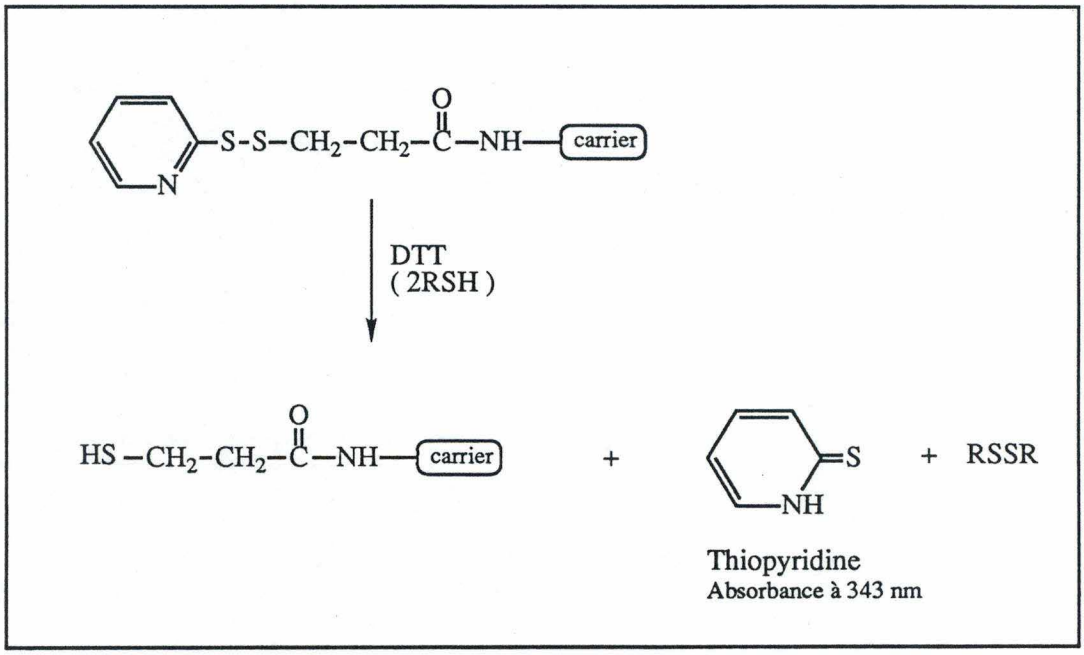
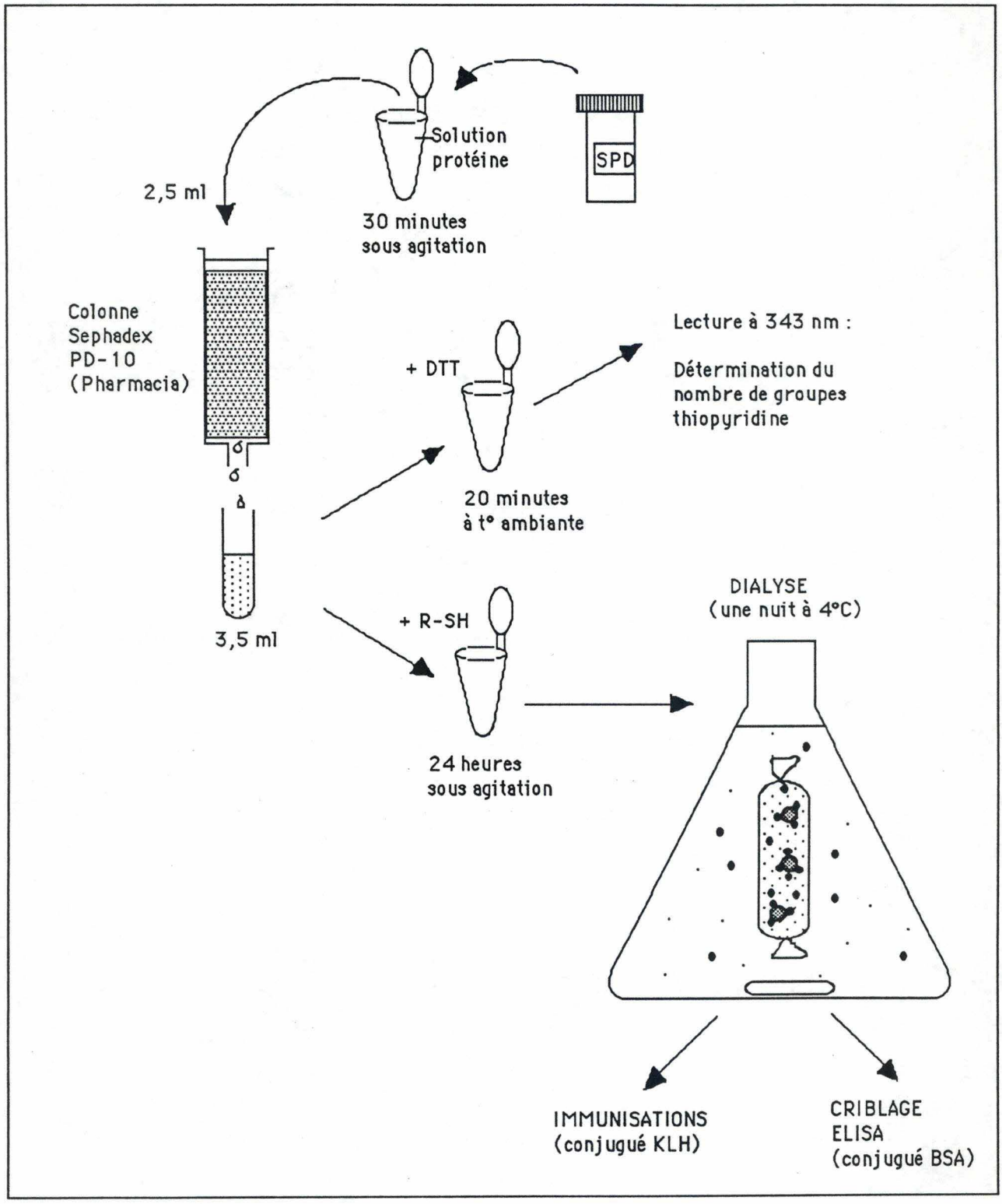


Schéma 52 :
Procédé de couplage au SPDP



Protocole :

(Schéma 52)

Les étapes du couplage s'effectuent dans un tampon phosphate 0,1 M pH = 7,5 contenant 0,1 M NaCl .

1. *Solubilisation du SPDP* (Sigma)
   Ajouter 534 µl d'éthanol absolu à 5 mg de SPDP (= 0,017 mmole) afin d'obtenir une solution 30 mM.

2. *Solubilisation de la protéine porteuse.*
   Préparer une solution de 1 à 10 mg de protéines par ml de tampon couplage.

3. *Activation de la protéine porteuse.*
- Prélever 500 µl de la solution protéique et ajouter le SPDP en excès molaire 30.
- Mettre en agitation mécanique pendant 30 minutes.
- Porter le volume à 2,5 ml et passer la solution sur une colonne de déssalage Séphadex G25 (colonne PD10, Pharmacia). Récolter 3,5 ml .

4. *Détermination du nombre de groupements thiopyridyles introduits par carrier.*
- Prélever 1 ml de la solution de protéine activée (diluée ou non) et ajouter 50 µl de dithiothréitol à 100 mM dans l'eau.
- Attendre 20 minutes avant de lire l'absorbance à 343 nm au spectrophotomètre.
- Calculer le nombre de groupements thiopyridyles sachant que le coefficient d'extinction molaire de la thiopyridine à 343 nm est de $8,08.10^3\ M^{-1}cm^{-1}$.

5. *Couplage proprement dit.*
- Ajouter à la solution de protéine activée le thiol en excès molaire (50 à 100) et agiter 24 heures à température ambiante.

- Eliminer l'excès de réactifs et de sous-produits réactionnels en dialysant une nuit à 4°C contre du PBS ou en membrane de dialyse (CO = 10000) ou en faisant une chromatographie sur PD-10 en PBS.

C. IMMUNISATIONS.

La réponse anticorps dépend de nombreux facteurs [44] :
- voie d'immunisation,
- planning d'immunisation,
- nature de l'antigène,
- individu.

Ainsi, il est conseillé d'utiliser de jeunes individus adultes en bonne santé et un antigène le plus pur possible.

Pour augmenter l'immunogénicité de l'antigène, un **adjuvant** peut y être mélangé. Le principe d'un adjuvant est de stimuler l'immunité non spécifique pour soutenir la réponse immunitaire spécifique. Les adjuvants déclenchent une réaction inflammatoire et permettent la rétention de l'antigène au site d'injection.

Les adjuvants les plus couramment utilisés sont l'adjuvant de Freund, le Quil A et le gel d'hydroxyde l'aluminium.[45] L'adjuvant de Freund est une émulsion eau-dans-l'huile contenant en plus des mycobactéries tuées dans le cas de l'adjuvant de Freund complet. Extrait de Quillaya saponaria, le Quil A se distingue de l'adjuvant précédent par sa nature glycosidique. C'est une saponine et son emploi en intrapéritonéal est déconseillé. Le gel d'hydroxyde d'aluminium est un adsorbant minéral reconnu pour être un bon adjuvant pour les composés peu immunogènes.

1. Protocole d'immunisation des souris avec l'haptène non couplé au carrier.

Pendant toute la durée de la synthèse du thioalcool, nous avons tenté d'immuniser des souris avec l'alcool EXO non couplé au carrier mais injecté simultanément. Cette initiative a été prise suite aux résultats publiés récemment par des chercheurs espagnols qui ont réussi à obtenir des anticorps anti-peptides alors que peptide et carrier n'étaient pas couplés.[46] Ces auteurs spéculent que le déterminant reconnu par les lymphocytes T ne doit pas nécessairement être lié de façon covalente à l'haptène pour pouvoir apporter l'aide aux lymphocytes B spécifiques de ce dernier. Il faut cependant injecter les déterminants T et B au même site.

Nous nous sommes inspirés de leur protocole d'immunisation. Les solutions pour l'immunisation contiennent l'alcool EXO (AE), le carrier et l'adjuvant. En parallèle, des mélanges témoins dépourvus de carrier ou d'adjuvant sont injectés.

Quatre groupes de 5 souris ont été immunisés par voie intra-musculaire avec des mélanges suivants (200 µl par individu) :

Groupe 1 : - 50 µl AE à 1 mg/ml PBS
- 150 µl PBS pH = 7,4

Groupe 2 : - 50 µl AE à 1 mg/ml PBS
- 50 µl KLH à 2 mg/ml PBS
- 100 µl PBS pH = 7,4

Groupe 3 : - 50 µl AE à 1 mg/ml
- 50 µl KLH à 2 mg/ml
- 100 µl Quil A à 0,3 mg/ml

Groupe 4 : - 50 µl AE à 1 mg/ml
- 50 µl KLH à 2 mg/ml
- 100 µl adjuvant complet de Freund (AFC)

Ces souris sont rappelées avec la même dose d'antigène par voie sous-cutanée (avec de l'adjuvant de Freund incomplet pour le groupe 4).

Canevas des immunisations série 1 (groupe 4)

	Première injection	Rappels
Antigène	50 µg AE 100 µg KLH	50 µg AE 100 µg KLH
Adjuvant	100 µl Quil A 0,3 mg/ml	100 µl Quil A 0,3 mg/ml
Voie d'injection	intramusculaire	sous-cutané
Date	6/12/91	20/12/91 3/1/92 23/1/91 30/2/92 6/4/92

Le sang est récolté par ponction du plexus rétro-orbital veineux . On laisse le sang coaguler une nuit à 4°C. L'échantillon est ensuite centrifugé 15 minutes à 3500 tours et le sérum est prélevé, aliquoté et stocké à -20°C.

2. Protocole d'immunisation avec le conjugué KLH-thioalcool.

7 souris ont été immunisée par voie intradermique avec le conjugué KLH-AE additionné d'adjuvant Quil A. Trois autres souris servant de contrôle ont reçu uniquement la KLH.

Canevas des immunisations série 2

	Première injection	Premier rappel
Antigène	KLH-AE ou KLH 100 µg	KLH-AE ou KLH 50 µg
Adjuvant	100 µl Quil A 0,3 mg/ml	100 µl Quil A 0,3 mg/ml
Voie d'injection	intradermique	intradermique
Date	27/8/92	14/9/92

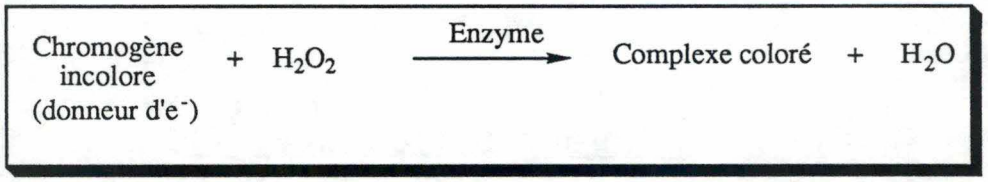
3. Protocole d'immunisation avec le conjugué OVA-AE .

Deux lots de 4 souris ont reçu le conjugué OVA-AE, l'un avec une faible densité de couplage (environ 2 haptènes par OVA) et l'autre lot avec une forte densité (environ 6 haptènes par OVA). La première injection est pratiquée en adjuvant complet de Freund et les rappels en gel d'hydroxyde d'aluminium.

Canevas des immunisations série 3 :

	Première injection	Premier rappel
Antigène	OVA-AE ou OVA-DNP	OVA-AE ou OVA-DNP
	100 µg	50 µg
Adjuvant	150 µl AFC	150 µl HA
Voie d'injection	sous-cutané (+ intradermo en foot-pad)	intrapéritonéal
Date	23/10/92	12/11/92

Schéma 53 :
Révélation des tests immunoenzymatiques par réaction colorimétrique (+ exemples d'enzymes et de substrats)



ENZYMES	SUBSTRATS
HRP (Horse Radish Peroxidase)	OPD (o-phénylènediamine) ABTS (sel d'ammonium de l'acide 6-(2,2' azidobis 3-éthylbenzothiazoline) sulfonique TMB (tétraméthylbenzidine) DAB (diaminobenzidine)
ALP (Phosphatase alcaline)	BCIP (sel de p-toluidine de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate) PNPP (p-nitrophénylphosphate)
β-GAL (β-Galactosidase)	ONPG (o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside)

D. TESTS DE CRIBLAGE DES ANTICORPS.

La mise en évidence dans l'antisérum d'anticorps spécifiques de l'haptène s'effectue dans notre laboratoire grâce à des techniques immunenzymatiques : **test ELISA** et **Dot-blot**.

1. Aspects théoriques.

a) Test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Le test ELISA [51, 52] est basé sur les deux principes suivants :

1. La spécificité d'un anticorps pour une molécule antigène.
2. L'habilité à détecter la présence de ce complexe en utilisant une réaction catalysée par une enzyme : substrat incolore transformé en un produit coloré (Schéma 53).

Il existe différents types de tests ELISA parmi lesquels nous avons utilisé les tests ELISA indirect et d'inhibition.

Le test **ELISA indirect** permet la mesure de la concentration en anticorps dans les fluides biologiques. Cette procédure utilise l'antigène immobilisé sur plaque. Une étape de saturation permet de bloquer tous les sites non occupés par l'antigène. L'échantillon contenant l'anticorps est ensuite déposé. Les anticorps fixés sont finalement détectés par un second anticorps du premier et couplé à une enzyme (Schéma 54).

Le test **ELISA d'inhibition** est une méthode permettant de vérifier la spécificité des anticorps. L'antigène est mélangé à l'antisérum avant que celui-ci ne soit déposé sur la plaque coatée avec la même molécule. Si l'antisérum contient des anticorps spécifiques de l'antigène, leur combinaison à l'antigène soluble empêche leur fixation sur l'antigène immobilisé (Schéma 55).

Schéma 54:
Test ELISA indirect

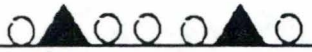
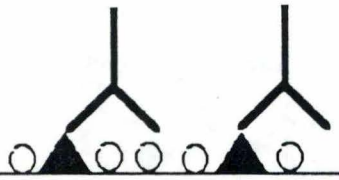
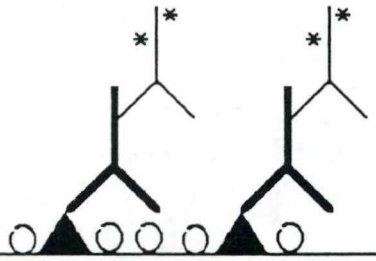
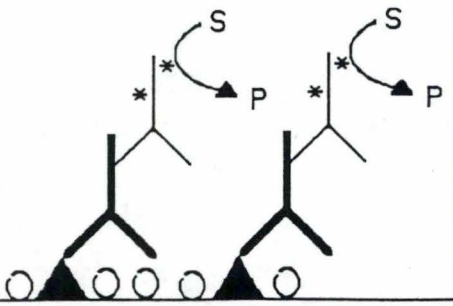
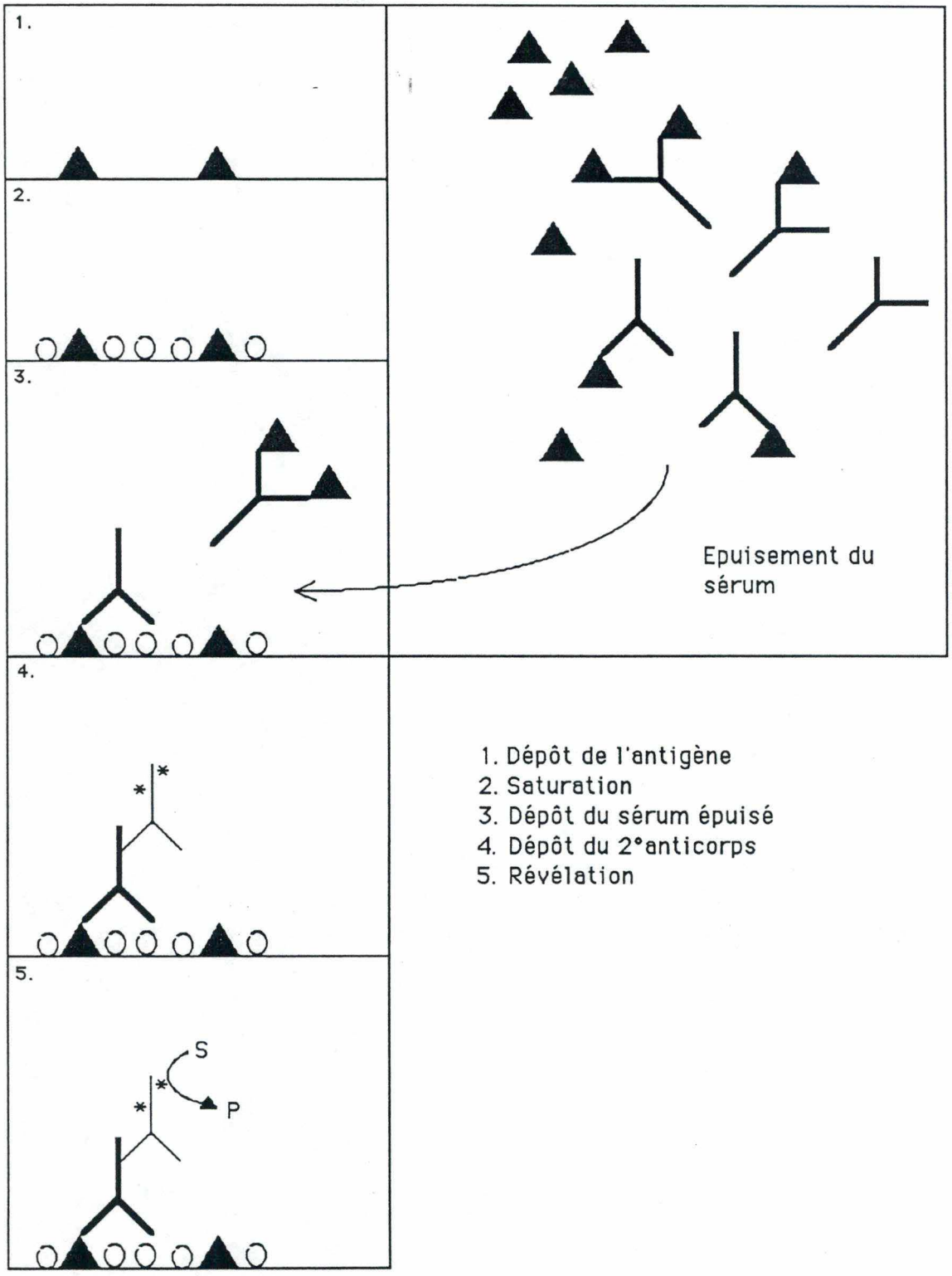
1. 	Dépôt de l'antigène.
2. 	Saturation.
3. 	Dépôt 1° anticorps.
4. 	Dépôt 2° anticorps couplé à la peroxydase
5. 	Révélation.

Schéma 55:
Test ELISA d'inhibition



1. Dépôt de l'antigène
2. Saturation
3. Dépôt du sérum épuisé
4. Dépôt du 2°anticorps
5. Révélation

Préparation de l'hydrolysat de caséine :

- Préparer 1,6 l de NaOH 0,3 N
- Ajouter 50 g caséine (FLUKA)
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation
- Mettre à pH = 7 avec de l'HCl concentré
- Porter le volume à 2 l avec de l'eau
- Filtrer

Composition PBS :

- KH_2PO_4 : 0,2 g
- $Na_2HPO_4.2\ H_2O$: 1,15 g
- NaCl : 8 g
- KCl : 0,2 g
- eau désionisée : 1 l

Composition PBS-Tween :

- Tween®20 : 1 g
- PBS : 100 ml
- eau désionisée : 1 l

Solution de révélation à l'OPD :

- 9 ml tampon citrate-phosphate :
  acide citrique : 8,9 g/l
  $Na_2HPO_4.2\ H_2O$: 20,5 g/l
  pH = 5,6
- 1 ml OPD à 4 mg/ml eau distillée
- 20 ml H_2O_2 3 %

(quantités pour révéler une plaque)

Solution de révélation à la DAB :

- DAB : 5 mg
- Tris-HCl 0,1M pH=7,4 : 10 ml
- H_2O_2 30 % : 10 µl

b) Dot-blot.

Ce test est basé sur les mêmes principes que le test ELISA. L'antigène est appliqué sous forme d'une petite tache sur une feuille de nitrocellulose.[47] La nitrocellulose est incubée avec l'antisérum et puis avec un second anticorps dirigé contre le premier et couplé à la peroxydase. Après l'addition du substrat de l'enzyme, une réaction positive est détectée sous forme d'une tache colorée sur fond blanc.

Par rapport au test ELISA, le dot-blot présente les avantages et désavantages suivants :

Avantage :
- Opérations simples
- Faibles quantités d'antigène requises

Désavantages :
- Nécessité de plus grandes quantités de tampon
- Résultats qualitatifs

2. Protocoles de détection des anticorps.

a) Détection des anticorps dans l'antisérum issu des immunisations avec l'haptène non couplé au carrier.

1. ELISA indirect.

Après mise au point du test ELISA indirect, les conditions suivantes ont été retenues :

- Concentration AE coating : 1 mg/ml en PBS pH = 7,4
- Plaques : Maxisorp (NUNC)
  Ces plaques en polyéthylène traité ont une affinité particulière pour les molécules polaires.
- Saturation : hydrolysat de caséine (HC) dilué 2 fois en PBS pH = 7,4
- Tampon de lavage : PBS-Tween®20 0,1 % pH = 7,4
  Le Tween est un détergent non ionique très visqueux.

Le Tween n'interfère pas avec la réaction antigène-anticorps mais empêche la formation de nouvelles interactions hydrophobes entre les protéines ajoutées et la phase solide sans toucher aux liens hydrophobes déjà formés.[53]

- Révélation : OPD = ortho-phénylènediamine

L'OPD sert de donneur d'électrons dans la réaction de réduction de l'H_2O_2 catalysée par la peroxydase. Par un mécanisme de polymérisation oxydative et de cyclisation oxydative, l'OPD est transformé en un vaste polymère coloré.

Protocole :

- Déposer l'antigène à une concentration de 1 µg/ml PBS pH = 7,4 à raison de 50 µl/puits sur plaque Maxisorp (NUNC)
- Incuber une nuit à 4°C et vider les puits
- Saturer avec 200 µl/puits d'hydrolysat de caséine (HC) dilué 2 fois en PBS pH = 7,4
- Incuber 3 heures à 37°C ou une nuit à 4°C
- Diluer le sérum de souris (1/50, 1/100, . . .) en PBS-Tween 0,1 %-HC 10 % pH = 7,4 et déposer 50 µl/puits
- Incuber une heure à 37°C
- Laver 10 fois chaque puits en PBS-Tween 0,1 % pH = 7,4
- Déposer le deuxième anticorps couplé à la peroxydase (SAM-POD, Amersham) dilué 500 fois en PBS-Tween-HC à raison de 50 µl/puits
- Incuber une heure à 37°C
- Laver 10 fois en PBS-Tween 0,1 % pH = 7,4
- Révéler avec 100 µl/puits de la solution de révélation OPD
- Stopper la réaction enzymatique après 20 minutes maximum par addition de 25 µl/puits de H_2SO_4 2N
- Lecture de l'absorbance à 630 et 405 nm au lecteur ELISA

2. ELISA d'inhibition.

Protocole :

- Coater et saturer la plaque Maxisorp comme pour un ELISA indirect
- Incuber les différentes dilutions du sérum en PBS-Tween-HC 10 % pH = 7,4 avec différentes concentrations d'antigène pendant une heure à 37°C.
- Déposer 50 µl/puits des solutions de sérum épuisé.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Laver la plaque avec du PBS-Tween 0,1 % pH = 7,4.

Les opérations suivantes sont identiques à celles d'un ELISA indirect.

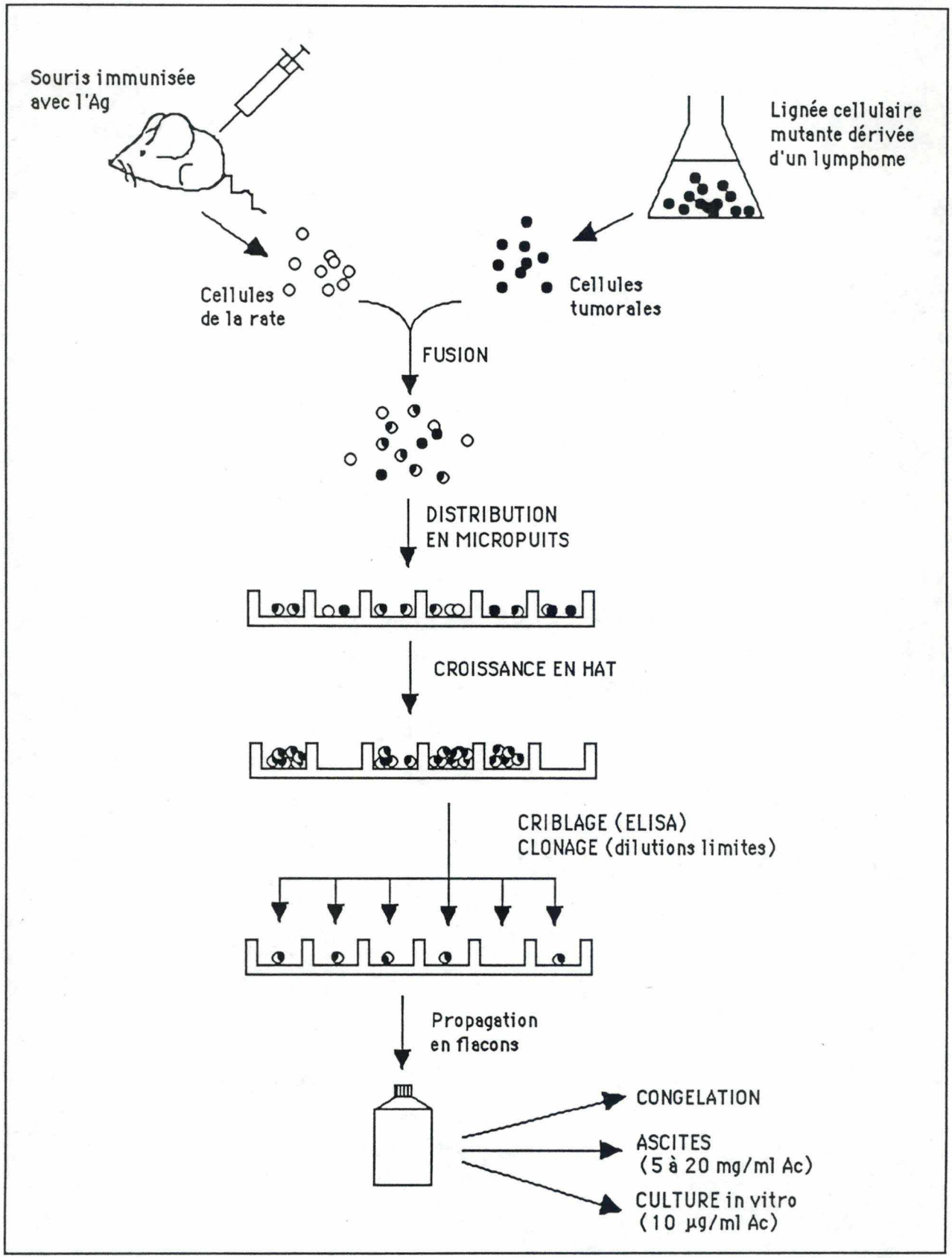
3. Dot-blot.

Protocole :

- Découper de petits carrés de nitrocellulose (environ 1 cm^2)
- Déposer 10 µl d'antigène à 1 mg/ml sur chaque carré
- Laisser bien sécher à l'étuve (37°C)
- Tremper les carrés une nuit à 4°C dans la solution de saturation (HC 2 fois dilué en PBS pH = 7,4)
- Laver les carrés 5 minutes dans du PBS-Tween 0,1 % pH = 7,4.
- Couvrir les carrés avec le sérum dilué dans du PBS-Tween 0,1 % pH = 7,4.
  (prévoir environ 200 µl/carrés).
- Laisser 45 minutes à température ambiante (attention, les carrés de nitrocellulose ne peuvent pas s'assécher).
- Laver 3 fois 10 minutes en PBS-Tween 0,1 % pH = 7,4 sous agitation.
- Couvrir les carrés avec le deuxième anticorps couplé à la peroxydase dilué 100 fois en PBS-Tween 0,1 % pH = 7,4.
- Laver 3 fois 10 minutes en PBS-Tween 0,1 % pH = 7 ,4 sous agitation.
- Tremper les carrés dans du Tris-HCl 0,1M pH = 7,6.

Schéma 56b :

Préparation d'hybridomes producteurs d'anticorps



E. PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.

1. Anticorps monoclonal : définition.

Lorsqu'on injecte une substance étrangère à un animal vertébré, la réponse anticorps de celui-ci ne sera pas homogène. Même si l'antigène est pur, l'animal produira un mélange d'anticorps pouvant être dirigés contre différents épitopes du même antigène et avec des affinités différentes (voir "Hétérogénéité des anticorps" dans la partie introduction).

Ce mélange hétérogène d'anticorps change continuellement au cours du temps de telle sorte que l'antisérum du même animal diffère d'une saignée à l'autre. En conséquence, il est impossible de produire des antiséra de pureté et reproductibilité suffisantes. De plus, les différents anticorps présents dans l'antisérum ne peuvent être séparés les uns des autres.

D'après la théorie de la sélection clonale, chaque cellule ne produit qu'un seul type d'anticorps. La descendance de cette cellule isolée, formant alors un clone serait la source abondante d'anticorps identiques dirigés contre un déterminant antigénique unique = ANTICORPS MONOCLONAL.

Cependant, les cellules productrices d'anticorps ne vivent que quelques jours en culture. Köhler et Milstein ont trouvé en 1975 la solution pour rendre ces cellules immortelles.[26]

2. Principe de la production des anticorps monoclonaux.

(Schéma 56a et b)

Les lymphocytes issus de la rate d'une souris immunisée et des cellules de myélome de souris (lignée cellulaire cancéreuse) sont fusionnés au moyen de polyéthylèneglycol (PEG).[48, 49]

Schéma 58 :
Analogie structurale entre l'azaguanine et la guanine

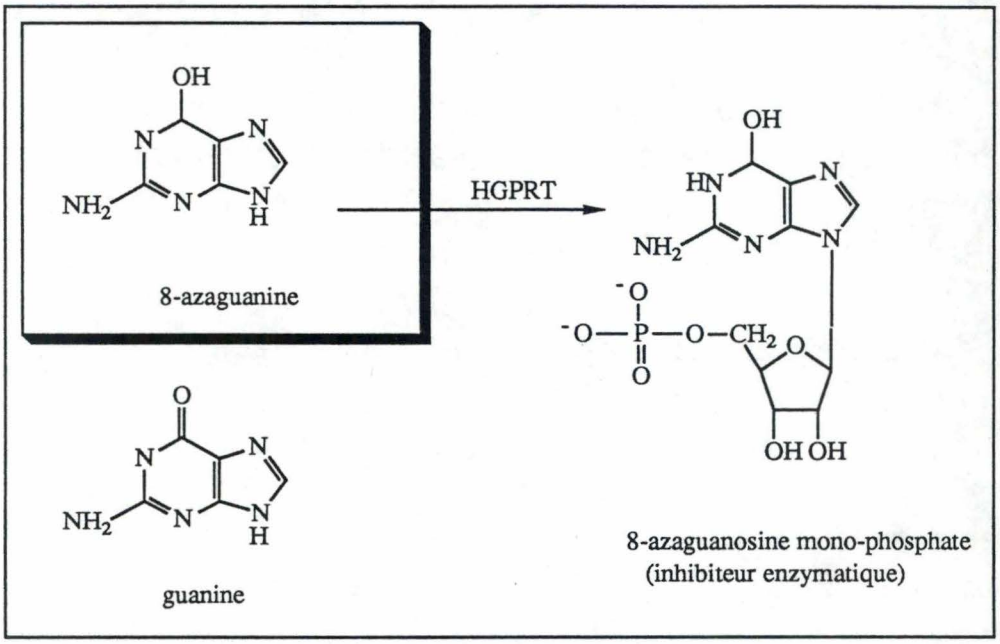
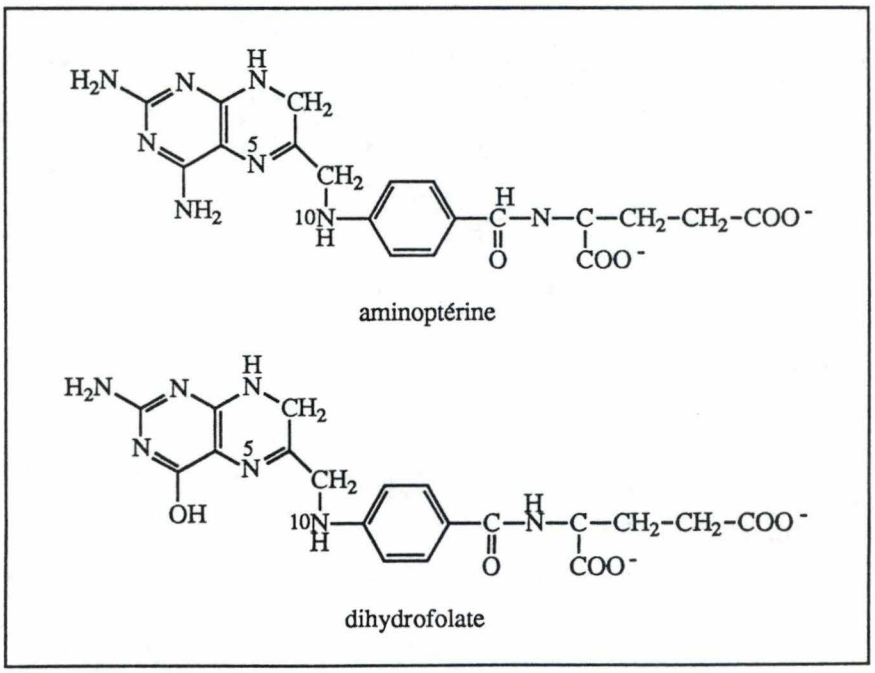


Schéma 59 :
Analogie structurale entre l'aminoptérine et le dihydrofolate



Des cellules hybrides obtenues ont acquis les caractéristiques des deux parents, à savoir :

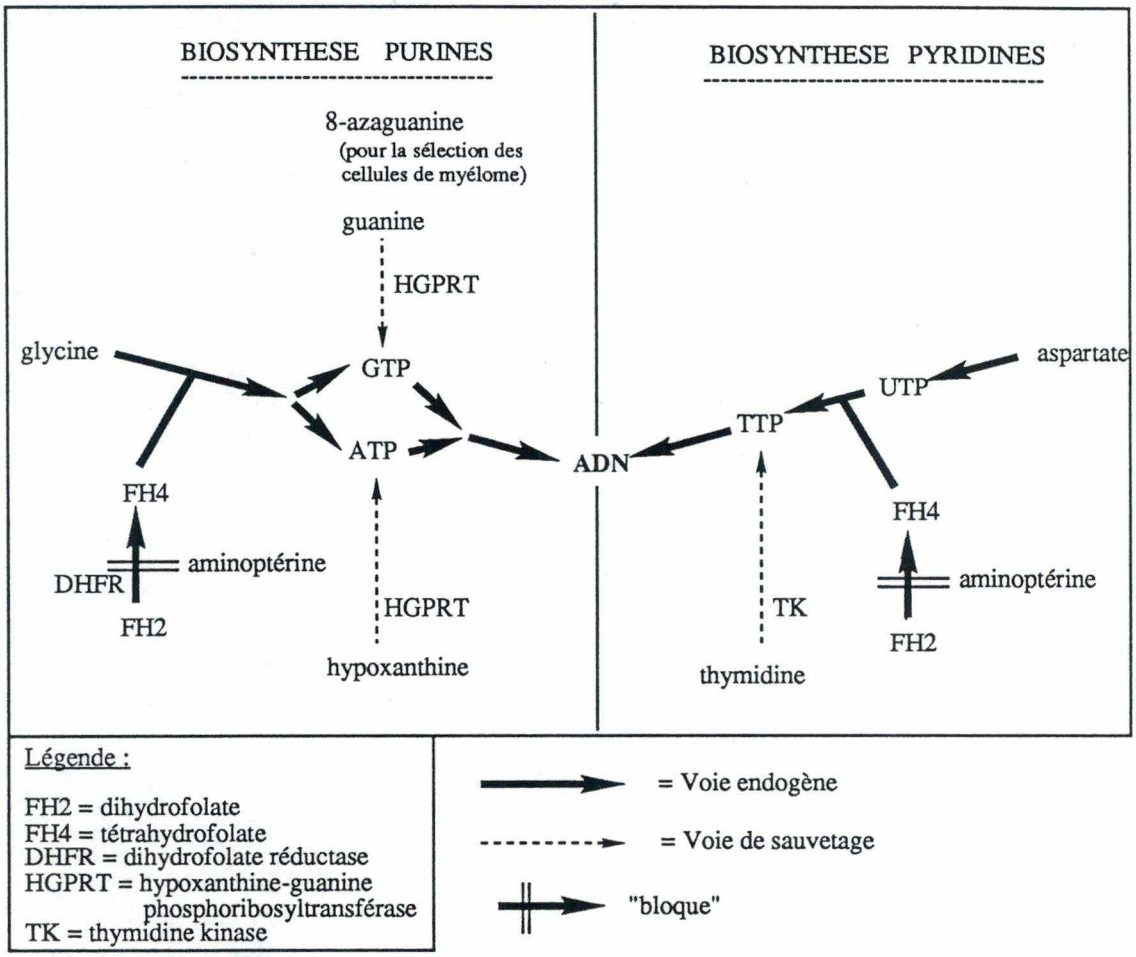
- croissance permanente (cellules de myélome),
- synthèse et sécrétion d'anticorps (lymphocytes).

Comme le processus de fusion est relativement inefficace, il est nécessaire de conférer un avantage sélectif aux cellules hybrydes par rapport aux cellules de myélome. C'est pourquoi on utilise une lignée cellulaire de myélome déficiente en une enzyme impliquée dans la voie de sauvetage de la synthèse de l'ADN (Schéma 57) : l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT).

Les cellules de myélome déficientes en HGPRT sont sélectionnées dans un milieu contenant de la 8-azaguanine (Schéma 58). Cette substance chimique, analogue de la guanine, est toxique pour les cellules sauf pour celles qui sont déficientes en HGPRT. L'enzyme HGPRT catalyse la transformation de 8-azaguanine en 8-azaguanosine monophosphate qui est l'inhibiteur allostérique d'une des premières enzymes de la voie de synthèse de novo des purines.[50]

L'unique autre voie pour la synthèse de l'ADN est la voie de sauvetage (ou voie endogène) qui peut être bloquée par l'**aminoptérine**. L'aminoptérine (Schéma 59) est un analogue du dihydrofolate (FH2). Elle a une affinité 5 fois plus importante que le dihydrofolate pour l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) qui convertit le dihydrofolate en N^5,N^{10}-méthylènetétrahydrofolate. Ce dernier est le donneur de méthyle dans la conversion du dUMP en dTMP.

Schéma 57 :
Biosynthèse de l'ADN



Ainsi, l'aminoptérine bloque la voie de synthèse "de novo" des purines et pyrimidine de la cellule. Celle-ci ne peut survivre que grâce à la voie de sauvetage en utilisant l'hypoxanthine et la thymidine.

Voilà pourquoi les cellules hybrides issues de la fusion sont sélectionnées dans un milieu HAT contenant :

- Hypoxanthine
- Thymidine
- Aminoptérine

Schéma 60 :

Composition du milieu RPMI minimum (mg/litre)

	100
	400
	48,84
	600
	80
D-Glucose	2000
Glutathion	1
Rouge phénol	5
L-Arginine HCL	241,86
L-Asparagine	50
L-Acide aspartique	20
L-Cystine.2HCl	65,15
L-Acide glutamique	20
L-Glutamine	300
Glycine	10
L-Histidine	15
L-Hydroxyproline	20
L-Isoleucine	50
L-Leucine	50
L-Lysine.HCl	40
L-Méthionine	15
L-Phénylalanine	15
L-Proline	20
L-Sérine	30
L-Thréonine	20
L-Tryptophane	5
L-Tyrosine	28,94
L-Valine	20
Biotine	0,20
Acide pantothénique	0,25
Chlorure de choline	3
Acide folique	1
Inositol	35
Nicotinamide	1
Acide para-aminobenzoïque	1
Pyridoxal HCl	1
Riboflavine	0,20
Thiamine HCl	1
Vitamine B12	0,005

Composition HAT 50 fois concentré :

- 136,1 mg hypoxanthine (Sigma) dissoute dans 100 ml d'eau désionisée
- 38,7 mg thymidine (Sigma)
- 10 ml aminoptérine 1000 fois concentrée (Fluka)
- 200 ml d'eau désionisée.

Composition 8-azaguanine :

- 40 mg 8-azaguanine-2-amino-6-oxy-azapurine (Sigma)
- 100 ml d'eau distillée

Les cellules de myélome déficientes en HGPRT ne peuvent utiliser la voie de sauvetage et meurent. Les lymphocytes, par contre, sont HGPRT+ et survivent en HAT. Cependant, ils ne résistent pas plus de deux semaines en culture normale. Seuls les hybrides survivent.

Les hybridomes sont mis en culture et les clones de spécificité voulue sont isolés.

3. Production des anticorps monoclonaux.

1. Milieux de culture utilisés.

- *RPMI minimal*
  = RPMI 1640 en poudre (Gibco) (Schéma 60)
  + 4,77 g HEPES (Sigma)
  0,85 g $NaHCO_3$ (Merck)
  10 ml glutamine 200 mM (Gibco)
  10 ml pyruvate de sodium (Gibco)
  10 ml mélange pénicilline-streptomycine (Gibco)
  1 litre d'eau bidistillée

Le mélange est mis à pH = 7,4 et filtré sur membrane de 0,22 µm.

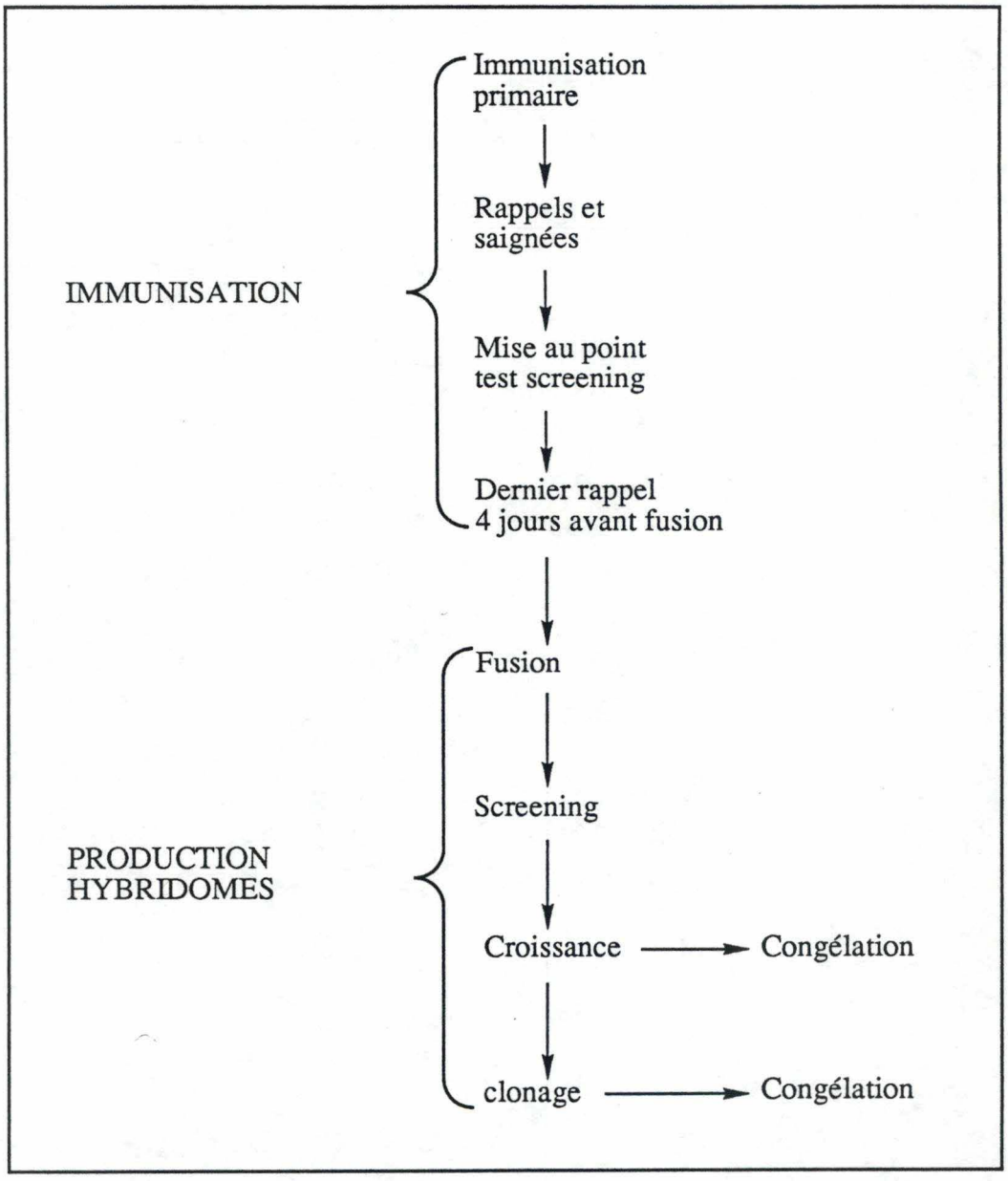
- *RPMI total*
  = RPMI minimal + 10% FCS (Fetal Calf Serum) (Gibco) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes

- *Milieu HAT*
  = RPMI total + 2 % HAT (Gibco) 50 fois concentré .

- *Milieu HT*
  = RPMI total + 2 % HT (Gibco) 50 fois concentré.

- *Milieu 8-azaguanine*
  = RPMI total + 5 % 8-azaguanine

Schéma 56a:
Etapes dans la production d'anticorps monoclonaux



2. Fusion.

a) Préparation des cellules nourricières (feeder layers).

La veille de la fusion, on injecte 20 ml de milieu RPMI sans sérum dans la cavité péritonéale d'un rat wistar. On masse le ventre de l'animal afin de décrocher un maximum de cellules, principalement des macrophages. Le milieu est ensuite récupéré et les cellules sont ajustées à une concentration de 10^5 cellules/ml. Elles sont ensuite réparties au fond de micropuits pour constituer des feeder layers.

Ces cellules nourricières permettront d'augmenter l'aptitude des cellules hybrides à croître à de très faibles densités. Sans les cellules nourricières, les clones d'hybrides grandissent difficilement.

Le rôle de ces macrophages est probablement double :
1. Sécrétion d'hormones et de facteurs de croissance.
2. Phagocytose des débris cellulaires (nombreux dans un milieu HAT !).

b) Partenaires de fusion.

La souris :
C'est la souris donnant le meilleur antisérum qui est choisie pour la fusion. Elle est rappelée 4 jours avant la fusion.

Le myélome :
La lignée myéloïde utilisée est la Sp2/0-Ag14 non productrice d'immunoglobulines et déficiente en HGPRT. Elle est dérivée d'un hybridome X63-Ag8X Balb/c.

Le jour de la fusion, le myélome doit être en phase de croissance exponentielle avec une viabilité supérieure à 95%.

Composition bromure d'éthidium-aridine orange :
(100 fois concentré)

- 50 mg bromure d'éthidium
- 15 mg acridine orange
- 1 ml éthanol 95 %
- 4 ml eau bidistilleé

Répartir en aliquots de 1 ml et stocker à -20°C

c) Préparation du Polyéthylèneglycol (PEG).

- Peser 5 g de PEG 4000 et porter à 10 g avec du PBS pH =7,4
- Ajouter 500 µl de diméthylsulfoxide (DMSO).
- Autoclaver (20 minutes à 121°C).

d) Fusion proprement dite.

- La souris est tuée et son sang est récolté pour les tests ultérieurs de screening. La rate est prélevée et broyée dans un potter en présence de NH_4Cl (8,3 g/l pH = 7) pour lyser les globules rouges. On centrifuge la suspension 10 minutes à 200 x g et le culot est resuspendu en RPMI minimal. Cette opération est répétée une deuxième fois.

- Les cellules de myélome sont suspendues en RPMI minimal et lavées deux fois par centrifugation (10 minutes à 200 x g). Le culot est suspendu en RPMI minimal.

- Un aliquot de cellules de rate et un aliquot de cellules de myélome sont prélevés pour le comptage à la cellule Thoma et pour le test de viabilité qu'on effectue en ajoutant le mélange bromure d'éthidium-acridine orange pour l'observation au microscope à fluorescence.

Cellules vivantes : vert
Cellules mortes : rouge.

- Les splénocytes et les cellules de myélome sont mélangés dans un rapport 5/1. On centrifuge le mélange des deux types cellulaires pendant 10 minutes à 200 X g. Le surnageant est éliminé. On ajoute au culot 1 ml de solution PEG goutte à goutte et en agitant doucement durant 2 minutes. Ensuite, le PEG est dilué progressivement avec du milieu RPMI minimal à 37°C toujours en agitant doucement. On centrifuge et le culot est resuspendu dans du milieu RPMI total. La suspension est mise 3 heures à 37°C afin de permettre aux cellules de "déstresser". Puis, les cellules sont resuspendues en HAT après centrifugation.

Le volume de milieu HAT est ajusté de sorteà obtenir environ 10^6 cellules par ml. Finalement ces cellules sont distribuées dans des puits tapissées de cellules nourricières (200 µl/puits). Les boîtes sont maintenues dans une étuve à 37°C et à 5 % CO_2. Elles ne sont pas fermées hermétiquement afin d'autoriser les échanges gazeux.

5. Screening.

Après 10 jours en général, les hybridomes sont bien développés. Le milieu HAT est remplacé par du milieu HT.

L'évaluation des hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques implique de tester des centaines de surnageants. Le test ELISA est une méthode reproductible, rapide et sensible pour screener et caractériser ces immunoglobulines. Le screening dès les premières étapes de la production d'anticorps monoclonaux élimine le maintien coûteux de lignées cellulaires non productrices.

Le test ELISA pour le screening comporte quelques variations par rapport au test du sérum polyclonal :

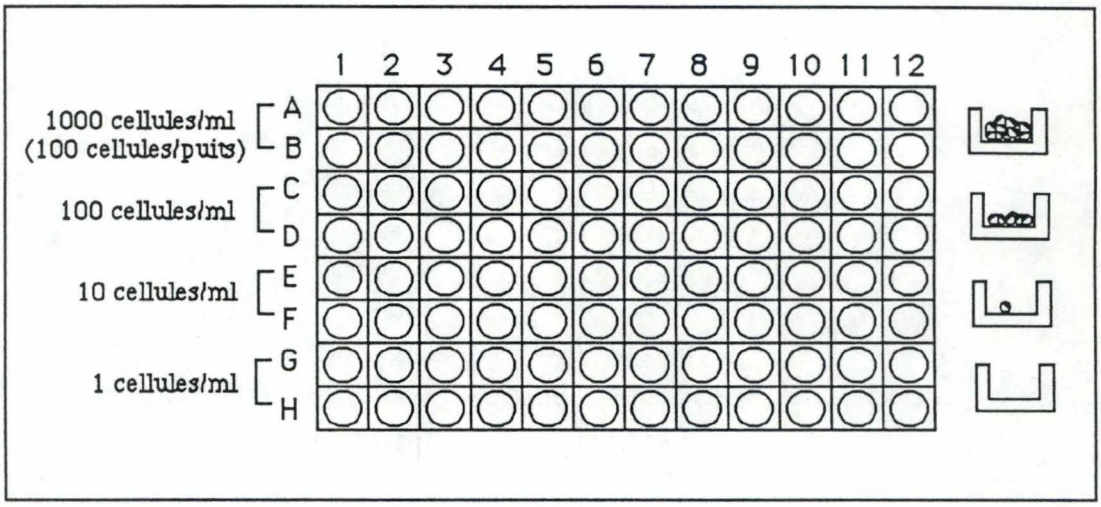
- Lavages en PBS pH = 7,4 (pas de détergent)
- Surnageant non dilué.
- Deuxième anticorps couplé à la péroxydase dilué 500 fois en PBS-sérum de bovin normal (SBN)10 %.

Protocole :

- Déposer 50 µl/puits d'une solution à 1 µg AE/ml PBS pH = 7,4 sur plaque Maxisorp (NUNC)
- Incuber une nuit à 4°C
- Saturer 3 heures à 37°C avec de l'hydrolysat de caséine dilué 2 fois en PBS pH = 7,4 (200 µl/puits)
- Vider les puits et déposer le surnageant pur à raison de 50 µl/puits
- Incuber 1 heure à 37°C
- Laver 10 fois les puits avec du PBS pH = 7,4.

Schéma 61 :

Méthode des dilutions limites sur plaque de microtitration



- Déposer 50 µl/puits du second anticorps couplé à la peroxydase dilué 500 fois en PBS-SBN 10 %.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Laver 10 chaque puits avec du PBS pH = 7,4.
- Révéler à l'OPD comme déjà décrit.

6. Clonage.

L'étape de sélection est très importante car il faut que le clone producteur d'immunoglobulines ne provienne que d'une seule cellule hybride pour ne sécréter qu'un seul type d'immunoglobuline.

Les hybridomes des puits révélés positifs au screening sont clonés par la méthode des **dilutions limites** (Schéma 61). C'est une méthode dans laquelle une cellule productrice d'anticorps est isolée et croît en une population homogène de cellules (= clone). Les cellules hybrides sont diluées en RPMI total sur plaque de microtitration avec cellules nourricières de sorte de n'avoir plus qu'1 ou 0 cellule par puits.

Remarques : Les hybridomes ont tendance à perdre leurs chromosomes. Donc, certains clones positifs au départ peuvent perdre leur capacité à produire des immunoglobulines.

7. Stockage des hybridomes.

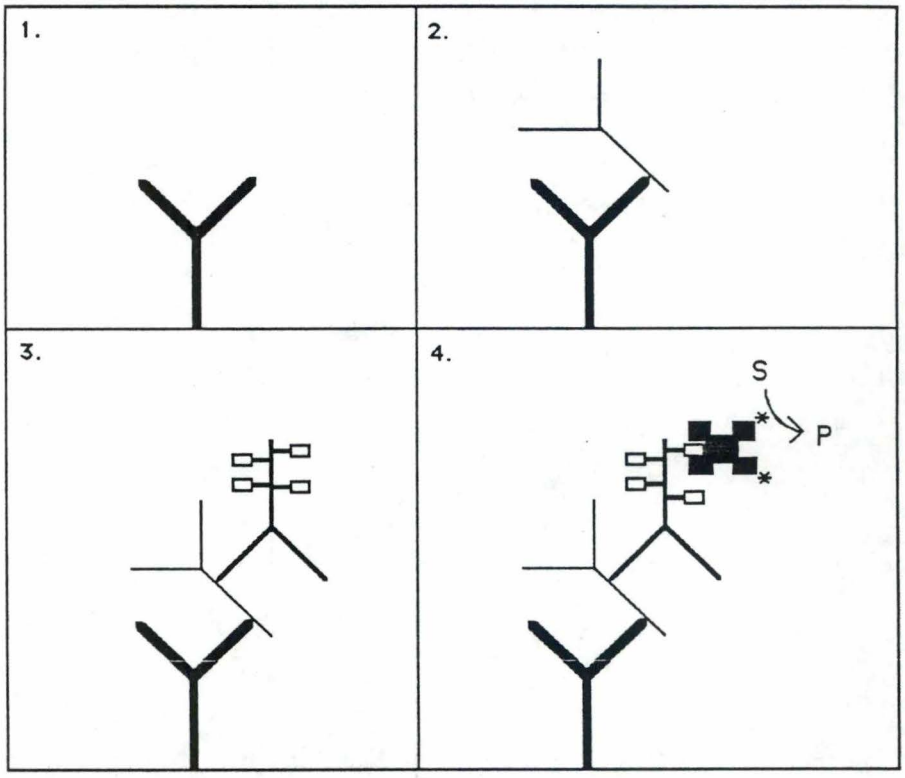
La congélation des clones à -196°C dans l'azote liquide assure leur conservation à long terme.

Procédure :

Les cellules en croissance sont remises en suspension à 4°C dans du FCS-DMSO 10%. La suspension est distribuée en aliquots de 1 ml dans des cryotubes que l'on place dans une boîte de frigolite à -80°C (la frigolite assure une diminution constante de la température de 0,9 °C/minute jusqu'à -80°C). Après 24 heures, les cryotubes sont transférés dans l'azote liquide.

Schéma 62 :

Test ELISA "sandwich" pour la détermination de l'isotypie



Légende :

= Ac anti- immunoglobuline de souris

= Ac surnageant monoclonal

= Ac biotinylé anti-isotype spécifique

= Avidine

* = Péroxydase

S = Substrats enzyme

P = Produits colorés

8. Isotypie.

L'isotype des anticorps produits durant une réponse immunitaire dépend précisément des facteurs cités au paragraphe sur l'immunisation.

La détermination de l'isotype est une application de la technique d'ELISA "sandwich" utilisant le système biotine-strepavidine (Schéma 62). La streptavidine est une molécule tétrahédrique dont les sous-unités contiennent un site de liaison de haute affinité pour la biotine.

Un anticorps anti-immunoglobuline de souris est immobilisé sur support solide et puis le surnageant de l'anticorps monoclonal est ajouté. Les immunoglobulines qu'il contient sont fixées par les premiers anticorps. Elles sont reconnues par un troisième anticorps spécifique de l'isotype et couplé à la biotine. La dernière étape consiste en l'addition du conjugué streptavidine-peroxydase.

Protocole :

- Déposer 50 µl/puits d'anticorps anti-immunoglobuline de souris à 10 mg/ml en PBS pH = 7,4 sur boîte de PVC souple.

  26A9 = IgM
  P3 = IgG1
  17A3 = IgG2a
  6C9 = IgG2b

- Incuber une nuit à 4°C
- Saturer les puits avec une solution de gélatine 0,02 % en PBS pH = 7,4 (déposer 200 µl/puits)
- Laver les puits avec du PBS pH = 7,4
- Incuber 3 heures à 37°C
- Laver 10 fois les puits avec du PBS pH = 7,4
- Déposer 50 µl/puits de surnageant monoclonal pur
- Incuber 1 heure à 37°C

- Laver 10 fois les puits avec du PBS pH = 7,4
- Ajouter 50 µl/puits d'anticorps anti-Ig G1, G2a, G2b, M de souris couplés à la biotine (dilution 1/1000 en PBS pH = 7,4)
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Laver 10 fois les puits avec du PBS pH = 7,4
- Ajouter 50 µl/puits du complexe streptavidine-peroxydase dilué 1500 fois en PBS pH = 7,4
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Laver 10 fois les puits avec du PBS pH = 7,4
- Révéler à l'OPD comme décrit page 50

III. RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

A. DETECTION DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI- HAPTENE NON COUPLE.

Pendant la synthèse du thioalcool, forme couplable de l'alcool EXO, nous avons immunisé 4 groupes des souris avec l'alcool EXO non couplé :

- Groupe 1 : AE
- Groupe 2 : AE + KLH (en mélange)
- Groupe 3 : AE + KLH + Adjuvant de Freund
- Groupe 4 : AE + KLH + Quil A

La spécificité des séra a été testée en dot-blot et en ELISA.

1. Tests dot-blot et ELISA des pools de sérum.

Les séra des 4 groupes de souris immunisées avec le cétoalcool EXO ont été testés en pools après le deuxième rappel. Le dot-blot du schéma 63 met en évidence une réponse anti-AE pour la plus faible dilution (1/10) et ce pour tous les pools de séra immuns. Le sérum d'une souris non immunisée (SSNI) servant de contrôle négatif ne donne pas de signal.

En ELISA (Schéma 64-a), nous voyons que le SSNI donne un bruit de fond non négligeable et que seul le sérum des souris immunisées avec l'AE en adjuvant Quil A donne un signal qui s'en distingue jusqu'à une dilution de 1/200.

Schéma 63 :
Dot-blot sur nitrocellulose des séra (pools) issus de la première saignée des souris immunisées avec l'AE non couplé

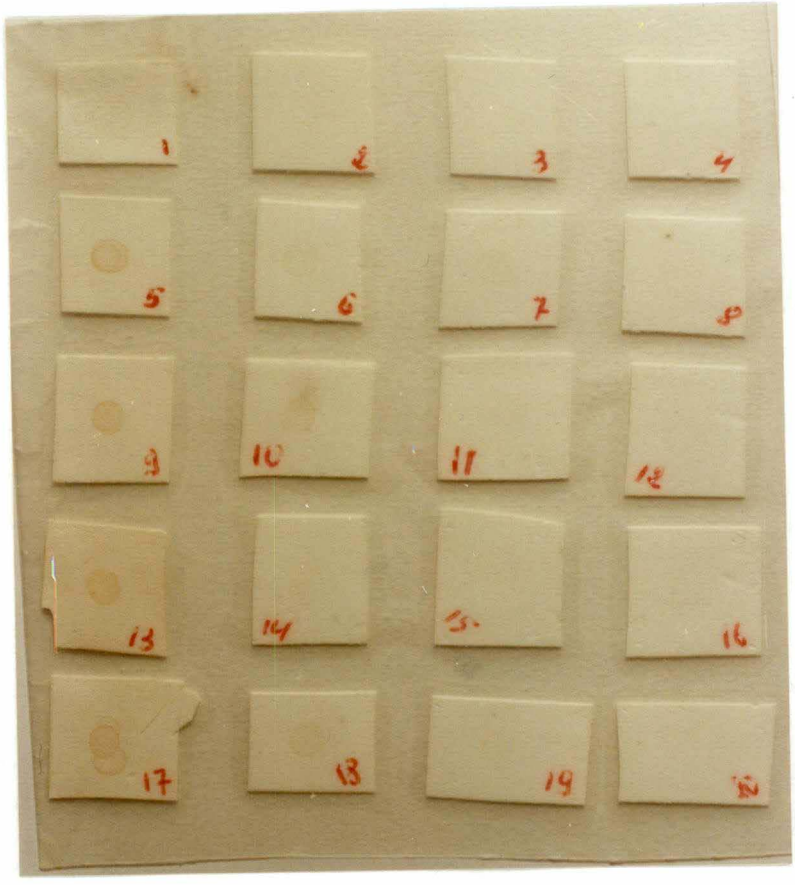
Conditions du test :

- Antigène déposé : 10 µl AE à 1 mg/ml
- Saturation : HC dilué 2 fois en PBS
- Polyséra : dilutions en PBS

1 SSNI 1/10	2 SSNI 1/50	3 SSNI 1/100	4 SSNI 1/200	**SSNI : sérum de souris non immunisée**
5 Groupe 1 1/10	6 Groupe 1 1/50	7 Groupe 1 1/100	8 Groupe 1 1/200	**Groupe 1 immunisé avec AE seul**
9 Groupe 2 1/10	10 Groupe 2 1/50	11 Groupe 2 1/100	12 Groupe 2 1/200	**Groupe 2 immunisé avec AE + KLH**
13 Groupe 3 1/10	14 Groupe 3 1/50	15 Groupe 3 1/100	16 Groupe 3 1/200	**Groupe 3 immunisé avec AE + KLH + adjuvant de Freund**
17 Groupe 4 1/10	18 Groupe 4 1/50	19 Groupe 4 1/100	20 Groupe 4 1/200	**Groupe 4 immunisé avec AE + KLH + Quil A**

- 2° anticorps : SAM-POD dilution 1/100 en PBS
- Révélation : DAB

Résultat (photo n° 1) :



Remarque : Nous travaillons toujours en dupliquates pour nos tests ELISA. Les valeurs moyennes et les écarts-types sont calculés.

Il apparaît aussi que les groupes de souris ayant reçu les solutions contenant la KLH produisent bien des anticorps contre cette grosse protéine, sans effet majeur de l'adjuvantation (Schéma 64-b). Ceci prouve que les souris ont bien été immunisées.

Nous avons donc une discordance entre le dot-blot et le test ELISA. Comme une réponse positive sur AE en dot-blot avec tous les groupes immunisés nous a semblée peu logique, nous avons décidé de ne travailler qu'avec le test ELISA.

Les résultats du test ELISA nous ont conduits à poursuivre les immunisations du groupe 4 (AE + KLH + Quil A) et à affiner le test. Comme le signal positif diminue rapidement en fonction de la dilution (extinction du signal positif entre les dilutions 200 et 400), nous avons donc été obligés de travailler avec de faibles dilutions de sérum.

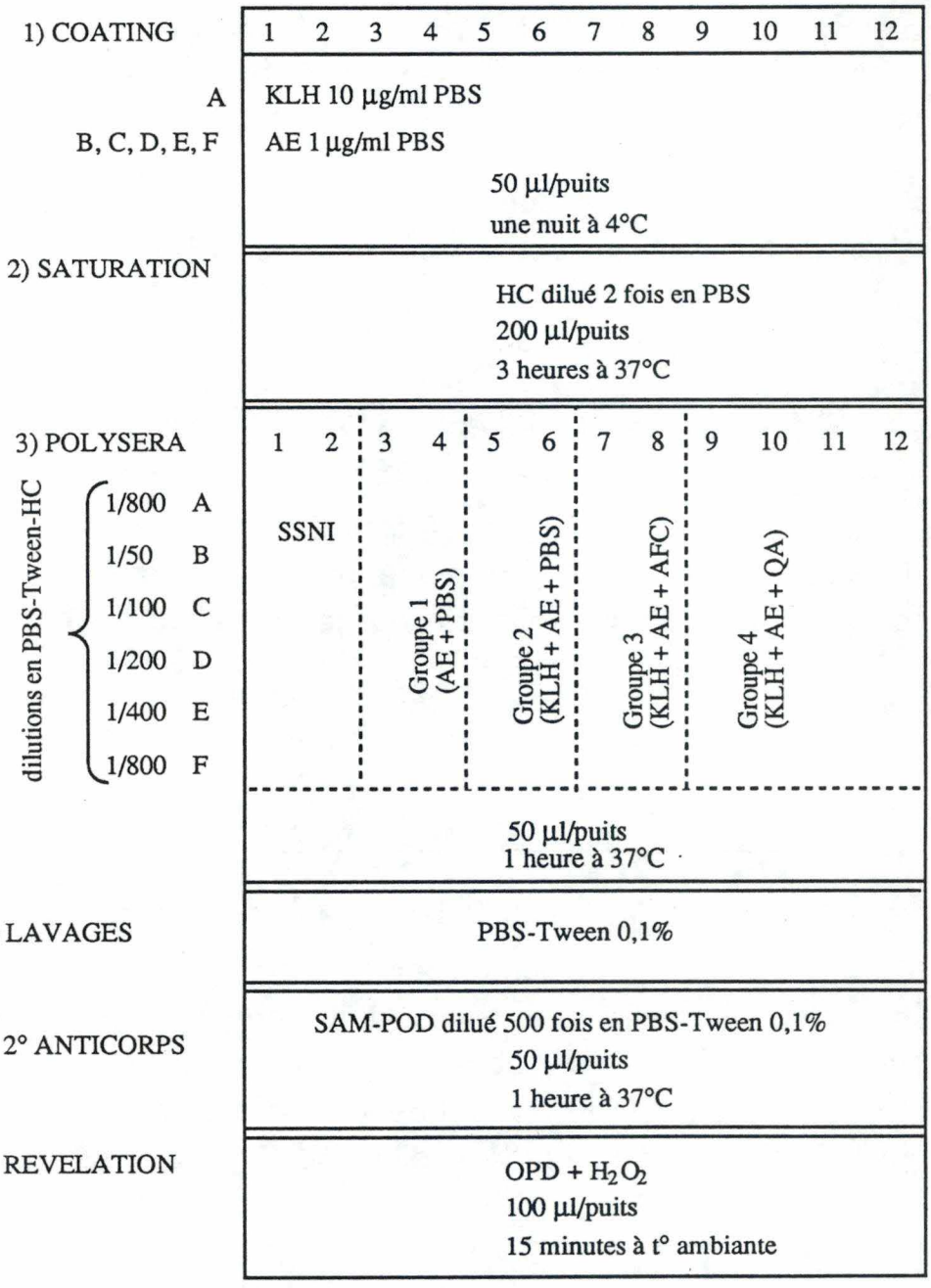
2. Mise au point du test ELISA.

Pour accroître la sensibilité du test ELISA, c'est-à-dire la diminution du signal donné par le sérum non immun par rapport au signal positif, nous avons fait varier divers paramètres du test ELISA : type de plaque, concentration de coating, tampon de lavage, chromogène. Pour tous les essais, nous avons utilisé le pool de sérum du groupe 4 dilué 50 fois en PBS-Tween-protéine de saturation 10 %.

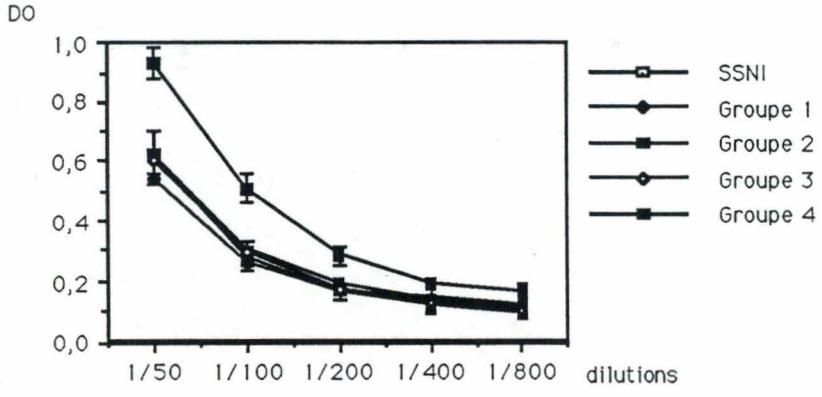
Nous voyons d'après les graphiques du schéma 65 que la saturation en hydrolysat de caséine (HC) sur une plaque coatée avec de l'AE à 1 µg/ml permet la mise en évidence d'anticorps ce qui n'est pas le cas avec la gélatine 0,02 % (schéma 65-a).

Schéma 64 :
Test ELISA des pools de sérum des souris issues des immunisations avec AE non couplé

Conditions du test :



a. Test des différents pools de sérum en dilution contre l'AE



b. Test des pools de sérum (dilution 1/800) contre la KLH.

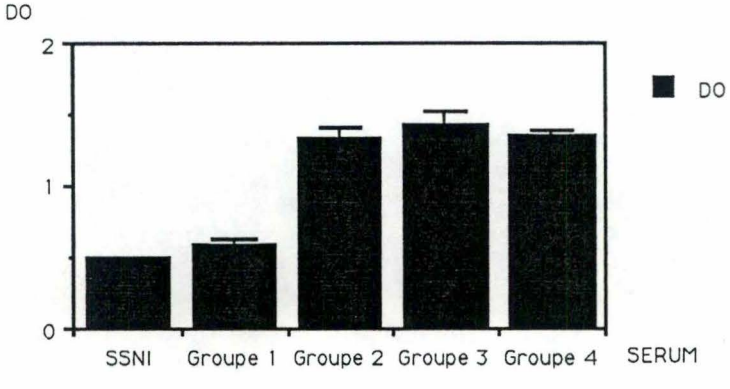
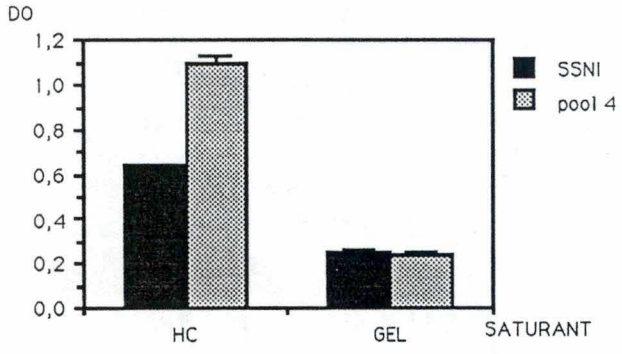
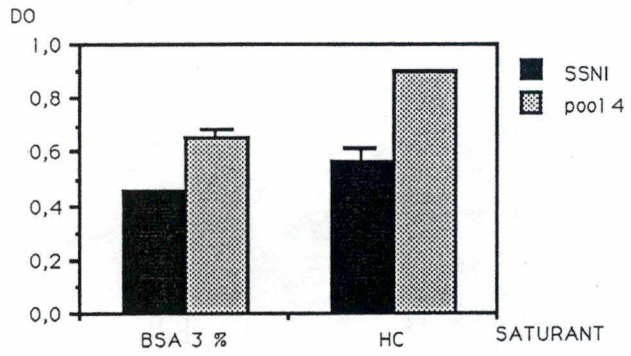


Schéma 65 :
Test ELISA pour la mise au point du moyen de saturation

a) Comparaison saturation hydrolysat de caséine (HC) 2 X dilué et gélatine 0,02% (GEL)
(coating avec AE 1 µg/ml, dilutions sérum 1/50 en PBS-Tween-HC 10 %, lavages en PBS-Tween, révélation à l' OPD)



b) Comparaison saturation BSA 3 % et HC 2 X dilué
(Coating avec AE 1 µg/ml, dilutions sérum 1/50 en PBS-Tween-HC 10 %, lavages en PBS-Tween, révélation à l'OPD)



La saturation avec de la BSA 3 % dans les mêmes conditions met le signal positif moins bien en évidence que l'HC (Schéma 65-b). Pour la suite de la mise au point, nous avons donc conservé l'HC comme moyen de saturation.

Nous n'avons pu mettre en évidence ni un effet significatif du tampon de lavage, ni une influence du type de chromogène. Nous avons dès lors opté pour un lavage en PBS-Tween et une révélation en OPD (cfr "Matériel et méthodes").

3. Test ELISA des séra individuels Quil A.

Quinze jours après le troisième rappel, nous avons testé individuellement en ELISA (conditions mises au point) l'antisérum des souris du groupe 4 immunisé en adjuvant Quil A contre l'AE. Le schéma 66 montre la réponse des souris par rapport au non immun. Les souris numérotées 1, 3 et 5 ont une réponse légèrement meilleure que les deux autres pour les dilutions 1/50 et 1/100. Le fait de ne mettre en évidence une réponse spécifique qu'à de faibles dilutions après le troisième rappel, laisse présager une réponse immunitaire de faible affinité ou bien une réponse avec une faible concentration en anticorps spécifiques. Un bon moyen de vérifier la spécificité d'un antisérum est de réaliser un test d'inhibition ou d'épuisement de sérum.

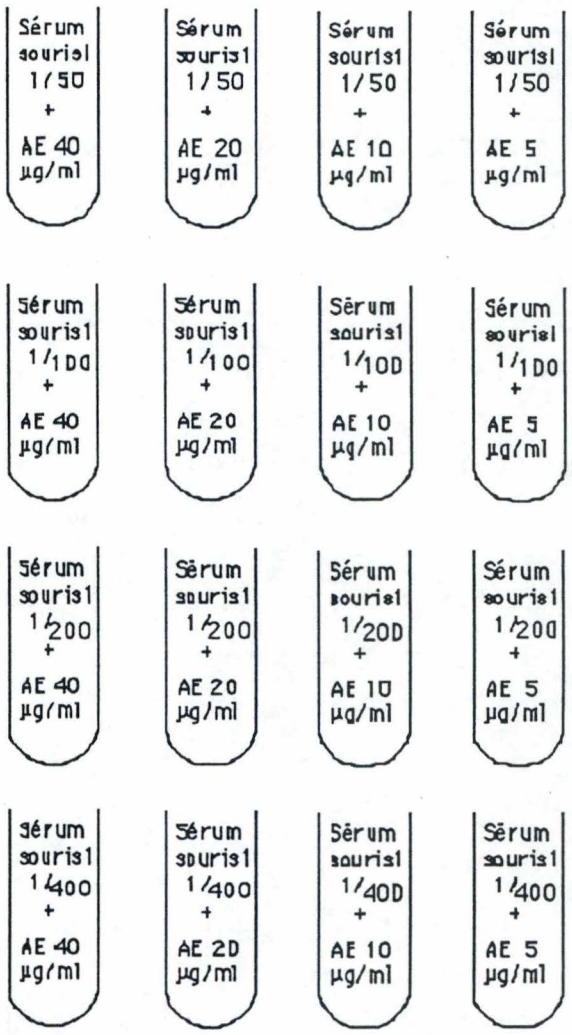
4. Test d'épuisement du sérum.

Pour ce test, dont les conditions expérimentales sont reprises au schéma 67, nous avons préparé différentes dilutions du sérum de la souris n°1 (groupe 4) avec du PBS-Tween-HC et nous les avons incubées (une heure à 37°C) avec des solutions de différentes concentrations en AE. Le mélange a été déposé sur des plaques coatées avec de l'AE et la suite du test s'est déroulée comme un test ELISA indirect dans les conditions déterminées.

Schéma 67 :
Test ELISA d'épuisement du sérum de la souris 1 avec différentes concentrations d'AE (5-10-20-40 µg/ml) et différentes dilutions de sérum (1/50, 1/100, 1/200, 1/400)

Incubation des séra dilués avec des solutions d'AE (v : v) :

- Une heure à 37°C
- Une heure à 4°C



disposition des séra sur la plaque de microtitration :

Dilution des séra :	SSNI non épuisé	sérum souris1 non épuisé	sérum souris1 épuisé	sérum souris1 épuisé	sérum souris1 épuisé	sérum souris1 épuisé
1/100						
1/200						
1/400						
1/800						

Résultat du test d'inhibition :

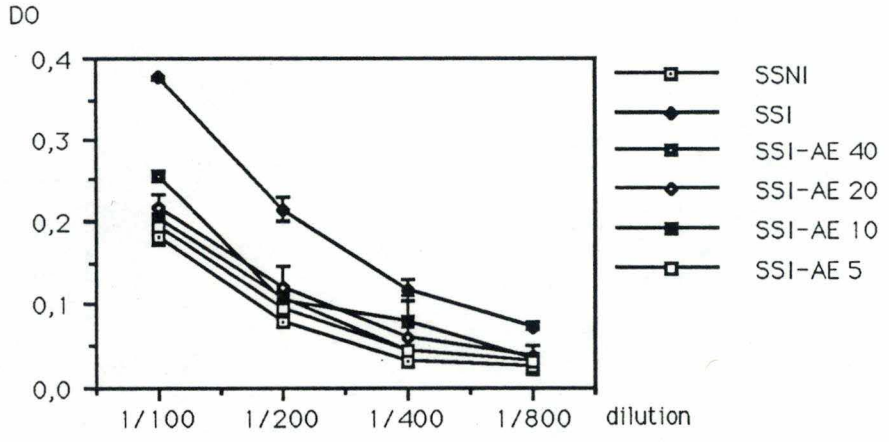
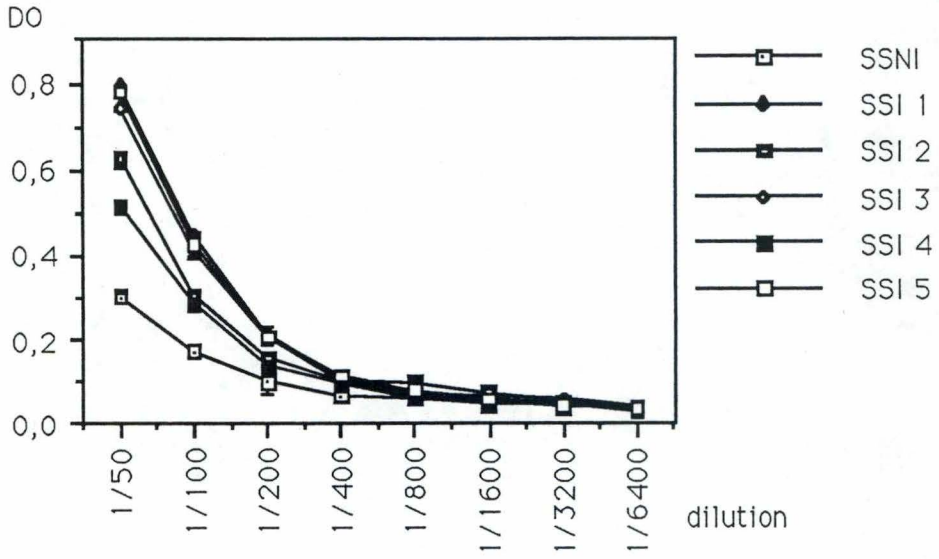


Schéma 66 :

Test ELISA des séra individuels des souris du groupe 4

(AE + KLH + Quil A)

Coating avec AE 1 µg/ml, saturation avec HC dilué 2 X en PBS, lavages en PBS-Tween, dilution des séra immuns et non immuns dans du PBS-Tween-HC 10 %, révélation à l'OPD-H_2O_2



Après révélation, nous avons mis en évidence une diminution du signal positif du sérum immun incubé avec AE par rapport au sérum non préincubé, et ce, pour toutes les dilutions et avec toutes les concentrations d'AE.

D'après ce test, le sérum contiendrait des anticorps capables de se combiner en solution à l'AE ; ces anticorps ne seraient plus capables de se combiner à l'antigène immobilisé sur support solide. Nous avons alors envisagé une fusion pour la production d'anticorps monoclonaux.

B. PRODUCTION ET CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.

1. Fusion.

C'est la souris 1 immunisée avec le mélange AE + KLH + Quil A qui a été choisie comme donneuse de splénocytes pour la production d'anticorps monoclonaux et ce après un dernier rappel 4 jours avant la fusion.

La suspension cellulaire issue de la fusion a été distribuée sur 10 boîtes tapissées de cellules nourricières.

2. Résultats du criblage.

Nous avons choisi le test ELISA pour la détection des anticorps monoclonaux après la fusion car la technique permet le criblage rapide, en une journée, de plusieurs centaines de clones.

Dix jours après la fusion, un premier criblage en utilisant comme antigène soit la KLH, soit l'AE a été réalisé. Ce test a permis d'éliminer 470 surnageants d'hybridomes sur 490. Ceux-ci se sont révélés soit négatifs soit positifs seulement contre la KLH. Quant aux 20 hybridomes positifs contre l'AE, ils se sont avérés être également légèrement positifs contre la KLH

Schéma 68 :

Représentation des résultats obtenus lors du premier criblage en ELISA des hybridomes (n°1 à n°80) sur AE 1 µg/ml et sur KLH 1 µg/ml

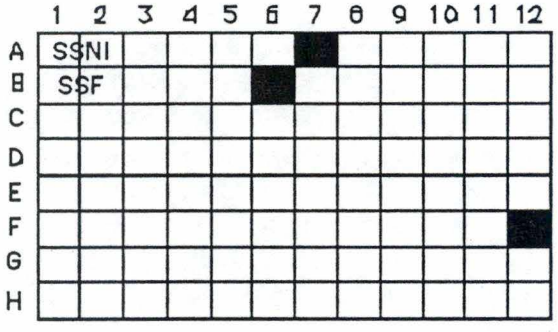
Saturation avec HC 2 X dilué, surnageants purs (en simple puits), sérum de la souris de fusion (SSF) et sérum non immun (SSNI) dilués 50 X en PBS-SBN (en dupliquate), lavages en PBS, deuxième anticorps dilué 500 X en PBS-SBN, révélation à l'OPD

Légende :

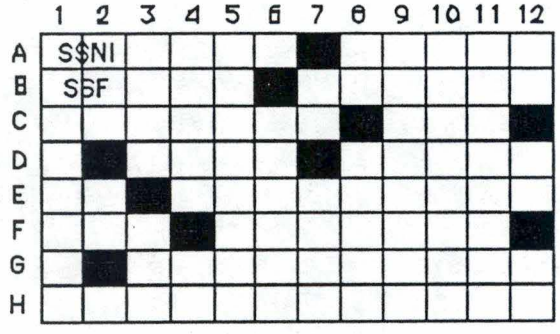
□ = signal inférieur à celui donné par le sérum de la souris de fusion (SSF)

■ = signal supérieur à celui du sérum de la souris de la fusion

a) Réponse contre AE.



b) Réponse contre la KLH.



(Schéma 68). Ces hybridomes ont été clonés en vue de caractériser leur exacte spécificité une fois rendus "monoclonaux".

3. Isotypie.

L'isotypie des anticorps contenus dans nos surnageants a été déterminée suivant le protocole décrit dans "Matériel et méthodes" en vue de tester la présence d'IgM, d'IgG1, d'IgG2a et d'IgG2b.

Tous nos clones positifs se sont révélés être producteurs d'IgM. Or, il est bien connu que ces immunoglobulines sont souvent caractéristiques des réponses primaires. Pourtant, la souris de fusion avait subi plusieurs rappels avec le mélange AE + KLH + Quil A.

Ce test de détermination de l'isotypie prouve en tout cas que nos surnageants contiennent bien des anticorps.

4. Spécificité des anticorps monoclonaux.

N'ayant toujours pas reçu le thioalcool (AESH), nous avons décidé d'approfondir le problème révélé lors du criblage de la fusion. Les hybrides sélectionnés donnaient un signal positif contre l'AE mais également contre la KLH.

Nous avons décidé de tester nos surnageants en dot-blot avec l'AE comme antigène et l'HC comme moyen de saturation. Aucun surnageant n'a permis de montrer de spot sur AE mais par contre, certains d'entre eux ont donné un bruit de fond très élevé sur toute la surface du carré de nitrocellulose.

Pour tenter de comprendre ce phénomène, nous avons testé en dot-blot le sérum de la souris ayant permis la fusion et, à titre d'exemple, le surnageant 8E4C10 en comparant deux moyens de saturation (HC 2 X dilué en PBS et BSA 3 %- Tween 0,4 %) et

Schéma 69 :
Dot-blot sur HC ou AE avec comme moyen de saturation HC ou BSA 3 %-Tween 0,4 %.

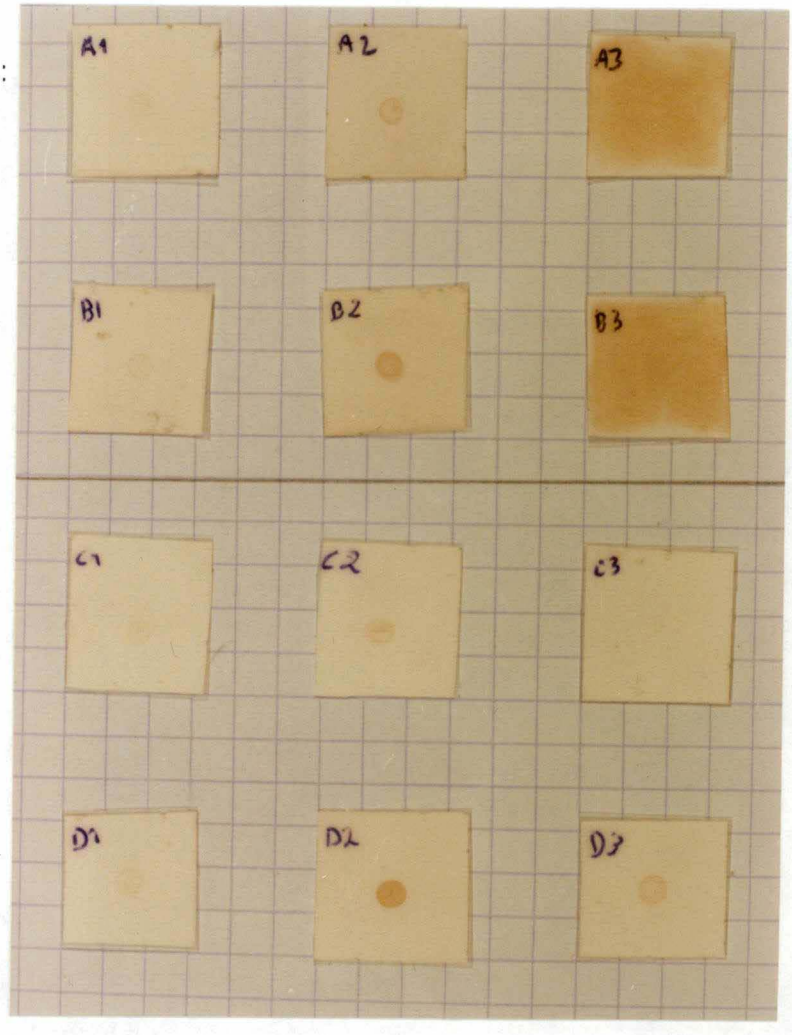
Conditions du test :

- Dépôt d'antigène : 10 µl par carré de nitrocellulose

A1 AE 1 mg/ml	A2 AE 1 mg/ml	A3 AE 1 mg/ml	Saturation HC dilué 2 X en PBS
B1 HC 2 fois dil.	B2 HC 2 fois dil.	B3 HC 2 fois dil.	
C1 AE 1 mg/ml	C2 AE 1 mg/ml	C3 AE 1 mg/ml	Saturation BSA 3 %-Tween 0,4 %
D1 HC 2 fois dil.	D2 HC 2 fois dil.	D3 HC 2 fois dil.	

- séra :
  - SSNI dil. 25 fois
  - SSF dil. 25 fois
  - 8E4H10 pur
- 2° anticorps : SAM-POD dilué 100 X en PBS
- Révélation : DAB

Résultat (photo n°2) :



deux antigènes immobilisés (AE et HC) (Schéma 69). Nous voyons sur la photo n°2 que le surnageant 8E4C10 reconnaît l'HC en spot sur le carré saturé à la BSA 3 % tandis que le sérum de la souris immunisée (dilution 1/25) reconnaît à la fois l'HC et l'AE. Le sérum non immun donne un très léger spot. Il y a donc une activité spécifique dans le sérum. Mais le surnageant monoclonal quant à lui reconnaît l'HC et pas l'AE.

Nous avons voulu vérifier ces observations en utilisant un test ELISA indirect. Une plaque maxisorp a été coatée avec des différentes molécules de nature protéique et glucidique afin de tester la spécificité des anticorps contenus dans le surnageant 8E4C10 (Schéma 70). Le test met en évidence la réactivité du surnageant 8E4C10 vis-à-vis de l'HC ainsi que de la KLH, la BSA et l'ovalbumine. Ce surnageant ne montre par contre pas de réactivité significative à l'encontre de la gélatine ni de la poudre de lait écrémé.

Un test ELISA d'inhibition a permis de confirmer la forte réactivité des anticorps avec l'HC (Schéma 7). Les surnageants préincubés avec de l'HC donnent un signal atténué sur la plaque de microtitration coatée avec AE et saturée avec HC. La préincubation avec de la gélatine n'altère pas l'intensité du signal positif sur HC car elle n'épuise pas le sérum en anticorps capables de se combiner avec l'HC. Des résultats résultats ont été obtenus sur une plaque n'ayant subi que la saturation en HC.

De l'ensemble de ces tests, nous pouvons dire que les anticorps monoclonaux détectent une conformation moléculaire présente dans l'HC.

La faible intensité de la réponse immune constatée nous a contraint de travailler à de faibles dilutions de sérum pour lesquelles la discrimination signal positif/bruit de fond était "critique". Il semble néanmoins que les tests 63, 64, 66 et 69 nous aient permis de montrer une réponse positive à l'encontre de l'AE, permettant de discriminer les séra des souris immunisées par rapport à celui de la souris non immunisée.

Schéma 70 :

Test ELISA pour la réactivité des anticorps monoclonaux du surnageant 8E4C10 vis-à-vis du lait en poudre (GLO), hydrolysat de caséine (HC), gélatine 0,02 %, phénylalanine (PHE), cystéine (CYS), albumine (BSA), ovalbumine (OVA), KLH, maltose (MAL) et inuline (INU)

Il n'y a pas eu dépôt d'un agent de saturation et le surnageant monoclonal a été utilisé pur.

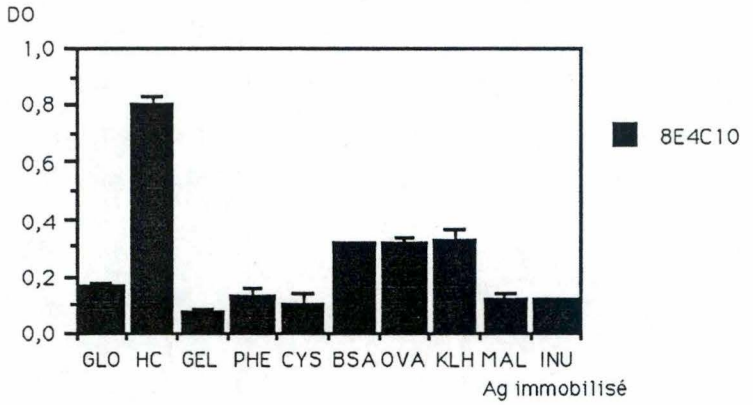
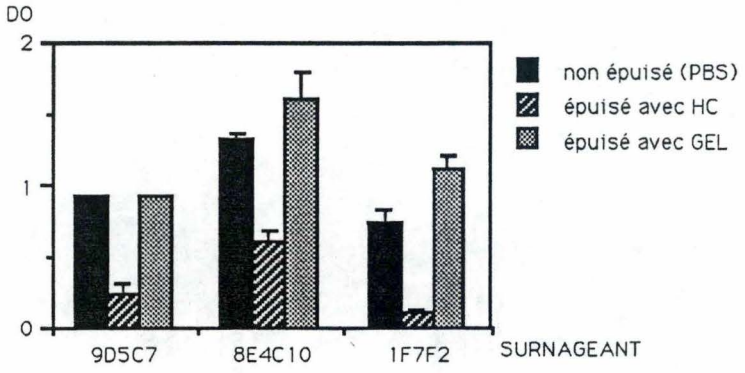


Schéma 71 :

Test ELISA d'inhibition des surnageants

(Préincubation des surnageants avec HC ou GEL et dépôt sur une plaque coatée avec AE et saturée avec HC)



Cependant, le test 69 nous montre que les séra immuns ont également une réactivité vis-à-vis de l'HC alors que les séra préincubé restent négatifs à son encontre.

Comme l'HC a été utilisée lors de tous les tests comme agent de saturation, il est possible que la réactivité à son encontre soit responsable d'une partie au moins du signal que nous attribuions à l'AE.

Il semble néanmoins certain que même s'il y avait dans le sérum polyclonal une réponse spécifique anti-AE, nous n'avons pas réussi lors du protocole de fusion à immortaliser les cellules B responsables de cette spécificité. Nous avons par contre sélectionné soit des cellules spécifiques de la KLH soit des cellules polyréactives.[59] Cette polyréactivité s'exprime entre autre vis-à-vis de l'HC et certaines autres protéines. Puisque nous ne mettons pas en évidence une telle réponse polyréactive chez la souris non immunisée, nous pouvons penser que cette réactivité est liée au processus d'immunisation et pourrait résulter d'une activité mitogénique polyclonale soit de la KLH soit de l'adjuvant Quil A qui auraient stimulé des cellules B polyréactionnelles. In fine, ce sont ces cellules qui auraient pris le pas sur le reste de la réponse et qui auraient été sélectionnés lors de la fusion.

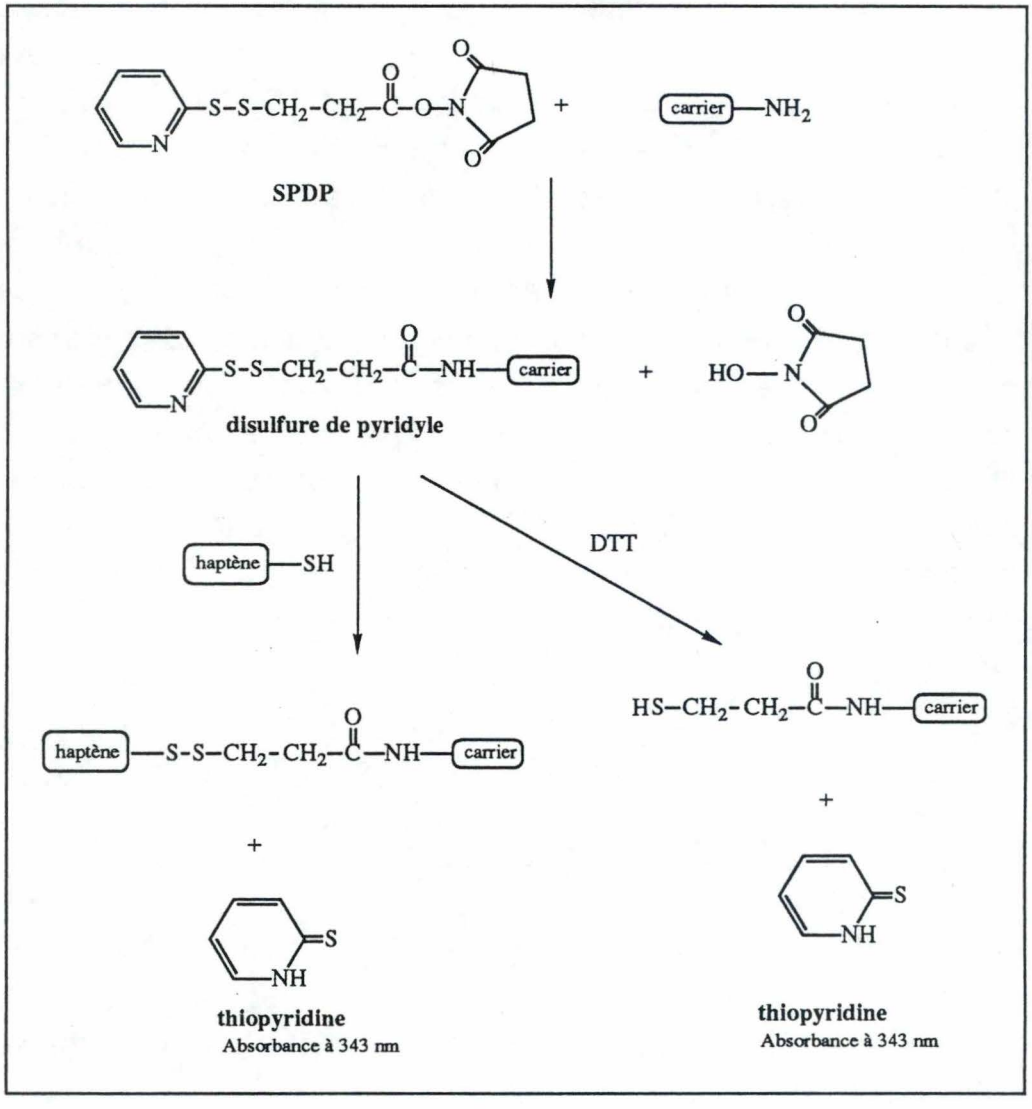
C. COUPLAGES première partie.

Pendant le processus d'immunisation avec l'AE non couplé et les tests de détection, nous avons reçu le thioalcool (AESH) synthétisé par P. Pasau pour le couplage à une protéine porteuse au moyen du SPDP.

Le procédé de couplage en deux étapes entre un groupe thiol et un groupe amine au moyen du SPDP est représenté au schéma 72.

Schéma 72 :

Rappel de la réaction de couplage entre un haptène thiolé et une protéine au moyen du SPDP



Le degré de substitution est estimé en déterminant la concentration de thiopyridine libérée par la mesure de l'absorbance à 343 nm.

Avant toute tentative de couplage au SPDP, nous avons voulu nous assurer que la structure bicyclique de notre haptène n'absorbait pas dans la même gamme de longueur d'onde que la thiopyridine générée au cours de la réaction. Nous avons soumis 1 ml d'une solution d'alcool EXO à 1 mg/ml à un balayage de longueur d'onde de 190 nm à 900 nm. La structure présente deux pics d'absorbance mais n'absorbe pas à 343 nm ce qui nous autorise à suivre les réactions de couplage à cette longueur d'onde.

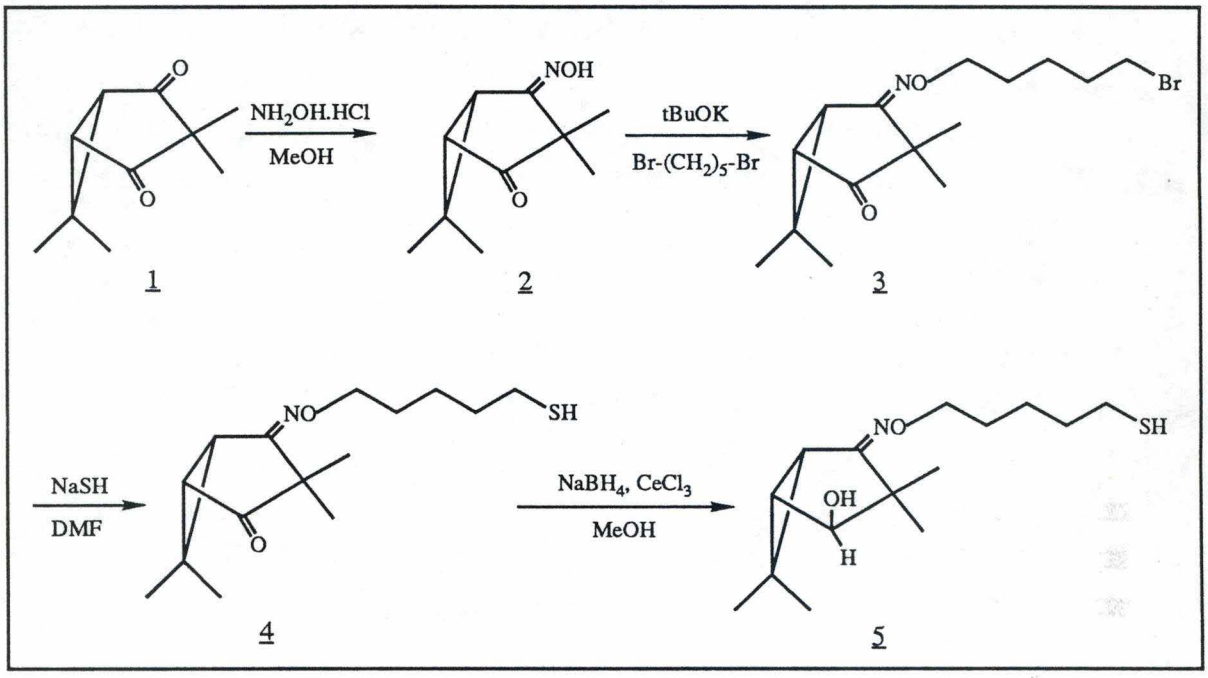
Le thioalcool synthétisé par P. Pasau (40 mg) a été mis en solution avec du PBS à une concentration de 10 mg/ml. Le couplage de cet haptène a d'abord été tenté avec comme carrier la BSA. Le thioalcool ajouté en excès molaire 50 par rapport aux disulfures de pyridyle n'a pas permis la libération de thiopyridine dans la solution de couplage, comme le témoigne le maintien de l'absorbance à 343 nm à sa valeur initiale.

Après de nombreuses tentatives en faisant varier température, densité de couplage ..., nous avons constaté que, contrairement à l'alcol EXO, le thioalcool n'était pas soluble en solution aqueuse. Nous avons essayé de solubiliser le thioalcool restant avec de la diméthylformamide ou DMF. Un spectre RMN de la solution de rinçage (éther) du récipient qui contenait le produit a été pris afin de s'assurer que le produit ne s'y trouvait plus. Vu l'absence de tout signal en RMN, nous en avons conclu que le thioalcool est soluble dans la DMF.

Nous avons utilisé une solution de thioalcool à 4 mg/ml en DMF en vue des couplages. Mais l'ajout de cette solution de thioalcool à la protéine activée au SPDP rendait la solution de couplage trouble ce qui ne nous autorisait plus à suivre la réaction de couplage à 343 nm. Des tests ont montré que la

Schéma 73 :

Rappel des quatres réactions conduisant au thioalcool 5



turbidité était liée à la présence du thioalcool dans la solution acqueuse contenant de la DMF.

Le produit étant épuisé après ces tentatives infructeuses de couplage, nous avons dû reprendre la synthèse de l'haptène.

D. SYNTHESE DU THIOALCOOL 5.

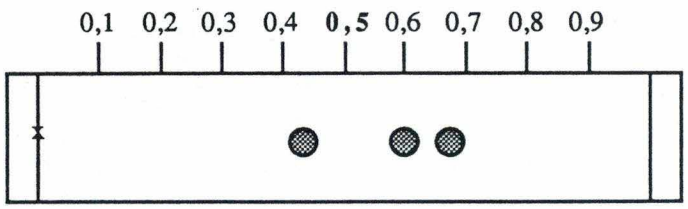
Le schéma 73 reprend les différentes étapes qui furent mises au point au laboratoire de chimie organique et que nous avons répétées pour obtenir des quantités plus importantes de thioalcool.

1. Synthèse de l'oxime 2.

Le produit de départ 1 (dicétone) a été préparé au Laboratoire de Chimie Organique par T. Ollevier. La première étape implique la condensation du chlorhydrate d'hydroxylamine sur cette dicétone. Nous avons dans un premier temps respecté les conditions élaborées par P. Pasau ($NH_2OH.HCl$ 1 éq., CH_3COONa 0,83 éq., CH_3OH, reflux, 15h). En chromatographie sur couche mince (Schéma 74), on distingue la présence de trois produits :

Rf=0,59 (produit A)
Rf=0,43 (produit B)
Rf=0,68 (dicétone)

Schéma 74 :
TLC du brut réactionnel de la première étape
(Les trois produits sont visibles séparément sous forme d'une tache sombre)

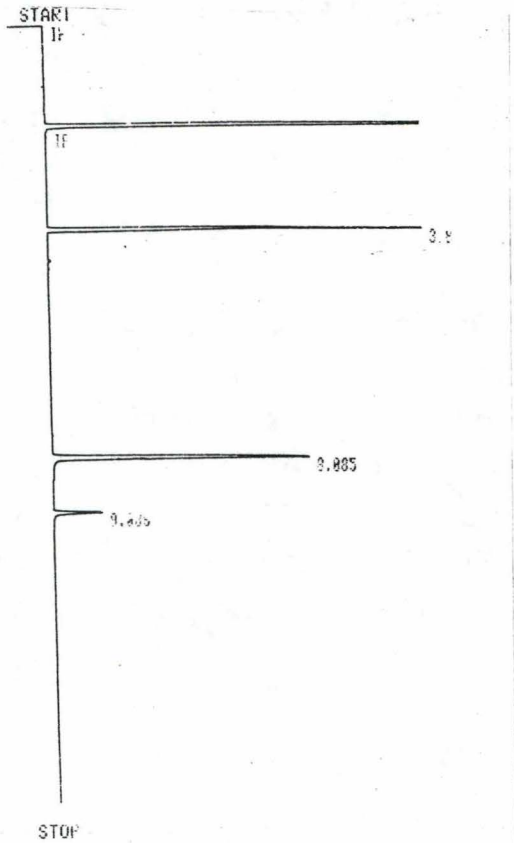


Eluant : éther / pentane (50 / 50)

Schéma 75 :
Chromatogramme GC

a) du brut issu de la réaction en quantité équimolaire de base
b) du brut issu de la réaction en excès de base

a)



STOP

Closing signal file M:SIGNAL .BNA

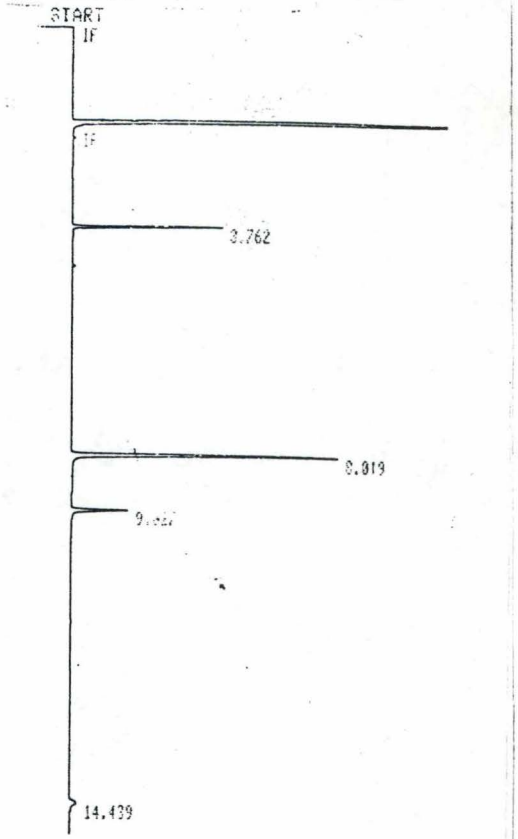
RUN# 625 APR 24, 1901 22:26:43

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNA
AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
3.837	1214270	PB	.033	53.82587
8.085	869912	PB	.043	38.56125
9.086	171741	PB	.045	7.61289

TOTAL AREA=2255923

b)



END OF SIGNAL

Closing signal file M:SIGNAL .BNA

RUN# 629 APR 25, 1901 02:32:28

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNA
AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
3.762	156969	PB	.027	23.03770
8.019	399963	PB	.038	58.70096
9.027	92650	PB	.042	13.59786
14.439	31775	BB	.117	4.66349

TOTAL AREA= 681357

Selon une étude de chromatographie en phase gazeuse (Schéma 75-a), les trois produits (dicétone/produit A/produit B) sont en proportions 54/38/8 (RT= 3,8 minutes, RT = 8,1 minutes, RT = 9,1 minutes). Cette analyse rend compte du faible rendement de la réaction : il reste encore 53 % de dicétone.

Nous avons recommencé la réaction avec un léger excès de chlorhydrate d'hydroxylamine par rapport à la dicétone (1,5 éq. $NH_2H.HCl$, 1,5 éq. CH_3COONa, CH_3OH, 15 h). Dans ces conditions, la dicétone a réagi avec un meilleur rendement (Schéma 75-b). La dicétone ne représente plus que 23 %. Cependant, outre les deux produits A et B déjà présents auparavant (RT_A = 7,8 minutes ; 59 %, RT_B = 8,8 minutes; 14 %), nous avons remarqué l'apparition d'un troisième composé C (RT_C = 13,9 minutes ; 4 %).

Nous avons pu facilement séparer ces divers composés par chromatographie sur colonne humide (éluant : éther/pentane (50/50)).

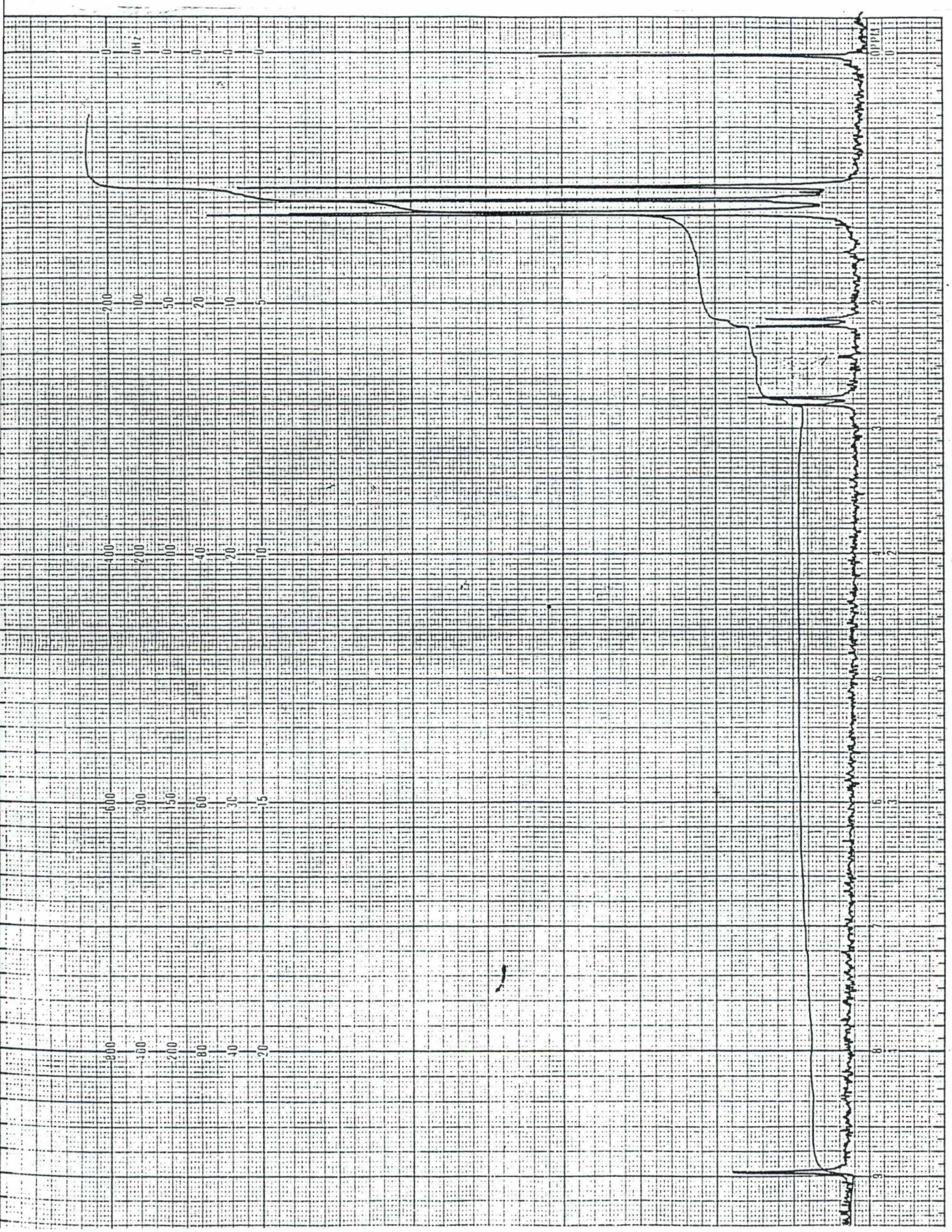
Après analyse en résonance magnétique nucléaire (Schéma 76), il ressort que les deux produits A et B présentent les caractéristiques spectrales des deux isomères géométriques de l'oxime 2 attendue. Ces 2 stéroisomères diffèrent par l'orientation dans l'espace de la liaison N-OH.

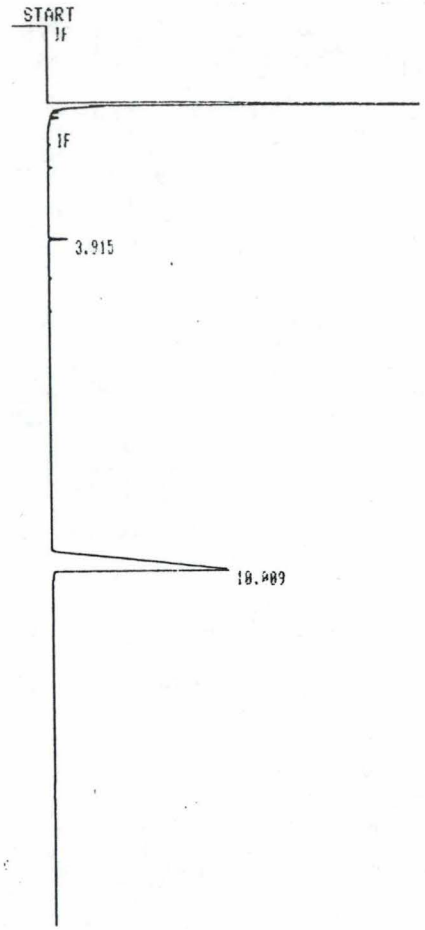
Comme il ne nous pas été impossible à notre stade de distinguer l'isomère SYN de l'isomère ANTI, nous avons appelé arbitrairement le produit A, l'oxime A et le produit B, l'oxime B.

Le produit possédant le temps de rétention le plus important en GC (RT_C = 13,9 minutes) s'avère être une dioxime, résultat de l'addition de l'hydroxylamine sur les deux fonctions cétoniques. Notons que dans ce cas, nous n'observons qu'un seul stéréoisomère.

Pour la suite de la synthèse, nous avons choisi l'oxime A (RT = 7,9 minutes ; Rf = 0,59) parce que quantitativement plus abondante.

Schéma 76 :
Spectre RMN de l'oxime 2A





STOP

Closing signal file M:SIGNAL .BNA

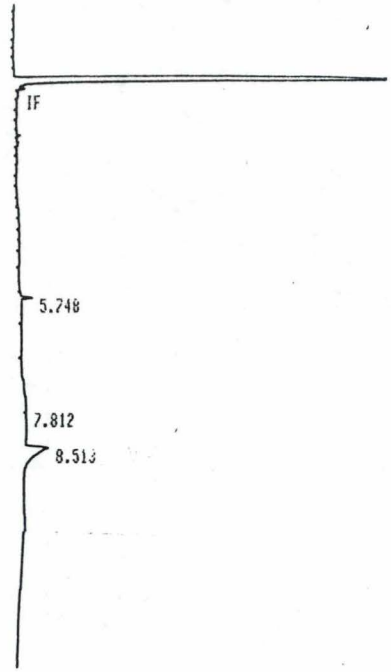
RUN# 747 MAY 8, 1901 01:35:03

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNA
AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
3.915	156296	PB	.825	1.46825
10.009	10488736	PB	.185	98.53174

TOTAL AREA=1.0645E+07

Schéma 80 :
Chromatogramme GC du cétothiol



STOP

Closing signal file M:SIGNAL .BNC

RUN# 707 MAY 2, 1901 06:20:06

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC
AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
5.748	9123	PB	.083	8.80785
7.812	42788	PV	.666	41.30994
8.513	51667	VV	.197	49.88222

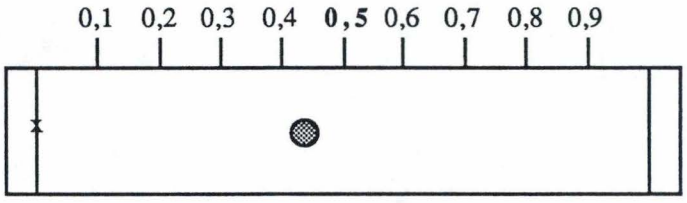
TOTAL AREA= 103578

Schéma 78 :
Chromatogramme GC de la bromocétone

Synthèse de la bromocétone 3.

La deuxième étape a consisté dans un premier temps à traiter la cétoxime 2 à la base (tBuOK, 1,1 éq. ; THF, 0°, 0,25 heure). Nous avons additionné le dibromopentane ($Br(CH_2)_5Br$, 4 éq.) à l'alcoolate formé. Après réaction (2 h, 20°C), nous avons isolé la bromocétone 3 (RT = 8,5 minutes, Rf = 0,45) avec un rendement de 83 % (Schéma 77 + Schéma 78).

Schéma 77 :
TLC de la bromocétone 3 après purification (Rf = 0,45)

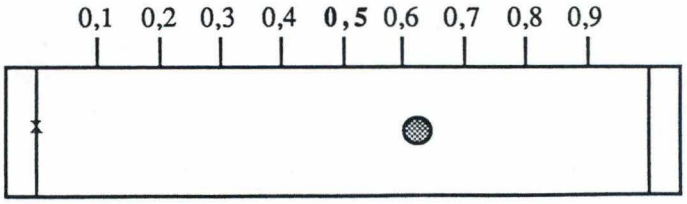


Eluant : éther / pentane (10 / 90)

3. Synthèse du cétothiol 4.

La bromocétone 3 a été mise en réaction avec l'hydrogénosulfure de sodium (NaSH, 13 éq. ; DMF ; 25°C ; 1 h). Nous avons obtenu après purification le cétothiol 4 (RT = 10,0 minutes, Rf = 0,63) avec un rendement de 73 % (Schéma 79 + Schéma 80).

Schéma 79 :
TLC du cétothiol après purification (Rf = 0,63)



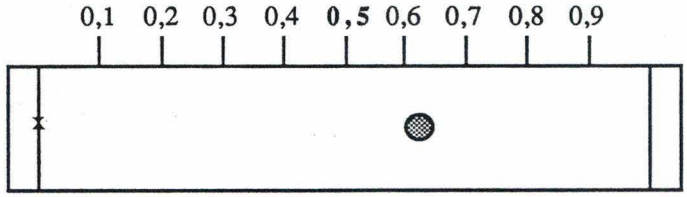
Eluant : éther / pentane (40 / 60)

4. Synthèse du thioalcool 5.

La dernière étape préconise la réduction du cétothiol 4 en espérant former sélectivement l'alcool EXO sans toucher à la fonction oxime (réduction stéréo- et chémosélective). Pour cette réduction, nous avons utilisé les mêmes conditions que celles décrites par T. Ollevier. Elles impliquent l'emploi de borohydrure de sodium ($NaBH_4$, 1 éq.) en présence de trichlorure de cérium (1 éq.) dans le méthanol à -78°C. Appliquées dans le cas du cétothiol 4, nous avons observé au cours de la réaction la formation d'un premier produit de Rf = 0,65 (éluant éther/pentane (70/30)). Celui-ci semble disparaître au profit d'un composé plus polaire de Rf = 0,40 pour des temps de réaction plus importants. Après deux heures, nous avons extrait le mélange réactionnel et isolé les deux produits : produit α, Rf = 0,65 ; produit β, Rf = 0,40 (Schéma 90). Remarquons que ces produits ne sont pas analysables en GC.

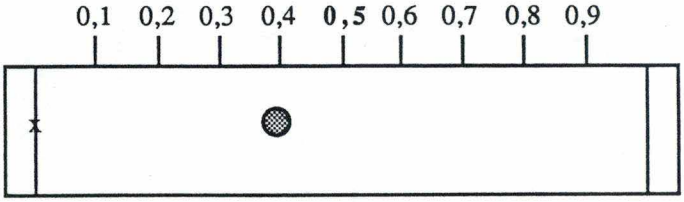
Schéma 90 :
TLC des deux produits isolés après réduction du cétothiol 4

a) Produit α (Rf = 0,65)



Eluant : éther / pentane (70 / 30)

b) Produit β (Rf = 0,40)



Eluant : éther / pentane (70 /30)

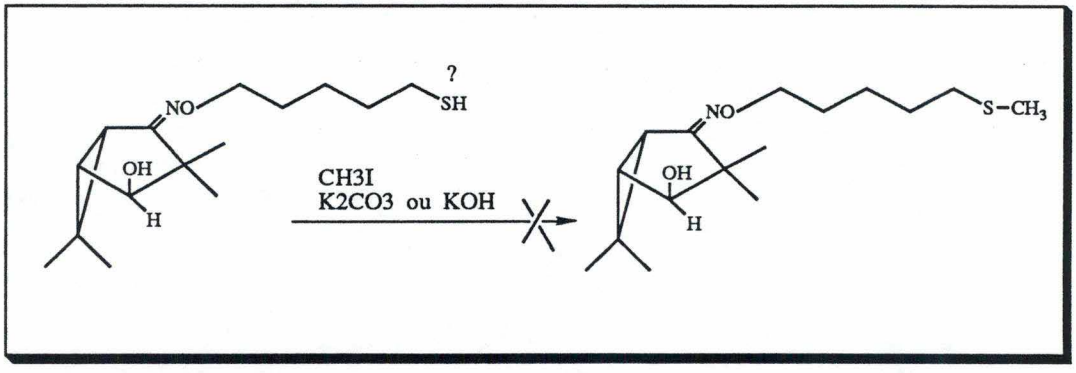
Les spectres RMN^{1}H des 2 produits sont très similaires et dès lors nous n'avons pas été en mesure de leur assigner sans ambiguïté la structure du cétothiol attendu.

Le spectre RMN^{1}H du premier produit (α) semble assez étrange en ce sens qu'il présente des signaux caractéristiques de la cétone de départ et du second produit.

Le spectre RMN^{1}H du produit β semble plus homogène et correspondrait à la structure du cétothiol attendu. Une analyse approfondie du spectre nous a laissé pensé que nous étions bien en présence de l'isomère EXO. La fonction oxime n'a pas été réduite. Cependant, nous n'avons pas pu distinguer le proton du thiol.

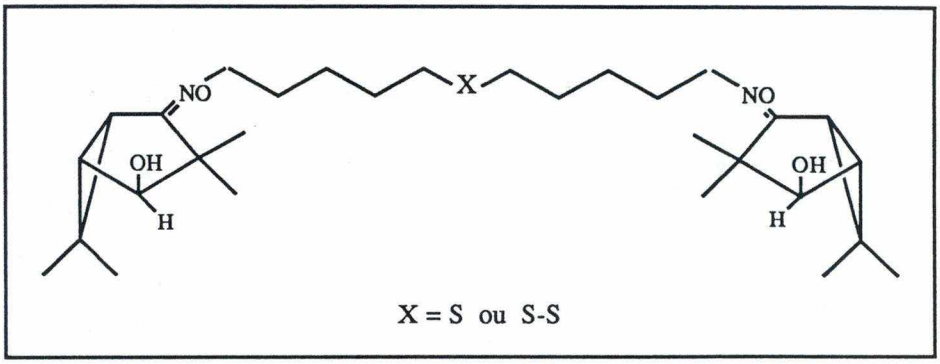
Une méthode pour détecter un groupe thiol dans une molécule est sa méthylation parce que le produit montre un signal caractéristique en RMN. La tentative de méthylation à l'iodure de méthyle (CH_3I) du produit β s'est soldée par un échec (Schéma 91). Nous avons récupéré le produit de départ intact.

Schéma 91 :
Tentative de méthylation du produit β



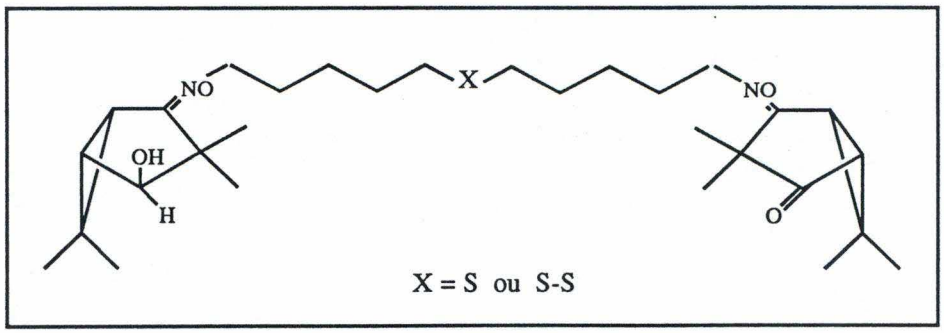
Nous avons supposé que ce produit possédait la structure d'un homodimère sulfure ou disulfure (Schéma 92).

Schéma 92 :
Proposition de structure pour le produit β



Une analyse en spectrométrie de masse (**Continental Pharmaceutica**, Mont-Saint-Guibert) a permis de confirmer cette hypothèse. Notre produit β est un dimère de disulfure en mélange avec des traces de sulfure et de thiol. Sur ces bases, il semblait que le premier produit de Rf = 0,65 soit un hétérodimère composé d'une unité cétoxime et d'une unité hydroxyoxime (Schéma 93).

Schéma 93 :
Proposition de structure pour le produit α



Nous avons ainsi soumis ce produit α à la réduction au $NaBH_4/CeCl_3$ selon le même protocole que celui utilisé précédemment. Cette réaction a engendré le produit plus polaire (produit β), ce qui a confirmé nos observations (Schéma 94).

Schéma 95 :
Formation de sulfure en excès de NaSH

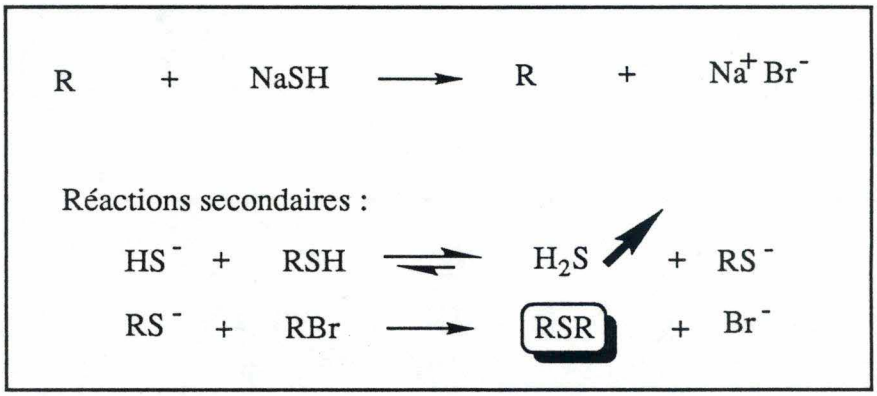


Schéma 96 :
Thiolation à la thiourée

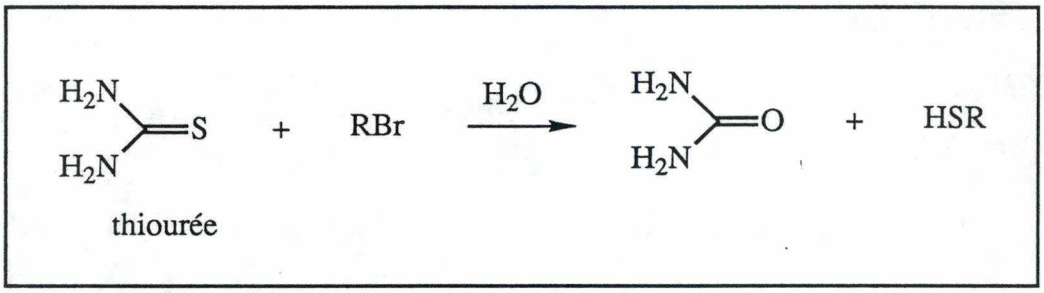
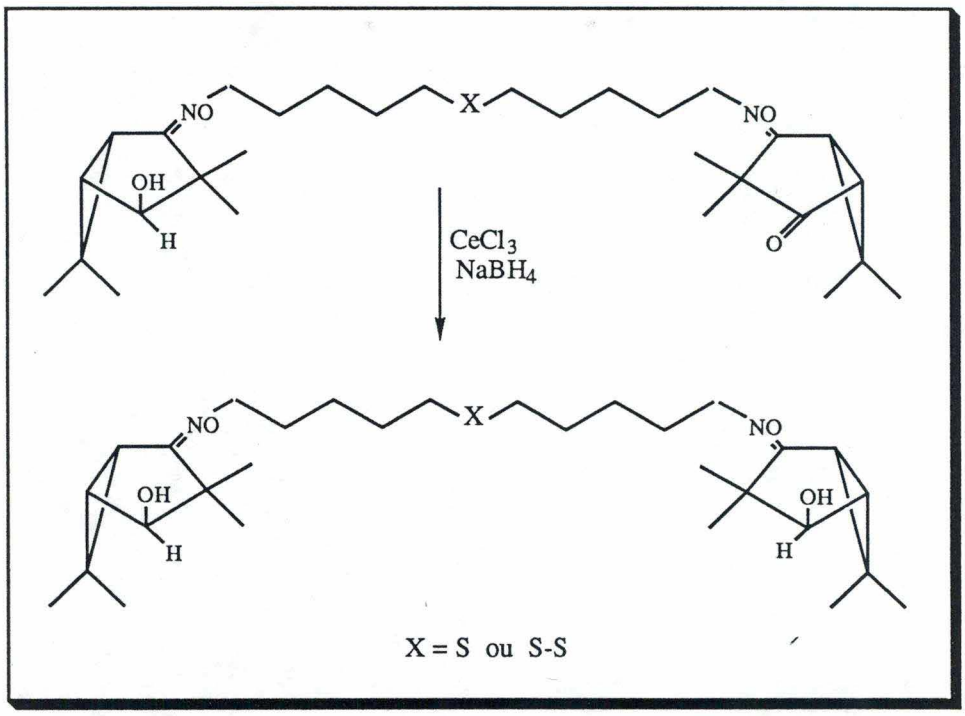


Schéma 94 :
Réduction du produit α au $NaBH_4/CeCl_3$

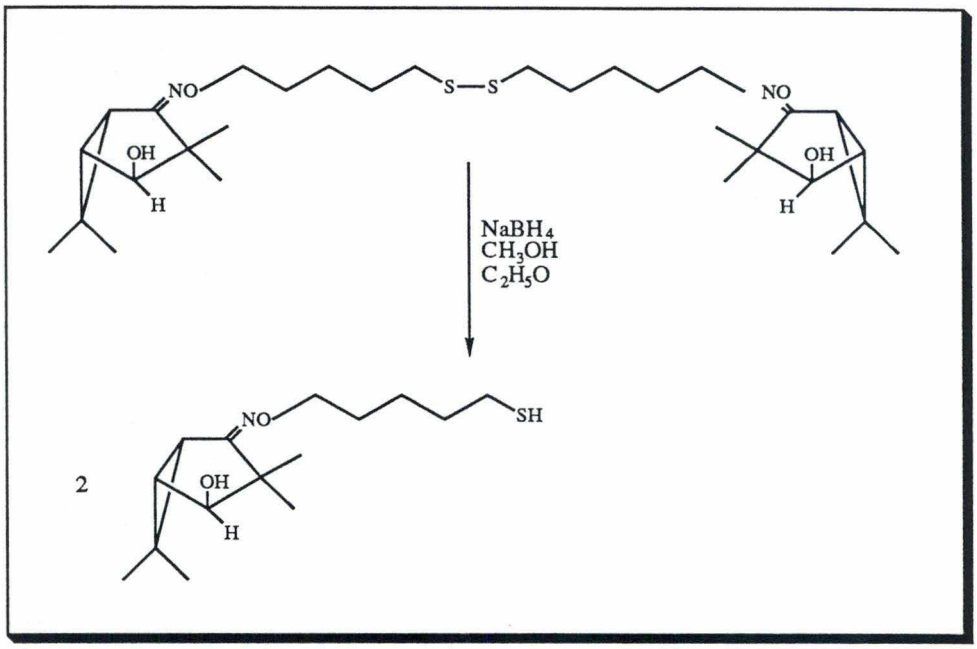


La présence de sulfure trouve vraisemblablement son origine lors de l'étape de thiolation. Cette réaction s'est déroulée dans un large excès de NaSH, milieu propice à certaines réactions secondaires (Schéma 95).

Il serait possible d'éviter la formation de sulfure en utilisant une autre méthode : la thiolation à la thiourée.
(Schéma 96)

Pour obtenir le thiol souhaité, nous avons essayé de réduire le lien disulfure du dimère. Après quelques essais infructueux avec du Na_2S, nous nous sommes tournés vers la méthode au $NaBH_4$ (Schéma 97).

Schéma 97 :
Réduction du produit β par le $NaBH_4$

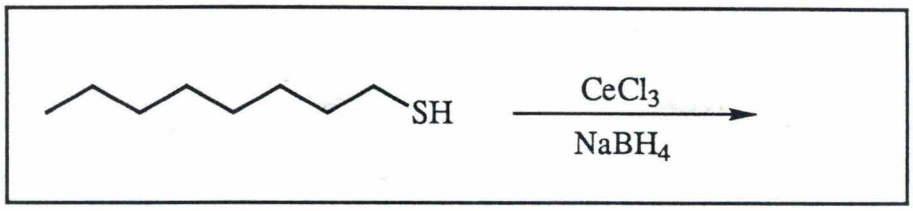


Dans ce cas, la réaction a abouti au thiol 5 attendu.

Nous nous sommes interrogés par la suite de savoir à quelle étape de la synthèse le disulfure pouvait apparaître. Pour cela, nous avons avons choisi un modèle de thiol aliphatique simple, l'octanethiol (OctSH) afin de tester nos conditions.

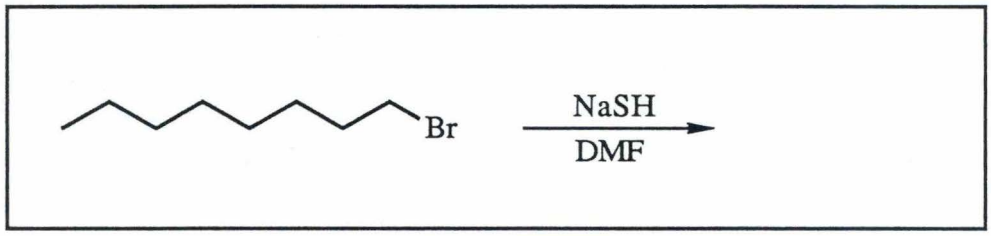
Le Dr. Dumont a synthétisé, à partir d'octanethiol (OctSH) redistillé et de bromooctane, le dioctylsulfure (OctSOct) et le dioctyldisulfure (OctSSOct). Analysés par GC, TLC et RMN, les dérivés de l'octanethiol présentent des caractéristiques propres (non présentées).

Nous avons tout d'abord mis l'OctSH en présence des réactifs de la quatrième étape de la voie de synthèse du thioalcool à savoir le trichlorure de cérium et le borohydrure de sodium :



Le produit de cette réaction présente toutes les caractéristiques TLC, GC et RMN^{1}H de l'OctSH pur. Ce n'est donc pas lors de la quatrième étape de la synthèse du thioalcool qu'une oxydation se serait produite.

Nous avons ensuite reproduit la troisième étape consistant en la thiolation du bromé :



L'analyse du brut réactionnel en GC et TLC nous montre la présence de trois produits :

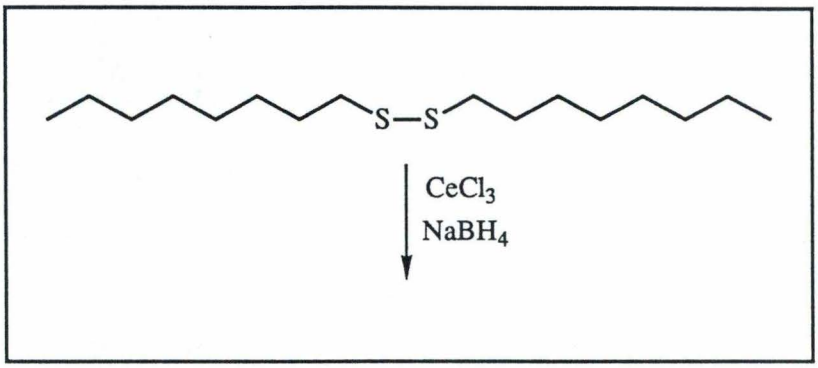
- l'octanethiol (OctSH),
- le dioctylmonosulfure (OctSOct),
- le dioctyldisulfure (OctSSOct)

Le pourcentage élevé de disulfure obtenu d'après la GC indique que le thiol a subi une oxydation soit pendant l'étape de purification soit dans l'appareil de détection.

Un thiol est donc facilement oxydable et c'est probablement lors de la purification de cette étape de thiolation que notre molécule se serait oxydée. Quant à la forme sulfure, elle est un sous-produit attendu de la réaction (cfr. Schéma 95).

Si nous avions déjà un disulfure au terme de la troisième étape de synthèse du thioalcool, nous nous sommes demandés comment un tel disulfure pouvait se comporter pendant la dernière étape qui est réductrice ($NaBH_4/CeCl_3$).

Nous avons mis l'OctSSOct dans ces conditions.



L'analyse en RMN du produit obtenu par réduction au $NaBH_4$ présente les mêmes caractéristiques que l'OctSH. Mais encore une fois, les techniques de GC et de TLC se sont avérées être oxydantes pour l'OctSH.

Cette série d'expériences montre qu'il est très délicat d'identifier les thiols et leurs disulfures correspondants. Les thiols sont en effet très oxydables et doivent donc être manipulés avec précaution dès leur formation.

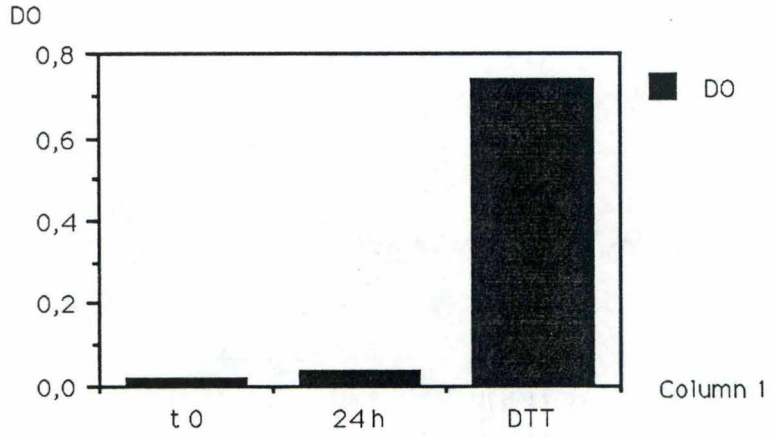
E. COUPLAGES deuxième partie.

Dans la première série de couplage, nous avons vu que le thioalcool dans la DMF rendait la solution de couplage trouble. Nous avons alors choisi un autre moyen de solubilisation pour le nouveau lot de thioalcool : le Tween ® 80 (polysorbate 80).

Schéma 98 :

Mesure de l'absorbance à 343 nm d'une solution de BSA activée au SPDP contenant 1 % de Tween 80 (au temps 0 et après 24 heures sous agitation à température ambiante).

Le traitement de cette solution au DTT nous donne l'absorbance maximale à 343 nm soit 0,735



1. Couplage du thioalcool.

a) Mise au point des couplages en Tween 80.

Les couplages avec le SPDP s'effectuent en tampon phosphate. Nous avons dû vérifier tout d'abord s'il était possible d'effectuer un couplage au moyen de SPDP en présence de Tween 80.

Ces couplages ont été réalisés avec une solution de BSA activée au SPDP à une densité d'environ 15 SPDP/BSA, la concentration de la solution en protéine étant de 0,3 mg/ml en tampon phosphate 0,1 M soit 18 nmoles/ml pour 224 nmoles de SPDP/ml. L'absorbance maximale à 343 nm a été déterminée par réduction au DTT de la solution protéique diluée 2 X en tampon phosphate : elle vaut 0,785.

1. Stabilité de la solution de protéine activée au SPDP en présence de Tween 80.

Avant tout essai de couplage, il nous a paru intéressant de vérifier la stabilité du groupe disulfure de pyridyle fixé sur la protéine. Nous avons mesuré l'absorbance à 343 nm d'une solution de BSA activée après un séjour de 24 heures sous agitation et en présence de 0,1 % de Tween 80 (Schéma 98). L'absorbance n'augmente que très peu comparée à la valeur maximale atteinte par traitement au DTT. La libération de thiopyridine n'étant pas spontanée dans ces conditions, nous avons entamé les couplages.

2. Couplage Peptide-SH.

Nous avons tout d'abord tenté de coupler un peptide synthétique de 13 acides aminés pourvu d'un groupe thiol (cystéine terminale) car nous savons que ce couplage procède efficacement dans les conditions standards (sans Tween 80).

Schéma 99 :

Essai de couplage de l'OcSH et de l'OctSSOct

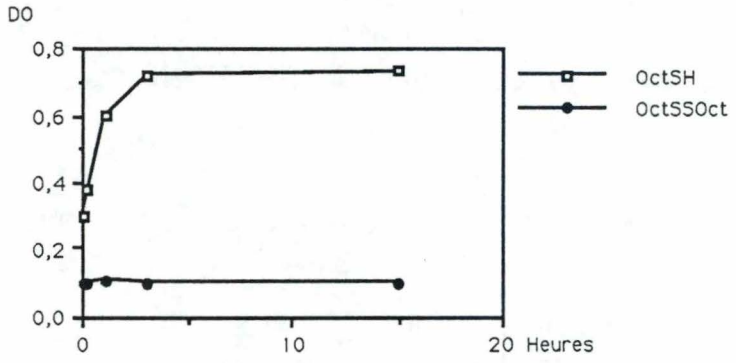
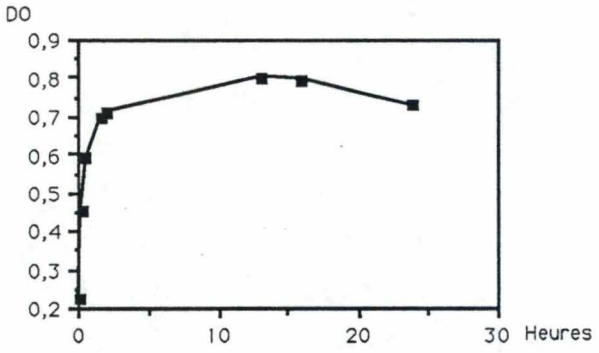


Schéma 100 :

Essai de couplage de l'OctSH issu de la réduction au $NaBH_4$



Le peptide dissous dans du tampon phosphate contenant 0,1 % de Tween 80 a été ajouté en excès molaire 10 à la BSA activée en tampon phosphate.

Après une heure, la moitié de l'absorbance maximale est atteinte ce qui signifie que 50 % des groupes disulfures de pyridile ont subi un échange avec le groupe thiol du peptide.

Donc, le Tween 80 ne nuit pas à la réaction de couplage.

3. Couplage de l'octanethiol (OctSH).

Avant de tenter le couplage du thioalcool 5, nous avons testé le couplage de notre modèle, l'octanethiol. Avec une chaîne hydrocarbonée de 8 carbones terminée par un groupe thiol, nous supposions que l'OctSH pouvait se comporter de manière similaire au spacer de notre molécule composé de 5 carbones et terminé par un groupe thiol.

L'octanethiol solubilisé dans un mélange eau-Tween 80 comme décrit dans "Matériel et méthodes" à la page 41 est ajouté en excès molaire 10 à la BSA activée et la libération du groupe thiopyridile est suivie au cours du temps (pendant 19 heures).

Celle-ci est très rapide pendant les deux premières heures (Schéma 99). En moins de 10 heures, l'absorbance atteint la valeur maximale déterminée précédemment par réduction au moyen de DTT.

Ainsi, un thiol de faible poids moleculaire solubilisé dans le Tween 80 réagit avec la protéine activée au SPDP pour s'y coupler.

Remarque : En parallèle, nous avons tenté le couplage du dioctyldisulfure dans les mêmes conditions (OctSSOct).

Schéma 101 :
Essai de couplage de AESH issu de la réduction au $NaBH_4$

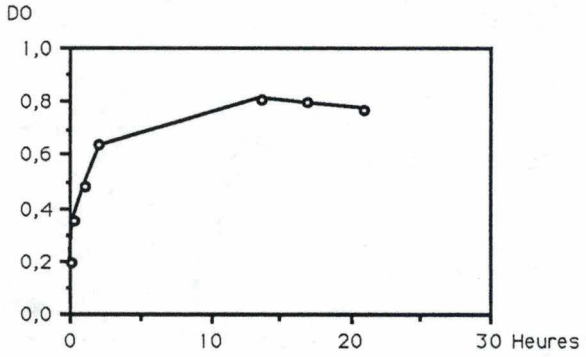
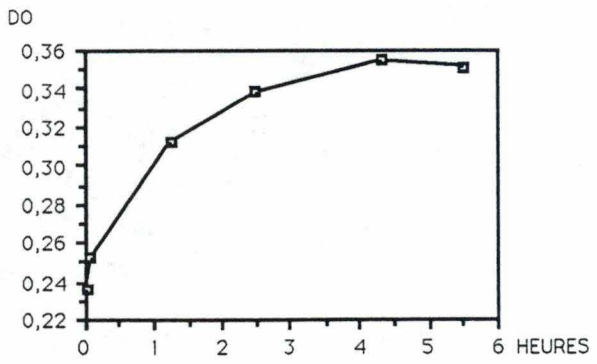


Schéma 102 :
Couplage de l'AESH à la KLH



La réaction n'a pas lieu comme le traduit l'absence d'augmentation d'absorbance à 343 nm. La forme disulfure n'est donc pas réactive.

3. Couplage du dioctyldisulfure réduit par $NaBH_4$.

L'OctSH a été réduit au moyen du $NaBH_4$ et le produit solubilisé comme précédemment. La réaction de couplage a été suivie par spectrophotométrie à 343 nm (Schéma 100). L'absorbance augmente au cours du temps jusqu'à la valeur maximale déterminée par la réduction au DTT (efficacité de couplage maximale).

Nous pouvons donc dire qu'un thiol issu de la réduction par le $NaBH_4$ de son disulfure correspondant est réactif vis-à-vis du SPDP en tampon phosphate-Tween. Ce résultat nous laissait entrevoir la possibilité de coupler notre produit traité au $NaBH_4$.

b) Couplage du thioalcool (AESH).

L'AESH produit par réduction au $NaBH_4$ est solubilisé à une concentration de 25 mg/ml dans la même solution. Cette concentration reste approximative car la proportion de disulfure restant est inconnue.

La solution d'AESH a été ajoutée en excès 50 par rapport au nombre de moles de SPDP fixé sur la BSA. Le couplage s'est produit de manière efficace comme le témoigne l'augmentation de l'absorbance à 343 nm (Schéma 101). Après dialyse en tampon PBS, la solution du conjugué BSA-AE servira pour les tests immunoenzymatiques de détection des anticorps anti-AE.

Pour la deuxième série d'immunisations, nous avons utilisé un protocole qui s'était révélé efficace pour des immunisations contre de petits peptides synthétiques.

Une solution de KLH à 1 mg/ml en PBS a été activée au SPDP (excès molaire 30) et le nombre de groupes disulfure de pyridyle

fixé par protéine a été déterminé par réduction au DTT (absorbance maximale = 0,325 ; degré de substitution = 150 ; absorbance de la solution de KLH à 343 nm = 0,063).

L'AESH a été ajouté en excès molaire 50 et le couplage suivi régulièrement au spectrophotomètre. Après 6 heures, l'efficacité de couplage peut être estimé à 90 %. La solution de conjugué KLH-AE a été dialysée dans une membrane de cut-off 10000. Nous avons déterminé la concentration en protéine par un test BCA (soit 0,7 mg/ml).

F. CRIBLAGE DES ANTICORPS POLYCLONAUX ISSUS DES IMMUNISATIONS AVEC L'ALCOOL EXO COUPLE A LA KLH.

Après deux immunisations avec le conjugué KLH-OVA ou avec la KLH seule dans les conditions décrites dans "Matériel et méthodes", nous avons testé le sérum des deux groupes de souris:

- Groupe A : KLH + Quil A
- Groupe B : KLH-AE + Quil A

Nous avons effectué plusieurs tests ELISA suivant le protocole page 52 afin de mettre en évidence les anticorps anti-AE. Les pools de sérum immuns ainsi que le sérum d'un souris non immunisée ont été testés contre la KLH, la BSA et le conjugué BSA-AE. Bien que les séra immuns reconnaissaient la KLH, ce qui témoigne de l'immunisation des individus, nous n'avons pas pu détecter une réponse positive contre le conjugué BSA-AE (résultats non présentés).

Nous avons alors émis quelques hypothèses pour expliquer l'absence de réponse immunitaire :

- le test ELISA ne permet pas la détection d'anticorps anti-AE parce qu'il ne serait pas au point,
- le couplage de l'AESH à la KLH n'aurait pas eu lieu (pour rappel, c'est un sous-produit de la réaction de couplage qui est détectable et non pas le conjugué lui-même),

- le conjugué serait labile dans le tampon de couplage ou in vivo (c'est la fonction oxime qui serait dans ce cas incriminée et non pas le groupe disulfure car des peptides synthétiques sont couplés dans des conditions identiques sont stables),
- le conjugué serait, pour de multiples raisons, un faible immunogène (haptène non accessible ; densité hapténique trop forte ou trop faible ; carrier, adjuvant, voie d'immunisation, horaires d'immunisation inappropriés...).

Nous avons recommencé plusieurs tests ELISA sans jamais mettre de réponse anti-AE en évidence. Nous avons alors décidé d'entreprendre une troisième série d'immunisations suivant le protocole décrit pour la production d'anticorps catalytiques.

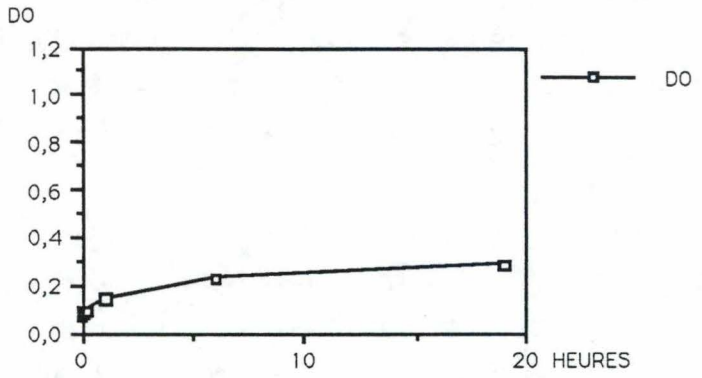
G. COUPLAGES troisième partie.

Pour cette troisième série de couplages et d'immunisations, nous avons choisi une autre protéine porteuse, l'ovalbumine, (OVA). Contrairement à la KLH qui est peu KLH soluble de par son important masse moléculaire, l'ovalbumine, avec un poids moléculaire de seulement 44000 ne présente pas de problème de solubilisation. De plus, elle est bien moins coûteuse et a souvent été utilisée avec succès dans des conjugués immunogènes.

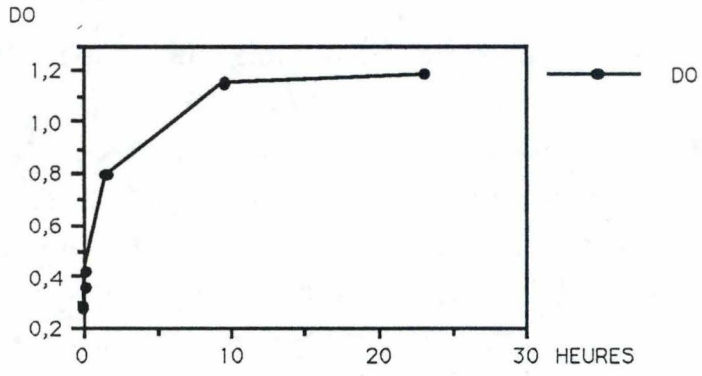
En vue de réaliser le couplage de l'AESH à l'OVA pour deux densités hapténiques (forte et faible), nous avons préparé deux solutions d'OVA activées au SPDP : l'une pour laquelle le SPDP a été ajouté en excès molaire 5 et l'autre, un excès molaire 30. Trois molécules de SPDP ont réagi par protéine dans le cas d'un excès 5 (solution à faible densité hapténique). Dans l'autre cas, le nombre de groupes disulfure de pyridyle par protéine a été déterminé à 8 (solution à forte densité hapténique). L'absorbance maximale à 343 nm pour la première solution est de 0,420 et l'absorbance de la seconde est de 1,699. L'AESH en excès molaire 50 est ajouté aux deux solutions et la réaction de couplage est suivie par spectrophotométrie (Schéma 103). Après 20 heures, 70 % de l'absorbance maximale est presque atteinte. Nous

Schéma 103 :
Couplage de l'ovalbumine (OVA) et du thioalcool (AESH) au moyen du SPDP

a) Couplage OVA et AESH en faible densité hapténique



b) Couplage OVA et AESH en forte densité hapténique



estimons avoir une densité hapténique de 2 pour la première solution et une densité de 6 pour la seconde.

H. CRIBLAGE DES ANTICORPS POLYCLONAUX ISSUS DES IMMUNISATIONS AVEC L'ALCOOL EXO COUPLE A L'OVALBUMINE.

Deux groupes de 4 souris ont été immunisées avec les solutions des conjugué suivants :

- Groupe I : OVA-AE (faible densité hapténique)
- Groupe II : OVA-AE (forte densité hapténique)

Nous avons testé en ELISA tous ces séra en pool pour des dilutions de 1/50 à 1/400 contre l'OVA et la BSA ; les séra des groupes I et II contre BSA-AE. Les résultats du test sont représentés au schéma 104. Après examen du schéma 104-a, nous pouvons dire que les 2 groupes de souris ont produit une réponse immunitaire contre la protéine ayant servi pour les immunisations. Le sérum d'une souris non immune ne donne pas de réponse. Les anticorps des séra immuns qui reconnaissent l'OVA ne réagissent pas de façon croisée avec la BSA. Le système de détection des anticorps anti-AE est donc fonctionnel.

Le graphique du schéma 104-b est prometteur : le signal fournit par le sérum des souris immunisées avec OVA-AE se distingue nettement de celui du sérum non immun et ce, sans diminution notoire en fonction de la dilution. Nous avons donc réussi à déclencher chez ces souris une forte réponse anti-AE.

Schéma 104 :

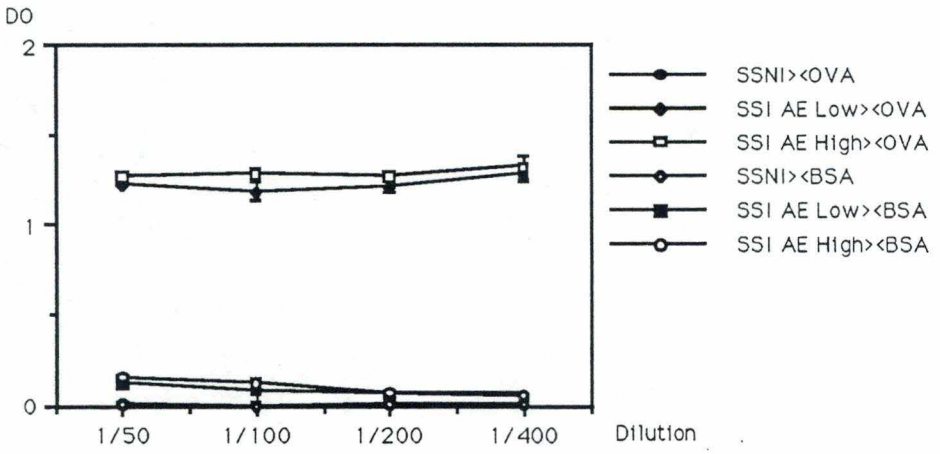
Test ELISA des pools de sérum des souris immunisées avec le conjugué OVA-AE (en forte ou faible densité hapténique)

Légende :

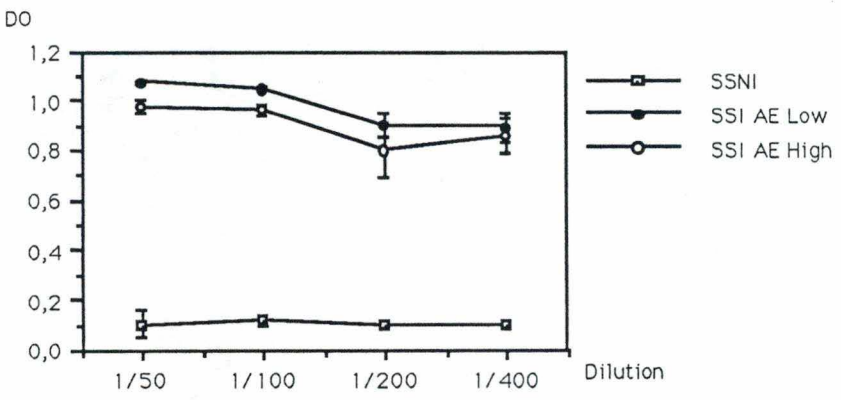
SSI AE Low = Sérum des souris immunisées avec le conjugué OVA-AE de faible densité hapténique (2)

SSI AE High = Sérum des souris immunisées avec le conjugué OVA-AE de forte densité hapténique (6)

a) Résultat du test ELISA des séra immuns et non immuns (dilutions 1/50, 1/100, 1/200, 1/400) contre la protéine du conjugué utilisé pour les immunisations (OVA) et contre la protéine du conjugué utilisé pour le criblage des anticorps anti-haptène (BSA)



b) Résultat du test ELISA contre le conjugué BSA-AE avec les sérum des souris immunisées avec le conjugué OVA-AE (forte et faible densité hapténique)



IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons tenté de trouver une stratégie adéquate pour l'obtention d'anticorps spécifiques de l'alcool EXO racémique.

Une première stratégie basée sur l'injection d'AE simultanément à la protéine porteuse ne nous a pas permis de disposer d'un sérum contenant des anticorps spécifiques de l'AE.

La seconde stratégie consistait à modifier la molécule en vue de son couplage covalent à la protéine porteuse au moyen d'un agent hétérobifonctionnel bien connu au laboratoire, le SPDP. L'immunisation par voie intramusculaire avec le conjugué KLH-AE en adjuvant Quil A n'a pas abouti à la production d'anticorps anti-AE. Un autre protocole d'immunisation par voie sous-cutanéea été suivi avec l'AE couplé à l'ovalbumine. Par un test ELISA, nous avons révélé la présence d'anticorps anti-AE dans le sérum ainsi produit.

Des perspectives à court et à long terme se dégagent de ce travail. Dans un premier temps, afin d'affiner la spécificité de la réponse contre l'AE, nous voulons exclure toute interférence avec des anticorps reconnaissant le spacer du conjugué utilisé pour l'immunisation. Ainsi, le conjugué BSA-AE servant au test de

détection pourrait être préparé au moyen d'un autre agent de couplage.[55] Une fois la spécificité de l'antisérum prouvée, nous pouvons envisager une fusion en vue de la production d'anticorps monoclonaux.

Après screening, les anticorps monoclonaux obtenus seraient testés pour leur énantiosélectivité afin de déterminer si l'immunisation avec le racémate EXO a permis la production d'anticorps à pouvoir discriminant entre énantiomères.

Si de tels anticorps sont révélés, une purification par immunoaffinité [56] d'un des énantiomères à partir du mélange racémique peut être envisagé. C'est ici que nous rejoignons les intérêts des chimistes organiciens pour lesquels seul un des énantiomères EXO contitue le précurseur de synthèse de l'acide chrysanthémique optiquement actif.

A long terme, la production d'anticorps catalysant une des étapes de synthèse de l'acide chrysanthémique peut être évoquée. Afin de réaliser ce projet, l'étude de la structure de l'haptène, mimant l'état de transition, et son antigénicité après couplage à une protéine porteuse devra être menée en collaboration entre chimistes et biologistes.

REFERENCES

1 Kagan, H.B.
Pour la science **1992**, *172*, 42.

2 Kagan, H.B.; Dang, T.P.
J. Am. Chem. Soc.. **1972**, *94*, 6429.

3 Sicsic, S.
La Recherche ***1987***, *18*, 626.

4 Whitesides, G.M.; Wong, C.H.
Angew. Chem., Int. Ed. **1985**, *24*, 617.

5 Anthony-Cahill, S.J.; Griffith, M.C.; Noren, C.J.; Suich, D.J.; Schultz, P.G.
TIBS **1989**, *14*, 400.

6 Estell, D.A.; Graycar, T.P.; Miller, J.V.; Powers, D.B.; Burnier, J.P.; Ng, P.G.; Wells, J.A.
Science **1986**, *233*, 659.

7 Breslow,R.
Science **1982**, *218*, 532.

8 Breslow,R.; Doherty, J.B.; Guillot, G.; Lipsey, C.
J. Am. Chem. Soc. **1978**, *100*, 3227.

9 Pasau, P., Thèse annexe, Namur, Mars 1992.

10 Silverton, E.W.; Navia, M.A.; Davies, D.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1977**, *74*, 5140.

11 Shokat, K.M.; Ko, M.K.; Scanlan, T.S.; Schultz, P.G.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1990**, *29*, 1296.

10 Silverton, E.W.; Navia, M.A.; Davies, D.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1977**, *74*, 5140.

12 Krief, A.; Surleraux, D.; Frauenrath, H.
Tetrahedron Lett. **1988**, *29*, 6157.

13 Krief, A.; Surleraux, D.
Synlett **1991**, 273.

14 Surleraux, D., Thèse de doctorat, Namur, Mai 1992.

15 Krief, A., Surleraux, D.
en cours de parution

16 Golub, E.S.; Green, D.R. *Immunology. A Synthesis* ; Sinauer associates, Inc. : Sunderland, 1991.

17 Roitt, I.; Brostoff, J., Male, D. *Immunologie fondamentale et appliquée* ; MEDSI/McGraw-Hill : New York, 1989.

18 Pressman, D.; Grossberg, A.L. *The Structural Basis of Antibody Speficity* ; W.A. Benjamin, Inc. : New York, 1968.

19 Karush, F.
J. Am. Chem. Soc. **1956**, *78*, 5519.

20 Mäkelä, O.; Seppälä, I.J.T. *Handbook of Experimental Immunology in Four Volumes* ; Blackwell : Oxford, 1986, volume 1, chapitre 3.

21 Boyd, W.C. *Fundamentals of Immunology* ; Interscience Publishers, Inc. : New York, **1956**, chapitre 3.

22 Van hegenmortel, M.H.V. ; Briand J.P. ; Müller, S. *Synthetic polypeptides as antigens* , chapitre 3; Elsier : Amsterdam, 1988.

23 Erlanger, B.F.
Methods in Enzymology ,**1980**,*70*, 85-104.

24 Boorsma, D.M.*Techniques in Immunochemistry,* Volume 2 Academic Press London, **1982**,154-174

25 Tramontano, A.; Ammann, A.; Lerner, R.
J. Am. Chem. Soc. **1988**, *110*, 2282

26 Köhler, G.; Milstein, C.
Nature ,**1975**, *256*, 495.

27 Tramontano, A.; Schloeder, D.
Methods in Enzymol. **1989**, *178*, 531-550.

28 Pollack, S.J.; Nakayama, G.R.; Schultz, P.G.
Methods in Enzymol. **1989**, *178*, 551-568.

29 Pollack, S.J.; Jacobs, J.W.; Schultz, P.G.
Science **1986**, 234, 1570.

30 Janda, K.D.; Benkovic, S.J.; Lerner, R.A.
Science **1989**, *244*, 437.

31 Paul, S.; Volle, D.J.; Beach, C.M.; Johnson, D.R.; Powell, M.J.
Science **1989**, *244*, 1158.

32 Janda, K.D.; Asley, J.A.; Jones, T.M.; McLeod, D.A.; Scloeder, D.M.; Weinhouse, M.I.
J. Am. Chem. Soc. **1990**, *112*, 8886.

33 Durfor, C.N.; Bolin, R.J.; Sugasawara, R.J.; Schultz, P.G.
J. Am. Chem. Soc. **1988**, *110*, 8713.

34 Lerner, R.A.; Tramontano, A.
TIBS, **1987**, 427.

34 Tang, Y.; Hicks, J.B.; Hilvert, D.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1991**, *88*, 8784.

35 Matsumura, F. *Toxicology of Insecticides* ; Plenum Press : New York, 1976, chapitres 2-4.

36 Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* ; Pergamon Press : Oxford, volume 12, chapitre 7.

37 Chen, Y.L.; Casida, J.E.
J. Agr. Food Chem. **1969**, *17*, 208.

38 *Deltaméthrine. Monographie ;* Roussel Uclaf, 1982.

39 Dandliker, W.B.; Holbert, S.P.; Florin, M.C.
J. Exp. Med., **1965**, 1029.

40 *The Interpretation of Proton Magnetic Resonance Spectra* ; Heyden and Son Ltd. : London, 1979.

41 Allinger, N.L.; Cava, M.P.; De Jongh, D.C.; Johnson, C.R.; Lebel, N.A.; Stevens, C.L. *Chimie organique* ; McGraw-Hill Paris, 1976, volume 1,chapitre 5, 9.

42 Field, L. ; Giles, P.M.
J. Org. Chem., **1971**, *36*, 309.

43 *SPDP. Heterobifunctional reagent* ; Pharmacia Fine Chemicals.

43' Carlsson, J.; Drevin, H.; Axén, R.
Biochem. J. **1978**, *173*, 723.

44 Hurn, B.A.L. ; Chantler, S.M.
Methods in Enzymology , **1980**, *70*. 104-142.

45 Gregoriadis, G.; Allison, A.C.; Poste, G. *Proceedings of a NATO Advanced Study Institute on Immunological Adjuvants and Vaccines* ; Plenum Press : New York,1989, pages 35-45.

46 Sarobe, P.; Lasarte, J.J.; Golvano, J.; Gullon, A.; Civeira, M.P.; Prieto, J.; Borras-Cuesta, F.
Eur. J. Immunol. **1991**, *21*, 1555.

47 Hawkes, R.; Niday, E.; Gordon, J.
Anal. Biochem. **1982**, *119*, 142.

48 Galfrè, G.; Milstein, C.
Methods in Enzymology ; **1981**, volume 73, 3-46.

49 Campbell, A.M. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Monoclonal antibody technology* ; Elsevier : chapitre 1.

50 *La biochimie de Lubert Stryer;* Flammarion Medecine-Science : **1985**, 515-554

51 Nakamura, R.M. ; Voller, A. ; Bidwell, D.E.
Handbook of Experimental Immunology in Four Volumes ; Blackwell : Oxford, **1986**, volume 1, chapitre 27.

52 Kantor, A.B.
Immunol. Today 1991, 12, 389

53 Batteiger, B.; Newhall V, W.J.; Jones, R.B.
J. Immunol. Methods **1982**, *55*, 297.

54 Tramontano, A.; Janda, K.D.; Lerner, R.A.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1986**, *83*, 6736.

55 Knox, J.P.; Galfre, G.
Anal. Biochem. **1986**, *155*, 92.

56 Quarrie, S.A.; galfre, G.;
Anal. Biochem.. **1985**, *151*, 389.