

Quand *E. coli* et les biologistes font mieux que les lymphocytes B

Création in vitro de la diversité des anticorps

La technique utilisée pour obtenir des anticorps monoclonaux est aujourd'hui celle des hybridomes : il s'agit de fusionner au hasard des lymphocytes B producteurs d'anticorps et des cellules tumorales de la lignée B, en l'occurrence des cellules de plasmocytome non sécrétant (c'est-à-dire ne produisant pas d'anticorps). Des clones sont ensuite produits à partir des différentes cellules hybrides obtenues et, au terme d'un travail long et répétitif, leurs produits de sécrétion sont analysés pour la spécificité anticorps recherchée. Cette méthodologie, du fait de sa lourdeur, n'est guère applicable au criblage de centaines de milliers ou de millions de clones. Une équipe américaine de Californie (*Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla*) vient de décrire une technique réellement révolutionnaire, probablement appelée à modifier radicalement les perspectives d'utilisation des anticorps dans de très nombreux domaines, notamment ceux de la catalyse par des « abzymes » ou (ACzymes) (*m/s n° 5, vol. 3, p. 300*), de la production des réactifs d'analyse et de la thérapeutique.

Le principe de cette méthode consiste à synthétiser par amplification *in vitro* (PCR, *polymerase chain reaction, m/s n° 8, vol. 4, p. 515*) les régions des messagers d'immunoglobuline correspondant au fragment Fab (il s'agit de la partie des molécules d'anticorps contenant le site de spécificité pour l'antigène mais dépourvue du fragment cristallisable Fc des chaînes lourdes, c'est-à-dire de leur moitié carboxyterminale), puis de cloner ces fragments dans une

phage λ (figure 1). Les amorces utilisées pour la PCR sont dérivées de séquences conservées en 5' et en 3' des fragments à amplifier. Les phages λ sont modifiés de manière à contenir, outre un promoteur procaryotique fort (celui de l'opéron lactose), différents signaux permettant une traduction efficace des messagers dans *E. coli*, ainsi que la sécrétion des produits protéiques. Deux banques séparées d'ADNc de lymphocytes B (de 1 à 2 millions de clones indépendants chacun dans le travail rapporté ici), sont tout d'abord constituées, l'une représentative de la diversité des chaînes légères

(κ) et l'autre des chaînes lourdes $\gamma 1$. Les séquences clonées proviennent de la transcription des gènes d'immunoglobuline qui ont subi un réarrangement productif (*m/s suppl. au n° 1, vol. 5, p. 5*). La figure 1 montre que les phages utilisés pour la construction de l'une et l'autre de ces banques contiennent des sites de restriction Eco R1 et Mlu 1 en orientation inverse. De l'ADN de phages recombinés des deux banques est isolé ; il contient un mélange de toutes les espèces de molécules présentes dans les banques. L'ADN préparé à partir de la banque de chaînes

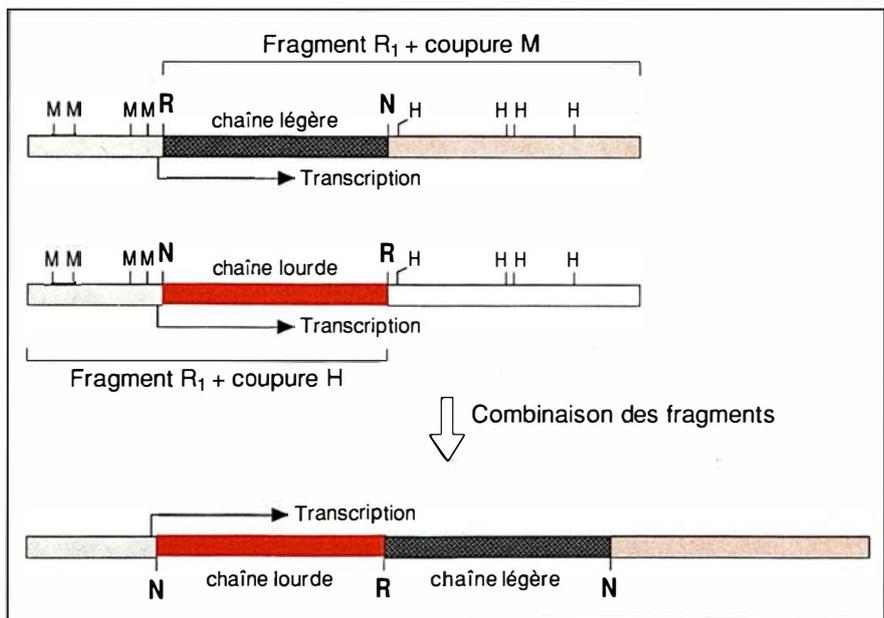


Figure 1. Schéma de la confection d'une banque d'ADNc co-exprimant le fragment variable (Fd) de la chaîne lourde $\gamma 1$ et la chaîne légère κ des immunoglobulines. M = site de coupure par l'enzyme de restriction Mlu 1 ; R = site Not 1 ; H = site Hind III. La transcription des fragments d'ADN insérés est initiée au niveau du promoteur de l'opéron lactose. Les fragments issus des coupures Mlu 1 - Eco R1 (banque de chaînes légères) et Eco R1 - Hind III (banque de chaînes lourdes) sont combinés par liaison au niveau des sites Eco R1.

