



Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

Laboratoire National de Production de Réactifs Monoclonaux



Sommaire

- ❑ L'équipe
- ❑ Les activités du laboratoire
- ❑ Locaux & équipements
- ❑ Réactifs et anticorps monoclonaux
- ❑ Anticorps monoclonaux humains
- ❑ Développement d'un réactif d'origine humaine
- ❑ Dynamisme de la R&D
- ❑ Glossaire



Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

L'équipe





Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

Les Activités du Laboratoire



Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

➤ R&D



IH

Recherche de clones à partir de prélèvements régionaux et nationaux

Collaborations

Inter-EFS
Avec des unités de recherche: CNRS, Universités, INSERM
Avec des industriels
Avec le CNRGS



➤ Production AcM

Cession de réactifs et MP IH

MP IH
lescriptif

Merck-Millipore

KEL2 P3A118OL67

FY1 P3TIM

LE1 P3N20V3 et GA2

MNS2 BO3

P1 P3NIL100

FY2 SpA264LBg1

LE2 P3F234MD4

MNS4 P3BER

Bio-Rad

RH8 P3P276R3

Diagast

KEL2 P3A118OL67

FY2 SpA264LBg1

➤ Production AcM

Cession
de MP
hors IH

Immunotech
Biocytex

Anti-CD38 T16

Abliance

Anti-CD14 RMO52

Brevet

CNRS

Partenariat d'exploitation pour le clone 35C1
(Aurora A)

IGDR

Brevet VHL en cours de dépôt

➤ Activité PLER: Produits Laboratoire, enseignement et recherche



Enseignement

Approvisionnement de toute la Bretagne: gestion de 45 conventions et 64 clients

Recherche

Universités
INSERM
Industriels...

Diagnostic

Fabrication du panel de dépistage
Fourniture en CGR et sang total pour le CNRGS,
l'INTS,
l'UPR et OCD

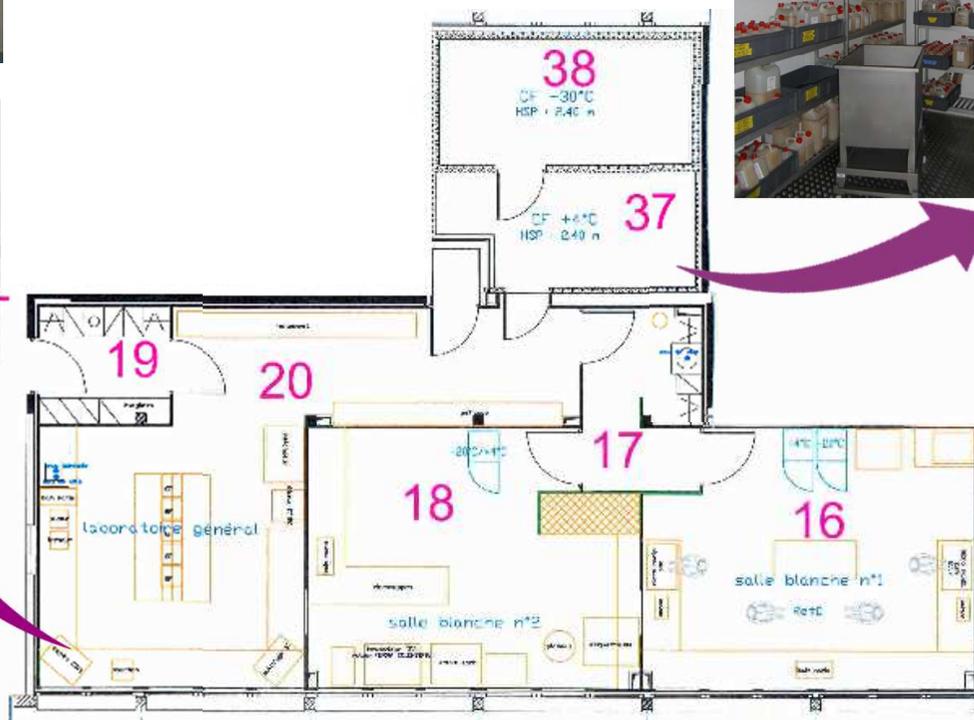


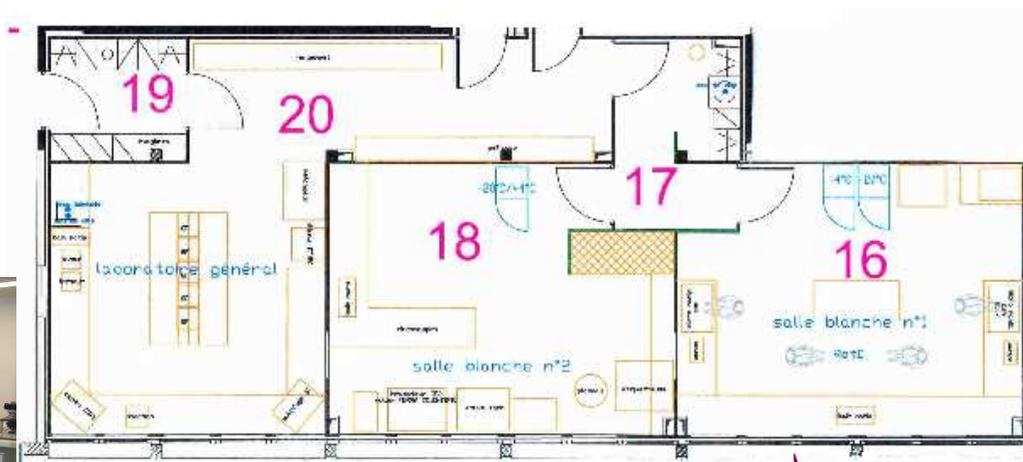
Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

Locaux & Équipements

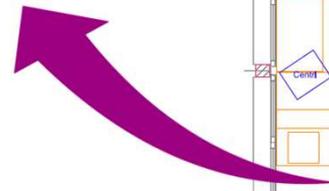
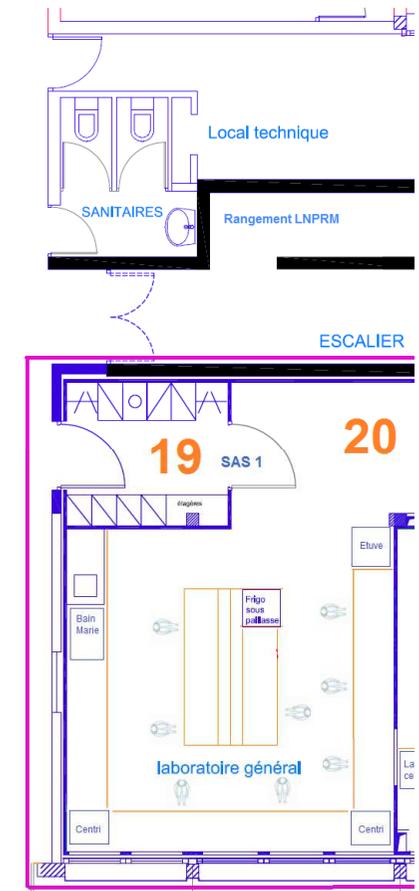
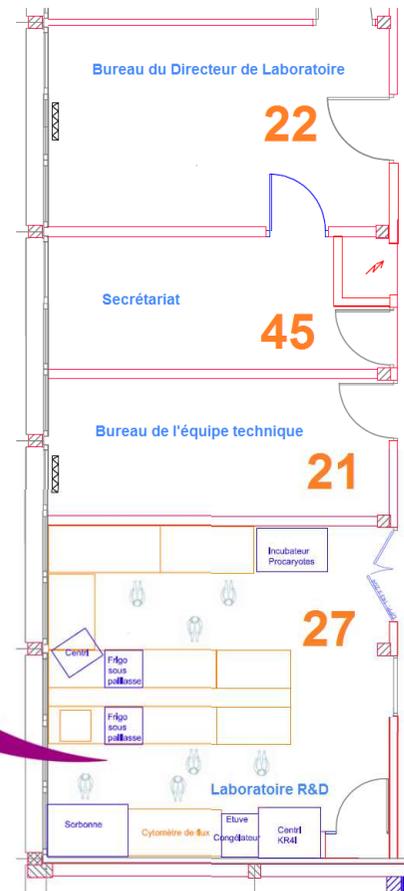
Le laboratoire général





Les salles propres

Le laboratoire R&D



Stockage cryogénique



Sauvegarde des clones



Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

Réactifs et Anticorps Monoclonaux

Réactifs de groupage sanguin

R. POLYCLONAUX

IgG (plasmas)

- mélange d'anticorps
- affinité faible
- spécificité large
(plusieurs épitopes reconnus)
- qualité variable
- risque infectieux
- production limitée

R. MONOCLONAUX

IgG, IgA ou IgM

- un seul anticorps
- haute affinité
- spécificité étroite
(un seul épitope)
- qualité constante
- risque infectieux réduit
- production illimitée



D'où proviennent les anticorps pour les réactifs ?

Les anticorps sont produits par les lymphocytes B (LyB). Les LyB sont des cellules qui ne peuvent pas être maintenues en culture plus de quelques jours.

Les LyB humains ciblés sont **rare**s.

Les LyB murins sont **nombreux** car les animaux sont stimulés.

Kholer et Milstein en 1975 publient la stratégie pour immortaliser le LyB murin en le fusionnant avec un myélome de souris: avènement des Ac monoclonaux (Prix Nobel en 1984).



Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

Anticorps monoclonaux humains

■ Pourquoi chez l'homme ?

- ▶ répertoire immunologique insuffisant chez l'animal
- ▶ structures moléculaires non reconnues comme des antigènes
- ▶ pas de stimulation antigénique possible (Bioéthique)

■ Comment ?

- ▶ prélèvement du sang périphérique de sujets immunisés
- ▶ adaptation de la stratégie de Kholer et Milstein

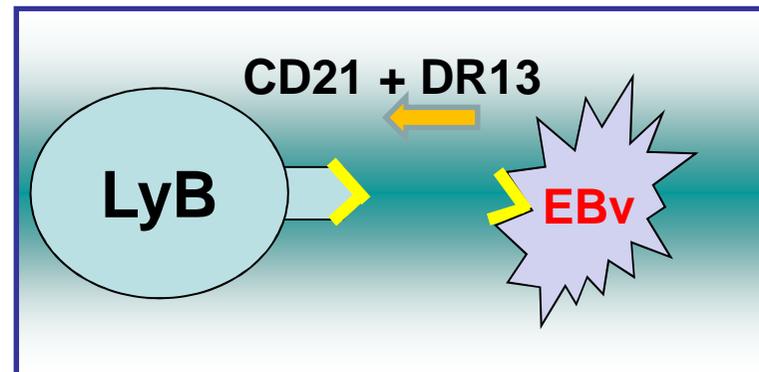


■ Stratégie en 2 étapes essentielles

- ▶ Immortalisation *in vitro* des lymphocytes B humains afin d'obtenir une amplification des LyB d'intérêt en générant des lignées lymphoblastoïdes sécrétrices d'Ac
- ▶ Fusion entre lignées lymphoblastoïdes sécrétrices et myélome murin ; hétérohybride homme/souris (AcM humains)

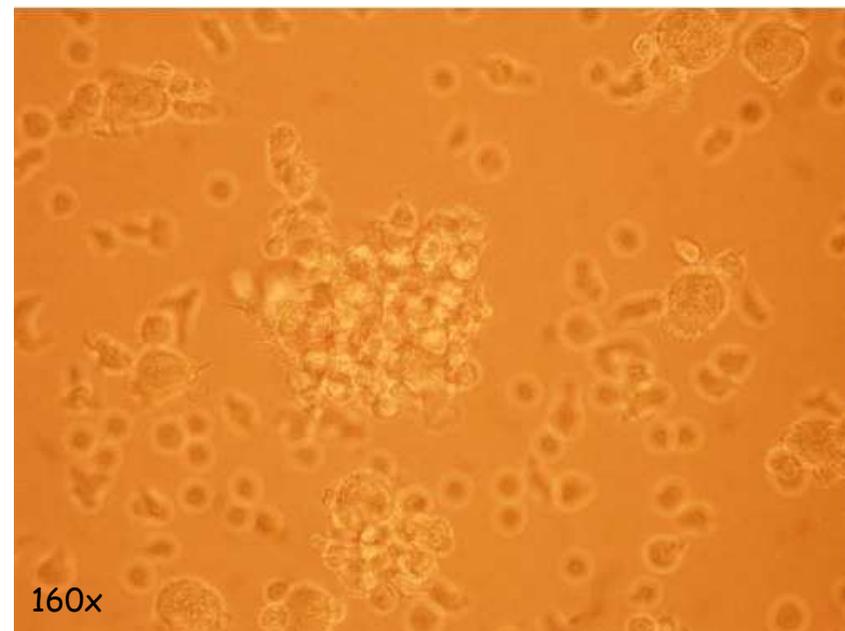
■ Étape n°1

- ▶ Sélection d'un donneur avec allo-immunisation
- ▶ Isolement des cellules mononucléées du sang circulant (CLP)
- ▶ Incubation des CMN avec des particules virales Epstein-Barr



- ▶ Mise en culture des cellules en plaques 96 puits en présence de cyclosporine A (suppression des LyT mémoires):
 - obtention de lignées lymphoblastoïdes
 - identification des lignées sécrétrices.

Colonies de cellules lymphoblastoïdes obtenues 14 jours après l'infection par le virus d'Epstein-Barr





■ Étape n°2

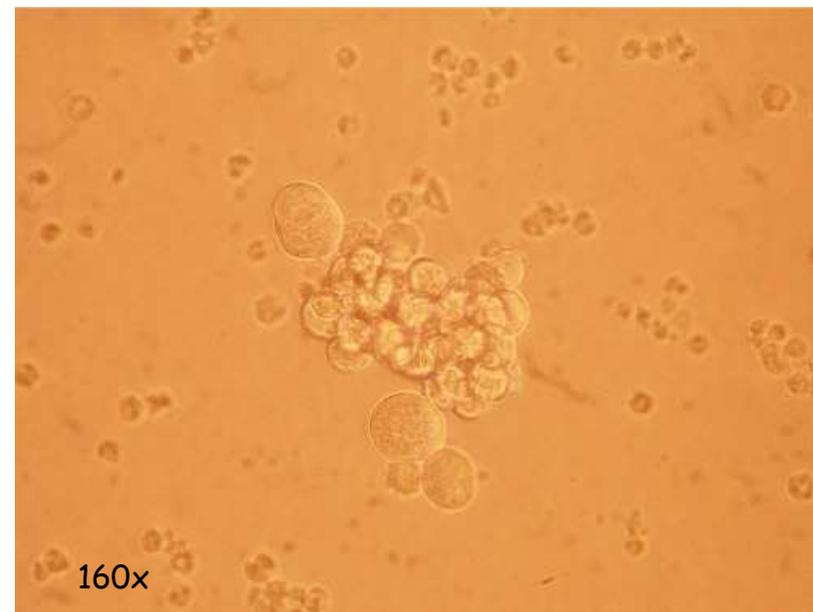
- ▶ Lignées lymphoblastoïdes et myélome murin P3Ag8.653 (HGPRT-)
- ▶ Fusion chimique avec PEG 1500 selon le rapport : 1 cell. B / 1 à 5 cell. de myélome
- ▶ Mise en culture des cellules en plaque 96 puits
- ▶ Double sélection chimique: aminoptérine/ouabaïne:
 - ▶ obtention des hybrides homme-souris
 - ▶ sélection des hétérohybrides sécréteurs.

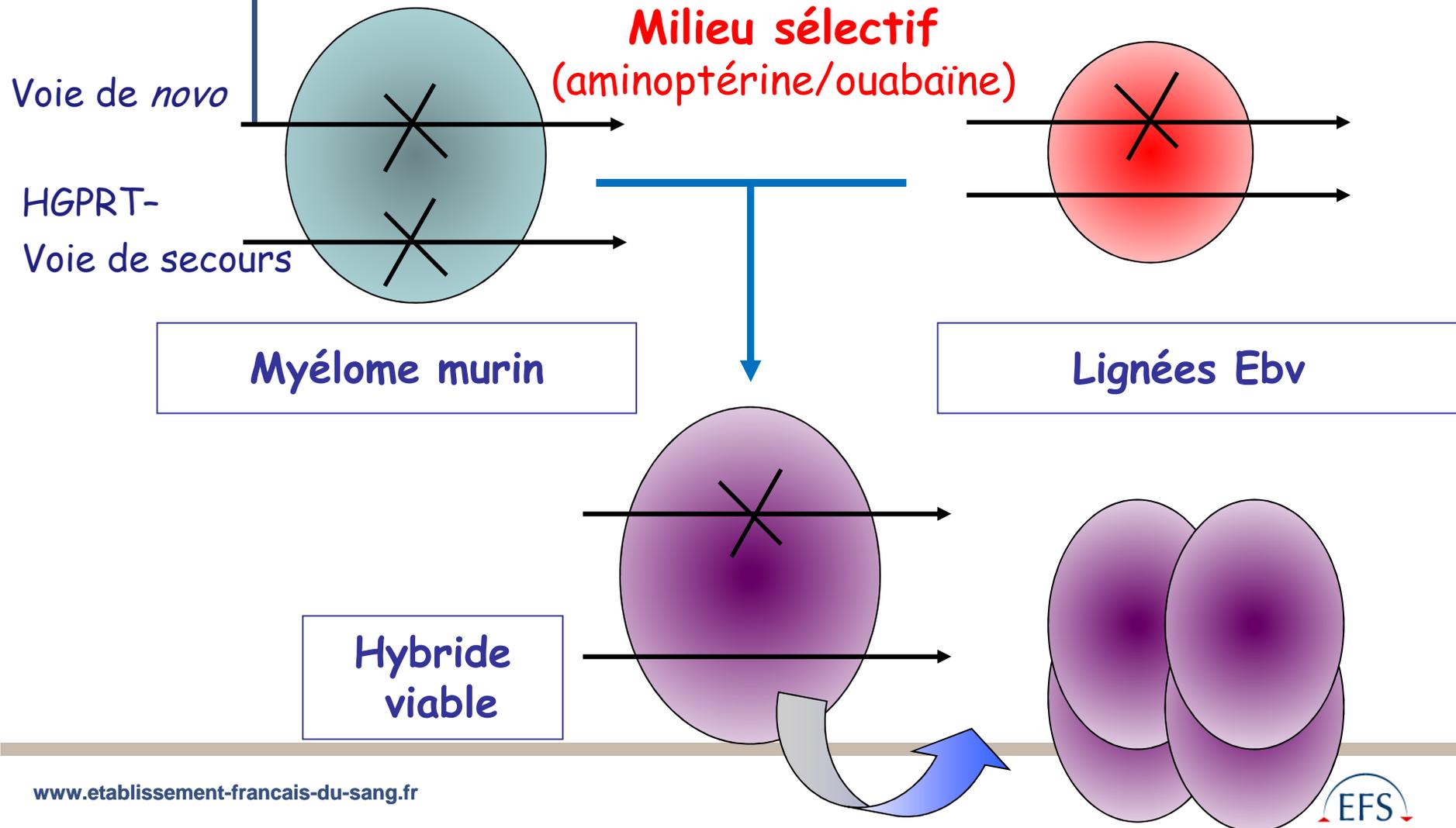
Obtention des hétéro-hybrides

20 minutes post-fusion



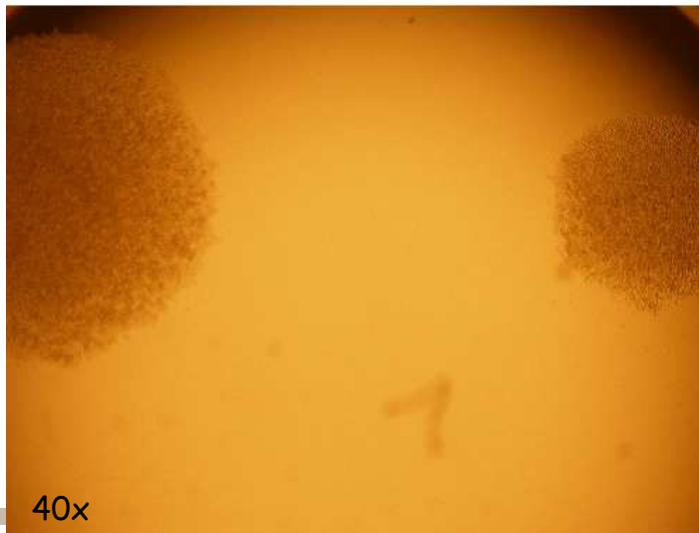
J+6





Clonage des hétéro-hybrides

- Distribution de 100 cellules ou moins dans une plaque 96 puits :
 - ▶ isoler le clone sécréteur et d'intérêt parmi les autres hybrides du puits de fusion
 - ▶ évaluer le % de sécrétion (min $\geq 80\%$)



Devenir des clones



Puits de fusion positif (plaque d'origine) : isoler le clone sécréteur

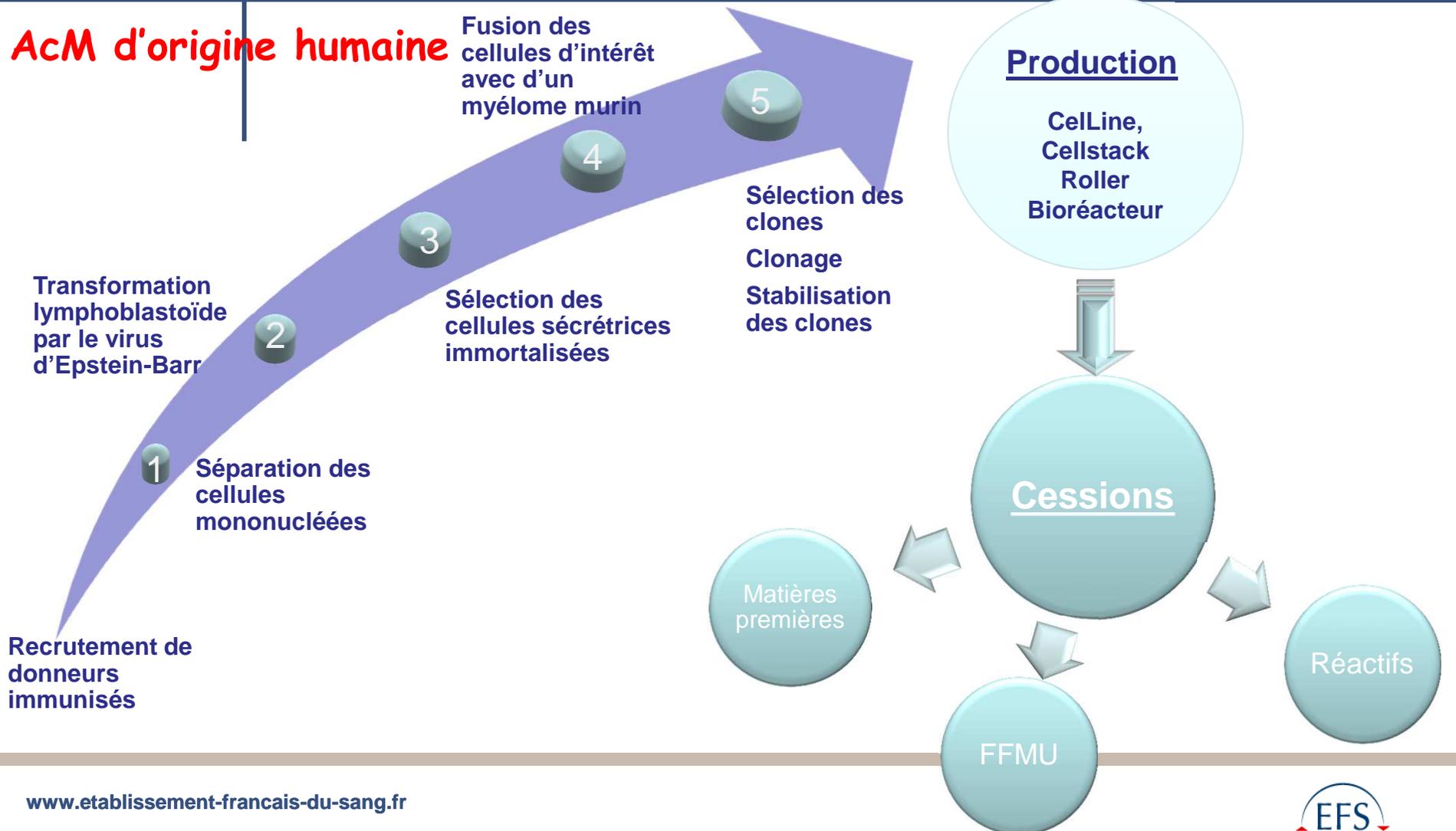
- Isolement du clone d'intérêt parmi les autres clones
- Vérification spécificité

- Pourcentage de sécrétion >80% pour étude de stabilité du clone (80 jours)

- Cryopréservation cellulaires à tous les niveaux et création des banques (SB, MB et WB)

Production

AcM d'origine humaine



En système roller

- ▶ Milieu base : RPMI 1640
- ▶ peptones + Sérum de Veau Foetal
- ▶ lot > 150 litres
- ▶ 4-5 semaines de production



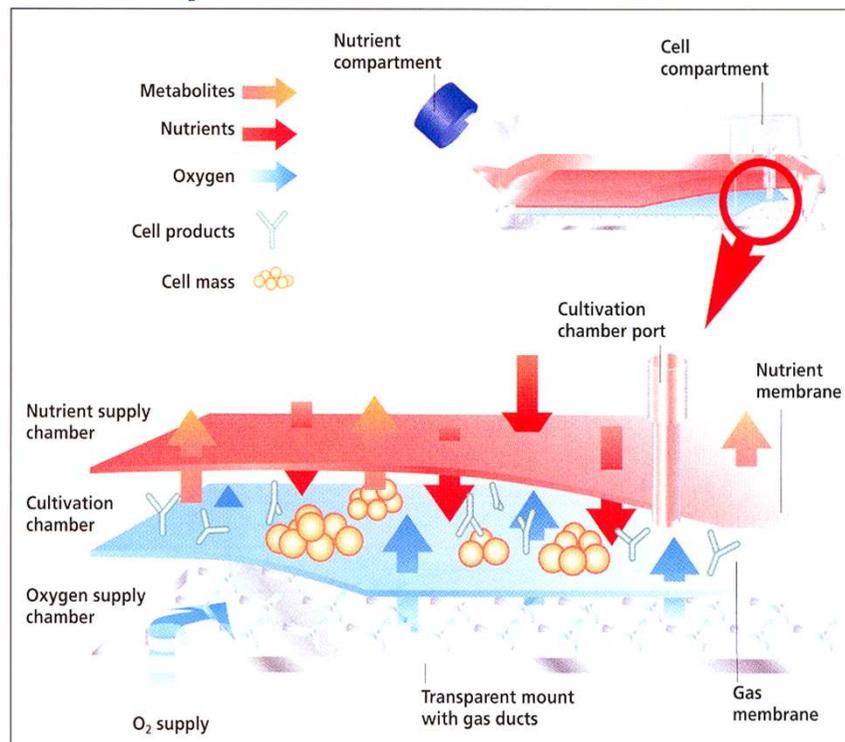
En Bioréacteur

- ▶ Poche à usage unique
- ▶ Gestion 4 gaz
- ▶ Monitoring de la culture (pH, O₂)
- ▶ Cycle de production de 25 L



Bioréacteur BIOSTAT® CultiBag

Systeme de production CellLine



Extraction et purification des anticorps produits

- Concentration (ultrafiltration et diafiltration):
 - ▶ Élimination des cellules à grande échelle par centrifugation continue
 - ▶ Ultrafiltration à flux tangentiel permet l'obtention d'un concentré de 1 à 5 g d'anticorps par litre
 - ▶ La diafiltration permet de concentrer l'anticorps dans un milieu défini



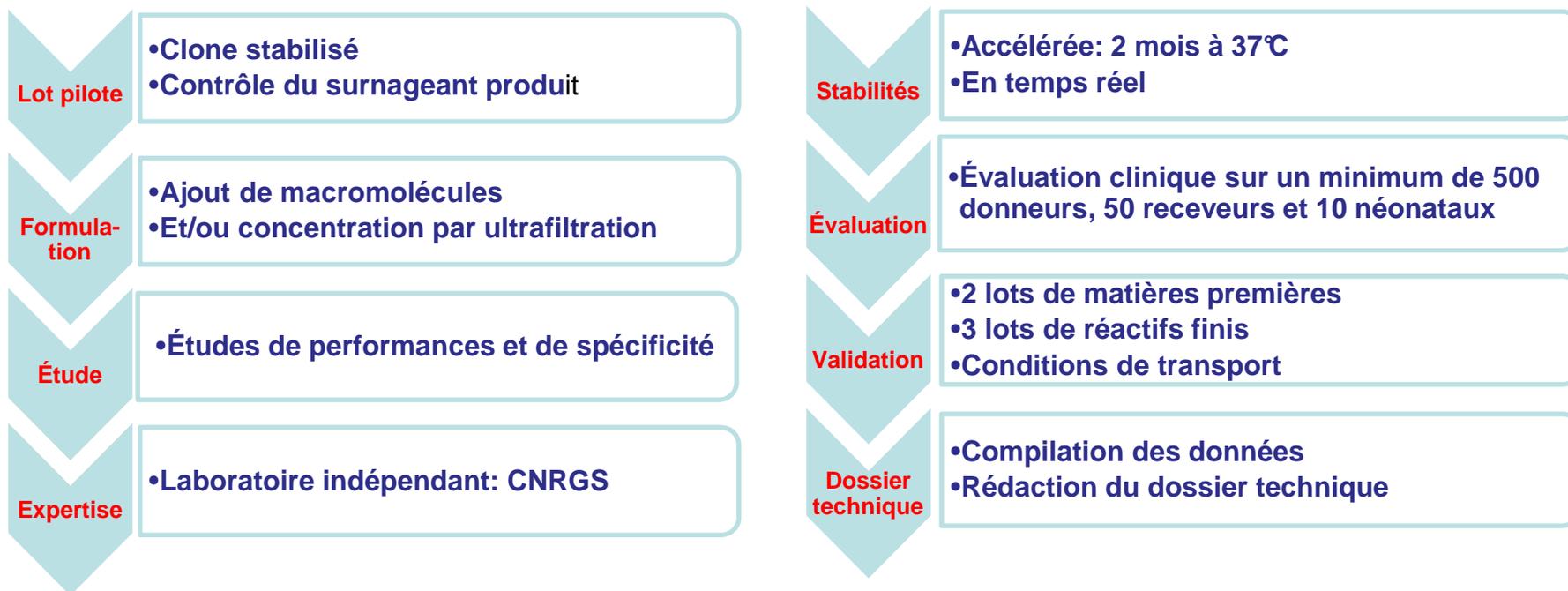


Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

Développement d'un Réactif d'Origine Humaine

Développement d'un réactif: référentiel EN13485





Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

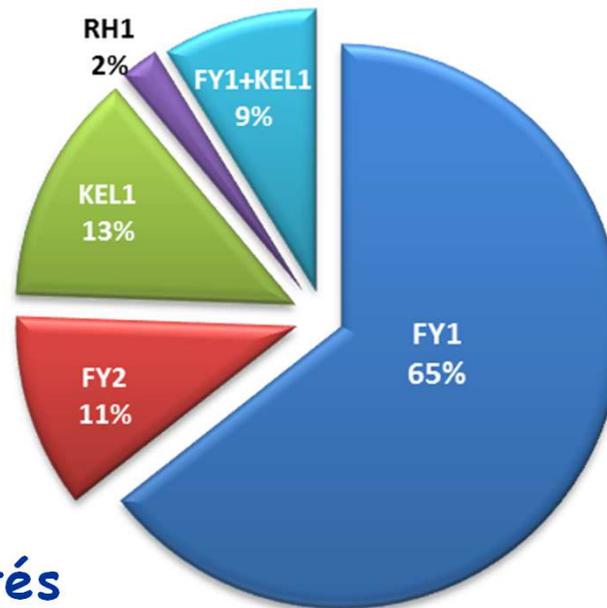
Dynamisme de la R&D

Bilan 2014 de la R&D humaine

Spécificités ciblées:

- FY1 (32)
- FY2
- KEL1
- RH1

45 prélèvements traités



1220 plaques traitées
≈400 000 tests

25 fusions

70 tests positifs

7 clones anti-KEL1 IgM

Les anticorps d'origine humaine depuis 2010

➤ Les AcM du phénotypage étendu :

- ✓ Anti KEL1 IgM
- ✓ Anti-KEL3 IgM
- ✓ Anti-MNS1 IgM
- ✓ Anti-MNS2 IgM
- ✓ Anti-MNS3 IgM
- ✓ Anti-FY1 IgG
- ✓ Anti-FY2 IgM et IgG
- ✓ Anti-LU1 IgG

➤ Les anticorps de collection :

- ✓ Anti-VEL IgG

Les spécificités recherchées

➤ Les anticorps du phénotypage étendu:

- ✓ Anti-FY1 (IgM)
- ✓ Anti-KEL4
- ✓ Anti-MNS3 et anti-JK2 plus performants

➤ Les anticorps « exotiques »:

- ✓ Anti-Diego (DI1)
- ✓ Anti-KEL6 (Jsa)



R&D animale

➤ VHL (IGDR):

La mutation de cette protéine serait responsable de certains cancers et en particulier de cancers du rein. Le développement d'AcM permettra de mieux caractériser la forme mutée de la protéine dans un but de diagnostic. Un premier anticorps reconnaissant la forme longue de la protéine a été publié.

➤ TRPV2 (INSERM):

Cette protéine, sous sa forme multimère, constitue un canal ionique. Sa surexpression a été identifiée dans différentes formes de cancers. Il n'existe pas d'outils spécifiques pour étudier les fonctions de ce canal.

➤ CD95 Ligand (INSERM):

La surexpression de cette protéine est un marqueur pronostic dans le cancer du sein. Le développement d'un kit diagnostique est essentiel pour le suivi et le traitement des malades.

Glossaire

- ❑ Anticorps monoclonaux:

anticorps issus d'un lymphocyte B unique. Les anticorps monoclonaux sont produits par des hybridomes. La culture des hybridomes en laboratoire permet d'obtenir de grandes quantités d'anticorps monoclonaux.

- ❑ Hybridome:

produit de la fusion de cellules différentes : LyB et myélome murin non sécréteur d'immunoglobuline. Si les LyB sont d'origine humaine, il s'agit d'hétérohybride.

- ❑ Virus d'Epstein-Barr:

ce virus infecte spécifiquement le LyB humain et de primates. Il induit la prolifération des LyB. Il est utilisé lors de la phase de transformation des LyB humains.

- ❑ Myélome:

lignée cellulaire établie issu d'un lymphocyte tumoral et immortel. La fusion entre le LyB et le myélome permet d'obtenir une lignée immortelle. Au LNPRM, le myélome utilisé est d'origine murine. L'équivalent humain n'est pas disponible.



Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES

Merci pour votre attention