

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) Nº de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 842 825

(21) Nº d'enregistrement national : 02 09631

(51) Int Cl<sup>7</sup> : C 12 P 21/00, C 12 P 21/08, C 07 K 16/00, 16/20,  
A 61 N 2/00

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 29.07.02.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : AYARI MOHAMED — FR et BALANA  
ARTHUR — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 30.01.04 Bulletin 04/05.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(72) Inventeur(s) : AYARI MOHAMED et BALANA  
ARTHUR.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) :

(54) PROCEDE D'OBTENTION D'ANTICORPS NECESSITANT L'UTILISATION D'UN ENSEMBLE DE CHAMPS  
ELECTROMAGNETIQUES.

(57) L'immunisation d'un sujet vivant par un antigène donné constitue une étape déterminante des procédés d'obtention d'anticorps s'associant audit antigène. Du mode d'immunisation choisi, dépendent les résultats des étapes suivantes du procédé d'obtention.

Lors de l'étape d'immunisation au cours du procédé d'obtention d'anticorps faisant l'objet de cette invention, nous appliquons à un sujet vivant un ensemble particulier de champs électromagnétiques, que nous avons décrits dans un précédent brevet, pour produire une réponse immunitaire dudit sujet dont dépend la réalisation des autres étapes pour l'obtention de ces anticorps.

FR 2 842 825 - A1



## 5 Etat de la technique.

L'immunisation d'un sujet vivant - dit sujet hôte, généralement animal - avec un antigène donné, est une étape déterminante des procédés d'obtentions d'anticorps se liant spécifiquement à cet antigène.

Un antigène est une molécule, souvent une protéine ; il peut être libre ou porté par une molécule porteuse ou par un microorganisme : virus, bactérie, parasite, cellule. Administré ou induit chez un sujet hôte, l'antigène suscite une réponse immunitaire plus ou moins importante de la part de l'organisme.

Ainsi, au terme de l'immunisation, la rate et les ganglions lymphatiques du sujet hôte contiennent en quantités variables, selon le protocole d'immunisation, des cellules productrices des anticorps recherchés. Les anticorps sériques produits sont caractérisés notamment par leur titre, affinité, concentration, classe et spécificité envers l'épitope de l'antigène [KENNEY, p.157] ; caractéristiques qui dépendent du protocole d'immunisation.

Si l'immunisation échoue, aucun anticorps ne peut être obtenu [MILSTEIN, p. 107.10].

20

Lorsque l'antigène, pour lequel on veut obtenir un anticorps, est porté par un microorganisme se développant très rapidement chez le sujet hôte, on peut choisir d'atténuer, tuer ou modifier ce microorganisme pour laisser au sujet hôte le temps de développer une réponse immunitaire. Mais certaines de ces opérations peuvent être complexes.

On peut aussi extraire un antigène membranaire. Cependant, l'antigène libre n'induit pas forcément une réponse immunitaire identique à celle obtenue lorsqu'il est associé à la membrane du microorganisme ; les épitopes libérés peuvent détourner une partie de la réponse immunitaire vers eux. D'autre part, l'obtention d'un anticorps monoclonal destiné à s'associer à un microorganisme vivant peut être compromise car la conformation de l'antigène peut avoir changé au cours de sa libération par les procédés employés ; la haute spécificité de l'anticorps obtenu ne permet plus alors de reconnaître l'antigène dans sa conformation native (épitope de conformation) lorsqu'il est fixé sur la

surface du microorganisme [DUNBAR, p.135 ; PETERS, BAUMGARTEN, p.44 ; PEARSON, 1986, p. 6.7].

On utilise habituellement des adjuvants afin de renforcer la réponse immunitaire, et 5 ce notamment lorsque l'antigène est faiblement immunogène ou disponible en très faibles quantités. Les adjuvants permettent d'accroître le nombre de cellules formant les anticorps et agissent sur la qualité des anticorps produits (affinité, spécificité, classe et sous-classe) [RUDBACK, p.4 ; KENNEY, p.157 ; PETERS, BAUMGARTEN, p.69].

L'adjuvant de FREUND est le plus connu. Cet adjuvant induit surtout la formation 10 d'IgG1 chez la souris BALB/C. Il provoque une hypergammaglobulinémie polyclonale avec de forts titres d'anticorps spécifiques, ainsi que la production non spécifique d'immunoglobulines [KENNEY, p.158 ; PETERS, BAUMGARTEN, p.58]. Il présente certains inconvenients : apparition de granulomes aux points d'injections, de myélomes et de la fièvre ; sa manipulation n'est pas sans danger, aussi bien pour l'animal (lésions cutanées 15 difficiles à cicatriser) que pour le manipulateur (réactions d'hypersensibilité parfois sévères, doigts ankylosés ou non fonctionnels de façon permanente suite à une injection accidentelle ; risque de cécité si contact avec les yeux) [GODING, p.59, p.255 ; PETERS, BAUMGARTEN, p.53-54, 59]. Certaines institutions interdisent par conséquent son utilisation 20 [HOWARD, BETHELL, p.36 ; RUDBACK, p.4]. La préparation de l'émulsion constituée de cet adjuvant et de la solution d'antigène présente quelques difficultés, ainsi que son injection, à cause de sa viscosité.

L'hydroxyde d'aluminium précipité est mieux toléré. Il permet l'agrégation des molécules d'antigène. Il induit surtout la formation d'IgG1 [KENNEY, p.158] et d'IgE [PETERS, BAUMGARTEN, p.69]. Il n'est pas efficace pour tous les antigènes, bien qu'utilisé 25 dans de nombreux vaccins. La présence de l'aluminium ne semble pas cependant dénuée d'effets secondaires et fait l'objet d'études et de discussions [GHERARDI ; SOKOLSHY, LEHNISCH].

Le lipopolysaccharide (LPS) ou le muramyl dipeptide (MDP) sont pyrétogènes et présentent des effets secondaires [KENNEY, p.158]. Le LPS induit aussi la formation non 30 spécifique d'immunoglobulines et l'activation polyclonale du système immunitaire [PETERS, BAUMGARTEN, p.58].

D'autres adjuvants présentent moins d'effets secondaires mais les études comparatives concernant leurs efficacités respectives (quantité et qualité des anticorps

produits) sont peu nombreuses ; pour certains antigènes ils s'avèrent moins performants en terme de titre d'anticorps [HOWARD, BETHELL, p.36 ; PETERS, BAUMGARTEN, p.60]. Cependant, le titre d'anticorps n'est pas toujours le critère déterminant dans le choix d'un adjuvant. Par exemple, on a montré que, pour l'antigène HSA chez la souris BALB/C, le Quil A et le RAS (Ribi adjuvant system) induisent moins d'anticorps que l'adjuvant de FREUND mais les anticorps sont spécifiques aux épitopes de la protéine native et non de la protéine dénaturée ; que le Quil A induit des anticorps plus affins que l'adjuvant de FREUND ; que *N*-acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamine induit en grande partie des anticorps de sous-classe IgG2a, plus efficaces pour l'activation du complément et des mécanismes cellulaires cytotoxiques dépendant des anticorps, alors que les autres adjuvants induisent surtout la sous-classe IgG1 [KENNEY, p.161-164].

D'autres adjuvants encore ont très peu d'effets seuls et doivent être employés en synergie, avec des résultats très variés. Ils ne semblent pas être recommandés pour la production d'anticorps monoclonaux [PETERS, BAUMGARTEN, p.58].

15

Le système immunitaire est plus ou moins sollicité selon la voie d'injection de l'antigène [HOWARD, BETHELL, p.37-39].

Une injection intramusculaire présente mieux l'antigène au système immunitaire, mais cause des lésions et est douloureuse pour le sujet hôte. Une anesthésie du sujet est vivement recommandée.

20 L'injection intraveineuse est souvent employée lors de la dernière injection d'antigène, quelques jours avant la saignée (obtention d'anticorps polyclonaux) ou la fusion (obtention d'anticorps monoclonaux), pour accroître rapidement et fortement la réponse immunitaire. Cependant, le risque de choc anaphylactique est loin d'être négligeable chez le sujet déjà sensibilisé [GODING, p.59 ; PETERS, BAUMGARTEN, p.49], même si l'antigène est injecté sans adjuvant.

25 L'injection intradermique nécessite aussi de nombreux points d'injections et est plus difficile à réaliser. Une anesthésie du sujet est aussi vivement recommandée et est obligatoire chez le rat et la souris. Des ulcérations peuvent causer la perte de l'animal, tout comme l'injection intramusculaire [PETERS, BAUMGARTEN, p.49].

30 L'injection sous cutanée nécessite plusieurs points d'injections pour favoriser l'interaction antigène-ganglions lymphatiques.

L'injection intrasplénique est utilisée lorsque l'on dispose de très faibles quantités

d'antigène. Sa mise en œuvre nécessite des précautions particulières puisqu'elle fait appel à un acte chirurgical sous anesthésie [PETERS, BAUMGARTEN, p.56].

L'injection intra-péritonéale est moins problématique [PETERS, BAUMGARTEN, p.48] et est applicable à toutes les espèces.

5 La voie d'administration de l'antigène a une action sur la classe des immuno-globulines produites. Ainsi, un antigène administré par voie oral ou intra-nasale induit la formation d'IgA [PETERS, BAUMGARTEN, p.69]. Elle peut aussi avoir un effet sur l'affinité et la concentration des anticorps [KENNEY, p.161 et 164].

10 La réponse primaire, obtenue après la première injection de l'antigène, est caractérisée tout d'abord par une période de latence pendant laquelle aucun anticorps n'est décelable, suivie d'une phase de croissance exponentielle de la concentration des anticorps jusqu'à atteindre une valeur maximale en plateau, puis une phase de décroissance suite à leur dégradation et leur association avec l'antigène. La cinétique et l'amplitude de cette 15 réponse est fonction de l'organisme hôte et du protocole de stimulation antigénique. Au cours de la réponse primaire, des anticorps de classe IgM apparaissent généralement en premier, puis des IgG ; dans certains cas, seules apparaissent des IgM [GODING, p.13].

La réponse secondaire est caractérisée par une période de latence plus courte, une phase en plateau plus longue et une décroissance plus lente. Dans le cas des antigènes 20 thymo-dépendants (ce qui est le cas de la plupart des antigènes), le taux maximum d'anticorps IgM est du même ordre de grandeur que lors de la réponse primaire, par contre le taux d'anticorps IgG est souvent au moins égal à 10 fois le taux atteint au cours de la réponse primaire [FELDMANN, p. 8.3]. On observe une amélioration de l'affinité des anticorps IgG d'autant plus que la dose injectée d'antigène est faible (ce qui permet de 25 sélectionner les lymphocytes B les plus afin), mais pas ou peu des IgM (l'avidité de ces dernières est cependant importante grâce à leur structure pentamérique) [GODING, p.13].

Les durées d'immunisation s'échelonnent habituellement entre 2 à 6 mois. De telles durées sont nécessaires pour améliorer l'affinité, la spécificité, et accroître le titre des 30 anticorps (notamment IgG et IgA) au fur et à mesure des réponses secondaires successives ; le titre des anticorps spécifiques étant d'autant meilleur que deux injections successives de l'antigène ne sont pas trop rapprochées dans le temps [PETERS, BAUMGARTEN, p.2, 45-47, 50]. Les courtes durées d'immunisation, faisant appel à une seule injection,

permettent d'obtenir des anticorps de classe IgM, parfois recherchés [PETER, BAUMGARTEN, p.69] (dans le domaine de l'analyse toutefois, les anticorps de cette classe ne sont pas retenus car ils présentent plus de réactions non spécifiques et sont moins stables que les IgG [HOWARD, BETHELL, p.35, p.56 ; PEARSON, 1986, p. 6.4]). En revanche, si l'antigène 5 administré au sujet hôte n'est pas pur, il est préférable d'éviter une immunisation trop prolongée qui aurait pour conséquence d'induire une réponse immunitaire contre les structures antigéniques indésirables [HOWARD, BETHELL, p.35].

Une fois le sujet hôte immunisé, on peut envisager la production d'anticorps.  
10 Les anticorps polyclonaux sont obtenus avec l'immun-sérum. Selon l'application à laquelle ils sont destinés ou le degré de spécificité recherché, une purification des anticorps peut s'avérer nécessaire.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par génie génétique, mais sont la plupart du temps obtenus par la technique des hybridomes. Le succès dans l'obtention 15 d'hybridomes viables et en quantité suffisante - pour réduire le temps et la complexité de la sélection des clones sécrétant l'anticorps recherché [HOWARD, BETHELL, p.56] - dépend de paramètres intervenants au cours des étapes de cette technique ; par exemple : cellules de myélome de préférence non productrices d'immunoglobulines, issues d'un sujet de même lignée que le sujet immunisé, et en phase de croissance logarithmique avant fusion 20 [PEARSON, 1980, p. 153] ; valeurs de la concentration en PEG, pH, et du temps de fusion dans le milieu de fusion [GODING, p.68] ; co-culture des hybridomes avec des cellules feeders, notamment des macrophages, et milieux de cultures appropriés [PEARSON, 1980, p.152].

Mais ce succès dépend aussi - et pour une grande part - des paramètres intervenant au 25 cours du protocole d'immunisation, tels que ceux précédemment présentés. Ainsi, un protocole d'immunisation qui induit une faible réponse immunitaire a pour conséquence d'avoir à réaliser de nombreux tests longs et laborieux nécessaires pour sélectionner les hybridomes positifs [DUNBAR, p.129 ; GODING, p.74]. En revanche, une immunisation est réussie lorsqu'elle aboutit à un titre sérique suffisamment élevé des anticorps recherchés ; 30 ce titre constitue une indication relativement viable quant au nombre d'hybridomes produisant les anticorps recherchés que l'on peut espérer obtenir [GODING, p.58 ; PEARSON, 1980, p.148-149 ; RUDBACH, p.7]. La production de masse des anticorps est finalement effectuée en bio-réacteur ou avec une ascite.

### Présentation de l'invention.

Le procédé d'obtention d'anticorps faisant l'objet de cette invention fait appel au procédé que nous avons décrit dans un précédent brevet [AYARI, BALANA, 2002]. Ce 5 procédé permet d'obtenir dans un volume d'exposition un ensemble particulier de champs électromagnétiques {EM} à visées diagnostiques, préventives, thérapeutiques et biotechnologiques.

L'exposition d'un sujet vivant à cet ensemble de champs EM permet la stimulation 10 de ses défenses naturelles en général. Même si les mécanismes qui sous-tendent cette stimulation ne sont pas encore étudiés, les résultats des effets biologiques qui en découlent peuvent d'ores et déjà être mis en application.

Un des résultats majeurs découlant de l'application de ces champs EM est qu'ils ne 15 produisent aucun effet secondaire néfaste sur l'organisme hôte. D'autre part, ils agissent sans pour autant éléver la température de l'organisme du sujet exposé, contrairement à certaines techniques de traitement mettant en œuvre des champs électromagnétiques ayant pour but justement d'éléver la température d'une partie ou de la totalité du sujet traité, telles que la diathermie.

Plus particulièrement, l'application de ces champs EM à un sujet hôte stimule, 20 accroît et accélère la réponse immunitaire dudit sujet à un antigène dont il est porteur. Ils favorisent l'apparition d'anticorps spécifiques à l'antigène et donc des lymphocytes formant ces anticorps, et accélèrent l'amélioration de l'affinité et la maturation de la réponse immunitaire.

C'est ainsi que, dans le cadre du présent brevet, cet ensemble de champs EM est 25 mis en œuvre dans le but de produire des anticorps se liant spécifiquement à un antigène.

Ce mode d'immunisation peut être indiqué dans de nombreuses situations. Par exemple, cet ensemble de champs EM permet d'accroître notamment la réponse immunitaire à un antigène donné lorsque :

30 - l'antigène est faiblement immunogène ; c'est le cas par exemple de protéines provenant d'un sujet donneur de même espèce que le sujet hôte à immuniser, ou de protéines similaires entre deux espèces différentes [HOWARD, BETHELL, p.33] ; on peut de plus tirer bénéfice d'une préparation de l'antigène sous forme agrégée [PETERS,

BAUMGARTEN, p.41], ou même lié à une molécule porteuse si la liaison antigène / anticorps obtenus ne dépend pas de la présence de cette molécule porteuse [idem, p.43].

- l'antigène est disponible en faible quantité (provenant par exemple d'un gel d'électrophorèse [DUNBAR, p.133-134]).

5 - l'antigène est faiblement immunogène et est fixé sur la membrane d'une cellule vivante ; c'est le cas par exemple de certaines lignées de cellules tumorales pour lesquelles on s'efforce d'obtenir des anticorps ; on évite ainsi d'avoir à extraire l'antigène.

10 - l'antigène est un haptène ; on évite ainsi l'utilisation d'une molécule porteuse qui induit la formation d'anticorps pour son propre compte, et on peut choisir une molécule porteuse moins immunogène.

15 - l'antigène est fixé sur la membrane d'un microorganisme particulièrement virulent chez le sujet hôte ; les champs EM peuvent permettre non seulement d'induire rapidement une réponse immunitaire pour cet antigène mais aussi de venir à bout de ce microorganisme ; on s'affranchit ainsi des opérations nécessaires pour atténuer le microorganisme ou extraire l'antigène.

- l'espèce ou la lignée du sujet hôte répond mal à l'antigène administré ; l'utilisation de cet ensemble de champs EM peut éviter la recherche d'une autre espèce ou lignée et permet d'obtenir des anticorps propres à ce sujet.

20 D'une façon générale, l'immunisation d'un sujet avec un antigène donné, quelque soit la forme sous laquelle il se présente, peut susciter l'utilisation de cet ensemble de champs EM pour obtenir les anticorps se liant spécifiquement audit antigène. L'utilisation de ces champs EM peut permettre de simplifier les opérations de préparation de l'antigène. De part son fort pouvoir immuno-stimulant, cet ensemble de champs EM permet de 25 s'affranchir de l'utilisation d'adjuvants et d'opter pour un mode d'injection de l'antigène de façon plus aisée.

30 Les valeurs des paramètres physiques des champs EM peuvent être optimisées par l'expérimentation en partant des valeurs que nous proposons en annexe. L'efficacité de la stimulation immunitaire dépend, entre autre, de l'intensité du champ magnétique, de la puissance du champ UHF et de son indice de modulation d'angle. La durée quotidienne et totale d'exposition du sujet hôte à ces champs EM est fixée en fonction des résultats biologiques obtenus, et ce pour le modèle biologique choisi ; elle est au minimum de

quelques heures par jour pendant quelques jours après l'administration de l'antigène. Le choix de toutes ces valeurs a une conséquence en particulier sur le titre, l'affinité, la spécificité, la classe et/ou la sous-classe des anticorps sériques présents en fin de phase d'immunisation.

5

La simplification de la préparation de l'antigène, l'accélération de la phase d'immunisation du sujet, la réduction du temps nécessaire aux tests des puits contenant les hybridomes dans le cas de la production d'anticorps monoclonaux, sont des facteurs qui contribuent à réduire la durée d'obtention de l'anticorps recherché.

10

En résumé, l'utilisation de cet ensemble de champs EM constitue une alternative - de nature physique - aux adjuvants habituellement utilisés, pour stimuler le processus d'immunisation d'un sujet porteur d'un antigène afin d'obtenir des anticorps spécifiques à cet antigène.

15

Pour mieux faire comprendre les étapes de réalisation du procédé faisant l'objet de l'invention, nous présentons quelques exemples, étant bien entendu qu'ils ne sauraient être limitatifs tant les variantes sont très nombreuses. En particulier, ils montrent bien que le mode d'immunisation avec cet ensemble de champs EM préconisé est aisé et concluant 20 quant à l'obtention des anticorps recherchés.

Nous proposons donc d'obtenir des anticorps polyclonaux de Lapin et des anticorps monoclonaux de Souris reconnaissant spécifiquement un antigène de surface de *Trypanosoma equiperdum* vivant. Ces anticorps sont destinés à des fins de tests et de diagnostics. Les résultats présentés ici sont en partie tirés d'un travail de recherche et de 25 synthèse qui sera publié.

30

### Exemples de réalisations.

#### *L'antigène et le protozoaire porteur.*

Le parasite africain *Trypanosoma equiperdum* est l'agent pathogène d'une maladie grave chez les équidés ; le vecteur de transmission est un insecte. Ce parasite est aisément observable au microscope optique. Il est strictement extracellulaire et est présent dans le sang du sujet hôte infecté. De forme allongée, il doit sa grande mobilité au long flagelle libre ondulant qu'il utilise pour se propulser (forme trypomastigote).

10 Chez le sujet hôte, ce parasite laisse apparaître plusieurs structures antigéniques. Certaines sont étroitement liées au corps parasitaire (antigènes somatiques) ; elles ne peuvent être libérées dans le milieu ambiant que par la destruction du parasite. D'autres structures peuvent diffuser facilement dans le milieu ambiant (exo-antigènes). Certaines structures antigéniques sont communes à une même souche ; d'autres sont spécifiques à 15 chaque type appartenant à cette souche : en effet, *T. equiperdum* présente le phénomène de variation antigénique. Lorsque l'évolution de la parasitose, chez l'organisme hôte, évolue sur un mode suffisamment long ou chronique, on assiste à une succession dans le temps de types antigéniques parasites distincts les uns des autres, dits variants ; distinction qui se manifeste notamment par les différents immun-sérum qu'ils suscitent [CAPBERN]. Chez le 20 Lapin, les variants se succèdent dans le temps tous les deux à trois jours ; le passage d'un variant à l'autre se produisant en quelques heures. En fait, au cours de la croissance du nombre de parasites d'un variant donné, d'autres variants apparaissent à raison de 1 nouveau variant pour  $\sim 10^4$  parasites du variant majoritaire ; ces variants minoritaires coexistent quelque temps avec le variant majoritaire, et ne sont pas décelables par une 25 réaction d'agglutination. Lorsque le système immunitaire a développé une réponse spécifique suffisamment intense contre le variant majoritaire, il est progressivement éliminé. Parmi les variants minoritaires, le plus virulent se développe plus rapidement et prend le dessus sur les autres. Les anticorps du sujet hôte jouent donc un rôle sélectif [VICKERMAN, p.615]. Finalement, cette variation permet au parasite d'échapper, par 30 compétition, aux défenses immunitaires de l'hôte.

Pour chaque vague parasitaire, on peut obtenir une population homogène quant au type (correspondant à un variant donné) en clonant un seul parasite prélevé à l'acmé de la

parasitème : le parasite unique est injecté à la Souris ou le Rat chez lesquels il se multiplie en une seule vague parasitaire. Chaque population issue d'un clone peut être cryo-conservée [Annexe]. A.CAPBERN et coll. ont pu ainsi isoler plus d'une centaine de types antigéniques différents à partir de leur souche [CAPBERN ; GIROUD, 1984].

5 Parmi tous ces types antigéniques, il existe un type préférentiel appelé type antigénique de base (baptisé BoTat-1 pour la souche employée par A.Capbern et coll.) ; il est caractéristique de chaque souche. Le type de base se comporte comme un type dominant : les différents types antigéniques de la souche évoluent préférentiellement vers le type de base. Les parasites demeurent dans cet état tant que le milieu hôte ne présente  
10 pas de résistance immunitaire spécifiquement dirigée contre ce type. Lors d'une parasitose chronique, la succession des variants se fait au début dans un ordre pratiquement prédéfini, puis au fur et à mesure de son évolution il est de plus en plus aléatoire [CAPBERN ; VIKERMAN, p. 614].

15 Chaque variant est caractérisé par une glycoprotéine spécifique de type située à la surface du parasite et présente un caractère immunogène dominant par rapport aux autres structures antigéniques [ROTH, p.726] ; purifiée, elle est très immunogène, et confère à l'animal immunisé une protection contre le parasite vivant [BALTZ, 1977, p.95]. Cette glycoprotéine contient des chaînes d'hydrates de carbone souvent localisées près de la membrane [VIKERMAN, p.615], bien que pour certains types antigéniques ces chaînes  
20 pourraient être plus accessibles [BALTZ, 1976, p.771] ; ces chaînes semblent de ce fait jouer un rôle modéré voire mineur dans la réponse immunitaire contre le parasite vivant. En revanche, la glycoprotéine de type sous forme libre est susceptible d'induire la formation d'antisérum qui présente une réaction croisée avec d'autres glycoprotéines, et ce même si les portions polypeptidiques sont différentes, car les chaînes d'hydrates de carbone sont  
25 partagées par de nombreuses glycoprotéines [GODING, p.41]. D'autre part, des réactions croisées entre différents types antigéniques de trypanosomes Africains, dont *T. equiperdum*, peuvent être mises en évidence à l'aide d'un test radio-immunologique avec les antigènes purifiés [LABASTIE, p.733] ; cependant, les déterminants antigéniques communs se situent probablement à l'intérieur de la couverture antigénique, et  
30 participeraient à l'ancrage des structures antigéniques spécifiques de type dans la membrane du parasite vivant [BARBET, p.1993 ; DUVILLIER, p.28].

Chez la Souris et le Rat, *T. equiperdum* provoque une trypanosomiase aiguë. L'inoculation est faite par voie intra-péritonéale. Dès lors, les trypanosomes se multiplient très rapidement et envahissent le sang circulant. La parasitémie, c'est-à-dire le nombre de parasites par  $\mu\text{l}$  de sang, est aisément contrôlable au microscope. Aucun animal ne résiste 5 spontanément à la trypanosomiase ; la mort survient lorsque le taux parasitaire est voisin de  $10^6$  parasites/ $\mu\text{l}$  de sang [VERDUCCI, p.404].

Il existe une relation linéaire entre le logarithme décimal du nombre de trypanosomes inoculés et la durée de survie de l'animal. Chez la Souris, pour  $2 \times 10^4$  parasites inoculés, la mort de l'animal survient entre, à peu près, la 90<sup>e</sup> et la 100<sup>e</sup> heure. Le 10 type antigénique inoculé persiste jusqu'à la mort de l'animal car la parasitémie croît très rapidement. Chez le Rat, pour obtenir une évolution semblable, il faut inoculer  $2 \times 10^5$  parasites.

Les anticorps humoraux sont pratiquement indécelables au cours de ces trypanosomiases aiguës. Néanmoins, lorsque la parasitose évolue pendant plus de 7 jours 15 (inoculation initiale avec un ou quelques trypanosomes seulement), le taux sérique des IgM augmente dans un rapport 4 à 8.

L'animal présente une splénomégalie accusée ; chez la Souris, le poids de la rate atteint 220 à 260mg chez les animaux mourants (elle est de 75 à 80mg chez la Souris normale).

20

Chez le lapin, cette trypanosomiase évolue sur le mode chronique. L'évolution du parasite provoque d'importants troubles et dégénérescences organiques qui affaiblissent considérablement l'animal, notamment à partir de la deuxième semaine : poussées fébriles irrégulières, apparition d'œdèmes en particulier au niveau du museau et des oreilles (qui 25 deviennent chaudes et tombantes) ; puis, sécheresse au niveau de la peau des oreilles qui se couvre de squames, perte des poils et formation d'escarres ; conjonctivite muco-purulente au niveau des yeux ; jetage nasal et formation de croûtes au dessous desquelles les tissus sont détruits ; infiltration et ulcération des membres, une parésie de l'arrière train pouvant survenir ; atteinte des organes génitaux externes (jusqu'à la perte des testicules chez le 30 mâle). Le parasite est présent dans la plupart des organes. Les formations lymphoïdes sont hypertrophiées. L'amaigrissement est progressif ; l'animal meurt au bout de 5 à 8 semaines.

Le parasite est aussi présent dans le sang mais n'est pas visible à l'examen microscopique. On peut le mettre en évidence en injectant du sang du lapin à des souris chez lesquelles le parasite se développe très rapidement et devient visible.

Le nombre de trypanosomes dans l'inoculum injecté au Lapin n'a pas une influence 5 majeure sur le déroulement de la parasitémie. Le nombre de trypanosomes inoculés par voie intra-péritonéale peut être choisie entre  $5 \times 10^6$  et  $5 \times 10^8$  contenus dans 1ml de sérum physiologique.

Le taux des IgG augmente de façon très variable d'un animal à l'autre (2 à 8 fois le taux normal) et peut subir des fluctuations importantes pour un même animal. Par contre, 10 la variation du taux de l'IgM sérique est plus stéréotypée. Chez tous les animaux, ce taux s'élève dès la première semaine suivant l'inoculation pour atteindre sa valeur maximale environ 15 jours après l'inoculation (6 à 16 fois le taux normal, selon l'animal). Cette valeur en plateau persiste tout au long de l'évolution de la trypanosomiase [MATTERN] et est due notamment aux successives apparitions des nouveaux types antigéniques [SEED, 1972, 15 p.103-104]. Cette hypergammaglobulinémie est en majeure partie non spécifique [SEED, 1969, p.289] suite à l'activation polyclonale des lymphocytes B et l'épuisement des lymphocytes B spécifiques [TAVERNE, p. 17.13].

Les anticorps agglutinants spécifiques au type antigénique inoculé apparaissent en premier ; la glycoprotéine spécifique de type participe à l'agglutination [BALTZ, 1976, 20 p.771]. Un peu plus d'une semaine après l'infestation, le titre est maximal : il peut atteindre 25000. Les anticorps agglutinants de nature IgM ont un titre nettement plus élevé que ceux de nature IgG [SEED, 1972, p.105]. Puis le titre décroît, puisque de nouveaux types antigéniques ont remplacé le type inoculé ; ce titre peut alors devenir très faible (~50) pour les animaux qui survivent longtemps. Chaque nouveau variant induit la formation 25 d'anticorps agglutinants qui lui sont spécifiques [CAPBERN]. Des anticorps agglutinants de classe IgG apparaissent après les anticorps agglutinants de classe IgM [SEED, 1969, p.288 ; GIROUD, 1975].

Les anticorps que nous cherchons à obtenir reconnaissent l'antigène de surface et 30 sont spécifiques au variant servant à l'immunisation.

***Obtention d'anticorps polyclonaux.***

Les anticorps polyclonaux que nous cherchons à obtenir sont des anticorps agglutinants spécifiques au type antigénique ; le type antigénique étant choisie en fonction du besoin. Ils sont destinés au diagnostic simple du type antigénique d'une suspension de 5 trypanosomes vivants prélevés chez un animal infesté, par exemple.

Puisque les anticorps polyclonaux que nous voulons obtenir doivent être employés sur des trypanosomes vivants, nous immunisons l'animal directement avec des inoculums du parasite vivant. Ceci assure la préservation des structures antigéniques sous leur forme native, et favorise l'élaboration des anticorps reconnaissant les épitopes apparents de 10 l'antigène de surface. L'animal choisi est le lapin adulte et doit être en bonne santé ; la lignée sélectionnée ayant peu d'importance dès lors qu'elle ne présente pas une déficience immunitaire.

L'inoculation est faite par voie intra-péritonéale avec  $10^7$  trypanosomes. Les 15 paramètres physiques choisis pour cette immunisation sont précisés en annexe. Vu le volume du sujet hôte, deux applicateurs UHF de part et d'autre (ou au dessus et au dessous) de l'animal sont recommandés. Le nombre d'animaux dépend des quantités d'immun-sérum que l'on veut recueillir. La durée quotidienne d'exposition à l'ensemble des champs EM est de 10 heures par jour.

20

L'exposition des animaux pendant quelques jours avant l'inoculation du parasite (pré-exposition) a pour effet de préparer le système immunitaire, l'aidant ainsi à enrayer rapidement la parasitémie dès l'inoculation des parasites ; les chances qu'un nouveau variant différent du type inoculé apparaisse sont de ce fait minimisées, ce qui contribue à 25 assurer la spécificité des lymphocytes formant les anticorps. Quoi qu'il en soit, que l'on applique ou pas une pré-exposition, les animaux sont exposés aux champs EM tout au plus quelques heures après l'inoculation pour ces mêmes raisons.

Après 6 jours d'exposition, tous les animaux sont négatifs. Chez la plupart des animaux, aucun parasite n'est décelé dans le sang périphérique. Chez certains animaux 30 toutefois, on peut déceler des trypanosomes durant les premiers jours seulement ; cette parasitémie peut encore se prolonger après, mais elle est alors extrêmement faible :

l'inoculation de sang de ces lapins à des souris ne provoque pas dans tout les cas une parasitémie aiguë chez celles-ci. Par la suite la parasitémie reste définitivement négative.

Aussi, il est préférable de prolonger l'exposition des animaux aux champs EM de 2 à 3 jours. En effet, bien qu'après 6 jours d'exposition le système immunitaire soit, pour la 5 plupart des animaux, suffisamment stimulé pour enrayer le développement éventuel d'un nouveau type antigénique différent du type inoculé, l'application pendant quelques jours encore aide à éliminer rapidement ce nouveau variant ; par conséquent, peu de lymphocytes spécifiques à ce nouveau variant sont produits.

Dans ces conditions, l'état clinique des animaux reste tout à fait normal. Signalons 10 que des poussées fébriles peuvent être observées durant les 3 ou 4 premiers jours (40 à 41°) ; mais la température redevient ensuite normale.

Les taux sériques des IgM et des IgG restent normaux ou augmentent légèrement (<2). Dix à 15 jours après cette première inoculation / exposition, les titres des anticorps agglutinants sont décelables mais de façon modérée (~ 400 à 1200 selon l'animal), alors 15 que, rappelons-le, chez les animaux non exposés le titre est nettement plus élevé. Ces valeurs des titres des anticorps agglutinants pourraient être dues au fait qu'une partie importante de ces anticorps se trouve engagée dans des complexes et dès lors neutralisée immunologiquement ; d'autre part, l'élimination rapide des parasites limite la présentation de l'antigène au système immunitaire. Un peu plus d'une dizaine de jours après que le taux 20 des anticorps agglutinants aient atteint leur valeur maximale, ce taux est devenu inférieur au 1/10<sup>ème</sup> de cette valeur maximale.

Une nouvelle inoculation avec des trypanosomes du même type antigénique que lors de la première inoculation conduit fatalement à la mort de l'animal. Par conséquent, 25 toutes les inoculations successives doivent être accompagnées d'une exposition des animaux aux champs EM : il est important de noter que la première réponse immunitaire a en fait déjà induit un état de protection important puisque deux séances d'exposition de 10h suffisent à négativer la nouvelle parasitémie. Une dizaine de jours après ce second traitement, le taux des anticorps agglutinants spécifiques atteint des valeurs de l'ordre de 30 ~12000 ; le taux de 20000 pouvant être atteint. Puis ce taux entame de nouveau une décroissance ; il est inférieur à 2000, dix à 15 jours après avoir atteint la valeur maximale.

15

On peut ainsi procéder à des inoculations / expositions tous les 15 à 20 jours. Au fur et à mesure de ces inoculations / expositions successives, le taux sérique des IgM augmente parfois un peu ; le taux des IgG augmente plus (~4 à 6). Dès la seconde inoculation / exposition, la nature des anticorps agglutinants est plus de nature IgG.

5

Signalons que d'autres anticorps, essentiellement de classe IgG, dirigés vers les autres structures antigéniques des trypanosomes sont aussi élaborés par l'organisme, tels que des anticorps précipitants avec les structures antigéniques somatiques du parasite. Néanmoins, ces anticorps ne sont pas gênants puisque les anticorps polyclonaux obtenus sont destinés à 10 être utilisés avec des trypanosomes vivants lors de tests d'agglutinations ; les anticorps agglutinants étant quant à eux spécifiques au type antigénique.

L'animal est saigné 8 jours après l'inoculation / exposition pour laquelle le titre en anticorps agglutinants est jugé suffisant, soit en général à partir de 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> inoculation 15 / exposition. Aucun des immun-sérum préparés avec BoTat-1 ne présente une réaction d'agglutination avec d'autres variants antigéniques tels que BoTat-2, Botat-4 (types précoces), BoTat-78 (type semi-tardif), BoTat-28 (type tardif) [dénominations d'après : CAPBERN, p.8-10].

20

25

30

***Obtention d'anticorps monoclonaux.***

Comme dans l'exemple précédent « obtention d'anticorps polyclonaux », nous inoculons un variant donné de *Trypanosoma equiperdum*. L'animal hôte choisi est la souris de lignée BALB/C. Les animaux doivent être en bonne santé, même s'il a été montré que 5 des animaux partiellement immunodéprimés (rayons X, cyclophosphamide, souris athymiques ou splénectomisées) élaboraient une réponse immunitaire encore importante grâce à l'ensemble des champs EM. De plus, ils doivent être âgés d'au moins 30 jours pour pouvoir disposer d'un système immunitaire suffisamment mature ; les animaux très jeunes succombent à l'inoculation du parasite malgré l'exposition aux champs EM.

10

Les paramètres physiques sont indiqués en annexes. Vu le volume des animaux, un seul applicateur UHF suffit ; il peut être placé au dessus ou au dessous des animaux, par exemple. L'efficacité de l'immunisation permet de n'utiliser que 2 ou 3 animaux, voir même 1 seul. La durée quotidienne d'exposition aux champs EM est de 6h par jour. 15 Chaque inoculation est faite par voie intra-péritonéale avec  $2 \times 10^4$  trypanosomes.

Les animaux sont exposés à l'ensemble des champs EM tout au plus quelques heures après la première inoculation. Après cette première inoculation, la parasitémie augmente rapidement comme chez les animaux non exposés aux champs EM. Puis, aux 20 alentours de la 50<sup>e</sup> heure, la courbe de parasitémie décroche par rapport à celle des animaux non exposés : la parasitémie cesse de croître et reste à peu près stationnaire pendant une vingtaine d'heures ; elle est alors inférieure à  $10^5$  parasites/ $\mu\text{l}$  de sang. Finalement, elle décroît rapidement et on assiste à la décroissance et disparition des parasites dans le sang de tous les animaux entre la 80<sup>e</sup> et la 90<sup>e</sup> heure après l'inoculation. 25 Notons que cette négativation peut survenir entre deux séances successives d'expositions, c'est-à-dire hors exposition aux champs EM.

Cependant, bien que les parasites ne soient pas visibles au microscope dans le sang, certains parasites peuvent subsister dans l'organisme, et provoquer par la suite soit une nouvelle vague parasitaire fatale pour l'animal, soit une rechute momentanée et 30 modérée suivie d'une nouvelle négativation. Cette seconde vague ou rechute est constituée d'un type antigénique différent du type inoculé. Par conséquent, l'application des champs EM est généralement prolongée de quelques jours pour permettre à l'organisme de se

débarrasser entièrement de tous les parasites et maintenir la spécificité de la réponse immunitaire envers le variant inoculé uniquement. En revanche, d'un autre côté, il faut éviter de trop prolonger cette application des champs EM pour limiter la réponse immunitaire aux endo-antigènes du parasite, et donc limiter le nombre de lymphocytes 5 produisant des anticorps non recherchés.

Signalons que des anticorps agglutinants apparaissent au cours de cette première négativation et sont spécifiques au type antigénique inoculé. Ils atteignent un taux de l'ordre de 200-400.

Le poids de la rate atteint une valeur de 170 à 180mg. Ces valeurs sont inférieures à 10 celles des animaux non exposés aux EM ce qui confirme le fait que, au regard de l'immunité acquise, les lymphocytes producteurs d'anticorps sont plus spécifiques que ceux des animaux non exposés.

Les inoculums suivants sont pratiqués de la même manière que le premier, espacés 15 de 15 à 20 jours après la première négativation et entre eux. L'état immunitaire acquis au cours de la première réponse est suffisamment intense pour permettre aux animaux de négativer la seconde parasitémie et les suivantes sans l'application des champs EM. Cependant, des ré-inoculations successives trop rapprochées peuvent conduire à une 20 rupture de l'état immunitaire fatale pour l'animal ; le variant qui se développe est cependant différent du type antigénique inoculé. Il est donc préférable d'appliquer les champs EM pendant 1 à 2 jours à chaque inoculation pour faciliter ces réponses secondaires, et ce d'autant plus que les périodes entre chaque ré-inoculation sont courtes. On assure ainsi, par ailleurs, la non apparition momentanée d'un type antigénique 25 différent ; type qui pourrait passer inaperçu suite à l'élaboration rapide d'une réponse du système immunitaire, vu son état très fortement stimulé.

Après la seconde négativation, le taux d'anticorps agglutinants atteint des valeurs de l'ordre de 5000 ; il atteint des valeurs de l'ordre de 20000, voir plus, au cours de la troisième ou quatrième négativation. Le titrage des anticorps agglutinants constitue ainsi un moyen pratique pour tester la réponse immunitaire de l'animal avant fusion.

30 Au cours des inoculations successives, notamment à partir de la seconde, ce processus d'immunisation favorise la synthèse d'anticorps de classe IgG.

Ce mode d'immunisation est donc relativement simple, et les risques d'accidents sont minimisés au regard de la voie d'injection adoptée pour cet exemple de réalisation ; une injection intraveineuse s'avère totalement inutile. L'état général de l'animal n'est jamais altéré.

5

Pour bénéficier du plus grand nombre de cellules productrices des anticorps recherchés, le prélèvement des cellules spléniques est effectué 3 à 4 jours après la dernière inoculation / exposition.

10

Des hybridomes, obtenus après fusion des cellules spléniques et de myélome (cellules SP2/0 dérivées d'un myélome de souris BALB/C) et sélection en milieu HAT, sont mis en culture dans des plaques de 96 puits. Les macrophages de souris isogéniques présents dans le milieu de culture augmentent de façon importante la viabilité des hybridomes [PEARSON, 1980, p.145]. Dix jours après, de l'ordre de 15 à 25%, selon l'animal, des puits contenant des hybridomes en phase de croissance sont positifs (révélés par immunofluorescence indirecte [Annexe]). Les hybridomes contenus dans les puits positifs sont clonés par la technique des dilutions limites. Toutes les populations d'hybridomes issues d'un seul clone se révèlent être spécifiques au variant inoculé, BoTat1 ; les tests réalisés avec BoTat-2, Botat-4, BoTat-78, BoTat-28 ne révèlent aucune réaction croisée.

15

Signalons par ailleurs, que l'état de protection immunitaire de l'animal hôte traduit le fait que l'immun-sérum contient, entre autre, en fin de phase d'immunisation, des titres importants d'anticorps séro-protecteurs ; ils sont spécifiques au type antigénique et sont essentiellement de nature IgG.

20

25

30

## Annexe.

### **Méthodes biologiques.**

#### *Stabilat de trypanosoma equiperdum.*

Chaque population constituée d'un variant antigénique est conservée à la température de 5 l'azote liquide (-196°C) dans un milieu constitué d'eau physiologique et de glycérine à parties égales [PAUTRIZEL, 1959, p.321].

#### *Isolation des trypanosomes pour tests.*

Pour obtenir une suspension de trypanosomes d'un type antigénique donné, en quantité 10 suffisante permettant de réaliser la réaction d'agglutination directe, un petit nombre de trypanosomes provenant d'un stabilat de ce type antigénique est multiplié dans une souris hôte. A l'acmé de la parasitémie, le sang héparinisé de l'animal est filtré dans une colonne de DEAE-cellulose retenant les éléments figurés du sang et laissant passer les trypanosomes [LANHAM, GODFREY, p. 523-524 ; PEARSON, 1980, p.142]. Les trypanosomes 15 sont maintenus à 4°C jusqu'aux tests.

#### *Détermination du taux d'anticorps agglutinants.*

La concentration de la suspension de trypanosomes doit être de l'ordre de  $15 \times 10^6$  20 parasites/ml pour éviter le phénomène de zone [PAUTRIZEL, 1962b], apparaissant notamment aux faibles dilutions de l'immun-sérum. Un volume de 50µl de cette suspension est mélangé à un égal volume de différentes dilutions de l'immun-sérum provenant du lapin immunisé et incubé à 37°C pendant 30mn ; la réaction d'agglutination étant pratiquée directement sur lame de verre en tampon PBS à pH 7,4 [BALTZ, 1976, p.763]. Au cours de la réaction, les trypanosomes sont vivants, mobiles. Le taux d'agglutination est défini 25 comme étant l'inverse de la dernière dilution de l'immun-sérum permettant une agglutination notable des trypanosomes (rosacées d'au moins 10-20 parasites).

#### *Détermination du taux sérique d'IgM et d'IgG.*

Technique semi-quantitative d'immuno-diffusion double : dilutions successives de 30 l'immun-sérum (6 puits satellites) contre des anticorps anti-IgM ou anti-IgG de lapin (puit

central). Les traits de précipitation sont comparés avec ceux obtenus avec le sérum du même animal avant injection des parasites.

*Test des anticorps monoclonaux.*

- 5 La présence d'anticorps, dans le surnageant des puits contenant les hybridomes après fusion ou clonage, est testée par immunofluorescence indirecte avec les trypanosomes vivants [PEARSON, 1980]. La réaction est réalisée en tubes contenant chacun une suspension de  $10^7$ - $10^8$  trypanosomes dans 0,2ml de tampon phosphate à pH 8 contenant du glucose (0,01g/ml), et un même volume de surnageant à tester [GIROUD, 1984, p.16] ; après lavage,
- 10 10 les anticorps sont révélés par un conjugué fluorescent anti-IgG de souris. Signalons pour mémoire que cette technique ne révèle pas de réaction croisée d'un immun-sérum entre les différents types antigéniques du parasite lorsque le sujet hôte est immunisé, par les méthodes habituelles, avec l'antigène purifié : une dilution notable de l'antisérum permet de détecter des anticorps avec le variant dont est extrait l'antigène inoculé, par contre le
- 15 15 sérum non dilué ne détecte pas d'autres variants [BARBET, p.1992].

**Valeurs des paramètres physiques des champs EM.**

Les valeurs des paramètres physiques des champs EM, produits dans le volume 20 d'exposition [AYARI, BALANA, 2002], pour les étapes d'immunisation dans les exemples des procédés d'obtention d'anticorps polyclonaux et monoclonaux, ont été obtenus après essais. Leurs valeurs sont les suivantes :

a ) Champ magnétique :

- uniforme : non,
- 25 intensité : entre 0,2 et 0,25 Tesla,
- variable en fonction du temps : non.

b ) Porteuse UHF :

fréquence : 9GHz.

c ) Modulation de phase de l'onde UHF :

- 30 forme du signal : sinusoïdale,
- fréquence du signal : 34MHz,
- indice :  $\delta = \pi/2$  à  $\pi$ .

d ) Modulation d'amplitude de l'onde UHF :

forme du signal : rectangulaire,

fréquence du signal : 1KHz,

5 rapport cyclique du signal : 1/1000,

taux : m = 1.

e ) Puissance crête de l'onde UHF modulée en amplitude et en phase : entre 0,1 et 1 W/cm<sup>2</sup>.

f ) Polarisation rectiligne tournant avec une période de 1Hz.

10

Vu les tailles des animaux utilisés, on aura intérêt à ce que chaque animal soit entièrement contenu dans le volume d'exposition au cours des séances d'expositions, afin de bénéficier de la meilleure efficacité biologique.

15

20

25

30

## Bibliographie

- 5 AYARI M., BALANA-CERVERÓ A. (2002). *Ensemble de champs électromagnétiques à visées diagnostiques, préventives, thérapeutiques et biotechnologiques*. Demande de brevet n° FR 01 01670, et n° PCT/FR 02/00325.
- 10 BALTZ T., BALTZ D., PAUTRIZEL R. (1976). *Affinité de la concanavaline A pour Trypanosoma Equiperdum. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique*. Annales d'Immunologie (Institut Pasteur), Vol. 127 C, p.761-774.
- 15 BALTZ T., BALTZ D., PAUTRIZEL R., RICHET C., LAMBLIN G., DEGAND P. (1977). *Chemical and immunological characterization of specific glycoproteins from Trypanosoma equiperdum variants*. FEBS Letters, Vol. 82, n°1, p.93-96.
- 20 BARBET A.F., McGuire T.C. (1978). *Crossreacting determinants in variant-specific surface antigens of African trypanosomes*. Proceedings of the National Academie of Sciences, USA, Vol. 75, n° 4, p.1989-1993.
- 25 CAPBERN A., GIROUD C., BALTZ T., MATTERN P. (1977). *Trypanosoma equiperdum : Etude des variations antigéniques au cours de la trypanosomose expérimentale du lapin*. Experimental Parasitology, n°42, p.6-13, 1977.
- 30 DUNBAR B.S. (1987). *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*. Plenum Press, New York.
- DUVILLIER G., RICHET C., BRIAND G., BALTZ T., DEGAND P. (1983). *Partial determination of the primary structure of variant surface glycoprotein from Trypanosoma equiperdum*. Molecular and Biochemical Parasitology, Vol. 8, p.17-30.

- FELDMANN M., MALE D. (1989). *Coopération cellulaire dans la réponse des anticorps.* Immunologie fondamentale - ROITT I., BROSTOFF J., MALE D., Medsi/McGraw-Hill, 2<sup>ème</sup> édition.
- 5 GHERARDI R.K., COQUET M., CHERIN P., BELEC L., MORETTO P., DREYFUS P.A., PELLISSIER J.-F., CHARIOT P., AUTHIER F.-J. (2002). *Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxyde in muscle.* Brain, A journal of neurobiology, Vol. 124, n° 9, p.1821-1831.
- 10 GIROUD C., CAPBERN A., MATTEN P., PAUTRIZEL R. (1975). *Etude des types antigéniques apparaissant au cours de la trypanosomiase chronique du Lapin à trypanosoma equiperdum.* Journal de Protozoologie, Vol. 22, n°3, A81-A82.
- 15 GIROUD C. (1984). *Etude des antigènes variables de Trypanosoma equiperdum à l'aide d'anticorps monoclonaux.* Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie, n°103, Université de Bordeaux II.
- 20 GODING J.W. (1983). *Monoclonal Antibodies : Principles and Practice.* Academic Press (London) Ltd.
- HOWARD G.C., BETHELL D.R. (2001). *Basic Methods in Antibody Production and Characterization.* CRC Press LLC.
- 25 KENNEY J.S., HUGHES B.W., MASADA M.P., ALLISON A.C. (1989). *Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies.* Journal of Immunological Methods, Vol. 121, p.157-166.
- 30 LABASTIE M.C., BALTZ T., RICHET C., GIROUD Ch., DUVILLIER G., PAUTRIZEL R., DEGAND P. (1981). *Variant specific glycoproteins of Trypanosoma equiperdum : cross reacting determinants and chemical studies.* Biochemical and biophysical research communications, Vol. 99, n°2, p.729-736.

- LANAHM S.M., GODFREY D.G. (1970). *Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose*. Experimental Parasitology, Vol. 28, p.521-534.
- 5 MATTERN P., DURET J., PAUTRIZEL R. (1963). *Hyper-β2-macroglobulinemia in the course of experimental trypanosomiasis of the rabbit due to Trypanosoma equiperdum*. C.r. hebd. séances de l'Académie des Sciences, Paris, Vol. 256, p.820-822.
- 10 MILSTEIN C. (1986). *Overview : Monoclonal antibodies*. Hanbook of Experimental Immunology, Vol. 4 : Applications of Immunological Methods in Biomedical Sciences, Chap. 107, Ed. by D.M. WEIR, 4<sup>th</sup> edition, Blackwell Scientific Publications.
- 15 PAUTRIZEL R., LAFAYE A., DURET J. (1959). *Diagnostic sérologique de la maladie du sommeil. 1. Amélioration de l'antigène préparé à partir de Trypanosoma equiperdum*. Bulletin de la société de pathologie exotique, Vol. 52, p.318-331.
- PAUTRIZEL R., DURET J., TRIBOULEY J., RIPERT Ch. (1962a). *Etude comparative de l'évolution de différents anticorps élaborés au cours de trypanosomoses expérimentales chez le Lapin*. Revue d'immunologie et de thérapie antimicrobienne, Vol. 26, p.157-166.
- 20 PAUTRIZEL R., DURET J., TRIBOULEY J., RIPERT Ch. (1962b). *Etude de la spécificité de la réaction d'agglutination des trypanosomes au cours des trypanosomoses*. Bulletin de la société de pathologie exotique, Vol. 55, p.383-390.
- PEARSON T.W, PINDER M., ROELANTS G.E., KAR S.K., LUNDIN L.B., MAYOR-WITHEY K.S.,
- 25 HEWETT R.S. (1980). *Methods for derivative and detection of anti-parasite monoclonal antibodies*. Journal of Immunological Methods, Vol. 34, p.141-154.
- PEARSON T.W, CLARKE M.W (1986). *Antigens of Parasites*. Hanbook of Experimental Immunology, Vol. 1 : Immunochemistry, Chap. 6, Ed. by D.M. WEIR, 4<sup>th</sup> edition,
- 30 Blackwell Scientific Publications.
- PERTERS J.H., BAUMGARTEN H. (1992). *Monoclonal Antibodies*. Springer Verlag.

ROTH C., JACQUEMOT C., GIROUD C., BRINGAUD F., EISEN H., BALTZ T. (1991). *Antigenic variation in Trypanosoma equiperdum*. Research in Microbiology, Vol. 142, p.725-730.

5 RUDBACH J.A., CANTRELL J.L., ULRICH J.T. (1995). *Methods of immunization to enhance the immune response to specific antigens in vivo in preparation for fusions yielding monoclonal antibodies*. Methods in Molecular Biology, Vol. 45 : Monoclonal Antibody Protocols. Ed. by W.C. Davis Humana Press Inc., Totowa, NJ, p.1-8.

10 SEED J.R., CORNILLE R.L., RISBY E.L., GAM A.A. (1969). *The presence of agglutinating antibody in the IgM immunoglobulin fraction of rabbit antiserum during experimental African Trypanosomiasis*. Parasitology, Vol. 59, p.283-292.

15 SEED J.R. (1972). *Trypanosoma gambiense and Trypanosoma equiperdum : characterisation of variant specific antigens*. Experimental Parasitologie, Vol. 31, p.98-108.

SOKOLSKY C., LEHNISCH E. (1999). *Faut-il avoir peur de l'aluminium*. Revue Que choisir, Paris, n°360, p.14-20, mai 1999.

20 TAVERNE J. (1989). *Immunité vis-à-vis des protozoaires et des helminthes*. Immunologie fondamentale - ROITT I., BROSTOFF J., MALE D., Medsi/McGraw-Hill, 2<sup>ème</sup> édition.

VERDUCCI G., PERITO S., ROSSI R., MANNARINO E., BISTONI F., MARCONI P. (1989). *Identification of a trypanocidal factor against Trypanosoma equiperdum in normal human serum*. Parasitology, Vol. 98, p.401-407.

25 VICKERMAN K. (1978). *Antigenic variation in trypanosomes*. Nature, Vol. 273, p.613-617.

**Revendications**

- 1) Procédé d'obtention d'anticorps, faisant suite à l'immunisation d'un animal hôte sain, immunisation qui consiste à administrer une préparation d'un antigène au dit animal et à lui appliquer un ensemble de champs électromagnétiques composé d'un champ magnétique superposé à un ou des champs électromagnétiques de très hautes fréquences, ces derniers étant essentiellement modulés en angle, caractérisé en ce que les anticorps sont produits à partir :
- 10                   - de l'immun-sérum dudit animal, auquel cas les anticorps sont polyclonaux, ou,
- des lymphocytes producteurs d'anticorps dudit animal, auquel cas les anticorps sont monoclonaux,
- et reconnaissent ledit antigène.
- 15                   2) Procédé d'obtention d'anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce que les anticorps monoclonaux sont produits avec la technique des hybridomes.
- 3) Anticorps polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus avec le procédé d'obtention selon la revendication 1.
- 20                   4) Anticorps monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus avec le procédé d'obtention selon l'une des revendications 1 à 2.

25

30