

TP Hybridation Lymphocytaire

Toutes les manipulations doivent être faites en conditions stériles

1. Milieux de culture et solutions

Milieu de base : Milieu RPMI 1640

Milieu complet : Milieu RPMI avec L-glutamine
Pénicilline/ streptomycine

Au moment de l'emploi, ajouter pour 100ml de RPMI

- 1mL de mélange de L-glutamine 200mM, Pénicilline (10 000 unités) / Streptomycine (10 000 µg/mL) (100X)

On peut également, si besoin ajouter de la fungizone (25µg/mL) et de la tylocine (solution 100X).

Milieu complet avec sérum : RPMI complet avec sérum de veau foetal (RPMI-SVF)

Pour 90ml de milieu RPMI complet, on ajoute 10ml de sérum de veau foetal décomplémenté (soit 10% final).

Milieu sélectif : RPMI-SVF-HAT

Pour 96 ml de milieu RPMI-SVF, ajouter 4ml d'une solution 50X de HAT.

Milieu sélectif enrichi : RPMI-SVF-H

C'est un milieu RPMI-SVF enrichi en hypoxanthine (50µM final) pour culture après criblage et sous-clonage.

Sérum de veau foetal : Décomplémenté pendant 45 minutes à 56°C.

Solution de PEG : (agent de fusion)

Polyéthylèneglycol : PEG 1500 stérile, prêt à l'emploi (PM 1500 W/V) dans une solution de DMSO.

2. Préparation des macrophages

Des macrophages péritonéaux sont utilisés pour conditionner le milieu des hybridomes, c'est-à-dire leur apporter des facteurs de croissance cellulaire, et assurer l'élimination des cellules dégradées. Pour éviter d'éventuels problèmes d'incompatibilité, les macrophages proviennent des mêmes souches de souris que celles dont sont issues les myélomes et les cellules spléniques (en général Balb/c ou Swiss). Sinon les macrophages doivent être irradiés.

Animaux : On prend généralement des femelles F1 de 2/3 mois.

Milieus : RPMI-SVF

Ou milieu de Hanks sans calcium ni magnésium

Ou PBS stérile

Méthode

- Fixer la souris sur la planche à dissection en position dorsale
- Désinfecter la peau avec de l'alcool à 70°C
- Faire une entaille dans la peau sur trois à quatre centimètres au niveau de l'abdomen
- Détacher soigneusement la peau du péritoine avec des pinces
- Injecter avec une seringue, 10mL de milieu préalablement préchauffé à 37°C
- Laisser la seringue en place, et masser doucement l'abdomen afin de détacher les cellules macrophagiques (pendant 1 à 3minutes)

- Aspirer le milieu avec soin (attention de pas traverser l'intestin)
- Récupérer le milieu dans un tube et conserver dans la glace si besoin
- Centrifuger et laver une fois avec le milieu 10 min, 200g, 4°C
- Reprendre le culot avec 5ml de milieu RPMI-SVF et compter les macrophages. Le culot de macrophage blanc peut être surmonté d'une couronne rouge d'hématies
- Préparer une suspension à 5×10^5 cellules/mL en RPMI-SVF et répartir à raison de 50µL par puits dans des plaques à 96 puits
- Laisser adhérer pendant 24h à 37°C et utiliser comme cellules nourricières et éboueurs pour la fusion

3. Protocole de fusion cellulaire

A - Préparation des suspensions cellulaires

Les Cellules de Myélomes

- Les cellules de la souche myélome de souris Sp2/O Ag ou X63, sont des cellules non sécrétrices d'immunoglobulines et déficientes en activité enzymatique HGPRT
- La culture est lancée environ deux semaines avant la fusion par décongélation de la lignée maintenue dans l'azote liquide et mise en culture en RPMI-SVF. Les cellules effectuent en moyenne 1 à 2 divisions par 24h. A partir de 4×10^5 cellules/mL, les cellules commencent à se lyser
- Les cellules sont maintenues en culture plusieurs jours à 1 à 2×10^5 cellules/mL et ramenées à 5×10^4 cellules/mL la veille afin qu'elles soient à 8×10^4 - 1×10^5 cellules/mL le jour de la fusion (milieu de phase exponentielle de croissance)
- Un contrôle de la sensibilité des cellules en milieu sélectif HAT doit être pratiqué avant chaque fusion.
- Le jour de la fusion, les cellules sont centrifugées dans des tubes coniques de 50mL à 250g pendant 5 minutes et sont lavées deux, fois en RPMI complet. Le culot est ensuite repris dans 20mL de milieu RPMI complet et une numération est effectuée à la cellule de Malassez (diluer au 1/20)

Les cellules spléniques de la souris immunisée

- La souris est sacrifiée (chloroforme ou rupture des vertèbres cervicales)
- On prélève le sang par ponction cardiaque (le sérum servira de témoin positif pour les tests de criblage)
- Coucher la souris sur le côté et prélever la rate stérilement, la mettre dans une petite boîte de Pétri renfermant du milieu RPMI (enlever la graisse adhérente si elle est présente). Une suspension cellulaire est ensuite obtenue (par broyage au potter, dilacération avec des pinces à dissection, sur nylon ou infiltration avec seringue et aiguille)
- Un volume d'environ 10mL est versé dans un tube conique de 50mL (si des agrégats se sont formés, transférer le surnageant dans un nouveau tube). On complète le volume à 40mL et une centrifugation de 5 minutes à 250g est faite.
- Le culot est repris dans 20mL de RPMI et une deuxième centrifugation est réalisée. Le culot est enfin repris dans 10 mL de RPMI complet et une numération est effectuée à la cellule de Malassez (diluer au 1/20 si besoin). Ne pas compter les hématies !

B - Fusion cellulaire

Tous les milieux et la solution de PEG doivent être préchauffés à 37°C

Mélange des deux types cellulaires

- Mélanger des aliquots des suspensions cellulaires de manière à avoir $2,5 \times 10^7$ cellules de myélomes et 5×10^7 cellules spléniques dans un tube à fond conique de 50mL.
- Centrifuger à 250g pendant 10 minutes
- Éliminer le surnageant (le culot doit être le plus sec possible)
- Remettre les cellules en suspension (taper légèrement la tube sur le bord de la paillasse)

Fusion

- Placer le tube et la solution de PEG pendant 2 minutes à 37°C
- Faire tomber goutte à goutte le long de la paroi du tube, 1mL de PEG 1500 pendant 1 minute tout en remuant doucement
- Stopper l'action du PEG par dilution progressive de 40mL de RPMI complet chaud :
 - 1 mL en 30 secondes
 - 4 mL en 30 secondes
 - 15 mL en 1 minute
 - 20 mL en 1 minute
- Laisser stabiliser la suspension pendant 10 minutes à température ambiante (agiter par rotation lente)
- Centrifuger 10 minutes à 250g. Éliminer le surnageant
- Rajouter 5mL de milieu RPMI-SVF sur le culot. Incuber 5 minutes à température ambiante
- suspendre le culot et répartir dans 5 boîtes de Pétri à raison de 1ml par boîte. Rajouter 10mL de RPMI-SVF par boîte et incuber 20h à 37°C en étuve à CO₂.

Culture en milieu sélectif

- Le lendemain on rajoute 10mL de milieu sélectif RPMI-SVF-HAT dans chaque boîte de Pétri
- Répartir à raison de 200µL par puits dans les microcupules d'une plaque à 96 puits à fond plat, conditionnées par les macrophages péritonéaux de souris
- Les cellules sont ensuite incubées à 37°C en atmosphère CO₂ 5%, humidité 100%
- Les hybrides commencent à se développer au bout de 5-6 jours. Au bout de 10-11 jours, on regarde les puits afin de voir ceux qui renferment les hybridomes (grosses cellules brillantes). Les clones sont parfois visibles à l'œil nu.
- On enlève le milieu sélectif et on rajoute du milieu RPMI-SVF-H (élimination des réponses faussement positives)
- Les surnageants sont bons à tester au bout de 14-15 jours après la fusion.

4 - Sélection et clonage des hybridomes producteurs

A - Premier criblage

- Lorsque les hybrides sont bien développés, 100µL de surnageant est testé pour la présence d'anticorps contre l'antigène utilisé pour l'immunisation (test ELISA, ...)
- Les clones positifs sont transférés et mis en culture dans des cupules d'une plaque à 24 puits en RPMI-SVF-H
- Après trois jours de culture, le surnageant de la grosse cupule est à nouveau testé en ELISA
- Les hybridomes les meilleurs répondeurs sont ensuite sous-clonés.

B – Sous-clonage

Les hybridomes sont sous-clonés par la méthode des dilutions limites ou directement à 1 cellule par puits (soit pour 100µL)

- La numération des cellules est effectuée à la cellule de Malassez
- Diluer les cellules de 16 cellules / 0,1ml à 0,5 cellule / 0,1ml en RPMI-SVF-H (dilution limite) ou préparer directement 10ml d'une solution à 1 cellule / 0,1ml
- Ajouter 10mL de milieu RPMI-SVF-H contenant 10⁷ thymocytes de souris (cellules nourricières)
- Répartir à raison de 200µL par puits et incuber 8 à 10 jours à l'étuve à CO₂
- Les sous-clones sont visualisés et dénombrés à la loupe et testés en ELISA
- Les puits renfermant un seul clone et positif sont transférés dans des plaques à 24 puits et cultivés 3-4 jours
- Un deuxième sous-clonage est réalisé et le même procédé de sélection est conduit.

Généralement après deux sous-clonages le caractère de monoclonalité est établi si tous les

surnageants des puits renfermant un seul clone sont positifs en ELISA.

5. Production et conservation des hybridomes producteurs

A - Production des anticorps monoclonaux

On abordera ici la production à petite échelle pour la caractérisation de l'anticorps, la conservation et l'utilisation en laboratoire. Pour des productions à grande échelle, les systèmes de culture en rollers, sur fibres creuses (technomouse, endotronics) et en fermenteurs sont nécessaires.

Culture en milieu liquide

La culture est faite en milieu RPMI-SVF dans des flacons de culture de capacité croissante 25, 75 et 125 cm². Des passages au 1/2 sont effectués pour des concentrations cellulaires de 8×10^4 cellules/mL à $1,6 \times 10^5$ cellules/mL. Cette méthode de production permet d'obtenir des concentrations d'anticorps de l'ordre de quelques dizaines de µg/mL de surnageant.

Production d'anticorps monoclonaux en liquides d'ascites (interdite en labo de recherche universitaire)

Des souris syngéniques ou Nude (récepteurs) reçoivent par voie intrapéritonéale 500µL de pristane (2,4,10,14 tétraméthylpentadécane) dans le but d'induire une inflammation péritonéale et ainsi provoquer une ascite (microenvironnement favorable à la prolifération de cellules anormales).

Huit jours après, une injection intrapéritonéale de 10^7 cellules d'hybridomes est faite.

L'évolution de l'ascite est appréciée cliniquement au cours du temps (état de la souris, gonflement du ventre).

Après 10-15 jours, le liquide ascitique est prélevé et les immunoglobulines sont purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie.

L'avantage de cette méthode est la concentration d'anticorps obtenue (de l'ordre du mg/mL), l'inconvénient est la contamination par les immunoglobulines de la souris récepteur.

Les méthodes de production en fibres creuses permettent d'obtenir des rendements équivalents à ceux des ascites sans utiliser de souris récepteur.

Détermination de l'isotype de l'anticorps monoclonal

Il est facilement établi à l'aide d'un kit commercial basé sur la reconnaissance de l'isotype de l'anticorps par des anticorps anti-isotypes de souris (classes et sous-classes des différentes chaînes d'immunoglobulines) immobilisés sur une bandelette. Pratiquement, le surnageant est incubé avec la bandelette, l'anticorps est reconnu par son isotype sur la bandelette. L'anticorps monoclonal est ensuite visualisé sur la bandelette par une reconnaissance de l'anticorps anti-immunoglobuline de souris marqué à la peroxydase. La révélation du marqueur est faite par la réaction avec le peroxyde d'oxygène et un chromogène.

B - Cryoconservation des hybridomes

Congélation des hybridomes

Le maintien permanent des hybridomes en culture comporte certains risques, tels que leur contamination, le développement de mutants non producteurs ou la mort cellulaire. La cryoconservation des cellules apparaît indispensable pour éviter la perte des hybridomes bons producteurs :

- Culture des cellules en phase exponentielle de croissances (8×10^4 à 10^5 cellules/mL), numération et centrifugation à 250g
- Reprise du culot dans le milieu de congélation à base de sérum de veau fœtal et de DMSO (9/1 V/V) à raison de 3×10^6 cellules/mL.
- Les cellules sont aliquotées dans des cryotubes de 1 ou 2mL.
- La congélation est progressive : 16 heures dans les vapeurs d'azote liquide, puis les tubes sont conservés dans l'azote liquide (-180°C) (stables 3 à 5 ans selon les clones). La congélation peut se faire aussi par passage à -80°C en boîtes de polystyrène 24-48h puis passage en azote liquide ou conservation à -80°C (stable environ 1 an).

Décongélation des hybridomes

- La décongélation doit se faire rapidement dans un bain à 37°C ou sous l'eau chaude. Avant que la décongélation soit complète (petit glaçon), on verse le contenu du cryotube dans 50mL de RPMI complet. Les cellules sont rincées deux fois à 250g et le culot est repris dans 10mL de milieu RPMI-SVF. Après numération au bleu trypan, les cellules sont remises en culture.
- Si la viabilité est supérieure à 80%, les cellules sont cultivées au départ en flacons de 25 ou 75 cm² à raison de 1 à 2 x 10⁵ cellules/mL.
- Si la viabilité est inférieure à 50%, il est préférable de relancer les clones sur des plaques 96 ou 24 puits renfermant des macrophages.

La stabilité cellulaire à la congélation / décongélation et le maintien du caractère producteur sont deux éléments indispensables à la caractérisation du clone producteur.