Conseil canadien de protection des animaux

lignes directrices:

production d'anticorps

Le présent document (*Lignes directrices du CCPA: production d'anticorps*) a été rédigé par le sous-comité *ad hoc* sur les procédures immunologiques du Comité de l'élaboration des lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

Dr Albert Clark, Queen's University (président)
Dr Dean Befus, University of Alberta (représentant de la Société canadienne d'immunologie)
Dr^e^ Pamela O'Hashi, University of Toronto
Dr Fred Hart, Aventis Pasteur
Dr Michael Schunk, Aventis Pasteur
Dr Andrew Fletch, McMaster University
Dr^e^ Gilly Griffin, Conseil canadien de protection des animaux

Le CCPA remercie également les nombreux organismes, personnes et associations qui ont commenté les ébauches de ces lignes directrices, notamment la Société canadienne d'immunologie, l'Association canadienne pour la science des animaux de laboratoire et l'Association canadienne pour la médecine des animaux de laboratoire; le Dr Terry Pearson, de la University of Victoria; le Dr Mavanur Suresh, de la University of Alberta; les Drs Ernest Olfert et Barry Ziola, de la University of Saskatchewan; et la Dr^e^ Patricia Shewen, de la University of Guelph.

© Conseil canadien de protection des animaux, 2002

ISBN: 0-919087-38-8

Conseil canadien de protection des animaux
315-350 rue Albert
Ottawa (ON) CANADA
K1R 1B1

http://www.ccac.ca

TABLE DES MATIÈRES

A. PRÉFACE 1

B. INTRODUCTION 2

C. PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX 3

1. Sélection et soin des animaux 4
2. Protocole d'immunisation 6
3. Procédés normalisés de fonctionnement 7
4. Préparation de l'immunogène 7
5. Choix de l'adjuvant 8
6. Voie d'injection 10
7. Volume d'injection et nombre de sites d'injection 12
8. Prélèvement sanguin 14
9. Surveillance des animaux 15
10. Disposition des animaux 15

D. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX 16

1. Sélection et soin des animaux 18
2. Clonage des hybridomes 19
3. Production d'ascites 20
   - 3.1 Amorçage 20
   - 3.2 Contamination 20
   - 3.3 Mise en place des hybridomes 21
   - 3.4 Surveillance des animaux et points limites 21
   - 3.5 Croissance de la tumeur ascite 22
   - 3.6 Prélèvement du liquide ascitique 22

E. RÉFÉRENCES 23

1. Généralités 23
2. Production d'anticorps polyclonaux 24
3. Production d'anticorps monoclonaux 27
   - 3.1 Autres références utiles 30
   - 3.2 Renseignements supplémentaires . .30

F. GLOSSAIRE 30

ANNEXE A

ADJUVANTS COMMUNS 33

ANNEXE B

IMMUNISATION – VOIES D'ADMINISTRATION ET VOLUMES RECOMMANDÉS
(adaptation de Leenars, *et al*., 1999) 37

ANNEXE C

ÉTAPES DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX 39

ANNEXE D

INFORMATIONS SUR LES TECHNIQUES DE PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX *IN VITRO* 41

production d'anticorps

A. PRÉFACE

Le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) a pour mandat de superviser l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests. En plus du *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation*, vol. 1, 2e éd., 1993 et vol. 2, 1984, où sont définis les principes généraux relatifs au soin et à l'utilisation des animaux, le CCPA publie également des lignes directrices sur les sujets d'intérêt actuel et futur. Les *Lignes directrices du CCPA: production d'anticorps* constituent le cinquième document de cette série. Elles ont été rédigées par le sous-comité *ad hoc* du CCPA sur les procédures immunologiques.

L'objet du présent document est de présenter des lignes directrices pour la production d'anticorps polyclonaux (AcP) et monoclonaux (AcM) afin d'aider les chercheurs et le personnel de recherche et de soin aux animaux à produire des résultats immunologiques satisfaisants tout en réduisant autant que possible l'inconfort des animaux utilisés. Ces lignes directrices s'adressent également aux membres des comités de protection des animaux (CPA) qui seront amenés à évaluer les protocoles impliquant la production d'anticorps, afin de leur permettre d'atteindre des normes de qualité les plus élevées en matière de soin et d'utilisation des animaux. Ces lignes directrices remplacent les directives relatives à la production d'anticorps figurant dans la politique du CCPA intitulée *Techniques d'immunisation approuvées* (1991).

Nombre d'institutions ont déjà d'excellents procédés normalisés de fonctionnement (PNF) pour la production des AcP et AcM. Les présentes lignes directrices s'inspirent en bonne partie de l'expérience de ces institutions et également des initiatives récentes de la communauté internationale en matière de raffinement des protocoles de production d'anticorps.

Le raffinement des méthodes d'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests est en évolution constante. Le CCPA reconnaît que la mise en œuvre des présentes lignes directrices peut entraîner des dépenses considérables, par exemple au chapitre de la mise sur pieds de services centraux de production d'AcM *in vitro*. Comme pour la mise en

œuvre des autres lignes directrices du CCPA, les institutions doivent considérer ces dépenses comme nécessaires si elles souhaitent effectuer des travaux de recherche valables sans infliger de souffrances inutiles. Le CCPA s'engage à appuyer les institutions en leur fournissant de l'information sur la production d'AcM *in vitro* ainsi que sur les meilleures pratiques de production d'AcP et d'AcM à partir d'animaux.

B. INTRODUCTION

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Le système immunitaire agit par l'intermédiaire de deux principaux mécanismes qui sont la réponse de type humoral (production d'anticorps) et la réponse à médiation cellulaire. Les immunogènes (antigènes) sont les molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les lymphocytes B se caractérisent par la présence, à leur surface, de récepteurs spécifiques d'immunoglobuline, et ils assurent la réponse humorale (production d'anticorps). Les anticorps sont sécrétés par des plasmocytes qui sont des lymphocytes B différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure, et elle peut se lier à cet épitope.

La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Étant donné la diversité des anticorps sécrétés dans la réponse polyclonale, les antisérums polyclonaux sont difficiles à reproduire. La quantité d'anticorps produits et leur qualité varient d'un animal à l'autre et même chez le même animal à des moments différents. Par conséquent, la disponibilité des AcP est limitée, et leurs caractéristiques peuvent changer pendant la période de production. Par ailleurs, les anticorps monoclonaux (AcM) sont issus d'un même clone et sont donc spécifiques à un même épitope pour lequel ils ont une affinité déterminée. Ainsi, si l'on obtient l'AcM souhaité, celui-ci pourra être extrêmement spécifique pour l'immunogène visé et, dans des conditions appropriées, on pourra créer un produit de qualité constante en quantité presque illimitée.

Il est possible d'obtenir des antisérums polyclonaux dans un délai relativement court (un à deux mois), alors que les procédés standardisés de production d'AcM peuvent être ardus et s'étendre sur trois à six mois. (Cependant de nouveaux procédés permettent de réduire le temps de production des AcM à un mois.) Les

anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Par contre, comme l'AcM a une affinité spécifique à un seul épitope, il suffit que celui-ci subisse une modification mineure pour que la capacité de liaison avec l'antigène soit perdue; c'est ce qui peut se produire lorsque l'antigène est dénaturé comme lors d'expériences d'immunoblot ou lors de la stérilisation de l'immunogène avant l'injection à l'animal. C'est pour cette raison qu'on combine parfois deux ou trois AcM.

Dès le départ, on doit envisager l'achat d'anticorps produits commercialement, ce qui s'avère être en conformité avec les lignes directrices du CCPA. Si l'on décide d'acheter sur le marché international, la compagnie devra être accréditée par l'Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International (AAALAC). On pourra trouver des renseignements à ce sujet ainsi que d'autres informations générales sur la production d'anticorps sur le site Antibody Resource, http://www.antibodyresource.com. Le Focus on Alternatives Group du Royaume-Uni a compilé une liste de fournisseurs d'AcM produits *in vitro*, et la Alternatives Research and Development Foundation des États-Unis a également constitué une liste des fournisseurs américains. On peut consulter ces deux listes à l'adresse http://www.frame.org.uk/Monoclonal_Suppliers.htm. D'autres documents utiles, par exemple les procédés normalisés de fonctionnement, se trouvent sur le site Internet du CCPA à l'adresse http://www.ccac.ca.

C. PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX

Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les transferts de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Pour pouvoir préparer des PNF les plus appropriés pour des immunogènes ou antigènes particuliers, il est essentiel d'avoir une connaissance générale des mécanismes de déclenchement de la réponse immunitaire (Hanly, *et al.*, 1995). Dans les références, on trouvera plusieurs ouvrages généraux traitant d'immunologie: Abbas, *et al.*, 2001; Anderson, 1999; Kuby, 2000; Roitt, *et al.*, 1998; Sharon, 1998; Sompayrac, 1999.

Principe directeur général: Dans la production d'anticorps polyclonaux, la principale priorité doit être de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés.

1. Sélection et soin des animaux

Principe directeur: L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux doit être choisie avec soin.

Le choix de l'espèce et de la souche animale doit être effectué avec soin. Le chercheur doit tenir compte des facteurs suivants: 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (on doit envisager de choisir des animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps (comme la capacité de fixer le complément, voir Hanly, *et al.*, 1995); et 4) l'utilisation prévue des anticorps (p. ex. dans un ELISA, l'anticorps qui se lie à l'antigène doit souvent provenir d'une espèce différente de celle ayant produit l'anticorps secondaire employé à l'étape suivante du test). Des souches différentes d'une même espèce peuvent aussi réagir différemment à cause de la variabilité génétique influençant la présentation de l'antigène dans les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et les mécanismes régulateurs de la réponse immunitaire (Hanly, *et al.*, 1995; Coligan, *et al.*, 1997).

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et à saigner et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité (Stills, 1994). Habituellement, un prélèvement effectué chez un lapin produit environ 250mg d'AcP, et un prélèvement terminal effectué à l'aide d'une solution saline de déplacement peut produire environ 1g d'AcP. Dans toute procédure immunologique, il est important d'utiliser des lapins exempts de maladies pour réduire les chances de formation d'abcès dus à la *Pasteurella multocida* aux sites d'injection et pour éviter la réactivité croisée avec d'autres antigènes avec lesquels le système immunitaire de l'animal aurait pu préalablement entrer en contact.

Pour les protocoles de production de grands volumes d'AcP, ou lorsqu'on prévoit garder des animaux comme producteurs d'anticorps sur une longue période, on pourra envisager l'emploi de balles de plastique (whiffle balls) ou de sacs pour la collecte de sérum (Whary, *et al.*, 1998). Il revient aux chercheurs et aux CPA d'évaluer si la simplification des procédures de prélèvement du sérum justifie l'implantation de la balle par voie chirurgicale.

Comme le poulet est phylogénétiquement éloigné des mammifères, il est utile pour la production d'AcP contre des protéines de mammifères et plus précisément contre les protéines intracellulaires, parce que de nombreuses protéines de ce type tendent à conserver leurs séquences d'acides aminés entre les diverses espèces de mammifères. Le produit, IgY, est à toutes fins pratiques presque équivalent à la classe des anticorps IgG. On peut considérer que l'emploi des poulets constitue un raffinement de la technique parce qu'il permet d'extraire les AcP du jaune d'œuf et donc d'éviter les prélèvements de sang. L'utilisation de poulets contribue également à la réduction du nombre d'animaux utilisés parce que ces derniers produisent de plus grandes quantités d'anticorps que les rongeurs de laboratoire (Schade, *et al.*, 1996; Bollen, *et al.*, 1995). Habituellement, un seul jaune d'œuf

contient jusqu'à 250mg d'AcP (Erhard, *et al.*, 2000). De façon générale, les poulets sont d'excellents producteurs d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères. Il faut cependant souligner que les poulets ne conviennent pas à toutes les applications et qu'on doit disposer d'installations appropriées pour les loger.

En général, les rongeurs sont moins employés que les lapins pour la production d'AcP, mais ils peuvent convenir pour la production de faibles volumes d'anticorps. Les volumes sanguins qu'on peut prélever chez ces animaux sont beaucoup moindres, et par conséquent la production de quantités raisonnables peut nécessiter une ponction cardiaque sous anesthésie terminale. Le rat peut être utilisé dans la production d'IgE ou d'anticorps de spécificité restreinte pour les protéines de souris (Garvey, *et al.*, 1977). Le hamster est employé pour produire des anticorps contre les protéines de souris lorsque les AcP peuvent difficilement être obtenus avec des rats ou lorsqu'ils doivent avoir une spécificité plus large.

Historiquement, on s'est servi du cobaye pour la production d'anticorps, notamment pour les dosages d'insuline, mais par ailleurs cette espèce ne semble présenter aucun avantage significatif par rapport à l'usage de rongeurs.

On opte pour des espèces animales de grandes tailles lorsqu'on a besoin de volumes importants d'antisérum, notamment pour la production commerciale. Les chevaux, les moutons et les chèvres, par exemple, ont une longue durée de vie, ils sont faciles à manipuler et on peut effectuer les prélèvements sanguins à partir de la veine jugulaire. Comme l'entretien de ces animaux est coûteux et qu'on doit disposer d'installations importantes pour les héberger, leur utilisation est généralement limitée à la production commerciale d'antisérums. On doit souligner que les chevaux, qui ont déjà servi à la production d'antisérums pour des toxines et des venins à des fins cliniques, sont particulièrement intolérants aux adjuvants à base d'huile comme l'adjuvant complet de Freund (ACF) et de saponine (Quil A). Il est possible d'extraire les anticorps du lait des bovins, des brebis et des chèvres, ce qui représente une méthode non invasive pour la production soutenue de grands volumes d'AcP (Brussow, *et al.*, 1987; Tacket, *et al.*, 1988; et Sarker, *et al.*, 1998).

Lorsque les facteurs spécifiques à certaines espèces n'ont pas à être pris en considération, on doit choisir l'espèce de façon à réduire la douleur et la détresse tout en tenant compte de la facilité de la manipulation lors des injections et des prélèvements sanguins. Le choix de l'espèce et du nombre d'animaux utilisés se fera en fonction du volume de sérum requis, qui dépendra lui-même de la quantité d'AcP à produire. Généralement, les jeunes animaux adultes sont de meilleurs producteurs d'AcP que les animaux plus âgés parce que la fonction immunitaire atteint son apogée à la puberté et diminue lentement par la suite. De plus, les femelles présentent certains avantages sur les mâles puisqu'elles ont souvent une réponse immunitaire plus marquée, qu'elles sont généralement plus dociles et faciles à manipuler et qu'il est plus aisé de les loger par deux ou en groupe. Chez les animaux de ferme de grandes tailles, les mâles castrés peuvent également convenir. Grossman (1989) a documenté la plus forte production d'AcP chez les femelles adultes.

Les autres facteurs qui influencent la production d'AcP sont la nature de l'immunogène utilisé, la voie et le calendrier d'injection, le type d'adjuvant et sa qualité, la nature de la formulation immunogène/adjuvant (émulsion, formation de liposomes, formation ou adsorption de complexes immunostimulants), la méthode de prélèvement sanguin, la souche, l'état de santé et le génotype de l'animal, la formation, l'expertise et la compétence du personnel chargé des soins aux animaux, l'alimentation et l'hébergement. De plus, il faut noter que la présence d'agents infectieux ou de stress peut supprimer la réponse immunitaire et ainsi réduire la quantité d'AcP produits ou même faire disparaître toute réponse significative.

On doit déterminer l'état d'immunisation préalable de l'animal en ce qui concerne l'immunogène à administrer ou toute réaction croisée avec un autre antigène. L'existence préalable d'anticorps spécifiques contre un immunogène donné peut influencer la quantité d'anticorps produits et leur qualité, en particulier lorsqu'on recherche un AcP monospécifique. Habituellement, on prépare un échantillon de sérum antérieur à l'immunisation (avant le prélèvement) en quantité suffisante pour disposer d'un contrôle pendant toute la durée des tests et de l'utilisation subséquente de l'immunesérum.

On trouvera des directives générales sur les soins à prodiguer aux animaux servant à la production d'anticorps dans les autres lignes directrices du CCPA. Dans la mesure du possible, les animaux doivent être logés dans les conditions qui répondent le mieux à leurs besoins sociaux et comportementaux de façon à leur permettre d'avoir un comportement naturel, le logement en groupe étant préférable (CCPA, 1990). Lorsque cette situation est impossible, la décision devrait être justifiée auprès du CPA.

Principe directeur: Les chercheurs et le personnel de recherche et de soins aux animaux travaillant à la production d'anticorps polyclonaux doivent être compétents et avoir reçu la formation pertinente.

La formation et la compétence des utilisateurs d'animaux et du personnel de soins sont d'une importance capitale pour la réduction de la douleur et de la détresse chez les animaux. En plus de posséder des connaissances sur le soin des animaux, le personnel doit comprendre les principes de base de l'immunologie et avoir la formation et la compétence voulues en matière de procédures d'immunisation et de prélèvement sanguin. Pour certaines espèces, il devra également connaître les procédures d'anesthésie. Le personnel doit aussi savoir reconnaître les signes de douleur et de détresse chez l'espèce utilisée (CCPA, 1993; 1999).

2. Protocole d'immunisation

Principe directeur: Les comités de protection des animaux doivent évaluer les protocoles d'immunisation en fonction du bien-être des animaux; ils doivent porter une attention particulière aux immunogènes atypiques et aux adjuvants susceptibles de causer de la douleur et/ou de la détresse.

Le comité local de protection des animaux doit examiner le protocole de production d'anticorps pour chaque nouvel immuno-

gène ou nouvelle combinaison d'immunogène/adjuvant; le protocole doit faire état des démarches entreprises pour déterminer si le produit requis est disponible commercialement ou auprès d'un autre groupe de recherche. L'examen peut être bref si le type d'immunogène en question a déjà été employé et si des PNF sont déjà en vigueur. Les protocoles relatifs à de nouveaux immunogènes doivent faire l'objet d'un examen plus attentif et, dans ce cas, on doit consulter un immunologiste. Des PNF doivent être en vigueur pour les procédures de routine, mais ils devront parfois être légèrement modifiés selon le projet envisagé. L'emploi de l'ACF peut causer une douleur et une détresse considérables chez les animaux. Par conséquent, tout protocole prévoyant l'emploi de l'ACF ou qui, selon le chercheur, peut mener à une réaction défavorable chez l'animal doit être examiné avec grand soin et classé dans la catégorie de techniques invasives D (CCPA, 1991). Cette catégorisation pourra être changée par la suite en une catégorie de techniques invasives C à partir d'un rapport favorable sur l'état de santé des animaux et rédigé par les personnes responsables de leur soin quotidien.

3. Procédés normalisés de fonctionnement

Principe directeur: Chaque animalerie doit élaborer des procédés normalisés de fonctionnement pour la production d'AcP chez chacune des espèces utilisées.

Le protocole d'immunisation soulève plusieurs questions importantes: 1) le mode de préparation de l'antigène; 2) l'emploi d'un adjuvant (y a-t-il lieu d'utiliser un adjuvant, et lequel?); 3) la voie d'administration et le nombre de sites d'injection; 4) le volume à injecter; et 5) le calendrier des injections. On doit également mettre en place des PNF pour limiter la fréquence d'utilisation de chaque animal et la durée de la période pendant laquelle un animal donné peut être utilisé à des fins de production d'anticorps.

4. Préparation de l'immunogène

Principe directeur: L'immunogène doit être préparé de façon à déclencher une réponse acceptable sans nuire au bien-être des animaux.

La qualité de la préparation de l'immunogène revêt une importance capitale. L'immunogène ne doit pas être toxique, et il doit être préparé dans des conditions d'asepsie ou être autrement rendu stérile et exempt de toxines et de pyrogènes. En particulier, on doit éliminer autant que possible tout résidu chimique, endotoxine contaminante ou autre contaminant toxique (p. ex. <1ng/ml pour les immunogènes produits à partir de bactéries gram-négatives) et ajuster le pH aux taux physiologiques. La plupart des immunogènes protéiques peuvent être stérilisés par passage à travers un filtre d'acétate de cellulose microporeux (taille des pores, 0,22μm). Dans un sondage récent effectué auprès des institutions canadiennes qui préparent régulièrement des AcP (Craig et Bayans, 1999), les répondants ont indiqué que l'immunisation à l'aide de protéines dans du gel de polyacrylamide était associée à des réactions adverses au site d'injection.

La quantité d'antigène à injecter pour obtenir une quantité raisonnable d'anticorps varie beaucoup selon l'espèce et la souche

de l'animal à immuniser, l'adjuvant, la voie et la fréquence des injections de même que l'immunogénicité de l'antigène.

La qualité des AcP produits et leur quantité dépendent de la taille et de l'état de l'immunogène. Pour obtenir une réponse immunitaire, il peut être nécessaire de conjuguer les petits polypeptides et les molécules autres que les protéines avec des protéines porteuses immunogéniques plus grosses. On doit choisir les molécules porteuses de façon à éviter la suppression de la réponse immunitaire à l'antigène due à l'existence préalable d'anticorps contre la molécule porteuse (dissimulation de l'épitope par la molécule porteuse) (Schutz, *et al.*, 1985).

Il faut également noter que la conformation de l'antigène revêt une certaine importance puisque les anticorps produits contre des protéines originales réagissent mieux avec des protéines originales et que ceux produits contre des protéines dénaturées réagissent parfois mieux avec des protéines dénaturées. Par exemple, si les AcP sont employés pour bloquer un site actif sur une protéine, l'antigène ne devrait pas être dénaturé avant l'injection. À cet égard, il convient de remarquer qu'un adjuvant préparé à l'avance dans une émulsion d'huile dans l'eau et où l'immunogène est à l'état adsorbé conservera mieux la conformation originale de l'antigène que si celui-ci est préparé dans une émulsion d'eau dans l'huile nécessitant un mélange vigoureux (Allison et Byars, 1991). Un antigène adsorbé sur alun peut également donner une bonne réponse de production d'anticorps contre la configuration native (Chen, *et al.*, 1964; Dardiri et Delay, 1964; Butler, *et al.*, 1969; Cohen, *et al.*, 1970; Weeke, *et al.*, 1975; et Ziola, *comm. pers.*).

5. Choix de l'adjuvant

Principe directeur: La décision d'employer ou non un adjuvant doit être mûrement réfléchie et justifiée. Les chercheurs doivent rechercher l'adjuvant le mieux adapté à l'antigène à employer à la lumière des connaissances les plus récentes sur les préparations immunogène/adjuvant. Pour tout protocole prévoyant l'utilisation d'un nouvel adjuvant ou immunogène, on doit demander l'avis d'un immunologiste compétent. L'emploi de l'adjuvant complet de Freund doit être évité dans la mesure du possible; au besoin, on ne doit s'en servir que pour l'immunisation primaire et il doit contenir moins de 0,5mg/ml de mycobactéries.

Les chercheurs et les membres des CPA ne doivent pas négliger la douleur et la détresse intenses produites par les adjuvants chez les animaux de laboratoire. La plupart des effets secondaires indésirables de gravité et de durée variables découlant de la production d'AcP sont causés par les adjuvants (Jennings, 1995). On doit donc commencer par déterminer si l'adjuvant est bien nécessaire. La fonction des adjuvants est de stimuler la réponse immunitaire. Leur emploi doit donc permettre d'accroître et de prolonger la production d'anticorps.

Les adjuvants ont plusieurs modes d'action. Ils forment parfois, au site de l'injection, un dépôt d'immunogène qui est libéré lentement sur un certain laps de temps, ce qui a pour effet d'entretenir la stimulation du système immunitaire. Ils peuvent également contribuer à acheminer l'immunogène à la rate ou aux ganglions lymphatiques, là où se produisent une grande partie des interactions cellule-cellule de la réponse

immunitaire. Les adjuvants peuvent activer directement ou indirectement divers types de cellules comme les macrophages ou les lymphocytes T auxiliaires qui interviennent dans la réponse immunitaire. Ils peuvent également avoir un effet sur la durée, la sous-classe et l'avidité des anticorps produits ainsi que sur l'immunité à médiation cellulaire (Hunter, *et al.*, 1995).

L'emploi d'un adjuvant est généralement nécessaire avec les préparations d'immunogènes purs ou relativement purs. Si l'immunogène est une petite molécule, il ne déclenche habituellement pas de réponse immunitaire lorsqu'il est seul. L'adjuvant permet aussi parfois de réduire la quantité d'immunogène employée, ce qui peut avoir son importance lorsqu'il s'agit de molécules rares ou particulièrement précieuses. Les antigènes fortement agrégés peuvent ne pas nécessiter d'adjuvant, et ils déclenchent même parfois une réponse immunitaire plus franche en l'absence d'adjuvant.

En présence de balles de plastique, les adjuvants ne sont pas nécessaires parce que la balle joue elle-même le rôle de réservoir d'immunogène qui prolonge la libération d'antigènes dans l'organisme (Clemons, *et al.*, 1992).

La préparation immunogène/adjuvant doit être peu toxique et facilement injectable en petits volumes. Les adjuvants les plus utilisés sont l'adjuvant complet de Freund (ACF), l'adjuvant incomplet de Freund (AIF), le Quil A, le Ribi[MD], le TiterMax[MD] et les adjuvants à base de substances minérales (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium et phosphate de calcium). Cependant, aucun des quelques 100 adjuvants connus ne possède à lui seul toutes les qualités recherchées. En plus des brèves descriptions des adjuvants communément utilisés au Canada pour remplacer l'ACF et l'AIF (Annexe A), voir Leenars, *et al.*, 1999; Jennings, 1995; CEDARLANE Laboratories Limited, “The Adjuvant Guide” (Hornby, Ontario) ou la base de données européenne sur les adjuvants (Stewart-Tull, 1995), où l'on trouvera des renseignements supplémentaires.

Le CCPA reconnaît que de nombreux chercheurs hésitent à abandonner l'ACF parce qu'il est considéré comme un étalon à cause de son efficacité bien connue avec une large gamme d'antigènes (Craig et Bayans, 1999). Bien que l'ACF soit l'un des adjuvants les plus efficaces, il peut causer des réactions inflammatoires chroniques plus intenses; par conséquent, on ne doit l'employer qu'après avoir démontré que les autres adjuvants sont inadéquats, par exemple lorsqu'on ne dispose que de faibles quantités d'immunogènes solubles ou lorsque la production d'anticorps est faible (Jennings, 1995). Broderson (1989) a montré que la réaction inflammatoire est moins prononcée si la concentration de mycobactéries dans la préparation d'ACF est inférieure à 0,1mg/ml. Si l'on dispose de grandes quantités d'un immunogène particulaire donné ou si l'antigène est fortement immunogène, on doit effectuer l'immunisation sans adjuvant ou avec un autre adjuvant. Si l'ACF est indispensable, on ne doit l'employer que pour l'immunisation primaire sous-cutanée, en suivant les procédures détaillées à la Partie C.7 – *Volume d'injection et nombre de sites d'injection*, puis opter pour l'AIF pour les immunisations de rappel si un adjuvant est encore nécessaire. Les immunisations secondaires (rappels) peuvent parfois être effectuées à l'aide d'une solution tampon saline.

Généralement, l'antigène doit être mélangé à un volume égal d'adjuvant et émulsifié. Pour obtenir une émulsification optimale, on procède à l'aide de deux seringues Luer-Lok et d'un connecteur à verrouillage, et on fait passer plusieurs fois l'adjuvant et l'immunogène d'un cylindre à l'autre jusqu'à ce que le mélange devienne pâteux. On peut aussi effectuer l'émulsification par sonication au moyen d'une sonde étroite; cependant, dans ce cas, il faut maintenir le mélange sur la glace pour éviter la surchauffe. L'étape de la préparation du mélange immunogène/adjuvant est importante parce que l'émulsification incomplète est l'une des principales causes d'échec de l'immunisation. La dispersion de l'émulsion avec un volume égal de 2 % de Tween 80 a pour effet de faciliter l'injection en réduisant la viscosité de la solution (Herbert, 1965).

6. Voie d'injection

Principe directeur: On doit choisir la voie d'injection de façon à provoquer le moins de détresse possible chez l'animal.

Comme on le voit à l'Annexe B, la voie d'injection peut être sous-cutanée (S.C.), intramusculaire (I.M.), intradermique (I.D.), intrapéritonéale (I.P.) ou intraveineuse (I.V.). **Les injections dans le coussinet plantaire ou dans les ganglions lymphatiques ou intraspléniques sont fortement déconseillées et, lorsqu'elles sont nécessaires, elles doivent être justifiées au cas par cas. Toute injection dans un espace clos est douloureuse, de sorte que même le choix de la voie intramusculaire ou intradermique peut être contestable. Aucune autre voie d'injection n'est permise**. Dans le passé, on procédait à des injections dans le coussinet plantaire pour pouvoir suivre la réponse immunitaire contre un antigène spécifique en examinant les cellules du système immunitaire ayant pour fonction de traiter l'antigène. Les immunogènes injectés dans le coussinet plantaire sont traités dans le ganglion lymphatique poplité, ce qui permet de prélever les cellules souhaitées régulièrement et avec précision. Cependant, on peut arriver au même résultat en pratiquant l'injection à la base de la queue ou dans la région du poplité.

L'administration par voie intraveineuse peut être la meilleure solution pour les immunogènes en petites particules parce que ceux-ci se disséminent alors dans l'ensemble de l'organisme et, par conséquent, ils sont facilement capturés par les cellules lymphoïdes. Les adjuvants à base d'huile, en gel visqueux ou en grosses particules ne doivent pas être administrés par voie intraveineuse parce qu'ils peuvent provoquer une embolie pulmonaire (Herbert, 1978).

Les adjuvants huileux ou en gel visqueux, et particulièrement l'ACF, doivent être injectés par voie sous-cutanée pour éviter la formation d'abcès stériles. Les adjuvants à base d'huile ou en gel visqueux ne doivent pas être administrés par voie intramusculaire chez les petits animaux comme les souris ou les rats. Le mélange immunogène/adjuvant injecté par voie I.M. peut se propager entre les faisceaux musculaires le long des plans interfasciaux et irriter les faisceaux nerveux, provoquant ainsi de sérieuses pathologies dues à l'inflammation.

La voie d'injection I.D. ne doit pas être employée chez les petits animaux; on doit

la réserver seulement aux cas où elle est absolument nécessaire. Lorsqu'on procède à des injections par voie I.D. chez les lapins et les animaux de plus grandes tailles, les volumes administrés doivent être petits (25μl chez le lapin) (Halliday, *et al.*, 2000).

L'injection de mélanges d'adjuvants par voie intrapéritonéale n'est pas recommandée pour la production d'AcP parce qu'elle provoque l'inflammation, la péritonite et des changements comportementaux (Leenars, *et al.*, 1999; Toth, *et al.*, 1989). Voir Partie C.7 – *Volume d'injection et nombre de sites d'injection*, et l'Annexe B, où l'on trouvera d'autres recommandations pour les cas où l'injection par voie I.P. est indispensable.

Les sites d'injection ne doivent pas entraver les manipulations subséquentes de l'animal lors des prélèvements sanguins, entre autres.

Si l'on cherche à obtenir de grands volumes d'AcP, on doit envisager l'emploi de balles de plastique. Celles qui sont utilisées chez le lapin sont des balles de golf perforées qu'on trouve chez divers fournisseurs commerciaux. Avant l'implantation, les balles doivent être stérilisées à l'oxyde d'éthylène. On doit les implanter conformément aux techniques de chirurgie aseptique décrites par Hillam, *et al.* (1974) et Reid, *et al.* (1992). Pendant l'intervention, on doit maintenir des conditions strictes d'asepsie pour éviter l'infection secondaire de l'implant. Au moins quatre semaines de récupération postopératoire sont nécessaires pour permettre la cicatrisation avant l'utilisation expérimentale; pendant ce laps de temps, les animaux doivent être logés individuellement pour éviter les blessures. Une fois préparée, la balle peut servir à l'injection primaire et aux rappels ainsi qu'au prélèvement du sérum.

Pour ce qui est de la voie d'injection, de la quantité d'antigène et de la cinétique de la production d'anticorps spécifiques, l'immunisation des poulets pour l'obtention d'AcP est comparable à celle des lapins (Haak-Frendscho, 1994; Song, *et al.*, 1985). Les adjuvants recommandés pour l'immunisation des poulets (Schade, *et al.*, 1996) sont l'adjuvant incomplet de Freund (AIC), le Specol ou de préférence le lipopeptide PCSL (Pam_3-Cys-ser-$[Lys]_4$; 250μg). Erhard, *et al.* (1997) ont constaté que le PCSL avait peu d'effets secondaires alors que le traitement à l'ACF ou à l'ACF/AIF produisait des granulomes multiples. La quantité d'immunogène administrée doit se situer dans la fourchette de 10ng à 1mg (de préférence de 10 à 100μg). Chez les jeunes poulets de laboratoire, l'injection doit être faite par voie I.M. (muscle du cou ou de la poitrine), et on doit éviter l'injection I.M. dans la jambe parce qu'elle peut provoquer une boiterie. Les poulets doivent avoir au moins sept semaines. Chez les poulets plus âgés, on doit opter pour la voie S.C. pour injecter un volume de moins de 1ml; on procède généralement à au moins deux vaccinations. On doit administrer la vaccination primaire et le rappel avant la période de ponte et à intervalle de six semaines pour les adjuvants en émulsion et de quatre semaines pour les adjuvants lipopeptidiques. La production d'œufs peut être affectée par le stress dû à la manipulation et par la nature de l'antigène ou de l'anticorps. On doit vérifier les titres d'anticorps dans le jaune d'œuf 14 jours après la dernière vaccination; si les titres d'anticorps diminuent, on peut administrer des rappels à intervalle de quatre à huit semaines pendant la période de ponte. On peut

prélever les anticorps contenus dans les œufs pendant toute la période de ponte (environ un an).

Il est également possible d'administrer l'adjuvant en aérosol et par voie orale et intranasale. Ces méthodes ont l'avantage de stimuler la réponse aux IgA et elles peuvent aussi être moins stressantes pour les animaux. On trouvera des exemples d'administration à des souris dans Shen, *et al.* (2000); Shen, *et al.* (2001); McCluskie et Davis (2001); McCluskie, *et al.* (2000); Coste, *et al.* (2000); Falero-Diaz, *et al.* (2000); et Holan, *et al.* (2000). Pour l'administration à des rats, voir Papp, *et al.* (1999); et Baxi, *et al.* (2000). Pour l'administration à des chevaux, voir Nally, *et al.* (2001); pour l'administration à des porcs, voir Katinger, *et al.* (1999); et Tuboly et Nagy (2001); et pour l'administration à des poulets, voir Sharma (1999).

7. Volume d'injection et nombre de sites d'injection

Principe directeur: Le volume d'injection doit être le plus petit possible et se situer dans les limites recommandées.

La littérature contient des recommandations visant à limiter le nombre de sites d'injection. Cependant, pour ce qui est de la réduction des effets adverses, il semble être moins stressant pour l'animal, au cours de la phase de post-immunisation, de réduire le plus possible le volume d'injection et d'utiliser des sites d'injection multiples. **Les volumes d'injection recommandés pour l'immunogène seul ou avec adjuvant sont indiqués à l'Annexe B.** Il convient de souligner que les volumes d'injection d'immunogène et d'adjuvant recommandés par site pour réduire autant que possible les réactions à l'immunisation sont inférieurs aux volumes d'injection généralement recommandés. Il faut employer des aiguilles de gros calibre (20 à 21 pour le lapin) parce que les mélanges immunogène/adjuvant sont assez visqueux. La double émulsification décrite par Herbert (1965) permet de réduire la viscosité de la solution et donc d'utiliser une aiguille de plus petit calibre (26 à 27).

Certaines espèces doivent être mises sous sédatif avant l'injection. Cet aspect peut revêtir une importance particulière si l'on a opté pour des sites d'injection multiples.

Dans tous les cas, on doit aseptiser[1] et laisser sécher le site immédiatement avant l'injection d'immunogène ou de mélange immunogène/adjuvant.

Pour éviter la formation d'abcès lors de l'administration d'ACF, il est important d'injecter tout le mélange de façon aseptique dans l'espace S.C. et non par voie I.D. ou I.M. On devra veiller en particulier à ne pas contaminer le passage de l'aiguille. Lorsque la solution a été injectée et avant que l'aiguille ne soit retirée de l'espace S.C., le piston doit être retiré de quelques mm et l'aiguille rapidement retirée de l'espace S.C. Ainsi on réduira les fuites dans le tissu dermique.

Lorsqu'il n'y a aucun signe de réaction à la première injection, on peut faire les injec-

[1] La préparation aseptique de la peau comprend le coupage de la fourrure et une préparation chirurgicale en trois étapes: l'utilisation de savon chirurgical, le rinçage avec alcool, puis une solution de préparation chirurgicale.

tions de rappel près du premier site pour mettre à profit les cellules-mémoires établies dans les ganglions lymphatiques qui drainent cette région. Cela peut possiblement réduire le nombre d'injections nécessaires par animal et/ou le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir une réponse immunitaire efficace. Les sites d'injection doivent être suffisamment espacés pour empêcher la coalescence des lésions inflammatoires, qui peut entraîner l'interruption de l'irrigation sanguine de la région touchée avec formation subséquente d'abcès ouverts et, occasionnellement, la perte de tissus. Cependant, s'il y a des signes de réaction locale, les injections de rappel doivent être effectuées à bonne distance des injections précédentes et jamais sur le site d'un granulome ou d'une enflure produite par une autre injection.

Immédiatement après l'injection primaire et après les rappels subséquents, on doit surveiller attentivement les animaux pour détecter toute réaction anaphylactique (voir Partie C.9 – *Surveillance des animaux*). Les animaux qui ressentent une douleur ou une détresse impossible à soulager doivent être euthanasiés.

Les immunogènes doivent être injectés directement dans la balle de plastique, le cas échéant (Clemons, *et al.*, 1992).

Le protocole de rappel peut avoir un effet significatif sur le résultat de l'immunisation. Le délai écoulé entre deux vaccinations peut influencer la production de cellules-mémoires B et le changement de classe des lymphocytes B (d'IgM à d'autres classes ou sous-classes d'anticorps). De façon générale, on peut envisager de procéder à un rappel lorsque le titre des anticorps a atteint sa valeur la plus élevée ou qu'il a commencé à diminuer ou lorsqu'on s'attend à une augmentation du nombre de cellules-mémoires. Si la première vaccination a été effectuée sans adjuvant formateur de dépôt, le titre d'anticorps atteint habituellement un maximum deux à trois semaines plus tard. En présence d'un adjuvant formateur de dépôt, l'injection de rappel peut être effectuée au moins quatre semaines après la première vaccination. Il n'est pas toujours nécessaire d'utiliser un adjuvant avec les injections de rappel.

Dans la plupart des cas, on doit considérer que le point limite de la production d'anticorps est le moment où le titre d'anticorps a atteint un niveau acceptable (généralement après un nombre maximal de deux rappels). Il est généralement inutile d'établir un calendrier de vaccination prolongé comportant des rappels répétés; en effet, cela ne mènerait pas uniquement à la production d'anticorps ayant une affinité accrue pour l'immunogène en question, mais également à la production d'un plus grand nombre d'anticorps spécifiques aux contaminants présents dans la préparation (si l'immunogène n'est pas une protéine purifiée ou un peptide purifié) (Leenars, *et al.*, 1999). Les rappels multiples ne devraient pas nécessiter l'emploi d'un adjuvant. Dans tous les cas, on doit tenir compte du bien-être des animaux.

Les animaux peuvent être mis au repos pendant de longues périodes entre les rappels. De plus, lorsque le titre d'anticorps dans le sérum a atteint un niveau suffisant, des prélèvements sanguins effectués à intervalles réguliers peuvent faciliter l'obtention de quantités adéquates d'anticorps

contre les immunogènes disponibles en quantités limitées. Cependant les animaux ne doivent pas être maintenus inutilement dans un programme de production d'anticorps. Ceux qui sont gardés à long terme dans une animalerie doivent être sous la surveillance d'un vétérinaire pendant cette période.

8. Prélèvement sanguin

Principe directeur: Le choix de la procédure de prélèvement sanguin doit viser à réduire le plus possible le stress chez l'animal et être conforme aux lignes directrices les plus récentes du CCPA.

Les procédés normalisés de fonctionnement pour la préparation d'AcP doivent inclure un volet sur les prélèvements sanguins. À cet égard, la formation et l'expertise du personnel chargé d'exécuter la procédure revêtent une importance significative (CCPA, 1999). Les animaux doivent être gardés au chaud et à l'écart des facteurs environnementaux stressants tels que le bruit. L'emploi de solvants organiques pour provoquer une vasodilatation n'est pas recommandé. L'anesthésie générale n'est pas nécessaire pour le prélèvement de sang chez les lapins et les animaux de plus grandes tailles, ni chez les rongeurs si l'on se sert de la veine de la queue ou de la veine saphène. Cependant, l'anesthésie terminale est requise lorsque le volume à prélever exige une ponction cardiaque. Sur les oreilles des lapins, il peut être avantageux d'employer des anesthésiques locaux comme une crème EMLA^{MD} ou des analgésiques parentéraux. Le calibre de l'aiguille doit être choisi en fonction de la taille du vaisseau sanguin. Les lapins doivent être saignés par la veine de l'oreille à l'aide d'une aiguille et non d'une lame de scalpel parce que l'incision peut endommager les vaisseaux sanguins et les tissus environnants, ce qui peut causer une nécrose de la région affectée et la perte de tissu de l'oreille. Le volume prélevé ne doit pas dépasser 10 % du volume sanguin total de l'animal (environ 1 % de son poids) si le prélèvement a lieu toutes les deux semaines, et 15 % du volume sanguin total si le prélèvement a lieu toutes les quatre semaines (Morton, *et al.*, 1993; McGuill et Rowan, 1989; Diehl, *et al.*, 2001).

Le prélèvement de sérum à partir de balles en plastique implantées est relativement facile et ne nécessite pas d'anesthésie locale. La peau recouvrant la balle doit être préparée de façon aseptique; on insère une aiguille hypodermique stérilisée munie d'un bouchon de coton par l'un des trous, dans la partie dorsale de la balle, et on retire le liquide par une seconde aiguille reliée à une seringue (Whary, *et al.*, 1998).

Pour la production d'AcP chez le poulet, on prélève les œufs quotidiennement (en général, un œuf est pondu par jour) et on les marque pour identification. On peut les conserver jusqu'à un an à une température de 4°C avant la purification des anticorps (IgY) (Haak-Frendscho, 1994; Svendsen, *et al.*, 1995).

L'exsanguination doit être effectuée sous anesthésie générale terminale par une technique permettant le prélèvement du volume maximal de sang. Après l'exsanguination, il faut s'assurer du décès du l'animal et l'euthanasier au besoin, conformément aux lignes directrices les plus récentes du CCPA.

9. Surveillance des animaux

Principe directeur: Les animaux doivent être surveillés quotidiennement et les procédés normalisés de fonctionnement doivent inclure une liste de vérification pour les points limites.

Les PNF doivent inclure la tenue obligatoire de dossiers. Le dossier d'immunisation doit indiquer l'agent, la voie d'administration, le ou les sites d'administration, le volume et la date d'injection et le poids de l'animal.

Les injections d'immunogènes ou de mélanges d'immunogène/adjuvant peuvent provoquer des réactions inflammatoires; par conséquent on doit surveiller tous les jours les réactions aux sites d'injection en particulier et vérifier l'état de santé et de détresse des animaux en général. Leur consommation d'eau et de nourriture, leur activité et leur apparence générale doivent être surveillées.

Les PNF doivent comporter, à l'intention du personnel chargé des soins, une liste de vérification quotidienne des animaux produisant des AcP ainsi que des points limites définis qui déclenchent l'arrêt des procédures (euthanasie) si l'animal subit une détresse qui ne peut être soulagée due à une réponse inflammatoire. Les PNF doivent inclure l'obligation pour les chercheurs de communiquer avec le personnel vétérinaire (et obliger le personnel vétérinaire à communiquer avec le chercheur principal) si des lésions aux sites d'injection ou des signes de douleur ou de détresse sont identifiés. Le personnel vétérinaire doit être chargé de procéder à une évaluation appropriée des animaux en temps opportun et de mettre en œuvre des mesures thérapeutiques au besoin. En cas de lésions dues à la vaccination, la thérapie de soutien peut comprendre un nettoyage topique et l'administration d'un antibiotique et (ou) d'un analgésique. Il peut être nécessaire d'administrer des liquides de remplacement ou des suppléments alimentaires aux animaux ayant bu de moins grandes quantités d'eau ou ayant manifesté une anorexie prolongée. Les animaux doivent également être surveillés attentivement après les prélèvements sanguins, particulièrement si la procédure a été effectuée sous anesthésie (CCPA, 1998).

10. Disposition des animaux

On doit disposer des animaux conformément aux lignes directrices du CCPA et aux règlements des CPA locaux. Lorsque le prélèvement d'anticorps est terminé, le chercheur a la responsabilité d'en informer le personnel chargé des soins pour qu'il dispose des animaux conformément à ce qui a été convenu dans le protocole. Il peut s'agir d'euthanasie ou de placement là où il existe des programmes d'adoption. Il convient de noter que si l'ACF a été administré à des animaux producteurs de viande, on ne doit pas revendre ceux-ci pour la consommation humaine. Pour l'élimination des animaux qui ont reçu d'autres adjuvants, on devra communiquer avec l'Agence canadienne d'inspection des aliments[2].

[2] Agence canadienne d'inspection des aliments, Gestionnaire nationale, Section des produits biologiques vétérinaires, Ottawa (ON) (613) 225-2342.

D. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux (AcM) sont des anticorps qui ont une seule spécificité choisie et qui sont habituellement sécrétés de façon continue par des hybridomes rendus «immortels». L'hybridome est un hybride artificiel construit à partir d'une cellule lymphoïde productrice d'anticorps et d'une cellule myélomateuse (immortelle). La technique des hybridomes mise au point par Köhler et Milstein en 1975 est un outil de production de grandes quantités d'anticorps hautement spécifiques qui a eu des répercussions considérables sur les méthodes de diagnostic et de thérapie ainsi que sur l'ensemble la recherche biomédicale.

La production des AcM se déroule en deux étapes principales: 1) la production *in vivo* (immunisation) de cellules lymphoïdes sécrétant des anticorps et la sélection *in vitro* d'un hybridome producteur d'anticorps; 2) la multiplication de clones de l'hybridome soit *in vitro*, soit *in vivo*. L'annexe C montre les étapes de la production d'AcM. Les méthodes les plus récentes de production d'AcM, par exemple les techniques d'expression des phages et l'expression sous forme de protéines recombinantes, ne nécessitent pas l'utilisation d'animaux et ne seront pas abordées ici.

En dépit des commentaires formulés à l'origine par Köhler et Milstein sur la méthodologie générale (*in vitro*) de production des hybridomes («La production d'anticorps spécifiques prédéfinis à partir de cultures de lignées cellulaires permanentes présente un intérêt d'ordre général.» et «De telles cellules peuvent être cultivées à grande échelle *in vitro*.» [traduction libre]), la production d'AcM est réalisée *in vivo* pour presque toutes les utilisations. Il s'est avéré qu'il était possible de produire des AcM par injection d'hybridomes dans la cavité abdominale de plusieurs espèces de rongeurs. La multiplication subséquente des hybridomes dans le liquide ascitique permet de produire facilement des AcM de façon économique.

Une autre méthode possible de production d'AcM, qui n'est cependant pas employée régulièrement, est l'extraction d'anticorps recombinants à partir du lait d'animaux génétiquement modifiés. Cette méthode sera peut-être de plus en plus utilisée à l'avenir parce qu'il faudra accroître la production d'anticorps pour répondre aux besoins et parce que l'expression des AcM semble être beaucoup plus importante dans le lait des souris et des chèvres transgéniques que dans les systèmes de culture cellulaire (Young, *et al.*, 1998). La création et l'utilisation d'animaux comme bioréacteurs pour la production d'AcM doivent être conformes aux *Lignes directrices du CCPA: animaux transgéniques* (1997b).

Principe directeur général: On doit faire tout ce qui est possible pour obtenir des substances déjà disponibles ou pour produire les AcM par des méthodes *in vitro*. Par conséquent, le chercheur doit justifier auprès du CPA tout projet de production d'anticorps monoclonaux par la méthode des ascites.

Les AcM produits commercialement devraient provenir de sources conformes aux lignes directrices du CCPA ou s'ils sont de source internationale, ils doivent être accrédités par AAALAC. Pour obtenir une liste de fournisseurs d'AcM produits

in vitro, voir http://www.frame.org.uk/Monoclonal_Suppliers.htm.

La production d'AcM par la méthode des ascites chez la souris soulève plusieurs questions liées au risque de douleurs et de souffrances intenses et inutiles chez ces animaux (Anon., 1989). Un certain nombre de méthodes *in vitro* ont donc été mises au point pour remplacer la méthode de l'ascite chez les rongeurs. Certains pays ont interdit la production régulière d'AcM *in vivo* (Shavlev, 1998). Dans un rapport récent produit par un comité du US National Research Council à la demande des National Institutes of Health américains, il est recommandé d'adopter des méthodes *in vitro* pour la production régulière là où cela est praticable et que lorsque l'on opte pour la méthode de l'ascite chez la souris, on soit tenu de justifier cette pratique auprès d'un comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux (Peterson, 1999). Il est généralement admis que les progrès accomplis dans le domaine des techniques *in vitro* permettent actuellement d'employer ces méthodes pour plus de 90 % de la production d'AcM (ILAR, 1999).

Dans ce contexte, il faut noter qu'en vertu des *Principes régissant la recherche sur les animaux* (1989) du CCPA, les chercheurs sont tenus de suivre le principe des «trois R» de Russell et Burch (1959) à savoir le remplacement (des animaux par du matériel non doué de sensation ou par d'autres animaux moins sensibles); la réduction (du nombre d'animaux utilisés); et le raffinement (de la technique, «pour réduire à un minimum absolu le niveau de détresse imposé aux animaux devant être utilisés»).

Chez l'animal, une douleur et une détresse considérables peuvent résulter de l'injection intrapéritonéale (I.P.) de l'amorce (p. ex. pristane ou adjuvant incomplet de Freund), de l'effet de l'amorce après administration, de l'inoculation I.P. des hybridomes, et de la croissance des cellules tumorales dans la cavité abdominale (effets primaires) sous forme de plaques péritonéales qui s'infiltrent dans la paroi abdominale ou les organes abdominaux. Plus précisément, il semble que l'injection par voie I.P. produit un niveau de détresse modéré; on signale que la production de l'ascite et la croissance de tumeurs causent de la souffrance chez les patients humains (Kuhlmann, *et al.*, 1989); de plus, les changements pathophysiologiques et pathologiques complexes peuvent provoquer une détresse considérable chez l'animal utilisé (Hendriksen, 1998). On pense que les ponctions de liquide ascitique soulagent partiellement la douleur ou la détresse dues à la distension abdominale, mais l'immobilisation et l'administration d'anesthésiques avant le prélèvement du liquide ascidique constituent une source supplémentaire de détresse pour les animaux.

Le CCPA reconnaît qu'il a la responsabilité d'appuyer les CPA en ce qui à trait aux preuves que les chercheurs doivent fournir pour démontrer qu'il n'existe pas de méthodes de remplacement appropriées (*Lignes directrices du CCPA: révision de protocoles d'utilisation d'animaux d'expérimentation*, 1997a). Par conséquent le CCPA constituera et maintiendra un répertoire d'informations sur les techniques appropriées de production d'AcM *in vitro* (Annexe D). Il reconnaît également que dans les pays qui ont interdit le procédé de l'ascite, l'utilisation de la méthodologie *in vitro* a été stimulée par la création de centres d'excellence qui centralisent la production d'AcM *in vitro* et fournissent la formation, l'expertise et les

ressources pertinentes. Certains organismes offrent aussi d'effectuer la production *in vitro* à contrat.

Idéalement, un système de remplacement *in vitro* ne devrait pas être plus coûteux qu'un système *in vivo*, ne pas nécessiter de conditions de culture spéciales, permettre de produire des AcM à forte concentration, être exempt de toute contamination, être réutilisable et permettre d'obtenir des quantités suffisantes d'AcM relativement purs dans un délai raisonnablement court (Falkenberg, 1993; 1995). Actuellement, il n'existe aucun système *in vitro* répondant à tous ces critères mais les chercheurs peuvent choisir celui qui leur convient selon la qualité des AcM qu'ils souhaitent produire et leur quantité (voir les références sur les diverses méthodes de production d'AcM à l'Annexe D). Si l'AcM recherché n'est pas disponible commercialement, les chercheurs devraient tout mettre en œuvre pour le produire *in vitro*. Avant de faire approuver un protocole de production par la méthode des ascites, pour se conformer aux recommandations formulées aux États-Unis et ailleurs, le chercheur doit démontrer qu'il a sérieusement tenté d'adapter l'hybridome à un système de culture permettant de produire les quantités requises d'AcM (p. ex. flacons de culture tissulaire, systèmes simples à membrane, fibres creuses, systèmes de fermentation) (Saxby, 1999; Smith et De Tolla, 1999). **La production d'AcM par culture d'hybridomes sous forme d'ascites doit être évitée lorsqu'elle n'est pas absolument nécessaire.**

Les principes directeurs qui suivent visent à préserver le bien-être des animaux (principalement les souris) que l'on emploie encore dans la production d'AcM.

Comme la proportion d'hybridomes qui produisent peu ou pas d'AcM *in vivo* peut atteindre 15 %, là où les méthodes *in vitro* sont impossibles, on doit demander aux chercheurs de procéder à une étude pilote de petite envergure pour tester les nouveaux hybridomes sur deux ou trois animaux.

Principe directeur: Il est nécessaire de définir des points limites clairs et de surveiller attentivement l'état des animaux pour réduire le plus possible les risques de douleur et/ou de détresse.

Conformément aux *Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests* (1998), on doit fixer des points limites clairement définis visant à réduire le plus possible la douleur et la détresse chez les animaux. On doit établir un programme précis de surveillance et de communication des observations ainsi que des PNF pour toute nouvelle combinaison immunogène/adjuvant.

1. Sélection et soin des animaux

Principe directeur: Lors de la sélection de l'espèce et de la souche d'animaux destinées à la production d'AcM, le principal objectif doit être la réduction de la douleur et/ou de la détresse de l'animal.

Les souris (ou les rats) doivent être de même souche (syngéniques) à la fois pour l'immunisation en vue de la création du clone d'hybridome et pour la production subséquente d'AcM, de sorte que les tissus utilisés soient histocompatibles. Les souris

Balb/c représentent souvent le meilleur choix puisque les cellules myélomateuses parentales employées dans le processus de fusion proviennent souvent de cette souche. Les souris utilisées préalablement pour la reproduction peuvent présenter certains avantages pour la production de l'ascite parce que leur musculature abdominale a déjà été étirée (Falkenburg, 1998).

On signale que les souris SCID (syndrome d'immunodéficience sévère combinée), bien que coûteuses, produisent moins d'anticorps murins non spécifiques avec un rendement équivalent d'AcM spécifiques, ce qui a pour effet de réduire les interférences, entre autres lors des essais immunologiques (Pistillo, *et al.*, 1992). Il faut noter que les souris SCID doivent être logées dans des installations à confinement et qu'il faut mettre en place des procédures détaillées (et coûteuses) pour leur assurer les soins appropriés.

Les CPA doivent veiller à ce que le nombre d'animaux utilisés soit adéquat. On peut calculer ce nombre en estimant que les souris produisent environ 0,5 à 10mg/ml d'AcM dans le liquide ascitique et qu'on récolte en moyenne 2ml de liquide ascitique par ponction (Smith et De Tolla, 1999). Il s'agit ici d'une approximation générale, chaque hybridome devant être considéré comme une lignée cellulaire unique.

2. Clonage des hybridomes

Les PNF d'immunisation doivent être établis selon les principes directeurs relatifs au choix de l'adjuvant, au site et au volume d'injection (voir Partie C.5-C.7 – *Choix de l'adjuvant, Voie d'injection et Volume d'injection et nombre de sites d'injection*).

Les procédures d'immunisation qui ne nécessitent pas d'adjuvant et qui peuvent être exécutées dans un court laps de temps sont efficaces pour la production d'hybridomes (Chase, *et al.*, 2001). Cette méthode semble causer moins de stress aux souris; elle nécessite plusieurs rappels dans un court délai, ce qui permet de se passer d'adjuvant. Cependant, l'immunisation rapide peut ne pas toujours produires des AcM de forte affinité et on doit prendre en considération cet aspect au moment de choisir le régime d'immunisation.

L'immunisation *in vitro* avec des antigènes a été employée avec succès pour remplacer l'immunisation *in vivo* (Borrebaeck, 1989). Cette procédure est particulièrement utile lorsque l'antigène est disponible en quantité limitée et que les tentatives préalables d'immunisation *in vivo* se sont soldées par des échecs dus à la faible immunogénicité de l'antigène ou à la ressemblance entre celui-ci et les auto-antigènes (Bunse et Henz, 1994). Les autres avantages de cette approche sont les suivants: elle exige l'utilisation d'un moins grand nombre d'animaux, la période d'immunisation est de quatre à cinq jours comparativement à contre plusieurs semaines dans le cas de l'immunisation traditionnelle *in vivo* (Grimaldi et French, 1995), il est possible de surveiller et de contrôler la réponse immunitaire en l'absence des mécanismes immunorégulateurs existant *in vivo*, et elle permet de produire des AcM contre des agents qui sont toxiques pour les animaux.

Pour des renseignements plus détaillés sur le clonage des hybridomes, voir Grimaldi et French (1995). Pour la sélection et le clonage des hybridomes en une étape, voir Stebeck, *et al.* (1996) et Chase, *et al.* (2001).

Avant d'effectuer l'immunisation, il est important d'avoir élaboré la méthodologie de détection de l'anticorps spécifique visé dans le sérum de la souris ou dans le surnageant de la culture de tissus, faute de quoi on risque des pertes de temps et de ressources significatives pendant la phase ultérieure de développement de l'AcM. En outre, le type d'utilisation des AcM doit être soigneusement pris en considération de façon à ce que les AcM qui sont efficaces dans l'essai fonctionnel final puissent être sélectionnés au moyen d'un dépistage approprié.

3. Production d'ascites

3.1 Amorçage

Principe directeur: L'adjuvant incomplet de Freund (AIF) ou un autre adjuvant moins invasif doit être utilisé comme amorce intrapéritonéale, le volume maximal étant de 0,3ml (AIF) injecté en une fois. Si l'on propose d'employer du pristane, on doit justifier cette pratique auprès du comité institutionnel de protection des animaux et limiter le volume à 0,2ml.

Selon la méthode originale de production d'AcM par ascite, la cavité péritonéale de la souris devait être «amorcée» chimiquement au moyen de pristane (0,5ml par injection intrapéritonéale). L'effet de l'amorce est double: elle supprime la réponse immunitaire, ce qui évite que la croissance des hybridomes dans la cavité abdominale ne soit compromise (de façon importante), et elle produit une irritation chimique qui provoque une péritonite et la sécrétion de liquide séreux (Kuhlmann, *et al.*, 1989). La suspension d'hybridomes est injectée sept à dix jours plus tard.

Les résultats préliminaires indiquent que l'utilisation d'analgésiques avant l'amorçage à l'aide de pristane peut diminuer la douleur et la détresse de la souris (Fletch, A. et Delaney, K., *comm. pers.*)

Des études de comparaison entre le pristane (à plusieurs volumes) et d'autres agents d'amorçage ont permis de démontrer que l'AIF présentait plusieurs avantages sur le pristane: moins de signes de stress chez l'animal, injection des hybridomes possible un jour seulement après l'amorçage et besoin d'un nombre réduit d'animaux (Gillette, 1987; Mueller, *et al.*, 1986; et Jones, *et al.*, 1990). Le bleu trypan est également employé comme agent d'amorçage (Wu et Kearney, 1980). Il faut noter qu'au préalable on doit dialyser le bleu trypan pendant 48 heures dans de l'eau fraîche distillée dans du verre en remplaçant l'eau deux fois par jour pour réduire la quantité d'impuretés de faible poids moléculaire. L'amorçage au bleu trypan doit être effectué 24 heures, puis à nouveau une heure avant l'injection des hybridomes.

3.2 Contamination

Principe directeur: Avant d'inoculer les hybridomes *in vivo* en vue de la multiplication des anticorps monoclonaux, on doit les tester pour détecter la présence d'agents viraux et mycoplasmiques adventices.

On constate souvent une contamination virale dans les spécimens murins inoculés avec des hybridomes provenant de la souris. Ce type de contamination peut être

à l'origine d'une infection chez l'hôte ou les hôtes et d'une propagation de la maladie dans l'ensemble de l'animalerie. De plus, on a déjà isolé le virus de la choriorméningite lymphocytaire, qui peut infecter les humains, à partir de lignées de cellules tumorales d'origine murine (Dykewicz, *et al.*, 1992). Le virus hépatite murine (VHM) peut déclencher une réponse immunorégulatrice qui se répercute sur la production subséquente d'AcM. De plus, il risque de se propager rapidement dans une animalerie et d'affecter d'autres travaux en cours. La méthode de dépistage la plus employée est l'épreuve de production d'anticorps de souris, qui consiste à injecter un échantillon du tissu en question à une souris, puis à euthanasier celle-ci après une période d'incubation de trois à quatre semaines pour effectuer des tests sérologiques pour une série d'agents adventices connus (Jackson, *et al.*, 1999). Les tests moléculaires effectués au moyen de la réaction en chaîne de la polymérase (RCP) et d'autres techniques apparentées permettront d'améliorer les capacités et les délais de détection.

3.3 Mise en place des hybridomes

Principe directeur: Dans la cavité péritonéale d'une souris ayant subi l'amorçage, on peut injecter au maximum 3 x 10^6 hybridomes dans un volume de 1,0ml.

Les lignées de cellules tumorales tendant à former des tumeurs solides produisent moins de liquide ascitique. Il est possible d'optimiser la production d'ascites par une série de repiquages de cellules tumorales non attachées sélectionnées au moyen d'un lavage péritonéal chez des souris présentant des tumeurs solides. Il a été démontré que la sélection des lignées cellulaires qui n'adhèrent pas aux flacons de culture de tissus permettait de réduire la probabilité de formation de tumeurs solides. Pour de nombreux hybridomes, il s'avère que le maximum nécessaire pour obtenir une bonne production d'AcM et de liquide ascitique est de 3 x 10^6 cellules. Dans certaines circonstances (p. ex. hybridomes produits dans les années 1970 et 1980 à partir de cellules myélomateuses de première génération), il faut une concentration plus élevée de cellules pour la production de liquide ascitique. Dans le cas de certaines lignées cellulaires agressives et à prolifération rapide, on doit parfois inoculer des concentrations moindres parce qu'une tumeur en croissance rapide peut provoquer une détresse grave et la mort.

3.4 Surveillance des animaux et points limites

Après l'injection des hybridomes, les soins réguliers doivent comporter des observations quotidiennes faites par un personnel bien formé pendant la première semaine (approximativement) et jusqu'à ce que l'accumulation de liquide ascitique devienne évidente (enflure de l'abdomen). Pendant cette période, toute observation d'un comportement inhabituel ou de symptômes doit donner lieu à un suivi rapide. On devra établir des procédures de suivi et fixer un point limite à la lumière du document *Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests* (1998). Les signes de détresse à surveiller sont les suivants: réduction de l'activité, apparence voûtée, poil ébouriffé, détresse respiratoire et perte de poids

(parfois masquée par l'accumulation de liquide dans l'abdomen). Lorsque l'accumulation de liquide ascitique a produit une enflure évidente de l'abdomen, habituellement sept à dix jours après l'injection, on doit vérifier l'état de l'animal à intervalle régulier au moins deux fois par période de 24 heures. Il convient de se rappeler que chez la souris la vitesse de propagation des hybridomes peut être très variable.

3.5 Croissance de la tumeur ascite

Principe directeur: La prise de poids résultant de l'accumulation de liquide ascitique dans l'abdomen ou du développement de la tumeur ne doit causer aucune douleur ou détresse chez l'animal; le gain de poids ne doit dépasser en aucun cas 20 % du poids normal d'une souris de la même souche, du même âge et du même sexe.

Conformément au document intitulé *Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests* (1998), on doit préparer un horaire de surveillance des animaux, établir des points limites clairement définis et rédiger des directives sur la communication des observations. Lorsqu'un point limite a été atteint, on doit soulager la pression abdominale en prélevant le liquide ascitique ou par euthanasie effectuée de façon humanitaire, suivi du prélèvement du liquide ascitique. À partir du quatrième jour après l'inoculation, on doit peser les souris quotidiennement pour suivre l'évolution de la tumeur ascite à l'aide du gain de poids et pour surveiller l'état de santé général des animaux. On pèsera la souris le jour de l'inoculation, et cette mesure servira à déterminer le moment où son gain de poids atteindra 20 % (Workman, *et al.*, 1998). Lorsqu'on se fie au poids corporel, il faut être prudent parce que les souris perdent souvent du poids pendant que la tumeur grossit. On peut évaluer le bien-être de l'animal à l'aide d'un système de pointage mesurant son état physique (Ullman-Culleré et Foltz, 1999), qui peut également servir à déterminer le moment de mettre fin à la procédure.

3.6 Prélèvement du liquide ascitique

Principe directeur: Selon l'état de la souris, un maximum de deux ponctions de liquide ascitique sont permises, la deuxième étant une procédure terminale. Il est essentiel d'avoir la formation et l'expérience voulues en matière de ponction et de prélèvement du liquide ascitique.

Il faut noter que le prélèvement de liquide risque d'entraîner des hémorragies, des œdèmes et la mort. Pour les lignées agressives causant une morbidité significative, on doit se limiter à une seule ponction terminale sous anesthésie générale. Lors de la première ponction (non terminale), on peut anesthésier l'animal conformément aux lignes directrices du CCPA. L'anesthésie entraîne cependant une diminution de la tension artérielle et une dépression respiratoire qui peuvent avoir des effets néfastes chez les souris déjà compromises. Par conséquent, on recommande de placer les souris dans une chambre à induction remplie d'oxygène pendant cinq à dix minutes, puis de procéder à une anesthésie modérée à l'aide d'un gaz (isoflurane), ce qui permettra une immobilisation adéquate de l'animal pour la durée de la procédure et

un rétablissement rapide. Pour éliminer tout risque de contamination bactérienne, le site de la paracentèse doit être préparé de façon aseptique pour la première ponction.

Pour la paracentèse, on recommande d'utiliser une aiguille de fort calibre (21 à 22) permettant d'accélérer le prélèvement du liquide ascitique, qui est visqueux, et de réduire la durée de l'immobilisation ou de l'anesthésie. Toutefois, une aiguille de trop fort calibre peut endommage le tissu. On peut prélever au maximum 4 à 5ml de liquide ascitique lors de la première ponction (avec survie). On doit palper l'abdomen de la souris pour rechercher toute tumeur solide intra-abdominale, qui justifie l'euthanasie de façon humanitaire. Il faut envisager l'administration de liquides de remplacement (1 à 2ml par voie S.C.) lorsqu'on prélève de grands volumes de liquide ascitique et que l'animal n'est pas euthanasié (Jackson et Fox, 1995).

Les animaux doivent être surveillés attentivement pendant les 60 premières minutes, puis à intervalles réguliers pendant plusieurs heures après la première ponction. Tout signe de détresse doit être suivi d'une euthanasie conformément aux plus récentes lignes directrices du CCPA.

Les CPA doivent s'assurer que le personnel chargé d'exécuter les procédures définies dans le protocole d'utilisation des animaux a au préalable obtenu la formation pertinente. En vertu des *Lignes directrices du CCPA: formation des utilisateurs d'animaux dans les institutions* (1999), on est tenu de veiller à la formation de tout personnel chargé d'exécuter des procédures d'utilisation des animaux.

E. RÉFÉRENCES

1. Généralités

ABBAS, A.K. et LICHTMAN, A.H. (2001). Basic Immunology. 309 pp. Philadelphia PA: W.B. Saunders.

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A. et POBER, J. (2000). Cellular and Molecular Immunology, 4th Edn. 553 pp. Philadelphia PA: W.B. Saunders.

ANDERSON, W.L. (1999). Immunology. 200 pp. Madison CT: Fence Creek Publishing (Blackwell).

COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., *et al.* (eds.) (1997). Current Protocols in Immunology. Baltimore MD: John Wiley & Sons Inc.

GRIMALDI, C.M. et FRENCH, D.L. (1995). Monoclonal antibodies by somatic cell fusion. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* **37**(3):125-132 (http://www4.nas.edu/cls/ijhome.nsf).

JANEWAY, C. Jr. et TRAVERS, P. (1999). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th Edn. 633 pp. New York NY: Garland Publishing Inc.

KUBY, J. (2000). Immunology, 4th Edn. 670 pp. New York NY: W.H. Freeman & Co. (http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm).

ROITT, I., BROSTOFF, J. et MALE, D. (1998). Immunology, 5th Edn. 423 pp. London UK: Mosby.

SHARON, J. (1998). Basic Immunology, 1st Edn. 303 pp. Baltimore MD: Williams and Wilkins.

SOMPAYRAC, L. (1999). How the Immune System Works. 111 pp. Oxford UK: Blackwell Science.

2. Production d'anticorps polyclonaux

ABBAS, A.K. et LICHTMAN, A.H. (2001). Basic Immunology. 309 pp. Philadelphia PA: W.B. Saunders.

ALLISON, A.C. et BAYARS, N.E. (1991). Immunological adjuvants: Desirable properties and side-effects. *Molecular Immunology* **28**:279-284.

ANDERSON, W.L. (1999). Immunology. 200 pp. Madison CT: Fence Creek Publishing (Blackwell).

BAXI, M.K., DEREGT, D., ROBERTSON, J., *et al.* (2000). Recombinant bovine adenovirus type 3 expressing bovine viral diarrhea virus glycoprotein E2 induces an immune response in cotton rats. *Virology* **278**(1):234-243.

BOLLEN, L.S., CROWLEY, A., STODULSKI, G., *et al.* (1995). Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of Immunological Methods* **191**:113-120.

BRODERSON, J.R. (1989). A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's Adjuvant. *Laboratory Animal Science* **39**(5):400-405.

BRUSSOW, H., HILPERT, H., WALTHER, I., *et al.* (1987). Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* **25**:982-986.

BUTLER, N.R., VOYCE, M.A., BURLAND, W.L., *et al.* (1969). Advantages of aluminum hydroxide adsorbed combined diptheria, tetanus, and pertussis vaccines for immunization of infants. *British Medical Journal* **March 15**:663.

CHEN, T.H., LARSON, A. et MEYER, K.F. (1964). Studies on immunization against plague. *Journal of Immunology* **93**(4):668.

CLEMONS, D.J., BESCH-WILLIFORD, C., STEFFEN, E.K., *et al.* (1992). Evaluation of a subcutaneously implanted chamber for antibody production in rabbits. *Laboratory Animal Science* **42**(3):307-311.

COHEN, H., NAGEL, J., VAN DER VEER, M., *et al.* (1970). Studies on tetanus antitoxin. *Journal of Immunology* **104**(6):1417.

COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., *et al.* (eds.) (1997). Current Protocols in Immunology. Baltimore MD: John Wiley & Sons Inc.

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1989). Politique du CCPA: Principes régissant la recherche sur les animaux. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/policies/politiqu.htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1990). Politique du CCPA: Besoins comportementaux des animaux d'expérimentation. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/policies/politiqu.htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1991). Politique du CCPA: Catégories de techniques invasives en expérimentation animale. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/policies/politiqu.htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1993). Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, vol. 1, 2e éd. 212 pp. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guframe.htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1998). Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests. 30 pp. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guframe.htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1999). Lignes directrices du CCPA: formation des utilisateurs d'animaux dans les institutions. 10 pp. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guframe. htm).

COSTE, A., SIRARD, J.C., JOHANSEN, K., *et al.* (2000). Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. *Journal of Virology* **74**(19): 8966-8971.

CRAIG, S. et BAYANS, T. (1999). Survey of adjuvant use for the production of polyclonal antibodies. *Canadian Association for Laboratory Animal Science Newsletter* **33**(3):32-35.

DARDIRI, A.H. et DELAY, P.D. (1964). Production of high potency anti-Taschen disease serum from rabbits and guinea pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **28**(1):3.

DIEHL, K.-H., HULL, R., MORTON, D., *et al.* (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**:15-23.

ERHARD, M.H., MAHN, K., SCHMIDT, P., *et al.* (2000). Evaluation of various immunization procedures in laying hens to induce high amounts of specific egg yolk antibodies. *Alternatives to Laboratory Animals* **28**:63-80.

ERHARD, M.H., SCHMIDT, P., HOFMANN, A., *et al.* (1997). The lipopeptide, Pam_3Cys-ser-$(Lys)_4$: An alternative adjuvant to Freund's Adjuvant for the immunization of chicken to produce egg yolk antibodies. *Alternatives to Laboratory Animals* **25**:173-181.

FALERO-DIAZ, G., CHALLACOMBE, S., RAHMAN, D., *et al.* (2000). Transmission of IgA and IgG monoclonal antibodies to mucosal fluids following intranasal or parenteral delivery. *International Archives of Allergy and Immunology* **122**(2):143-150.

GARVEY, J.S., CREMER, N.E. et SUSSDORF, D.H. (1977). Methods in Immunology, 3rd Edn. Reading MA: W.A. Benjamin, Inc.

GROSSMAN, C.J. (1989). Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *Journal of Steroid Biochemistry* **34**:241-251.

HAAK-FRENDSCHO, M. (1994). Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. *Promega Notes Magazine* **46**:11.

HALLIDAY, L.C., ARTWOHL, J.E., HANLY, W.C., *et al.* (2000). Physiologic and behavioral assessment of rabbits immunized with Freund's Complete Adjuvant. *Contemporary Topics of Laboratory Animal Science* **30**(7):8-13.

HANLY, W.C., ARTWOHL, J.E. et BENNETT, B.T. (1995). Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* **37**:93-118.

HERBERT, W.J. (1965). Multiple emulsions: A new form of mineral-oil adjuvant. *Lancet* **October 16**:771.

HERBERT, W.J. (1978). Mineral-oil Adjuvants and the Immunization of Laboratory Animals. In: *Handbook of Experimental Immunology*, 3rd Edn. (ed. D.M. Weir). Pp. A3, 1-3,15. Oxford UK: Blackwell Scientific Publications.

HILLAM, R.P., TENGERDY, R.P. et BROWN, G.L. (1974). Local antibody production against the murine toxin of *Yersinia pestis* in a golf-ball-induced granuloma. *Infection and Immunology* **10**:458-463.

HOLAN, V., ZAJICOVA, A., KRULOVA, M., *et al.* (2000). Induction of specific transplantation immunity by oral immunization with allogenic cells. *Immunology* **101**(3):404-411.

HUNTER, R.L., OLSEN, M.R. et BENNETT, B. (1995). Copolymer Adjuvants and TiterMax™. In: *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (ed. D.E.S. Stewart-

Tull). New York NY: Wiley.

JENNINGS, V.M. (1995). Review of adjuvants used in antibody production. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* **37**:119-125.

KATINGER, A., LUBITZ, W., SZOSTAK, M.P., *et al.* (1999). Pigs aerogenously immunized with genetically inactivated (ghosts) or irradiated *Actinobacillus pleuropneumoniae* are protected against a homologous aerosol challenge despite differing in pulmonary cellular and antibody responses. *Journal of Biotechnology* **73**(2-3):251-260.

KUBY, J. (2000). Immunology, 4th Edn. 670 pp. New York NY: W.H. Freeman & Co. (http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm).

LEENARS, M.P.P.A., HENDRIKSEN, C.F.M., DE LEEUW, W.A., *et al.* (1999). The production of polyclonal antibodies in laboratory animals: The report and recommendations of ECVAM Workshop 35. *Alternatives to Laboratory Animals* **27**(1):79-102 (http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam35.htm).

McCLUSKIE, M.J. et DAVIS, H.L. (2001). Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxy nucleotides as adjuvants. *Vaccine* **19**:413-422.

McCLUSKIE, M.J., WEERATNA, R.D. et DAVIS, H.L. (2000). Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. *Molecular Medicine* **6**(10): 867-877.

McGUILL, M.W. et ROWAN, A.N. (1989). Biological effects of blood loss: Implications for sampling volumes and techniques. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* **31**: 5-18.

MORTON, D.B., ABBOT, D., BARCLAY, R., *et al.* (1993). Removal of blood from laboratory mammals and birds: First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **27**: 1-22.

NALLY, J.E., ARTIUSHIN, S., SHEORAN, A.S., *et al.* (2001). Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by intranasal vaccination using a sucrose acetate isobutyrate based delivery system. *Vaccine* **19**:492-497.

PAPP, Z., BABIUK, L.A. et BACA-ESTRADA, M.E. (1999). The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. *Vaccine* **17**: 933-943.

REID, J.L., WALKER-SIMMONS, M.K., EVERARD, J.D., *et al.* (1992). Production of polyclonal antibodies in rabbits is simplified using perforated plastic golf balls. *Biotechniques* **12**:661-666.

RUSSELL, W.M.S. et BURCH, R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen. 238 pp. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), Potters Bar, Herts, UK: England. **Special edition** (1992) (http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm).

SARKER, S.A., CASSWALL, T.H., ALBERT, M., *et al.* (1998). Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. *Pediatric Infectious Diseases Journal* **17**:1149-1154.

SCHADE, R., STAAK, C., HENDRIKSEN, C., *et al.* (1996). The production of avian (egg yolk) antibodies-IgY: The report and recommendations of ECVAM Workshop 21. *Alternatives to Laboratory Animals* **24**(6): 925-934 (http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam21.htm).

SCHUTZ, M.P., LECLERC, M., JOLIVER, F., *et al.* (1985). Carrier induced epitopic suppression; a major issue for synthetic vaccines. *Journal of Immunology* **135**:2319-2322.

SHARMA, J.M. (1999). Introduction to poultry vaccines and immunity. *Advanced Veterinary Medicine* **41**:481-494.

SHARON, J. (1998). Basic Immunology, 1st Edn. 303 pp. Baltimore MD: Williams and Wilkins.

SHEN, X., LAGERGARD, T., YANG, Y., *et al.* (2000). Preparation and preclinical evaluation of experimental group B *Streptococcus* type III polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine for intranasal immunization. *Vaccine* **19**(7-8):850-861.

SHEN, X., LAGERGARD, T., YANG, Y., *et al.* (2001). Group B *Streptococcus* capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccines prepared by different methods for intranasal immunization. *Infection and Immunity* **69**(1):297-306.

SOMPAYRAC, L. (1999). How the Immune System Works. 111 pp. Oxford UK: Blackwell Science.

SONG, C.-S., YU, J.H., BAI, D.H., *et al.* (1985). Antibodies to the α-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *Journal of Immunology* **135**(5):3354-3359.

STEWART-TULL, D.E.S. (ed.) (1995). The Theory and Practical Application of Adjuvants. 392 pp. New York NY: Wiley.

STILLS, H.F. (1994). Polyclonal Antibody Production. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*, 2nd Edn. (eds. P.J. Manning, D.H. Ringler & C.E. Newcomer). Pp. 435-448. San Diego CA: Academic Press.

SVENDSEN, L., CROWLEY, A., OSTERGAARD, L.H., *et al.* (1995). Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolks. *Laboratory Animal Science* **45**:89-96.

TACKET, C.O., LOSONSKY, G., LINK, H. *et al.* (1988). Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *The New England Journal of Medicine* **318**(19):1240-1243.

TOTH, L.A., DUNLAP, A.W., OLSON, G.A., *et al.* (1989). An evaluation of distress following intraperitoneal immunization with Freund's Adjuvant in mice. *Laboratory Animal Science* **39**(2):122-126.

TUBOLY, T. et NAGY, E. (2001). Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. *Journal of General Virology* **82**(Pt. 1): 183-190.

WEEKE, B., WEEK, E. et LOWENSTEIN, H. (1975). The adsorption of serum proteins to aluminum hydroxide gel examined by means of quantitative immunoelectrophoresis. *Scandinavian Journal of Immunology* **4** (Suppl. 2):149.

WHARY, M.T., CAREY, D.D. et FERGUSON, F.G. (1998). Reduction in animal numbers required for antisera production using the subcutaneous chamber technique in rabbits. *Laboratory Animals* **32**:46-54.

3. Production d'anticorps monoclonaux

ANON. (1989). Code of Practice for the Production of Monoclonal Antibodies. 6 pp. Rijswijk, The Netherlands: Veterinary Health Inspectorate.

BORREBAEK, C.A.K. (1989). Strategy for the production of human monoclonal antibodies using *in vitro* activated B cells. *Journal of Immunological Methods* **123**:157-165.

BUNSE, R. et HEINZ, H.-P. (1994). Characterization of a monoclonal antibody to the

capsule of *Haemophilus influenzae* type b, generated by *in vitro* immunization. *Journal of Immunological Methods* **177**:89-99.

CHASE, J.C., DAWSON-COATES, J.A., HADDOW, J.D., *et al.* (2001). Analysis of kudoa thyrsites (*Myxozoa: Myxosporea*) spore antigens using monoclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms* **45**:121-129.

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1989). Politique du CCPA: Principes régissant la recherche sur les animaux. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/policies/politiqu.htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1997a). Lignes directrices du CCPA: révision de protocoles d'utilisation d'animaux d'expérimentation. 12 pp. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guframe. htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1997b). Lignes directrices du CCPA: animaux transgéniques. 12 pp. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guframe. htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1998). Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests. 30 pp. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guframe. htm).

CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (1999). Lignes directrices du CCPA: formation des utilisateurs d'animaux dans les institutions. 10 pp. Ottawa (ON): CCPA (http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guframe. htm).

DYKEWICZ, C.A., DATO, V.M., FISHER-HOCH, S.P., *et al.* (1992). Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with nude mice in a research institute. *Journal of the American Medical Association* **267**:1349-1353.

FALKENBURG, F.W. (1998). Monoclonal antibody production: Problems and solutions. *Research Immunology* **149**:542-547.

FALKENBERG, F.W., HENGELAGE, T., KRANE, M., *et al.* (1993). A simple and inexpensive high density dialysis tubing cell culture system for the *in vitro* production of monoclonal antibodies in high concentrations. *Journal of Immunological Methods* **165**: 193-206.

FALKENBERG, F.W., WEICHERT, H., KRANE, M., *et al.* (1995). *In vitro* production of monoclonal antibodies in high concentrations in a new and easy to handle modular minifermentor. *Journal of Immunological Methods* **179**:13-29.

GILLETTE, R.W. (1987). Alternatives to pristane priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods* **99**:21-23.

GRIMALDI, C.M. et FRENCH, D.L. (1995). Monoclonal antibodies by somatic cell fusion. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* **37**(3):125-132 (http://www4.nas.edu/cls/ijhome.nsf).

HENDRIKSEN, C.F.M. (1998). A call for a European prohibition of monoclonal antibody production by the ascites procedure in laboratory animals. *Alternatives to Laboratory Animals* **26**:523-540.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (ILAR) (1999). Monoclonal Antibody Production: A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. ILAR, NRC. Washington DC: National Academy Press (http://grants.nih.gov/grants/policy/antibodies.pdf).

JACKSON, L.R. et FOX, J.G. (1995). Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. *Institute*

for Laboratory Animal Research Journal **37**(3):141-152 (http://www4.nas.edu/cls/ijhome.nsf).

JACKSON, L.R., TRUDEL, B.A. et LIPMAN, N.S. (1999). Small scale monoclonal antibody production *in vitro*: Methods and resources. *Lab Animal* **28**(3):38-50.

JOHNSON, D.R. (1995). Murine Monoclonal Antibody Development. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 51: Antibody Engineering Protocols* (ed. S. Paul). Pp. 123-137. Totawa NJ: Humana Press.

JONES, S.L., COS, J.C. et PERSON, J.E. (1990). Increased monoclonal antibody ascites production in mice primed with Freund's Incomplete Adjuvant. *Journal of Immunological Methods* **129**:227-231.

KÖHLER, G. et MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.

KUHLMANN, I., KURTH, W. et RUHDEL, I. (1989). Monoclonal antibodies *in vivo* and *in vitro* production on a laboratory scale, with a consideration of the legal aspects of animal protection. *Alternatives to Laboratory Animals* **17**:73-82.

MUELLER, U.W., HAWES, C.S. et JONES, W.R. (1986). Monoclonal antibody production by hybridoma growth in Freund's Adjuvant primed mice. *Journal of Immunological Methods* **87**:193-196.

PETERSON, N.C. (1999). *In vitro* antibodies and good faith efforts: An overview of the NRC report on monoclonal antibody production. *Lab Animal* **Autumn special edition**:5-8.

PISTILLO, M.P., SYUERSO, V. et FERRARA, G.B. (1992). High yields of anti-HLA human monoclonal antibodies can be provided by SCID mice. *Human Immunology* **35**:256-259.

RUSSELL, W.M.S. et BURCH, R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen. 238 pp. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), Potters Bar, Herts, UK: England. **Special edition** (1992) (http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm).

SAXBY, S.J.Y. (1999). Perspective on *in vitro* production of monoclonal antibodies. *Lab Animal* **Autumn special edition**:9-11.

SHAVLEV, M. (1998). European and US regulation of monoclonal antibodies. *Lab Animal* **27**(2):15-17.

SMITH, J.M. et DE TOLLA, L.J. (1999). An IACUC guide to reviewing protocols calling for monoclonal antibody production by mouse ascites. *Lab Animal* **Autumn special edition**: 12-17.

SPICER, S.S., SPIVEY, M.A., ITO, M., *et al.* (1994). Some ascites monoclonal antibody preparations contain contaminants that bind to selected Golgi zones and mast cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **42**:213-221.

STEBECK, C.E., FREVERT, U., MOMMSEN, T.P., *et al.* (1996). Molecular characterization of glycosomal NAD+-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Molecular and Biochemical Parasitology* **76**:145-158.

ULLMAN-CULLERÉ, M.H. et FOLTZ, C.J. (1999). Body condition scoring: A rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science* **49**(3):319-323.

WORKMAN, P., TWENTYMAN, P., BALKWELL, F., *et al.* (1998). United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia, 2nd Edn., July 1997. *British Journal of Cancer* **77**: 1-10.

WU, R.L. et KEARNEY, R. (1980). Specific tumor immunity induced with mitomycin C-treated syngeneic tumor cells (MCT). Effects of carrageenan and trypan blue on MCT-induced immunity in mice. *Journal of the National Cancer Institute* **64**(1): 81-87.

YOUNG, M.W., MEADE, H., CURLING, J.M., *et al.* (1998). Production of recombinant antibodies in the milk of transgenic antibodies. *Research Immunology* **149**:609-610.

3.1 Autres références utiles

APPELMELK, B.J., VERWEIJ-VAN VUGHT, A.M., MAASKANT, J.J., *et al.* (1992). Murine ascites fluids contain varying amounts of an inhibitor that interferes with complement mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Immunological Letters* **33**: 135-138.

FROMER, M.J. (1997). NIH denies petition to ban *in vivo* mAb production: Lawsuit threatened. *Oncology Times* **19**:37-40.

MARX, U. et MERZ, W. (1995). *In Vivo* and *In Vitro* Production of Monoclonal Antibodies. Bioreactors versus Immune Ascites. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 45, Monoclonal Antibody Protocols* (ed. W.C. Davis). Pp. 169-176. Totowa NJ: Humana Press.

MARX, U., EMBLETON, J.M., FISCHER, R., *et al.* (1997). Monoclonal antibody production: The report and recommendations of ECVAM Workshop 23. *Alternatives to Laboratory Animals* **25**(2):121-137 (http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam23.htm).

MCARDLE, J. (1997/98). Alternatives to ascites production of monoclonal antibodies. National Agricultural Library, Beltsville MD. *Animal Welfare Information Center Newsletter* **8**(3-4):1-2, 15-18.

3.2 Renseignements supplémentaires

Informations générales sur AcM (http://altweb.jhsph.edu/topics/mabs/mabs.htm).

Liste de fournisseurs de AcM produits *in vitro* (http://www.frame.org.uk/Monoclonal_Suppliers.htm).

Nature Biotechnology Guide (http://www.guide.nature.com/).

University of California, Davis CA - Readings and Resources for mAbs (http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal_Alternatives/biblio~1.htm).

F. GLOSSAIRE

Adjuvant: Substance qui accroît la réponse immunitaire à un antigène lorsqu'elle est administrée au même moment et au même site que celui-ci. En présence d'un adjuvant, les doses d'antigène nécessaires sont moindres et la production d'anticorps dure plus longtemps.

Affinité: Force et stabilité du lien entre un épitope et un anticorps, mesurées par la quantité de complexe anticorps-antigène à l'équilibre.

Anticorps: Protéine produite en réponse à un antigène donné et qui possède une structure unique lui permettant de se combiner spécifiquement avec cet antigène. Les anticorps sont sécrétés par les lymphocytes et se divisent en cinq classes : IgG, IgM, IgA, IgE et IgD.

Anticorps monoclonaux: molécules d'anticorps produites par les cellules d'un clone et qui reconnaissent un seul épitope sur un antigène.

Anticorps polyclonaux: molécules d'anticorps produites par plusieurs familles de lymphocytes B et qui, par conséquent, reconnaissent plusieurs épitopes, y compris sur le même antigène.

Antigène: Toute substance à laquelle peut se lier un anticorps ayant pour fonction de lutter contre elle.

Antisérum: Sérum, c'est-à-dire l'ensemble des composantes non cellulaires du sang qui restent après la coagulation, qui est obtenu après l'injection d'antigènes et qui contient les anticorps produits en réponse à ces derniers.

Avidité: Force du lien existant entre un antigène et un anticorps. L'avidité dépend de l'affinité et des valences de l'antigène et de l'anticorps.

Cellules mémoires: Lymphocytes pouvant opposer une réponse rapide et intense à un nouvel antigène parce qu'elles y ont été préalablement exposées.

Clone: Ensemble de cellules génétiquement identiques et descendant de la même cellule.

- **Monoclonaux**: provenant du même clone et, par conséquent, génétiquement identique.
- **Polyclonaux**: provenant de clones différents.

Complément: Ensemble de protéines plasmatiques qui agissent conjointement pour attaquer des formes de pathogènes extra-cellulaires. Les compléments peuvent être activés spontanément par certains pathogènes ou par la liaison de l'anticorps sur le pathogène.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): Analyse immunologique au moyen d'antigènes ou d'anticorps marqués par une enzyme.

Épitope: Partie d'un antigène qui est reconnue par un anticorps. Un épitope ne peut se combiner qu'avec une seule molécule d'anticorps, mais un même antigène peut avoir plusieurs épitopes.

Formulation immunogène/adjuvant:

- **Émulsion**: mélange stable d'huile dans l'eau ou d'eau dans l'huile.
- **Formation de liposome**: dans un milieu aqueux, formation d'une particule sphérique constituée d'une bicouche lipidique entourant un compartiment aqueux.
- **Formation d'un complexe immunostimulant**: formation d'un complexe constitué d'un antigène retenu dans une matrice lipidique; celle-ci agit comme adjuvant et introduit l'antigène dans le cytoplasme d'une cellule par fusion de la partie lipidique avec la membrane plasmatique de celle-ci.
- **Adsorption**: attraction et rétention d'une substance sur une surface.

Granulome: Réponse inflammatoire chronique entretenue par une stimulation persistante.

Histocompatibilité: Degré de ressemblance génétique entre le donneur et le receveur d'une greffe.

- **Complexe majeur d'histocompatibilité**: gènes déterminant le rejet des greffes d'un individu à l'autre.

Hybridome: Hybride artificiel construit à partir d'une cellule lymphoïde productrice d'anticorps et d'une cellule myélomateuse maligne (immortelle).

Immunoblot: Technique d'identification des caractéristiques des antigènes protéiques. Le transfert de Western est un transfert par buvardage d'une protéine sur un papier de nitrocellulose, suivi de la détection de protéines spécifiques au moyen d'anticorps marqués.

Immunogène: Substance pouvant stimuler le système immunitaire.

Immunogénicité: Capacité de déclencher une réponse immunitaire.

Immunoglobuline: Membre d'un groupe de protéines ayant les propriétés des anticorps, que leur cible soit connue ou non. (Pour qu'une substance soit considérée comme un anticorps, l'antigène avec lequel elle se lie doit être connu.) Chez les mammifères, les anticorps comportent cinq classes d'immunoglobuline (Ig), soit IgM, IgG, IgA, IgD et IgE. Chez les oiseaux, ils se divisent en trois classes, soit IgM, IgY et IgA.

Immunohistochimie, immunoprécipitation, immunofluorescence, immunoélectromicroscopie: Techniques de détection ou de séparation moléculaire par la liaison des molécules avec des anticorps qui sont souvent marqués à l'aide de colorants fluorescents, par exemple, et qui permettent de reconnaître visuellement l'emplacement des molécules en question.

Liquide ascitique (ou ascite): Liquide intrapéritonéal que l'on extrait de l'organisme des animaux chez qui une tumeur péritonéale s'est développée.

Lymphocytes: Cellules qui circulent dans la lymphe et le sang et qui ont une fonction immunitaire. Ils se divisent en deux groupes les lymphocytes B et les lymphocytes T.

- **Lymphocytes B**: cellules produisant les anticorps et leurs précurseurs.
- **Lymphocytes T**: cellules constituant le fondement de l'immunité à médiation cellulaire et contribuant à la production des anticorps par les lymphocytes B.

Plasmocytes: Cellules spécialisées descendant des lymphocytes B et qui synthétisent des anticorps.

Réponse immunitaire: Réponse humorale ou à médiation cellulaire du système immunitaire en présence d'un antigène.

- **Réponse humorale**: production d'anticorps en réponse à la présence d'un antigène.
- **Réponse à médiation cellulaire**: liaison d'un type particulier de lymphocytes T, appelés lymphocytes T cytotoxiques, avec des cellules étrangères ou infectées, entraînant la lyse de ces cellules.

SCID: Syndrome d'immunodéficience sévère combinée.

Définitions inspirées des ouvrages suivants:

BACH, J.-F. (1993). Traité d'immunologie. Collection Médecine-Sciences. 1205 pp. Paris: Flammarion.

GENETET, N. (1997). Immunologie, 3e éd. Collection Biologie Médicale. 604 pp. Rennes: Ministère de l'éducation nationale, Éditions Médicales Internationales.

GODING, J.W. (1986). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 2nd Edn. 315 pp. London UK: Academic Press.

HARLOW, E. et LANE, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. 726 pp. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

REGNAULT, J.-P. (1988). Immunologie générale. 469 pp. Montréal: Descarie Éditeur.

le 15 février 2002

Pour obtenir de plus amples informations sur tout aspect de nos lignes directrices, veuillez contacter le:

Conseil canadien de protection des animaux
315-350 rue Albert
Ottawa (ON) CANADA K1R 1B1
(Site web: www.ccac.ca)

ANNEXE A

ADJUVANTS COMMUNS

Cette annexe est une liste des adjuvants les plus souvent utilisés et de leurs propriétés fondamentales. Cette liste n'est pas un appuie à un produit spécifique.

L'adjuvant complet de Freund (ACF) est une émulsion d'eau dans l'huile constituée d'huile minérale, de monooléate de mannide et de mycobactéries *Mycobacterium tuberculosis* (ou *M. butyricum*) tuées par chaleur, ou de composantes de cet organisme. L'ACF est un adjuvant puissant qui stimule la réponse immunitaire humorale et celle à médiation cellulaire. L'ACF est souvent fortement réactif parce que l'huile minérale ne peut pas être métabolisée et que les composantes mycobactériennes peuvent provoquer des réactions granulomateuses (inflammatoires) intenses. La concentration de mycobactéries varie grandement d'une préparation commerciale d'ACF à l'autre. À cet effet, il faut noter que si la concentration de mycobactéries est de moins de 0,5mg/ml, (0,1mg/ml selon Broderson [1989]), les réactions inflammatoires sont moins intenses.

L'adjuvant incomplet de Freund (AIF) est identique à l'ACF mais il ne contient pas de mycobactéries ni leurs composantes cellulaires. L'AIF est moins efficace que l'ACF pour la production d'importants titres d'anticorps et pour la stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Les adjuvants Ribi[MD] sont des émulsions d'huile dans l'eau où l'antigène est mélangé à un petit volume d'huile, puis émulsionné dans une solution saline contenant l'agent de surface Tween 80 (Ribi, *et al.*, 1975). Bien que les émulsions d'huile dans l'eau soient moins visqueuses et plus faciles à injecter que les émulsions d'eau dans l'huile, ce sont de piètres adjuvants lorsqu'elles sont utilisées seules et il faut des immunostimulants pour accroître leur immunogénicité. Les immunostimulants employés dans le système Ribi[MD] comprennent deux produits mycobactériens raffinés (tréhalose 6,6'-dimycolate et composantes du squelette de la paroi cellulaire) et un produit purifié de bactéries gram-négatives (lipide A monophosphoryle). Pour de plus amples explications concernant l'activité biologique des adjuvants Ribi[MD], voir Jennings (1995). Les adjuvants Ribi[MD] sont habituellement moins puissants que l'ACF, mais ils sont également moins toxiques et ont une activité suffisante pour de nombreux types d'utilisations.

Le lipide A monophosphoryle (une des composantes du système Ribi[MD]), peut être lui-même un adjuvant puissant. Tout comme l'hydroxyde d'aluminium, le LMP a un profil de sécurité bien documenté et c'est un adjuvant très efficace pour certains immunogènes.

L'adjuvant TiterMax[MD] est une émulsion d'eau dans l'huile de microparticules, qui est fabriquée à partir d'un copolymère séquencé non ionique (CRL-8941) et de squalène, une huile métabolisable. Le CRL-8941 est enduit de particules de silice qui stabilisent l'émulsion. L'une des principales propriétés du TiterMax[MD] est sa stabilité, qui lui permet de contenir une grande variété d'antigènes en l'absence de grandes quantités d'agents émulsifiants toxiques. Le copolymère transporte à sa surface une plus grande quantité d'antigène que si celui-ci était en solution. Il active aussi le complé-

ment, ce qui contribue à la rétention de l'antigène dans les tissus lymphoïdes et à l'activation des cellules immunoréactives. Le TiterMax[MD] accroît l'expression des molécules de classe II (Ia) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur les macrophages et améliore la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Lorsque le TiterMax[MD] donne de bons résultats, il permet la production de titres d'anticorps égaux ou supérieurs à l'ACF tout en étant moins toxique. Par contre, la stimulation par le TiterMax[MD] ne réussit pas toujours. De plus, ce produit contient de faibles quantités d'agents émulsifiants et de particules de silice qui peuvent jouer un rôle dans des réactions de type retardé au vaccin.

Le **Quil A** est une saponine ou un glucoside triterpénique tiré de l'écorce de l'arbre *Quila saponara* et que l'on purifie pour réduire la quantité de composantes causant des réactions inflammatoires localisées. De façon générale, les saponines ne doivent pas être administrées par voie intrapéritonéale ou intraveineuse parce qu'elles ont un effet hémolytique. Étant donné que le Quil A est seulement semi-purifié, il peut être pyrogène et causer des réactions localisées intenses. Par conséquent, avant d'utiliser un mélange contenant du Quil A, on devrait le tester *in vitro* (tel que pour mesurer sa toxicité sur une culture cellulaire). Les propriétés d'adjuvant du Quil A résultent de la formation de complexes immunostimulants qui sont particulièrement utiles pour la production d'anticorps contre des antigènes membranaires. Les complexes immunostimulants sont des clathrates de 35nm ressemblant à des micelles composées de Quil A, de cholestérol, de phosphatidylcholine et d'antigène. La composante de la saponine purifiée ayant l'indice adjuvant-toxicité le plus élevé est appelée QS21. Lorsqu'on cherche à produire des IgA, on ne doit jamais administrer les préparations contenant des saponines par les muqueuses comme la surface intranasale.

Adjuvants à base de substances minérales. Trois composés minéraux sont habituellement employés dans les adjuvants: soit l'hydroxyde d'aluminium; le phosphate d'aluminium; et le phosphate de calcium. On prétend que les sels d'aluminium sont les adjuvants qui ont la meilleure capacité de stimulation de la réponse immunitaire contre les immunogènes faibles, y compris ceux pour lesquels l'ACF n'a aucun effet. Les alhydrogels sont des gels stériles stables d'hydroxyde d'aluminium ne contenant aucun pyrogène, et ils ont une forte capacité d'adsorption. À un pH inférieur à 9, les alhydrogels portent une charge positive et ils adsorbent donc facilement les molécules chargées négativement (p. ex. protéines à un pH neutre).

L'ADN CpG est un activateur immunitaire non spécifique qu'on peut employer seul ou conjointement avec d'autres composantes d'adjuvants pour stimuler la réponse immunitaire. Les préparations commerciales d'ADN CpG contiennent de courts morceaux d'ADN (oligonucléotides) comportant des dinucléotides cytosine-guanine déméthylés avec un certain contact de base. Le système immunitaire des mammifères a évolué de sorte qu'il reconnaît ces séquences qui sont naturellement présentes dans l'ADN des bactéries et qui sont un signe d'infection. Diverses séquences d'ADN CpG activent le système immunitaire de différentes espèces, et les préparations commerciales de cet adjuvant sont donc spécifiques à certaines espèces.

Renseignements supplémentaires sur les adjuvants

The Adjuvant Guide: CEDARLANE Laboratories Limited (http://www.cedarlanelabs.com).

Animal Welfare Information Center, Information Resources for Adjuvant and Antibody Production: Comparisons and Alternative Technologies (1990-97) (http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/).

LEENARS, P.P.A.M. (1997). Adjuvants in Laboratory Animals. 207 pp. Rotterdam, The Netherlands: Erasmus University.

RIBI, E.T., MEYER, J., AZUMA R., *et al.* (1975). Biologically active components from mycobacterial cell walls IV. Protection of Mice Against Aerosol Infection with Virulent Mycobacterium tuberculosis. *Cellular Immunology* **16**:1-10.

STEWART-TULL, D.E.S. (ed.) (1995). The Theory and Practical Application of Adjuvants. 392 pp.New York NY: Wiley.

WEERATNA, R.D., McCLUSKIE, M.J., XU, Y. *et al.* (2000). CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* **18**:1755-1762.

ANNEXE B

IMMUNISATION – VOIES D'ADMINISTRATION ET VOLUMES RECOMMANDÉS

(adaptation de Leenars, *et al.*, 1999)

TABLEAU I VOIES D'INJECTION SUGGÉRÉES AVEC OU SANS ADJU-

Injection primaire		Rappel(s)	
avec adjuvant	**sans adjuvant**	**avec adjuvant**	**sans adjuvant**
S.C. I.M.+ I.D.‡ I.P.*	I.V. S.C. I.M. I.P. I.D.‡	S.C. I.M.+ I.D.‡	S.C. I.M. I.V. I.P. I.D.‡

* Seulement chez les souris et non recommandé en général.

\+ À ne pas utiliser pour des adjuvants visqueux sur de petits animaux.

‡ À ne pas utiliser chez les petits animaux et non recommandé en général.

TABLEAU II VOLUME MAXIMAL PAR SITE D'INJECTION DE MÉLANGES IMMUNOGÈNES/ADJUVANT FORMANT UN DÉPÔT, POUR DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES

Espèce	Volume maximal par site	Injection primaire	Injections subséquentes
Souris, hamsters	100µl (0,1ml)	S.C.	S.C.
Souris, hamsters	50µl (0,05ml)	I.M.+	I.M.+
Souris	500µl (0,5ml)	I.P.*	S.C., I.M.+
Cobayes, rats	200µl (0,2ml)	S.C., I.M.+	S.C., I.M.+
Lapins	250µl (0,25ml)	S.C., I.M.	S.C., I.M.
	25µl (0,025ml)	I.D.	S.C., I.M.
Mutons, chèvres, ânes, porcs	500µl (0,5ml) (dans des sites multiple, 250µl [0,25ml]/site)	S.C., I.M.	
Poulets	500µl	S.C., I.M.	

* Non recommandé en général pour la production d'AcP.

\+ Non recommandé en général pas pour les adjuvants visqueux en particulier.

TABLEAU III VOLUME D'INJECTION MAXIMAL RECOMMANDÉ D'ANTIGÈNES SANS ADJUVANTS, POUR DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES

	Volume maximal d'injection, millilitres				
	S.C.	**I.M.**	**I.D.**	**I.P.**	**I.V.**
Souris	0,5ml	0,05ml		1ml	0,2ml
Hamsters	1,0ml	0,1ml		2 à 3ml	0,3ml
Cobayes	1,0ml	0,1ml		10ml	0,5ml
Rats	1,0ml	0,1ml		5ml	0,5ml
Lapins	1,5ml	0,5ml	0,05ml	20ml	1 à 5ml
Moutons ou chèvres	5,0ml		0,05ml	10ml	30ml
Porcs (<50kg)	3,0ml	2,0ml	0,1ml	250ml	20ml
Poulets	4,0ml	0,5ml		10ml	0.5ml

Il s'agit ici des volumes maximaux suggérés; on trouvera des informations supplémentaires dans les ouvrages suivants:

BAUMANS, V., TENBERG, R.G.M., BERTENS, A.P.M.G., *et al.* (1993). Experimental Techniques. In: *Principles of Laboratory Animal Science* (eds. L.F.M. van Zutphen, V. Baumans & A.C. Beynen). Pp. 299-318. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

DIEHL, K.-H., HULL, R., MORTON, D., *et al.* (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**:15-23.

HARLOW, E. et LANE, D. (1988). Adjuvants. In: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Pp. 96-124. Cold Spring Harbour NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

HERBERT, W.J. et KRISTENSEN, F. (1986). Laboratory Animal Techniques for Immunology. In: *Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, Immunology – Laboratory Manuals* (ed. D.M. Weir). Pp. 133.1-133.13. Oxford UK: Blackwell.

LEENARS, M.P.P.A., HENDRIKSEN, C.F.M., DE LEEUW, W.A., *et al.* (1999). The production of polyclonal antibodies in laboratory animals: The report and recommendations of ECVAM Workshop 35. *Alternatives to Laboratory Animals* **27**(1):79-102 (http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam35.htm).

ANNEXE C

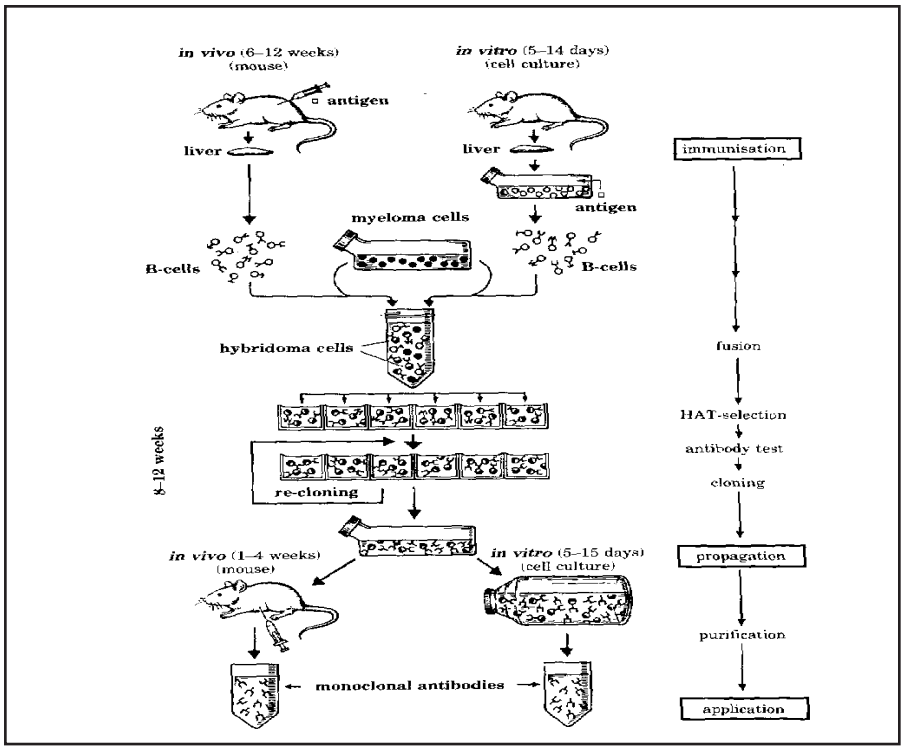
ÉTAPES DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Création et sélection des hybridomes

La première étape (création et sélection des hybridomes) se fait généralement à l'aide d'un ou de plusieurs rats ou souris. Dans le cas des souris, on recommande qu'elles soient âgées de six à huit semaines et exemptes de toute infection.

1. L'antigène est généralement, mais pas toujours, injecté à l'animal conjointement avec un adjuvant dont la fonction est d'accroître la réponse immunitaire (voir Partie C.2-C.7 – *Protocole d'immunisation, Procédés normalisés de fonctionnement, Préparation de l'immunogène, Choix de l'adjuvant, Voie d'injection* et *Volume d'injection et nombre de sites d'injection*).
2. En général, le délai minimal entre les doses de rappel d'immunogène doit être de sept à dix jours sauf dans le cas d'un protocole d'immunisation rapide sans adjuvant.

Production d'anticorps monoclonaux à l'échelle du laboratoire – *in vivo* (souris) et *in vitro* (culture de cellules)



Reproduit avec la permission de Kuhlmann, I., Kurth, W. et Ruhdel, I. (1989). Monoclonal antibodies: *In vivo* and *in vitro* production on a laboratory scale, with a consideration of the legal aspects of animal protection. *Alternatives to Laboratory Animals* **17**:73-82.

3. On doit effectuer les saignées d'essai trois jours après le dernier rappel pour vérifier qu'il y a une réponse appropriée contre l'antigène et qu'il y a production des anticorps spécifiques. La plupart des tests immunologiques servant à déterminer s'il y a production des anticorps désirés nécessitent moins de 10μl de sérum murin. Après avoir confirmé l'existence de la réponse recherchée, on doit administrer un autre rappel à la souris, puis l'euthanasier trois jours plus tard et prélever sa rate; on isole alors les cellules lymphoïdes de cet organe et, dans certains cas, des ganglions lymphatiques.

4. Par l'ajout de polyéthylène glycol qui favorise la fusion des membranes, on fait fusionner les cellules lymphoïdes avec des cellules myélomateuses parentales cultivées *in vitro*. Seule une petite partie des cellules se fusionnent avec succès.

5. Le mélange formé par les deux types de cellules non fusionnées et les nouvelles cellules hybrides est placé sur un milieu de culture sélectif contenant du HAT, un mélange d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine. L'aminoptérine contenue dans le HAT est une toxine puissante qui bloque l'une des voies métaboliques. La cellule peut contourner ce blocage si elle est en présence des métabolites intermédiaires que sont l'hypoxanthine et la thymidine. Les cellules de la rate croissent sur le HAT parce qu'elles peuvent utiliser cette voie métabolique de rechange, mais les cellules myélomateuses ont une déficience qui les en empêche et elles finissent donc par mourir. Les cellules de la rate meurent naturellement au bout d'une à deux semaines de culture, mais les cellules fusionnées survivent parce qu'elles ont acquis à la fois l'immortalité des cellules myélomateuses et la voie métabolique de rechange des cellules de la rate. Certaines cellules fusionnées héritent également de la capacité de production d'anticorps des cellules de la rate.

6. Par des procédures de dosage immunologique, on trie les hybridomes qui sécrètent l'anticorps recherché. Si le résultat est positif, on clone les cultures en étalant les cellules pour en placer une seule dans chaque cupule. On obtient ainsi un clone issu d'une même cellule d'origine immortelle et productrice d'anticorps.

7. Les hybridomes ainsi sélectionnés sont souvent clonés deux ou trois fois *in vitro* pour assurer la production de cultures d'hybridomes véritablement monoclonaux dont les anticorps ont une spécificité unique (voir Partie D.3.2 – *Contamination*). À cette étape, on multiplie les cellules pour les préparer à la *cryopréservation*.

8. On peut multiplier les hybridomes ainsi clonés soit en continuant de les cultiver *in vitro*, soit *in vivo*. On trouvera des sources d'information sur les systèmes de production *in vitro* à l'Annexe D.

ANNEXE D

INFORMATIONS SUR LES TECHNIQUES DE PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX *IN VITRO*

74th Forum in Immunology. *Research Immunology* **149**:533-620, 1998.

DE GEUS, B. et HENDRIKSEN, C.F.M. *In vivo* and *in vitro* production of monoclonal antibodies: Current possibilities and future perspectives. 533-534.

FALKENBERG, F.W. Monoclonal antibody production: Problems and solutions. 542-547.

LIPSKI, L.A., WITZLEB, M.P. et REDDINGTON, G.M. Evaluation of small to moderate scale *in vitro* monoclonal antibody via the use of the i-mab™ gas-permeable bag system. 547-552.

PETERSON, N.C. Considerations for *in vitro* monoclonal antibody production. 553-557.

MARX, U. Membrane-based cell culture technologies: A scientifically and economically satisfactory alternative to malignant ascites production for monoclonal antibodies. 557-559.

FALKENBERG, F.W. Production of monoclonal antibodies in the miniperm™ bioreactor: Comparison with other hybridoma culture methods. 560-570.

LIPMAN, N.S. et JACKSON, L.R. Hollow fibre bioreactors: An alternative to murine ascites for small scale (<1g) monoclonal antibody production. 571-576.

SHI, Y., SARDONNI, C.A. et GOFFE, R.A. The use of oxygen carriers for increasing the production of monoclonal antibodies from hollow fibre bioreactors. 576-587.

DE GEUS, B. The next generation of antibodies: Production of recombinant antibodies or fragments derived thereof. 587-589.

FRENKEN, L.G.J., HESSING, J.G.M., VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J., *et al.* Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms. 589-599.

PENNELL, C.A. et ELDIN, P. *In vitro* production of recombinant antibody fragments in *Pichia Pastoris*. 599-603.

LARRICK, J.W., YU, J., CHEN, S., *et al.* Production of antibodies in transgenic plants. 603-608.

ALTSHULER, G.L., DZIEWULSKI, D.M., SOWEK, J.A., *et al.* (1986). Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors-separators. *Biotechnology and Bioengineering* **28**:646-658.

AMOS, B., AL-RUBEAI, M. et EMERY, A.N. (1994). Hybridoma growth and monoclonal antibody production in a dialysis perfusion system. *Enzyme and Microbial Technology* **16**(8):688-695.

BLASEY, H.D. et WINZER, U. (1989). Low protein serum-free medium for antibody production in stirred bioreactors. *Biotechnology Letters* **11**(7):455-460.

BLIEM, R., OAKLEY, R., MATSUOKA, K., *et al.* (1990). Antibody production in packed bed reactors using serum-free and protein-free medium. *Cytotechnology* **4**(3):279-283.

BOYD, J.E. et JAMES, K. (1989). Human Monoclonal Antibodies: Their Potential, Problems and Prospects. In: *Monoclonal Antibodies: Production and Application* (ed. A. Mizrahi). Pp. 1-43. New York NY: Alan R. Liss.

BRENNAN, A., DENOMME, L., VELEZ, D., *et al.* (1987). A novel perfusion system for growth of shear-sensitive hybridoma cells and

antibody production in a stirred reactor. *Abstracts from the Annual Meeting of the American Society of Microbiologists* **87**: 268.

BUGARSKI, B., KING, G.A., JAVANOVIC, G., *et al.* (1989). Performance of an external loop airlift bioreactor for the production of monoclonal antibodies by immobilized hybridoma cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**:264-269.

FALKENBERG, F.W., HENGELAGE, F.W.T., KRANE, M., *et al*. (1993). A simple and inexpensive high density dialysis tubing cell culture system for the *in vitro* production of monoclonal antibodies in high concentration. *Journal of Immunological Methods* **165**: 193-206.

FALKENBERG, F.W., WEICHERT, W.H., KRANE, M., *et al.* (1995). *In vitro* production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter. *Journal of Immunological Methods* **179**:13-29.

GOODALL, M. (1997). Production of monoclonal antibodies: *In vivo* versus *in vitro* methods. In: *Animal Alternatives, Welfare and Ethics:* Proceedings of the 2nd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. (eds. L.F.M. van Zutphen & M. Balls) Pp. 965-972. Amsterdam: Elsevier.

GORTER, A., VAN DE GRIEND, R.J., VAN EENDENBURG, J.D., *et al.* (1993). Production of bi-specific monoclonal antibodies in a hollow fibre bioreactor. *Journal of Immunological Methods* **161**(2):145-150.

HEIDEL, J.R. et STANG, B.V. (1997). Monoclonal antibody production in gas-permeable tissue culture bags using serum-free media. In: *CAAT Technical Report #8: Alternatives in Monoclonal Antibody Production*, September 1997.

HEIDEMANN, R., RIESE, U., LUTKEMEYER, D., *et al.* (1994). The super spinner: A low cost animal cell culture bioreactor for the CO_2 incubator. *Cytotechnology* **14**(1):1-9.

HEWISH, D. (1996). Ascites and alternatives. *Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching News* **9**(2):8-10.

HOFMANN, F., WRASIDLO, W., DEWINTER, D., *et al.* (1989). Fully Integrated, Compact Membrane Reactor System for the Large Scale Production of Monoclonal Antibodies. In: *Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses* (eds. R.E. Spier, *et al.*). 585 pp. Kent, England: Butterworths, Seven Oaks.

HOLLEY, M.C. (1992). A simple *in vitro* method for raising monoclonal antibodies to cochlear proteins. *Tissue Cell* **24**(5):613-624.

HOPKINSON, J. (1985). Hollow fiber cell culture systems for economical cell-product manufacturing. *Bio*/*Technology* **3**:225-230.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (ILAR) (1999). Monoclonal Antibody Production: A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. ILAR, NRC. Washington DC: National Academy Press (http://grants.nih.gov/grants/policy/antibodies.pdf).

JACKSON, L.R. et FOX, J.G. (1995). Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* **37**(3): 141-152.

JACKSON, L.R., TRUDEL, L.J., FOX, J.G., *et al.* (1996). Evaluation of hollow fiber bioreactors as an alternative to murine ascites production for small scale monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods* **189**(2):217-231.

JACKSON, L.R., TRUDEL, L.J. et LIPMAN, N.S. (1999). Small-scale monoclonal antibody production *in vitro*: Methods and resources. *Lab Animal* **Autumn special edition**:20-30.

JASPERT, R., GESKE, T., TEICHMANN, A., *et al.* (1995). Laboratory scale production of monoclonal antibodies in a tumbling chamber. *Journal of Immunological Methods* **178**:77-87.

JENSEN, D'A. et PETRIE SMITH, C. (1999). Selected list of company and institute resources providing new technologies in monoclonal antibody production. *Lab Animal* **Autumn special edition**:31-34.

KAGAN, E., VIERA, E. et PETRIE, H.T. (1997). Comparison of hollow fiber bioreactors and modular minifermentors for the production of mAbs *in vitro*. In: *CAAT Technical Report #8: Alternatives in Monoclonal Antibody Production*, September 1997.

KARU, A.E. (1993). Monoclonal Antibodies and Their Use in Detection of Hazardous Substances. In: *Hazard Assessment of Chemicals-Current Developments* (ed. J. Saxena). Pp. 205-321. Washington DC: Taylor & Francis International Publishers.

KUHLMANN, I., KURTH, W. et RUHDEL, I. (1989). Monoclonal antibodies: *In vitro* and *in vivo* production on a laboratory scale, with a consideration of the legal aspects of animal protection. *Alternatives to Laboratory Animals* **17**:73-82.

KURKELA, R., FRAUNE, E. et VIHKO, P. (1993). Pilot-scale production of murine monoclonal antibodies in agitated, ceramic-matrix, or hollow-fiber cell culture systems. *Biotechniques* **15**(4):674-683.

LERNER, R.A., KANG, A.S., BAIN, J.D., *et al.* (1992). Antibodies without immunization. *Science* **258** (November 20):1313-1314.

LOWREY, D.M., MESLOVICH, K., NGUYEN, A., *et al.* (1994). Monoclonal antibody production and purification using miniature hollow fiber cell culture technology. *American Biotechnology Laboratory* **12**(6):16-17.

MARX, U. et MERZ, W. (1995). *In Vivo* and *In Vitro* Production of Monoclonal Antibodies. Bioreactors versus Immune Ascites. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 45, Monoclonal Antibody Protocols* (ed. W.C. Davis). Pp. 169-176. Totowa NJ: Humana Press.

MARX, U., EMBLETON, M.J., FISCHER, R., *et al.* (1997). Monoclonal antibody production. The report and recommendations of ECVAM Workshop 23. *Alternatives to Laboratory Animals* **25**(2):121-137 (http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam23.htm).

MCARDLE, J. (1997/98). Alternatives to ascites production of monoclonal antibodies. National Agricultural Library, Beltsville MD. *Animal Welfare Information Center Newsletter* **8**(3-4):1-2, 15-18.

MORO, A.M., RODRIGUES, M.T.A., GOUVEA, M.N., *et al.* (1994). Multiparametric analyses of hybridoma growth on cylinders in a packed-bed bioreactor system with internal areation. Serum-Supplementation and Serum-Free Media Comparison for mAb Production. *Journal of Immunological Methods* **176**: 67-77.

OH, D.J., CHOI, S.K. et CHANG, H.N. (1994). High-density continuous cultures of hybridoma cells in a depth filter perfusion system. *Biotechnology and Bioengineering* **44**(8):895-901.

PANNELL, R. et MILSTEIN, C. (1992). An oscillating bubble chamber for laboratory scale production of monoclonal antibodies as an alternative to ascitic tumours. *Journal of Immunological Methods* **146**:43-48.

PERSSON, B. et EMBORG, C. (1992). A comparison of three different mammalian cell bioreactors for the production of monoclonal antibodies. *Bioprocess Engineering* **8**(3-4): 157-163.

PETRIE, H. (1997). Modular bioreactors as an alternative to ascitic fluid production of monoclonal antibodies. *Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching News* **10**(2):6.

PETROSSIAN, A. et CORTESSIS, G.P. (1990). Large-scale production of monoclonal antibodies in defined serum-free media in airlift bioreactors. *Biotechniques* **8**(4):414-422.

RAMIREZ, O.T., MUTHARASAN, R. et MAGEE, W.E. (1987). A novel immobilized hybridoma reactor for the production of monoclonal antibodies. *Biotechnology Techniques* **1**(4):245-250.

REUVENY, S. et LAZAR, A. (1989). Equipment and Procedures for Production of Monoclonal Antibodies in Culture. In: *Monoclonal Antibodies: Production and Application* (ed. A. Mizrahi). Pp. 45-80. New York NY: Alan R. Liss.

REUVENY, S., VELEZ, D., MACMILLAN, J.D., *et al.* (1986a). Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of Immunological Methods* **86**:53-59.

REUVENY, S., VELEZ, D., MILLER, L., *et al.* (1986b). Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermenters. *Journal of Immunological Methods* **86**:61-69.

RUHDEL, I. et KUHLMANN, I. (1994). Production of monoclonal antibodies in roller bottles with reduced serum concentrations and serum substitutes. *Bioengineering* **10**(2): 15-18, 21-22.

SAXBY, S. (1999). Commercial Production of Monoclonal Antibodies. In: *Proceedings of the Production of Monoclonal Antibodies Workshop*, August 1999 (eds. J.E. McArdle & C.J. Lund). Alternatives Research and Development Foundation (http://altweb.jhsph.edu/topics/mabs/ardf/saxby.htm).

SCHELLING, M.E. (1995). Methods of Immunization to Enhance the Immune Response to Specific, Antigens *In Vitro*. In: *Methods in Molecular Biology: Vol. 45, Monoclonal Antibody Protocols* (ed. W.C. Davis). Totowa NJ: Humana Press.

SHEVITZ, J., REUVENY, S., LAPORTE, T.L., *et al.* (1989). Stirred tank perfusion reactors for cell propagation and monoclonal antibody production. *Advanced Biotechnology Processes* **11**:81-106.

SHUEH, L., SITLANI, S. et BECK, T. (1993). Monoclonal antibody production by artificial capillary hybridoma culture. Joint meeting of the American Association of Immunologists and the Clinical Immunology Society, May 21-25, 1993, Denver CO. *Journal of Immunology* **150**(8 Pt. 2):327A.

SJÖRGREN-JANSSON, E. et JEANSON, S. (1990). Growing Hybridomas in Dialysis Tubing, Optimization of Technique. In: *Laboratory Methods in Immunology* (ed. E. Zola). Pp. 1-41. Boca Raton FL: CRC Press.

VAN DER KAMP, M. et DE LEEUW, W. (1996). Short review of *in vitro* methods for monoclonal antibodies. *Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use Newsletter* **3**: 10-12.

WANG, G.Z., ZHANG, W.Y., FREEDMAN, D., *et al.* (1992). Use of packed bed reactor for production of monoclonal antibodies. *Molecular Biology of the Cell* **3** (Suppl.):185A.

WEICHERT, H., FALKENBERG, F.W., KRANE, M., *et al.* (1995). *In Vitro* Production of Monoclonal Antibodies in High Concentration in a New and Easy to Handle Modular Minifermenter. In: *Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences Series, Vol. 11, Proceedings of the World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Research, Testing* (eds. A.M. Goldberg & L.F.M. van Zutphen). Pp. 253-259. New York NY: Mary Ann Liebert, Inc.

WEICHERT, H., KRANE, M., BARTELS, I., *et al.* (1994). *In vitro* production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter. *In Vitro Toxicology* **7**(2):193.