



La présente information technique est une version actualisée de la directive « Production d'anticorps conforme à la protection des animaux chez lapins, les poules et les rongeurs de laboratoire 3.04 ». On a actualisé les renvois aux textes de lois.

Juillet 2017

## Information technique expérimentation animale

# Production d'anticorps conforme à la protection des animaux chez les lapins, les poules et les rongeurs de laboratoire 3.04

### A But et champ d'application

Les anticorps sont des auxiliaires et des réactifs employés non seulement dans des procédés relatifs à la biochimie, la biologie moléculaire et l'immunohistochimie, mais aussi à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Selon la méthode utilisée, la production d'anticorps provoque des réactions inflammatoires plus ou moins aiguës chez l'animal. Le but de cette information technique est de présenter les possibilités de réduire la contrainte subie par l'animal lors de la production d'anticorps (amélioration du procédé ou « **refinement** »).

La présente information technique traite principalement la question de la production d'**anticorps polyclonaux**. Elle est applicable également, par analogie, à l'immunisation de souris et d'autres rongeurs de laboratoire réalisée avant la production *in vitro* d'**anticorps monoclonaux**. Elle n'aborde pas la question de l'immunisation préventive (vaccins) ni celle de la production de sérums immunologiques (produits biologiques).

La présente information technique s'adresse à toutes les personnes qui exécutent, ordonnent ou surveillent les immunisations réalisées en vue de la production d'anticorps (**chercheurs, personnel de laboratoire, responsables d'expériences, délégués à la protection des animaux**). Elle s'adresse également à **l'autorité compétente chargée de délivrer les autorisations ainsi qu'à sa commission consultative**.

### B Bases légales et principes régissant l'octroi des autorisations

La production d'anticorps est une **expérience sur animaux qui, lors de sa réalisation, impose des douleurs, des maux ou des souffrance à l'animal. Or, des douleurs, des maux ou des dommages ou un état d'anxiété ne peuvent être imposés à un animal que si le but de l'expérience ne peut être atteint d'une autre manière** (cf. art. 20 de la loi du 16 décembre 2005 sur la protection des animaux, LPA ; RS 455)

Les expériences sur animaux ne peuvent être exécutées que sous la direction d'un spécialiste expérimenté et par des personnes disposant des **connaissances professionnelles** nécessaires et de la **formation pratique requise** (cf. art. 134 de l'ordonnance du 23 avril 2008 sur la protection des animaux, OPAn).

La production d'anticorps requiert des connaissances précises sur:

N° 3.04\_f | mars 1999

- le potentiel inflammatoire des différents adjuvants en soi et en fonction des méthodes et des volumes d'injection,
- les divers degrés de contrainte propres à chaque voie d'injection,
- les techniques de prélèvement de sang conformes à la protection des animaux et les volumes de prélèvement admis pour les différentes espèces animales conformément à l'information technique de l'OSAV 3.02,
- les effets secondaires indésirables des combinaisons antigène/adjuvant choisies.

Le chercheur doit maintenir ses **connaissances à jour** par l'étude de la littérature spécialisée ou au moyen d'autres méthodes appropriées, et prêter une attention particulière aux méthodes de substitution au sens des 3R.

L'autorité qui délivre l'autorisation est tenue de s'assurer, au moyen de **charges** s'il le faut, que seules des méthodes ménageant les animaux sont appliquées et que celles-ci sont exécutées selon la présente information technique par des personnes disposant des connaissances professionnelles requises.

## C Principes de l'immunisation ménageant les animaux

### 1 Bases d'immunologie

Lors de la production d'anticorps, on tire parti de la réaction naturelle de défense du corps contre les molécules étrangères immunogènes de taille suffisante: les organismes étrangers ayant pénétré dans le corps, les toxines voire les cellules mortes du corps lui-même sont neutralisés et/ou éliminés lors d'une interaction complexe et contrôlée entre cellules et médiateurs. Les étapes essentielles de cette interaction sont le **transport** de l'antigène, via la lymphe ou le sang, du lieu de pénétration aux cellules de défenses spécifiques, situées dans les ganglions lymphatiques et la rate, la **présentation de l'antigène** par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T auxiliaires et, enfin, **l'activation des cellules de défense spécifiques à l'antigène** et leur transformation en plasmocytes produisant les anticorps (réponse humorale) et/ou en cellules T cytotoxiques (réponse à médiation cellulaire) et en cellules B à mémoire dans la rate et les ganglions lymphatiques.

Un nouveau contact avec le même antigène provoquera une réponse plus rapide et plus forte. Ne survivant que quelques jours, voire quelques semaines, les plasmocytes doivent être remplacés continuellement par **réactivation des cellules douées de mémoire**.

### 2 Choix de l'espèce animale

Selon les interventions à effectuer sur l'animal en vue de produire des anticorps, il y a lieu de tenir compte des facteurs suivants lors du choix de l'espèce animale: docilité, sensibilité au stress, possibilités d'application ainsi que, suivant les quantités de sérum nécessaires, accès aux vaisseaux sanguins et volume sanguin total. Jouent, en outre, un rôle décisif le patrimoine génétique, la distance phylogénétique par rapport à l'espèce d'origine ainsi que le type d'anticorps à produire.

Il faut, dans tous les cas, tenir suffisamment compte des **exigences de détention** spécifiques à chaque espèce (détention en groupe pour les espèces sociables, enclos structurés, occupation).

Table 1: Critères régissant le choix de l'espèce animale

espèce animale	production de sérum <sup>1</sup>	exigences de détention
lapin	simple	détention en groupe, possibilité de ronger
poule	ne s'applique pas	détention par paire, nid, perchoir, litière

espèce animale	production de sérum <sup>1</sup>	exigences de détention
souris	uniquement préterminale	détention en groupe, occupation
rat	uniquement préterminale	détention en groupe, occupation
cobaye	préterminale s'il y a lieu, une seule ponction cardiaque	détention en groupe, possibilité de ronger

<sup>1</sup> cf. information technique 3.02 de l'OSAV

La meilleure production d'anticorps est obtenue chez les jeunes adultes. En effet, les animaux trop jeunes ne sont pas entièrement immunocompétents. C'est pourquoi nous recommandons, selon l'espèce concernée, l'**âge** suivant pour la première immunisation:

lapin: 3 mois  
poule: 5 mois  
souris: 6 semaines  
rat: 6 semaines  
cobaye: 3 mois

### 3 Immunisation

Pour les immunisations de routine, on déterminera la procédure d'immunisation optimale (bonne production d'anticorps par rapport à une contrainte minimale infligée à l'animal) pour chaque espèce animale utilisée et pour chaque combinaison antigène/adjuvant à l'aide d'**études pilotes**. Cette règle ne s'applique pas aux immunisations occasionnelles, pour lesquelles la contrainte subie par l'animal peut cependant être réduite en tenant compte de certains facteurs décrits dans les chapitres suivants.

#### 31 Antigènes

Les bonnes **substances immunogènes** induisent des titres d'anticorps élevés, produisent des anticorps de haute affinité (force de la liaison) et une mémoire immunologique. Les antigènes corpusculaires, tels que des bactéries ou des cellules entières ou des fractions de la paroi cellulaire produisent en général l'effet désiré sans qu'il soit nécessaire de faire usage d'un adjuvant. Les adjuvants sont le plus souvent nécessaires lorsqu'on procède à une immunisation au moyen d'antigènes natifs ou solubles (protéines, peptides, polysaccharides) et lorsque l'antigène est présent en très faible quantité.

Pour qu'il puisse provoquer la formation d'anticorps, l'antigène doit être présent dans un intervalle de concentration caractéristique (entre environ 10µg - 1 mg, **zone d'immunogénicité**). En dehors de cette zone, point de formation d'anticorps (répression de la réponse immunitaire, tolérance). Il faut en tenir compte lors de la détermination de la dose d'antigène.

La **stérilité de l'inoculum** revêt une grande importance non seulement pour la réussite de l'immunisation mais aussi pour la réduction de la contrainte subie par l'animal d'expérience. Lors de la préparation de l'antigène, il faut donc éviter toute contamination de l'inoculum avec des germes ou des substances étrangères, avec leurs composants ou avec des résidus (solvants toxiques, antigènes extraits de gels). Plus l'antigène est pur, plus la spécificité de l'anticorps est élevée et, en règle générale, moins nombreux sont les effets secondaires de l'immunisation. C'est la raison pour laquelle nous recommandons de contrôler la stérilité de la solution contenant l'antigène avant l'injection et, le cas échéant, de la décontaminer (filtration) ou de la jeter.

#### 32 Utilisation d'adjuvants

Les adjuvants sont des substances auxiliaires de composition des plus diverses utilisées pour renforcer et/ou prolonger une réponse immunitaire. Ils agissent sur le niveau et l'évolution du titre d'anticorps, sur l'avidité et le type de la réponse immunitaire (humorale ou à médiation cellulaire, type

de l'anticorps). Divers **mécanismes d'action** sont connus: formation d'un dépôt (protection de l'antigène contre sa destruction et libération continue), amélioration de la présentation de l'antigène par la concentration/agrégation de l'antigène (surfactants dont les stabilisateurs, les substances véhicules et porteuses), facilitation du transport de l'antigène vers les centres de défense (véhicules) et activation de l'inflammation (bactéries, endotoxines, lipide A, dérivés de bactéries ainsi que certains surfactants).

Selon l'antigène, l'espèce animale, mais aussi le site et le volume d'injection, les adjuvants peuvent provoquer des **effets secondaires** d'intensité variable, tels que des granulomes, des abcès, des fistules, des ulcères, des nécroses, des péritonites ou des embolies mortelles. Pour cette raison, il convient de **déterminer avec soin s'il y a lieu d'utiliser un adjuvant** et, dans l'affirmative, de limiter son utilisation au strict nécessaire. Si le recours à un adjuvant est nécessaire, on choisira celui qui provoque la contrainte la plus faible.

Table 2: **Potentiel inflammatoire** des divers composants d'un adjuvant

Composants d'un adjuvant		Potentiel inflammatoire	Exemples d'adjuvants avec leurs composants correspondants
<b>bactéries</b> <b>dérivés synthétiques</b>	mycobactéries	+++	AFC <sup>1</sup>
	MDP <sup>2</sup>	++	SAF <sup>3</sup> , Gerbu
	TDM <sup>4</sup>	+	RIBI
	MPL <sup>5</sup>	-	RIBI
<b>huiles</b>	Huile minérale	++	AF <sup>6</sup> , Specol, Montanide Titermax, SAF, Montanide
	Squalen, Squalan	+	
<b>saponines</b>	Quil A	++(+)	ISCOMs <sup>7</sup>
	ISCOMs <sup>7</sup> avec Quil A	-	
<b>sels d'aluminium</b>		(+)	Alhydrogel

<sup>1</sup> Adjuvant de Freund complet

<sup>2</sup> Muramyldipeptide

<sup>3</sup> Syntex Adjuvant Formulation

<sup>4</sup> Trehalose Dimycolat

<sup>5</sup> Monophosphoryl Lipid A

<sup>6</sup> Adjuvant de Freund

<sup>7</sup> immunestimulating complexes

### 33 Volumes d'injection acceptables par site d'injection (au minimum 4 dépôts sous-cutanés ou intradermiques)

Table 3: Solution d'antigène avec adjuvant

	Sous-cutanée	Intra-dermique	Intra-musculaire	Intra-péritonéale	Intra-veineuse	patte
lapin	0,25 ml	(0,025 ml)	-	-	-	-
poule	0,5 ml	-	(0,5 ml)	-	-	-
souris	0,1 ml	-	-	(0,2 ml)	-	-
rat	0,2 ml	-	-	(0,2 ml)	-	-
cobaye	0,2 ml	-	-	-	-	-

Table 4: Solution d'antigène sans adjuvant

	Sous-cutanée	Intra-dermique	Intra-musculaire	Intra-péritonéale	Intra-veineuse	patte
lapin	1,5 ml	(0,05 ml)	-	(10 ml)	(5 ml)	-
poule	4 ml	-	0,5 ml	(10 ml)	(0,5* ml)	(0,05 ml)
souris	0,5 ml	-	-	1 ml	-	(0,1ml)
rat	1 ml	-	-	5 ml	(0,5 ml)	-
cobaye	1 ml	-	-	(5 ml)	-	-

\* 0,5 ml par kg de poids corporel; ( ) justifier le choix de cette méthode d'injection; - pour ces espèces cette méthode d'injection est à rejeter.

### 34 Méthodes d'injection

Sont efficaces les méthodes d'injection permettant une diffusion rapide et étendue de l'antigène dans les ganglions lymphatiques et la rate. Le choix de la méthode dépend de l'espèce animale, de l'adjuvant ainsi que de la nature et de la quantité d'antigène. Parmi les méthodes possibles, il faut choisir celle qui fait subir la contrainte la plus faible à l'animal.

Table 5: Pour les injections, il faut utiliser des **aiguilles stériles jetables** et pointues. Nous recommandons les diamètres suivants:

	Sous-cutanée	Intradermique	Intra-musculaire	Intra-péritonéale	Intraveineuse
lapin	Ø 0,9 mm	(Ø 0,45 mm)	-	(Ø 0,8 mm)	(Ø max. 0,9 mm)
poule	Ø 0,6 mm	-	Ø max. 0,8 mm	(Ø 0,8 mm)	(Ø 0,6 mm)
souris	Ø max. 0,5 mm	-	-	Ø max. 0,6 mm	-
rat	Ø max. 0,6 mm	-	-	Ø 0,6 mm	(Ø max. 0,5 mm)
cobaye	Ø max. 0,9 mm	-	-	(Ø 0,6 mm)	-

- méthode d'injection à rejeter pour cette espèce animale; ( ) justifier le choix de cette méthode d'injection.

Il est recommandé, pour les solutions huileuses tout particulièrement, de procéder à des injections lentes et par la voie sous-cutanée.

#### Injections multiples

Les volumes d'injection importants (**difficultés à obtenir un antigène concentré**) doivent être répartis sur **quatre dépôts au maximum**. Ces dépôts sous-cutanés ou intradermiques doivent être espacés les uns des autres. Les inoculums contenant des adjuvants **très irritants** doivent être répartis sur quatre dépôts sous-cutanés au maximum.

#### I. sous-cutanée (s.c.)

**Technique de choix** pour toutes les espèces animales. Faible contrainte, bonne répartition de l'antigène.

#### I. intradermique (i.d.)

L'antigène parvient rapidement aux ganglions lymphatiques. Contrainte moyenne à élevée (douleur due à la pression, ulcères lors de l'utilisation de certains adjuvants tels que l'AFC). Cette technique d'injection peut être appliquée aux lapins dans des cas **justifiés** (quantité d'antigène faible), à condition que le personnel soit expérimenté.

#### I. intramusculaire (i.m.)

Les antigènes de petite taille parviennent rapidement dans les organes du système immunitaire via le sang ou la lymphe. Contrainte moyenne à

élevée (utilisation d'adjuvants huileux, diffusion accidentelle qui endommage les nerfs). A rejeter pour les rongeurs en raison de leur faible masse musculaire et pour les lapins car l'injection sous-cutanée est l'alternative provoquant une contrainte moindre. Appropriée pour les **poules** (m. pectoralis), à l'exclusion de l'injection d'adjuvants très irritants.

**I. intrapéritonéale (i.p.)** Diffusion étendue et rapide de l'antigène, d'où le risque de provoquer un choc anaphylactique lors des injections de rappel. Acceptable pour les souris et les rats, à condition qu'il ne soit pas fait usage d'adjuvants très irritants (contrainte moyenne à élevée) et que les antigènes solubles ne soient injectés qu'une seule fois par cette voie d'injection. Il faut administrer un **sédatif** aux animaux avant de leur injecter des solutions irritantes.

**I. intraveineuse (i.v.)** L'injection intraveineuse ne convient que pour les **cas particuliers justifiés**, par exemple pour inoculer des antigènes de petite taille et présents sous la forme de particules. Elle n'est pas admise pour des antigènes de dimension plus grande et solubles ni pour la plupart des adjuvants en raison du risque d'embolie et d'anaphylaxie.

**I. dans la patte** Acceptable uniquement dans des **cas particuliers justifiés** (quantité d'antigène très faible, p. ex.) sur les rats et les souris, si les conditions suivantes sont remplies: il n'est pas fait usage d'adjuvants irritants, l'injection est réalisée sur la face dorsale et sur un seul côté d'une patte postérieure. L'animal a reçu préalablement un sédatif et le personnel est expérimenté. L'animal est détenu sur une litière molle. On ne recourra pas à ce type d'injection pour la production d'anticorps polyclonaux.

Injections directement dans la **rate** ou dans les **ganglions lymphatiques** Admises uniquement dans des **cas particuliers, indispensables et bien justifiés** (quantité d'antigène très faible, p. ex.), si les conditions suivantes sont remplies: on n'a pas recours à un adjuvant, on n'effectue pas d'injections de rappel avec ce type d'injection, l'intervention est effectuée sous **anesthésie générale**. On ne recourra pas à ce type d'injection pour la production d'anticorps polyclonaux.

### 35 Injections de rappel et prélèvements de sang

Pour stimuler les cellules douées de mémoire, il faut moins d'antigène que pour la première immunisation et la méthode d'injection **sous-cutanée** permet d'obtenir en général les résultats voulus. Les injections de rappel d'antigènes solubles effectuées par voie intraveineuse ou intrapéritonéale ne sont pas admises en raison du risque d'anaphylaxie.

Les injections de rappel doivent être effectuées sans **adjuvant** ou à l'aide d'adjuvants causant une faible contrainte, car lorsqu'ils sont administrés plusieurs fois, ces adjuvants ont, d'une part, des effets secondaires plus importants que ceux de la première immunisation et, d'autre part, leur utilisation n'est pas toujours nécessaire pour atteindre de bons titres d'anticorps.

En général, on procède rarement à plus de deux injections de rappel pour obtenir une bonne production d'anticorps. Le moment de la deuxième injection et des injections suivantes est déterminé par l'évolution du titre d'anticorps. En effet, une injection de rappel prématurée et des injections de rappel trop fréquentes provoquent plutôt une immunosuppression et font subir une contrainte inutile à l'animal. Lorsqu'on utilise des adjuvants formant un dépôt, on attendra généralement **au moins quatre semaines** avant de procéder à l'injection de rappel.

Pour les **prélèvements de sang**, la technique à choisir et les volumes de prélèvement admis sont ceux énoncés dans l'information technique 3.02 de l'OSAV. Pour déterminer le titre d'anticorps sériques chez les poules, le sang doit être prélevé de la veine alaire.

#### 4 Surveillance des animaux immunisés

Certains adjuvants, en particulier ceux contenant des composants bactériens ou huileux, provoquent chez l'animal des **réactions inflammatoires** chroniques, graves dans certains cas (cf. ch. 32). Aussi faut-il, après l'immunisation, **contrôler chaque jour** les animaux et surtout les sites d'injection, inscrire sur le protocole les modifications constatées et indiquer le degré de gravité. Attention: les lésions graves n'apparaissent qu'après quelques semaines, les sécrétions sous-cutanées consécutives à des plaies peuvent migrer de la face dorsale à la face ventrale. Les animaux présentant des altérations doivent **recevoir un traitement adéquat**.

### D Adjuvants sélectionnés

#### 1 Principes à observer lors de l'utilisation de l'adjuvant de Freund complet (AFC)

L'adjuvant de Freund complet (AFC) est un adjuvant très efficace pour de nombreux antigènes. Toutefois, son utilisation chez l'animal cause occasionnellement de graves lésions tissulaires qui s'accompagnent surtout durant les premiers jours de symptômes cliniques plus ou moins marqués, tels qu'enflures, perte de poids, diminution de l'activité locomotrice.

Parmi les nombreux adjuvants modernes mis sur le marché, on trouve pour de nombreux antigènes celui qui sera adapté à l'espèce animale utilisée et qui provoquera des contraintes moindres (études comparatives, analyse de la littérature scientifique). Si ce n'est pas le cas et que l'on utilise l'AFC, on respectera les **restrictions d'utilisation** suivantes:

Pour les **protocoles d'immunisations de routine**, il n'est permis d'utiliser l'AFC que lorsque des essais préliminaires (études pilotes) ont démontré que les antigènes à utiliser ont produit des résultats insuffisants avec au moins deux autres adjuvants. En règle générale, des symptômes cliniques et pathologiques graves ne doivent pas apparaître, lorsqu' on utilise cet adjuvant.

L'utilisation de l'AFC est acceptable pour des **immunisations occasionnelles**, lorsqu'aucun résultat probant avec des adjuvants de substitution n'est décrit dans la littérature scientifique pour un antigène similaire et pour la même espèce animale. De plus, les **conditions** suivantes doivent être remplies:

- l'AFC est injecté par voie **sous-cutanée**, chez la poule par voie intramusculaire exceptionnellement, mais dans ce cas également il y a lieu de préférer la voie sous-cutanée (extension du volume des abcès);
- il n'est pas injecté à des **emplacements** où une automutilation serait possible ou aux endroits où l'on saisit l'animal lorsqu'on le manipule;
- le **volume injecté est faible** ou est réparti sur quatre dépôts **sous-cutanés** au maximum très espacés les uns des autres (cf. page 6, chapitre 33);
- un adjuvant provoquant une faible contrainte est utilisé pour les **injections de rappel**.

#### Ne sont pas admises:

- une **deuxième injection** d'AFC et les **injections successives** en raison du risque d'anaphylaxie.
- les **injections intrapéritonéales** en raison du risque de péritonite.
- les **injections intradermiques** en raison du risque d'ulcère.
- les **injections intraveineuses** en raison du risque d'embolie.
- les injections dans la **patte**, dans les **ganglions lymphatiques** ou dans la **rate**.

## **2 Adjuvants de substitution**

Les fabricants améliorent constamment la composition des adjuvants de substitution en vue de réduire la contrainte subie par l'animal et d'obtenir un bon titre d'anticorps. Les commentaires qui suivent doivent être considérés par conséquent comme des remarques générales. Les requérants doivent se tenir informés sur les modifications apportées à la composition des adjuvants qui sont déjà commercialisés ainsi que sur l'apparition de nouveaux adjuvants.

### **21 Specol**

Malgré sa teneur en huile minérale, le specol est de loin mieux supporté que l'AFC surtout par les lapins. Il permet d'obtenir de bons, voire d'excellents titres d'anticorps avec différents antigènes, à l'exception des antigènes très hydrophobes ou des autoantigènes. L'utilisation du specol sur les lapins (sous-cutanée), les souris (sous-cutanée) et les poules (sous-cutanée, intramusculaire) ne pose pas de problèmes.

### **22 Adjuvants Montanide ISA (ISA = Incomplete Seppic Adjuvant)**

Les adjuvants Montanide ISA ont des teneurs différentes en huiles partiellement métabolisables et en surfactants. Administré par voie sous-cutanée aux lapins, souris ou cobayes, le Montanide ISA 740 est généralement bien toléré. Quant aux autres adjuvants Montanide, leur tolérance varie suivant l'espèce animale, mais ils sont en général de loin mieux tolérés que l'AFC. Ils permettent d'obtenir des titres d'anticorps bons, voire excellents avec différents antigènes.

### **23 Ribis Adjuvant System RAS**

Disponible sur le marché dans diverses compositions, cet adjuvant convient pour différentes espèces animales. Il contient des dérivés de bactéries modifiés et une huile métabolisable. Généralement bien toléré, le RAS peut toutefois provoquer de vives réactions inflammatoires chez le lapin surtout lorsqu'il est utilisé avec certains antigènes. Injecté par voie sous-cutanée, il permet d'obtenir, avec des antigènes protéiques et polypeptidiques et de fréquentes injections de rappel, de bons titres d'anticorps chez les souris, les lapins et les poules.

### **24 Gerbu**

Gerbu contient un détergent ainsi que du GMDP, à savoir une combinaison entre le dérivé bactérien synthétique MDP et une glucosamine, composant immunologiquement actif des lactobacilles. Il est généralement bien toléré, même par les poules lorsqu'il est administré par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Les nouvelles compositions, caractérisées par une faible teneur en GMDP, produisent généralement d'excellents titres d'anticorps lorsqu'elles sont administrées aux rats et aux souris avec différents antigènes. Cet adjuvant n'ayant pas d'effet de dépôt, des injections de rappel fréquentes sont nécessaires pour obtenir un bon titre d'anticorps.

### **25 ISCOMs (immunestimulating complexes)**

Ces complexes d'immunostimulation sont composés de micelles de saponine/cholestérol/antigène qui sont transportées rapidement dans les ganglions lymphatiques où ils présentent l'antigène. Administrés par voie sous-cutanée ou intramusculaire, ils sont bien tolérés. Les injections intrapéritonéales par contre provoquent de graves lésions. Pour obtenir un bon titre d'anticorps, un intervalle de six à huit semaines doit être respecté entre la première injection et l'injection de rappel. Les RV-ISCOMs, qui contiennent une glycoprotéine du virus de la rage à la place des protéines capsidiales virales, produisent d'excellents titres d'anticorps avec des antigènes de petite taille (peptides, autoantigènes). Les ISCOMs ne sont pas en vente sur le marché et leur préparation n'est pas des plus faciles.

## 26 Hunter's Titermax

Cet adjuvant contient une huile métabolisable. Cependant, il provoque parfois de fortes réactions inflammatoires chez les souris surtout. C'est la raison pour laquelle son injection par voie intrapéritonéale chez les souris n'est pas admise. Titermax est généralement bien toléré chez les lapins. Il faut dans tous les cas respecter les volumes d'injection recommandés par le fabricant. Ceux-ci sont plus faibles que les volumes habituels. Suivant l'espèce animale et l'antigène utilisés, le titre d'anticorps obtenu à l'aide de cet adjuvant peut varier fortement: la bande de variation allant de non satisfaisant à excellent.

## 27 Adjuvant de Freund incomplet (AFI)

L'AFI ne se distingue de l'adjuvant de Freund complet (AFC) que par l'absence des mycobactéries; cela explique que l'AFI provoque moins d'effets secondaires importants. Utilisé surtout pour les injections de rappel après une injection effectuée avec de l'adjuvant de Freund complet, l'AFI peut aussi être utilisé pour les premières immunisations; dans ce dernier cas, les titres d'anticorps obtenus sont cependant plus faibles que ceux atteints à l'aide de l'AFC. L'AFI stimule la réponse humorale exclusivement.

## 28 Syntex Adjuvant Formulation SAF

SAF est un adjuvant véhicule qui, combiné à des protéines munies d'un groupement hydrophobe ou à des antigènes viraux, provoque une forte réponse humorale ainsi qu'une importante réponse à médiation cellulaire. Il a généralement peu d'effets secondaires, s'il est injecté par voie sous-cutanée ou intramusculaire.

## 29 Alhydrogel (Al(OH)<sub>3</sub>)

Les sels d'aluminium conviennent pour des antigènes protéiques et n'occasionnent qu'une faible contrainte, d'où leur utilisation dans des vaccins. Ils ne sont cependant pas toujours assez efficaces pour la production d'anticorps. Ils sont administrés par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Plusieurs injections de rappel sont nécessaires, pour lesquelles il est parfois possible de renoncer à l'utilisation d'un adjuvant.

## 30 poly(A).poly(U) (acides polyadényles-polyuridydes)

Complexe synthétique comprenant un double brin d'ARN, le poly(A).poly(U) a une action immunomodulante et antitumorale. Outre une réponse humorale, il provoque surtout une réponse à médiation cellulaire. Lorsqu'il est bien toléré (convient aussi à l'application intrapéritonéale chez la souris), il permet d'obtenir un bon titre d'anticorps.

## E Production d'anticorps à partir d'œufs de poules (amélioration du procédé ou „refinement“)

La production d'anticorps à partir du jaune d'œuf de poules préalablement immunisées occasionne une faible contrainte et constitue une alternative à la production traditionnelle d'anticorps à partir de sérum. Elle suppose toutefois une **détention des poules conforme aux exigences de l'espèce** et une méthode d'immunisation ménageant l'animal. Les **injections sous-cutanées** doivent être préférées à toute autre forme d'injection. En cas d'injection intramusculaire, il faut renoncer à utiliser des adjuvants irritants. Outre les adjuvants de Freund (complet ou incomplet), on utilise également pour les poules les adjuvants suivants: Titermax, Specol, Gerbu et RIBI.

## F Procédé de l'ascite (méthode non admise)

Les anticorps monoclonaux peuvent en principe être produits par des procédés *in vitro*. Les exceptions sont énoncées dans l'information technique de l'OSAV 5.01.

## G Littérature scientifique recommandée

- Information technique 3.02 de l'OSAV Prélèvements de sang chez les rongeurs de laboratoire et les lapins à des fins expérimentales.
- Information technique 3.03 de l'OSAV Anesthésie et analgésie conformes à la protection des animaux, chez les rongeurs de laboratoire et les lapins.
- Information technique 5.01 de l'OSAV La production d'anticorps monoclonaux.
- ECVAM-Workshop report Nr. 35 1999: The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. Bezugsquelle: ECVAM, TP580, JRC IHCP, I-21020 Ispra (Va).
- Leenaars PPA, Hendriksen CFM, de Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R, Halder M, Hanly WC, Hartinger J, Hau J, Lindblad EB, Nicklas W, Outschoorn IM, Stewart-Tull DES 1999: The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. ATLA 27, 79-102.
- AWIC (Animal Welfare Center) 1997: Information Resources for Adjuvants and Antibody Production: Comparisons and Alternative Technologies. U.S. Dep. of Agriculture, National Agricultural Library, AWIC, 10301 Baltimore Avenue, Beltsville, MD 20705, USA; <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/>
- de Leeuw WA, de Greeve P 1996: Experience with the Dutch Code of Practice for the Immunization of laboratory animals. p. 210-15. In: Forschung ohne Tierversuche 1996, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Jackson LR, Fox JG 1995: Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production. ILAR Journal 37, 3: 141-52.
- Hanley CW, Artwohl JE, Taylor Bennett B 1995: Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. ILAR Journal 37,3: 93-118.
- Landwehr M 1996: Die tierschutzrechtliche Beurteilung der Immunisierung von Tieren in Deutschland, p.204-9. In: Forschung ohne Tierversuche 1996, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Amyx HL 1987: Control of animal pain and distress in antibody production and infectious disease studies. JAVMA 191 (10), 1287-9.

## Adjuvants

- Leenaars Marlies 1997: Adjuvants in Laboratory Animals; Evaluation of immunostimulating properties and side effects of Freund's complete adjuvant and alternative adjuvants in immunization procedures. Dissertation Erasmus Universität Rotterdam ISBN: 90-9010685-5. Dr. P.P.A.M. Leenaars, RIVM-CDL, Postfach 1, NL-3720 BA Bilthoven.
- Leenaars M, Hendriksen CFM, Koedam MA, Claassen E 1996: Comparison of alternatives to Freund's Complete Adjuvant, p. 233-41. In: Forschung ohne Tierversuche 1996, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Leenaars M, Claassen E, Hendriksen CFM 1996: Considering the side-effects of adjuvant products in immunization procedures. Lab Animal 25 (8), 40-3.
- Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, Angulo AF, Koedam MA, Claassen E 1994: Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. Veterinary Immunology and Immunopathology 40, 225-41.

- Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, Koedam MA, Claassen I, Claassen E 1995: Comparison of adjuvants for immune potentiating properties and side effects in mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 48, 123-38
- Linxweiler W 1996: Effizienz und Verträglichkeit von Adjuvantien bei der Immunisierung von Mäusen, Kaninchen und Schafen, p. 242-8. In: *Forschung ohne Tierversuche 1996*, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Stewart-Tull DES (Hrsg.) 1995: *The Theory and Practical Application of Adjuvants*. John Wiley & Sons, Chichester. ISBN: 0-471-95170-6.
- Jennings VM 1995: Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR Journal* 37, 3: 119-25.
- Allison AC, Byars NE 1994: Adjuvants. p. 141-51. In: *Antibody Techniques*. Hrsg. Malik VS, Lillehoj EP. Academic Press, San Diego. ISBN: 0-12-466460-1.
- Claassen E, Boersma WJA et al. 1992: 44<sup>th</sup> Forum in Immunology: Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complete adjuvant. *Research in Immunology* 143 (5), 471-586.
- Johnson AG 1994: Molecular Adjuvants and Immunomodulators: New Approaches to Immunization. *Clinical Microbiology Reviews* 7 (3), 277-89.
- Johnston BA, Eisen H, Fry D 1991: An Evaluation of Several Adjuvant Emulsion Regimens for the Production of Polyclonal Antisera in Rabbits. *Laboratory Animal Science* 41 (1), 15-21.
- Stills HF, Bailey MQ 1991: The Use of Freund's Complete Adjuvant. *Lab Animal* 20 (4), 25-30.
- Toth LA, Dunlap AW, Olson GA, Hessler JR 1989: An Evaluation of Distress Following Intraperitoneal Immunization with Freund's Adjuvant in Mice. *Laboratory Animal Science* 39 (2), 122-6.
- Kuhlmann I, Storz B, Gast I 1995: Erfahrungen mit dem Einsatz des alternativen Ribi-Adjuvans-Systems zur Gewinnung von Antisera zu Forschungszwecken. *Der Tierschutzbeauftragte* 2, 136-40.
- Sang Jin Park, Won Ho Kim et al. 1995: Adjuvant effect of polyadenylic-polyuridylic acid on antibody production of recombinant hepatitis B surface antigen in mice. *Int. J. Immunopharmac.* 17 (6), 513-6.

### **Production d'anticorps à partir d'œufs de poule**

- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, Larsson A, Pollmann W, van Regenmortel M, Fijke E, Spielmann H, Steinbusch H, Straughan D 1996: The production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *ATLA* 24, 925-34.
- Schade R, Hlinak A, Schwarzkopf C et al. 1996: Dottersack-Antikörper, Egg Yolk Antibodies, IgY-Technology. *ALTEX* 13, Supplement 96.
- Schwarzkopf C, Thiele B 1996: Freund's komplettes Adjuvans und mögliche Alternativen zur Gewinnung von IgY: Immunisierungsschemata, Titerentwicklung, Affinitätsreifung und biologische (Un-)Verträglichkeit, p. 254-62. In: *Forschung ohne Tierversuche 1996*, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Schmidt P, Erhard M, Hofmann A, Schmahl W 1996: Lokale Reaktionen bei Verwendung verschiedener Adjuvantien bei Legehennen. *ALTEX* 13, Supplement 96.
- Schwarzkopf C, Thiele B 1996: Effectivity of Alternative Adjuvants in Comparison to Freund's Complete Adjuvant. *ALTEX* 13, Supplement 96.
- Erhard MH, Hofmann A, Stangassinger M, Löscher U 1996: Lipopeptide als nebenwirkungsfreie Adjuvantien zur Immunisierung von Legehennen. p. 263-7. In: *Forschung ohne Tierversuche 1996*, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.

