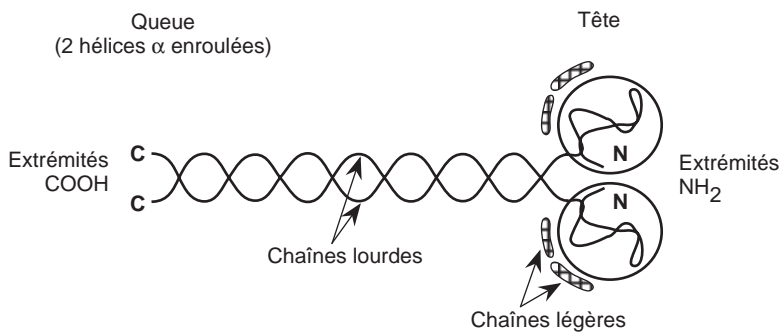


**Figure 1.** Schéma d'une molécule de myosine.**Tableau 1.** Caractéristiques contractiles et métaboliques des trois principaux types de fibres musculaires.

Type de fibres	Lentes = I	Rapides	
		IIA	IIB
Chaîne lourde de myosine	I	IIa	IIb
Activité ATPasique	faible	forte	forte
Métabolisme	oxydatif	oxydo-glycolytique	glycolytique

Ce dernier offre l'avantage d'être quantitatif, plus représentatif de l'ensemble du muscle qu'une coupe histologique, et de pouvoir être appliqué sur un grand nombre d'échantillons.

Différents anticorps sont commercialisés, cependant, jusqu'en 1995, aucun anticorps spécifique des isoformes MHC IIa et IIb n'était disponible dans le commerce pour aucune espèce. Aussi, plusieurs équipes INRA se sont associées à la société Biocytex afin de produire des anticorps monoclonaux spécifiques des isoformes de myosine IIa et IIb chez le bovin, le porc, le poisson, le poulet, la dinde et le cheval, dans le cadre d'un projet nommé « Noé ». La démarche suivie ainsi que les résultats obtenus sont décrits dans ce dossier. De plus, les applications possibles sont détaillées pour chacune des espèces concernées.

## Références

- Brooke M.M., Kaiser K., 1970. Muscle fiber type : how many and what kind ? Arch. Neurology, 23, 369-370.
- Peter J.B., Barnard R., Edgerton V.R., Gillespie C.A., Stempel K.E., 1972. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochem., 11, 2627-2633.
- Pette D., Staron R.S., 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 116, 1-76.

C. JURIE,  
J. NÉDELEC\*,  
B. PICARD

INRA Laboratoire  
Croissance  
et Métabolismes des  
Herbivores, Theix,  
63122 Saint-Genès  
Champanelle

\* Biocytex, 140,  
Chemin de l'Armée  
d'Afrique, 13010  
Marseille

## Production des anticorps monoclonaux spécifiques des chaînes lourdes de myosine

Le principe de production des anticorps monoclonaux consiste à extraire la myosine des muscles d'animaux des différentes espèces, à la purifier et à l'injecter à des souris (immunisation) censées fabriquer des anticorps contre la myosine. Lorsqu'une bonne réponse en anticorps est obtenue, les lymphocytes spléniques (cellules de la rate qui produisent des anticorps) sont fusionnés avec des cellules d'une lignée de myélome (immortelles) grâce à l'addition de polyéthylène glycol qui induit la fusion membranaire. Les lymphocytes ayant fusionné avec les cellules de myélome sont repérés en culture sur un milieu sélectif et sont appelés hybridomes. Chaque hybridome est testé pour la production d'anticorps anti-myosine. Si la réponse est positive, la culture est clonée, c'est-à-dire répartie dans des plaques multipuits de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule par puits,

celle-ci étant à la fois immortelle et productrice d'anticorps (monoclonal) (figure 1).

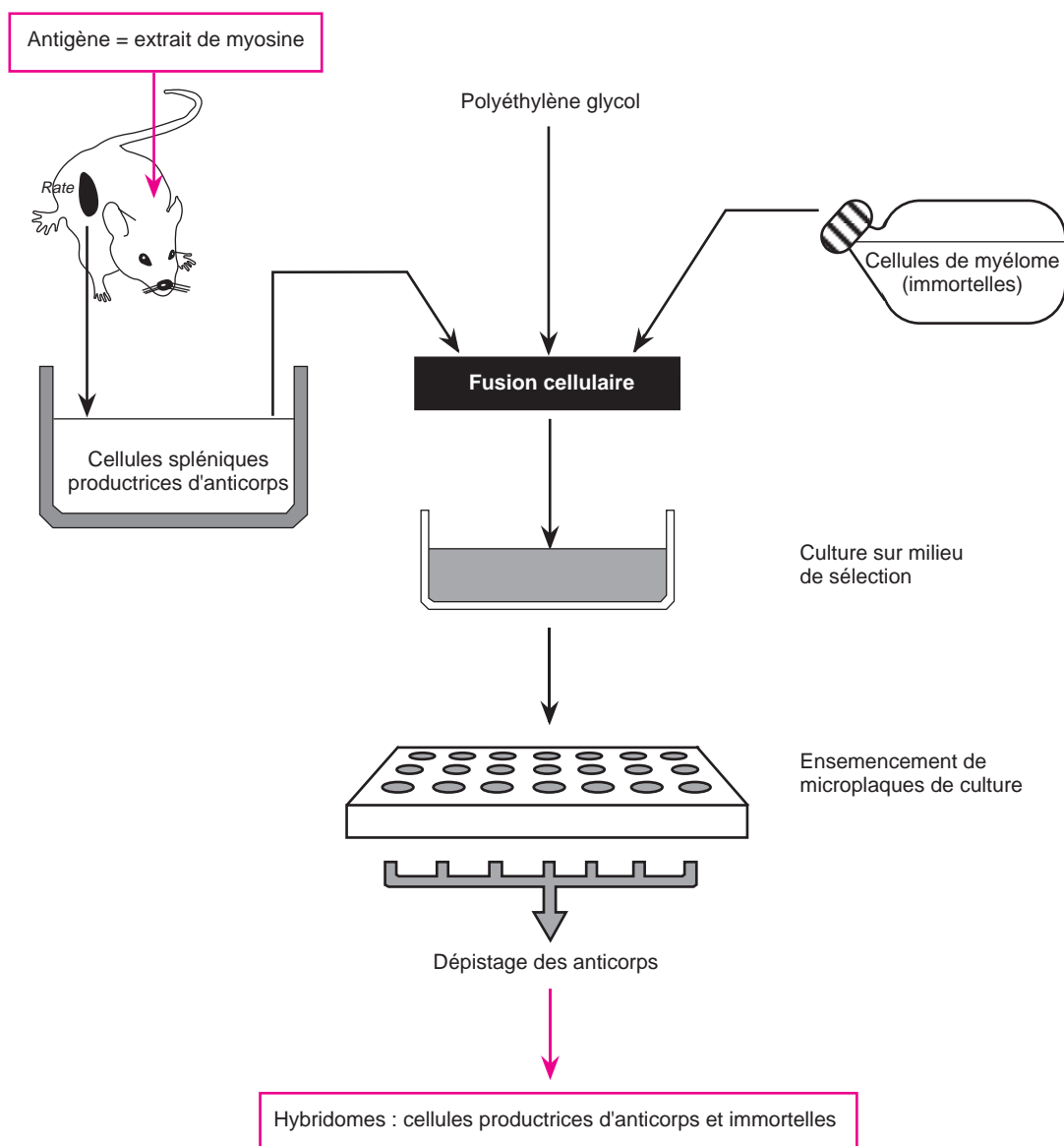
## Protocole expérimental

### Extraction de myosine purifiée

Pour chaque espèce, l'extraction de myosine a été effectuée à partir d'un échantillon de 1 g de muscle, congelé et conservé à - 80 °C. Toutes les étapes de l'extraction ont été réalisées à + 4 °C afin d'inhiber l'action des protéases.

Pour éviter des variations dues aux différentes techniques de purification utilisables, toutes les extractions de myosine purifiée ont été réalisées par la même personne du labora-

Figure 1. Production des anticorps monoclonaux.



toire Croissance et Métabolismes des Herbivores de l'INRA. Au départ, deux techniques ont été testées, une technique utilisant un tampon Guba-Straub classique (Pearson et Young 1989) et une technique décrite par Martone *et al* (1986). Bien que différentes dans la composition de leurs tampons d'extraction, ces deux techniques sont basées sur le même principe, qui repose sur les propriétés chimiques de la myosine, à savoir que celle-ci est soluble à haute force ionique ( $> 0,23$ ), insoluble à faible force ionique et possède la propriété d'hydrolyser l'ATP.

L'échantillon est tout d'abord broyé et homogénéisé dans un tampon de faible force ionique pour extraire les protéines. Après centrifugation, le culot contenant la fraction protéique myofibrillaire est repris dans un tampon de haute force ionique afin de solubiliser la myosine. De l'ATP est ajouté pour dissocier les complexes actine-myosine et donc libérer la myosine. Après une nouvelle cen-

trifugation, permettant entre autres d'éliminer l'actine dans le culot, celle-ci n'étant pas soluble à haute force ionique, le surnageant contenant la myosine est récupéré. La myosine est ensuite précipitée par addition d'EDTA pour la technique de Pearson et Young (1989) ou de  $\text{KHCO}_3$  pour la technique de Martone *et al* (1986), ces deux produits permettant de diminuer ainsi la force ionique. Cette étape s'est révélée la plus importante d'un point de vue quantitatif. En effet, le rendement en myosine avec la précipitation au  $\text{KHCO}_3$  est bien supérieur à celui obtenu avec la précipitation à l'EDTA. La méthode de Martone *et al* (1986) donnant un meilleur rendement et de plus étant plus rapide a été retenue. Ces deux dernières étapes, solubilisation de la myosine et précipitation avec  $\text{KHCO}_3$ , sont réalisées une deuxième fois afin de purifier et de concentrer la myosine. Le culot final, obtenu après centrifugation, est repris avec un tampon de

**Tableau 1.** Caractéristiques des hybridomes retenus par l'ensemble des espèces.

Spécificité	Hybridome	Isotype Immunoglobulines ( $\mu\text{g/ml}$ )	Espèces
anti-myosine totale	S5 7E6	IgG1 $\kappa$ (2,8)	bovin, cheval, porc
anti-MHC I	S4 9G11	IgM $\kappa$ (64)	cheval
	S4 17F7	IgG1 $\kappa$ (6,8)	poulet
	S5 7F10	IgG2b $\kappa$ (140)	dinde
anti-MHC II	S5 15F4	IgG1 $\kappa$ (8)	bovin, cheval
	S4 10G9	IgG1 $\kappa$ (22)	cheval
	S5 14B3	IgG (56) et IgG2b $\kappa$ (6,1)	porc
	S4 8E6	IgG1 $\kappa$ (8)	poisson
	S5 16D12	IgM $\kappa$ (92)	poulet
anti-MHC II mosaïque	S5 8F3	IgG2b $\kappa$ (94)	poulet
	S5 8H2	IgG1 $\kappa$ (22)	dinde
	S5 7D4	IgG1 $\kappa$ (26)	dinde
	S5 11D6	IgG1 $\kappa$ (3,6)	dinde
anti-myosine (mosaïque)	S4 10H9	IgG1 $\kappa$ (31)	poisson
anti-MHC I + IIb	S5 8H2	IgG1 $\kappa$ (22)	bovin, cheval, porc
anti-MHC IIa + IIx	S5 7D4	IgG1 $\kappa$ (26)	porc
anti-MHC IIb	S4 10B6	IgG2b $\kappa$ (0,064)	bovin
	S4 9H5	IgG1 (22) et IgM $\kappa$ (12)	poulet

solubilisation, additionné de glycérol à raison de 50 % et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les extractions de myosine purifiée **en vue de l'immunisation** ont été réalisées sur des échantillons de muscles ne contenant que des isoformes de chaînes lourdes rapides (MHC IIa, MHC IIb) :

- le muscle *cutaneus trunci* pour le bovin et le cheval (bien que ce muscle ne soit pas entièrement rapide chez ce dernier) ;
- le *semitendinosus* pour le porc ;
- le *posterior latissimus dorsi* pour la dinde et le poulet ;
- le muscle blanc de poisson.

De plus, des extractions de myosine purifiée ont été réalisées en vue du tri : le muscle *masseter* (MHC I) pour le bovin, le *pectoralis major* (MHC IIb) pour le poulet et la dinde, le *diaphragma* (MHC I, MHC IIa) pour le cheval.

Afin de vérifier la pureté des myosines obtenues, une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12 % en présence de détergent SDS (Laemmli 1970) a été réalisée pour chacune des espèces. Les résultats obtenus ont montré que l'extraction faite contenait des traces d'autres protéines myofibrillaires (troponine et/ou tropomyosine).

### Immunisation

Six souris (S1 à S6) de la souche BALB/C femelles âgées de six semaines ont été immunisées chacune par 4 injections d'extraits de myosine sur une période de 79 jours. Les immunisations ont été réalisées de la façon suivante : S1 et S2 ont reçu un mélange des extraits de myosine de bovin et de cheval ; S3 et S4 ont reçu un mélange des extraits de myosine de poisson et de dinde ; S5 et S6 ont reçu

un mélange des extraits de myosine de porc et de poulet. Lors des trois premières injections (à J0, J21 et J42) chaque souris a été immunisée avec deux fois  $20 \mu\text{g}$  de myosine des deux espèces différentes. La première injection (J0) a été réalisée en présence d'adjuvant complet de Freund et les deux injections suivantes (J21 et J42) en présence d'adjuvant incomplet de Freund (l'adjuvant de Freund est une émulsion d'antigène dans l'huile capable d'augmenter non spécifiquement la réponse immunitaire à un antigène ; il contient aussi des *mycobacterium tuberculosis* tuées, l'adjuvant incomplet n'en contient pas). La dernière injection (J79) a été réalisée en intraveineux avec deux fois  $10 \mu\text{g}$  de myosine en PBS stérile trois jours avant la fusion cellulaire.

Le choix d'immuniser les souris avec deux types de myosine a été dicté par des impératifs d'organisation du travail. Ce choix n'est pas gênant car le système immunitaire des mammifères est habitué à répondre à des stimulations variées et simultanées. La sélection des anticorps spécifiques de chaque myosine est réalisée par la suite : les anticorps sont testés séparément sur chaque myosine ayant servi à l'immunisation. Il est cependant clair que les différentes myosines ont un fort niveau d'homologie dans leur séquence, aussi, certains anticorps monoclonaux produits pourront reconnaître des séquences communes à toutes les myosines.

### Testage des sérums polyclonaux

Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur les souris après immunisation à J37 et J57. Les sérums contenant les anticorps ont été testés en ELISA (dosage quantitatif immunoenzymatique) sur les différents ex-

traits de myosine par la société Biocytex. Ils ont également été testés en immunohistochimie sur des coupes de muscles de chaque espèce par le laboratoire Croissance et Métabolismes des Herbivores (INRA).

Les résultats d'ELISA et d'immunohistochimie montrent que les souris S3, S4, S5, S6 ont développé une réponse forte contre les myosines. Quelle que soit l'espèce, leurs sérums contiennent des anticorps capables de reconnaître différents types de MHC. Au vu de l'intensité de la réponse, seuls les lymphocytes des souris S4 et S5 ont été retenus pour réaliser une fusion.

Par contre, les souris S1 et S2, immunisées avec les myosines de cheval et de bovin, ont beaucoup moins bien répondu. Les sérums obtenus n'ont pas permis de distinguer les myosines, ceci dans toutes les espèces, même chez le bovin et le cheval. Ces sérums ne contiennent donc pas d'anticorps capables de reconnaître les MHC. Il a donc été décidé de poursuivre l'immunisation des souris S1 et S2 afin d'augmenter leur réponse à l'antigène. Par la suite, les lymphocytes de la souris S2 ont été fusionnés, mais sans succès.

## Fusion

Les fusions cellulaires ont été réalisées selon le protocole modifié de Köhler et Milstein (1975). Les hybridomes ont été préparés par fusion entre les splénocytes d'une souris immunisée (S4 et S5) et les cellules de myélome X63 Ag8/653 ou celles du myélome SP2/0-Ag14. Les deux types de cellules ont été mélangés selon un rapport 5:1 en présence d'une solution à 40 % de polyéthylène glycol de poids moléculaire 1500 selon le protocole décrit à la figure 1. Les hybridomes (cellules productrices d'anticorps et immortelles) ont été ensuite ensemencés dans des microplaques de culture.

## Testage des surnageants des hybridomes

Le surnageant des puits contenant une seule cellule (clone) visible au microscope a été testé pour la production d'anticorps spécifiques de la myosine par dosage ELISA réalisé par la société Biocytex. De plus, chaque équipe INRA a testé environ 50 hybridomes, les mêmes pour les 6 espèces, issus de la fusion S4 (poisson + dinde) ou S5 (poulet + porc), en ELISA (Picard *et al* 1994) pour l'équipe cheval ou en immunohistologie

pour les équipes bovin, dinde, poisson, porc, poulet.

## Résultats

Les hybridomes testés se répartissent selon 4 groupes :

- des hybridomes qui ne reconnaissent aucune myosine ;
- des hybridomes qui reconnaissent à la fois les myosines rapides et les myosines lentes ;
- des hybridomes qui ne reconnaissent que les myosines rapides, sans distinction entre les fibres de type IIA et les fibres de type IIB ;
- **quelques hybridomes (2 à 3) par espèce qui différencient 2 populations de fibres rapides.**

Chaque équipe a sélectionné 4 hybridomes parmi les plus intéressants. Ils ont été à nouveau testés en immunohistologie sur plusieurs muscles présentant des caractéristiques contractiles différentes, mais également en ELISA, en Western Blot ou en cultures de cellules, selon les espèces. En définitive, seuls les hybridomes dont les caractéristiques sont décrites dans le tableau 1 ont été retenus. L'utilisation possible des anticorps monoclonaux produits par ces hybridomes est détaillée dans les articles ci-après pour chacune des espèces concernées.

## Références

- Köhler G., Milstein C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody to predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Martone C.B., Busconi L., Folco E.J., Trucco R.E., Sanchez J.J., 1986. A simplified myosin preparation from marine fish species. *J. Food Sci.*, 51, 1554-1555.
- Pearson A.M., Young R.B., 1989. 3. Proteins of thick filament. In : B.S. Schweigert and S.L. Taylor (eds), *Muscle and meat biochemistry*. Academic press Inc., San Diego, California.
- Picard B., Léger J., Robelin J., 1994. Quantitative determination of type I MHC in bovine muscle with anti myosin monoclonal antibodies. *Meat Sci.*, 36, 333-343.