

# LES ANTICORPS MONOCLONAUX DES OUTILS BIOLOGIQUES

## A : LES ANTICORPS

1 : LES DIFFÉRENTS DOMAINES DES IMMUNOGLOBULINES

2 : CLASSES ET SOUS-CLASSES

## B : LE PRINCIPE DE L'IMMUNISATION

## C : LA TECHNIQUE DE PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

## D : ANTICORPS MONOCLONAUX - ANTICORPS POLYCLONAUX

## E : LES ANTICORPS DES OUTILS BIOLOGIQUES

### 1 : POUR L'IDENTIFICATION D'UNE PROTÉINE DE MEMBRANE

a : méthode de marquage et d'analyse d'une population cellulaire

1. *principe du marquage*

2. *principe du double marquage*

b : analyse d'une population cellulaire par cytométrie de flux

1. *Principe général de la cytométrie de flux*

c : méthode de séparation cellulaire utilisant les anticorps

1. *séparation par tri magnétique*

### 2 : POUR L'IDENTIFICATION D'UNE PROTÉINE SOLUBLE

a : méthode par dosage ELISA

1. *principe*

2. *exemple*

# A : LES ANTICORPS

## LES ANTICORPS OU IMMUNOGLOBULINES

4 GLYCOPROTÉINES PRODUITES IN VIVO PAR LES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE EN RÉPONSE A UNE MOLÉCULE ÉTRANGÈRE (**ANTIGÈNE**)

4 PRODUITS PAR LES LYMPHOCYTES B ACTIVÉS

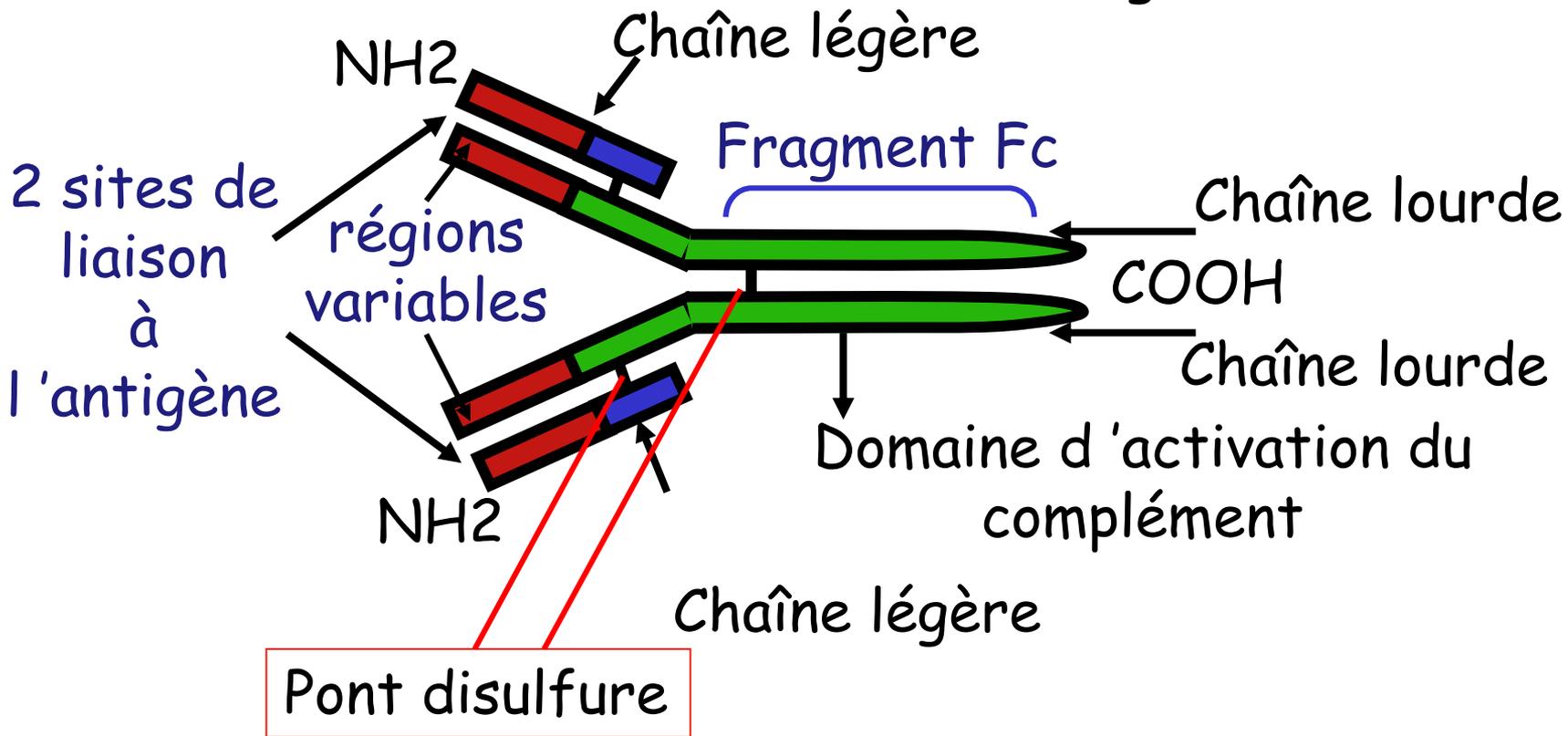
4 POSSÈDENT LA MÊME STRUCTURE DE BASE, DIFFÉRENT AU NIVEAU DE LA RÉGION QUI SE LIE À L'ANTIGÈNE (= **SITES ANTIGÉNIQUES**)

4 APPARTIENNENT A LA SUPER FAMILLE DES **IMMUNOGLOBULINES**

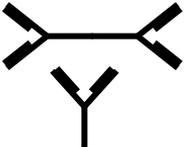
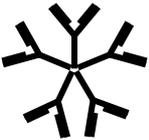
4 PRÉSENTS DANS LES SÉRUMS ET LES FLUIDES BIOLOGIQUES

# 1 : LES DIFFÉRENTS DOMAINES DES IMMUNOGLOBULINES

Chaîne légère = L  
Chaîne lourde = H  
Région variable = V  
Région constante = C



## 2 : CLASSES ET SOUS-CLASSES

Classe	IgG	IgA	IgD	IgE	IgM
Sous-classe	IgG1 à IgG4	IgA1 et IgA2			
Chaîne légère	$\kappa$ ou $\lambda$	$\kappa$ ou $\lambda$	$\kappa$ ou $\lambda$	$\kappa$ ou $\lambda$	$\kappa$ ou $\lambda$
chaîne lourde	$\gamma$ 1 à $\gamma$ 4	$\alpha$ 1 et $\alpha$ 2	$\delta$	$\epsilon$	$\mu$
Structure Y					
Concentration sérique mg/ml	9 à 0,5	3 et 0,5	traces	traces	1,5

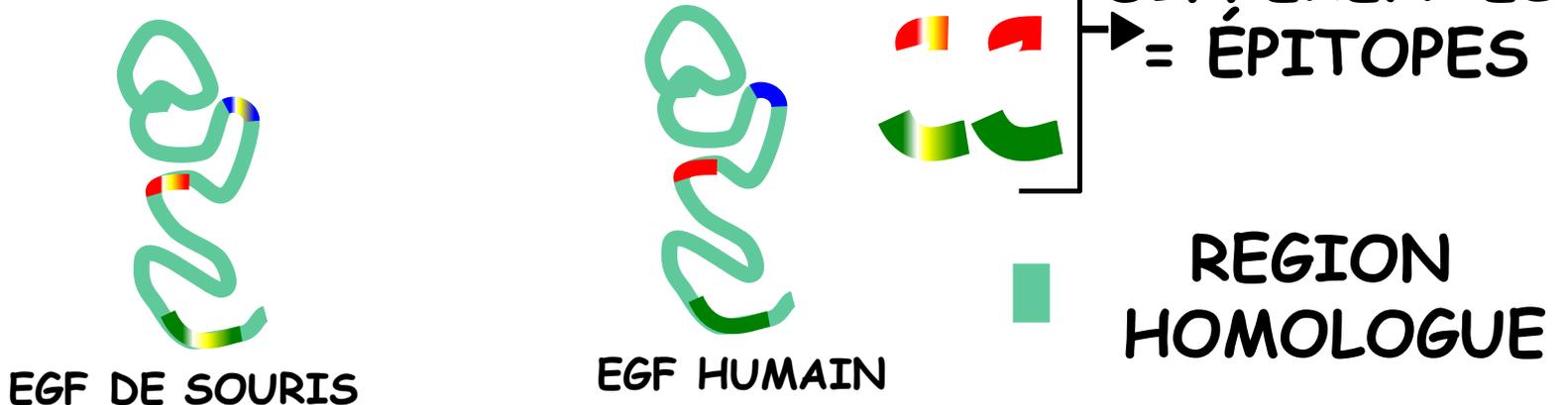
Ne pas apprendre par coeur

# B : LE PRINCIPE DE L'IMMUNISATION

EXEMPLE : GÉNÉRER DES ANTICORPS MONOCLONAUX DE SOURIS DIRIGÉS CONTRE UNE PROTÉINE HUMAINE : L'EGF HUMAIN

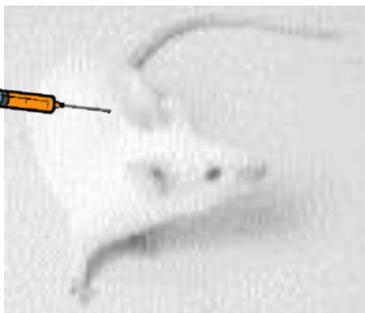
➡ EGF : EPIDERMAL GROTHW FACTOR EST UNE GLYCOPROTEINE (FACTEUR DE CROISSANCE)

➡ 70 % D'HOMOLOGIE ENTRE L'EGF DE SOURIS ET L'EGF HUMAIN:



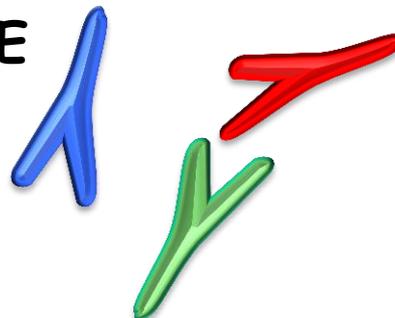
# 👉 IMMUNISATION D'UNE SOURIS AVEC DE L'EGF HUMAIN

SOURIS  
IMMUNISEE  
PAR DE L'EGF  
HUMAIN

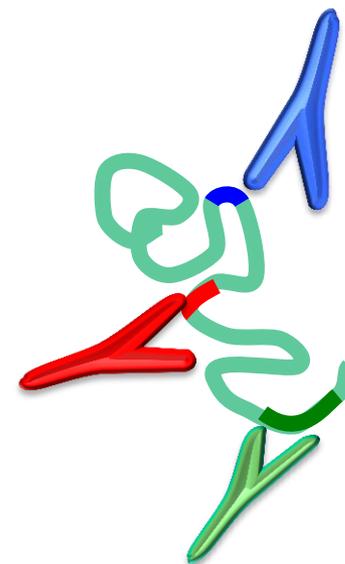


INJECTE LA PROTÉINE 3 OU 4  
FOIS À 15 JOURS D'INTERVALLE  
= IMMUNISATION

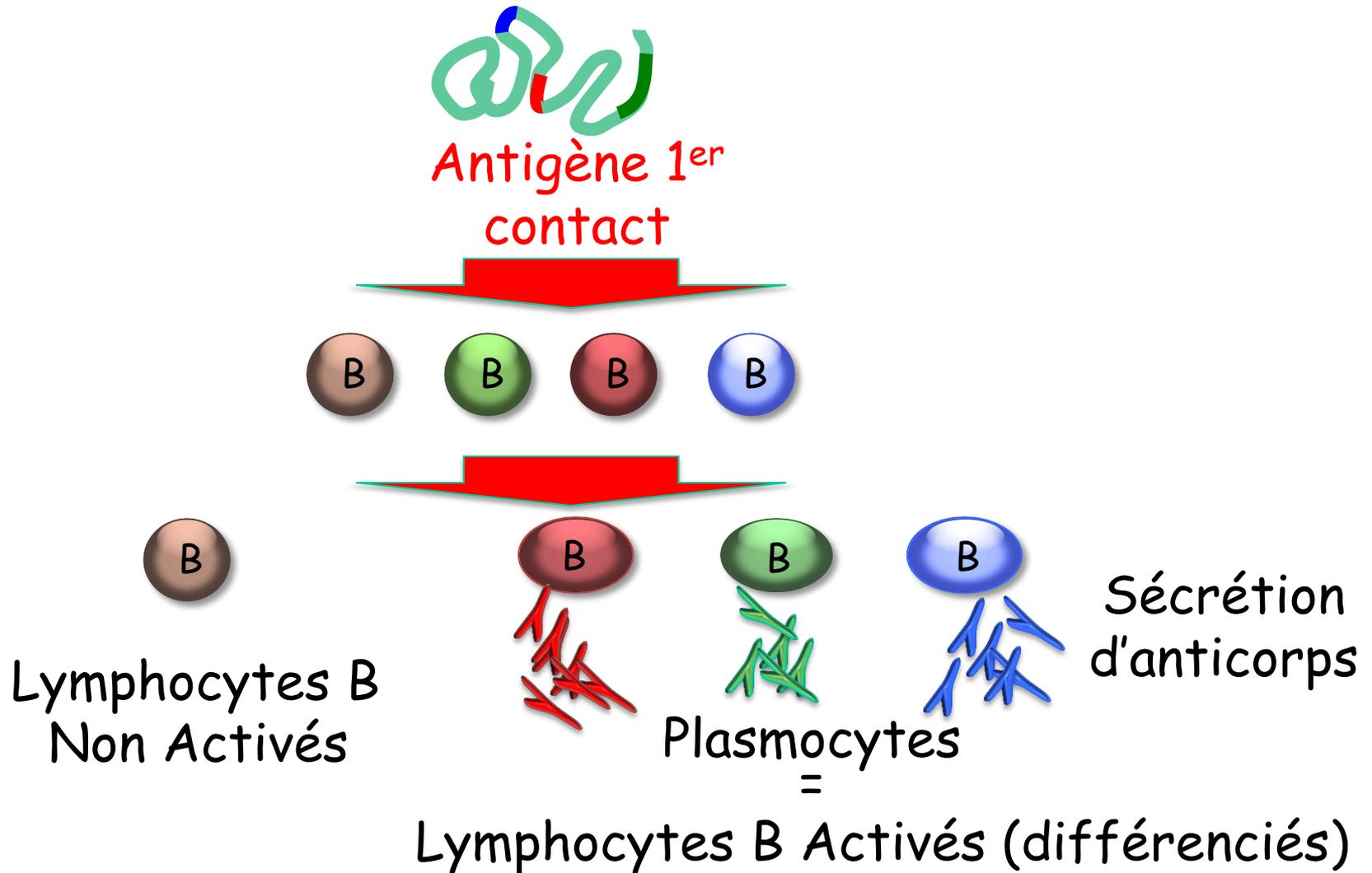
RÉACTION IMMUNITAIRE  
PRODUCTION  
D'ANTICORPS PAR  
LES LYMPHOCYTES B



LES ANTICORPS  
PRODUITS  
RECONNAISSENT DES  
ÉPITOPES DIFFÉRENTS  
PRÉSENTS SUR  
L'EGF HUMAIN

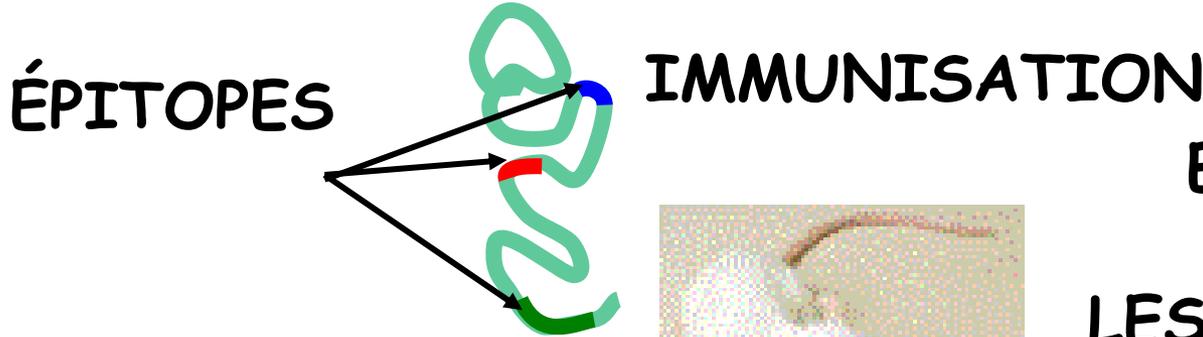


# ➡ RÉACTION IMMUNITAIRE ENGENDRÉE PAR LES ÉPITOPES DIFFÉRENTS ENTRE LES DEUX ESPÈCES



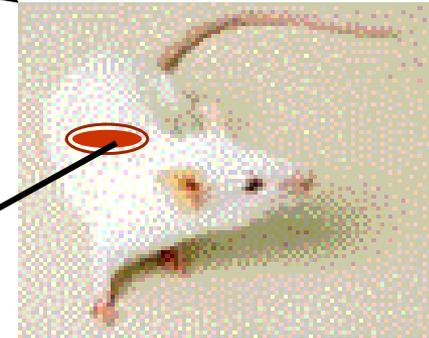
# C : LA TECHNIQUE DE PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

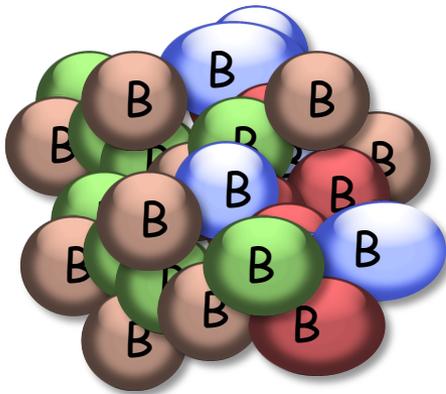
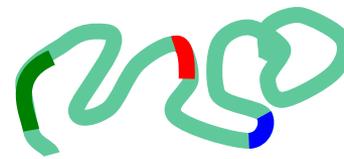
ANTIGÈNE : EGF humain



EN RÉPONSE A  
L'ANTIGÈNE :  
LES LYMPHOCYTES B  
VONT FABRIQUER  
DES ANTICORPS

PRÉLÈVEMENT DE LA RATE,  
BROYAGE, ISOLEMENT DES  
LYMPHOCYTES B





Mélange de  
lymphocytes  
B issus de la  
rate

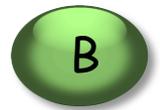
CELLULE PRODUISANT DES ANTICORPS  
SPÉCIFIQUES DE L'ÉPITOPE BLEU :



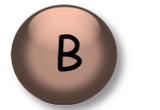
CELLULE PRODUISANT DES ANTICORPS  
SPÉCIFIQUES DE L'ÉPITOPE ROUGE :



CELLULE PRODUISANT DES ANTICORPS  
SPÉCIFIQUES DE L'ÉPITOPE VERT :



CELLULE NE PRODUISANT PAS  
D' ANTICORPS :



SOURCE CONTINUE DE LYMPHOCYTES B  
SOURCE CONTINUE D'ANTICORPS

# IMMORTALISER, SÉLECTIONNER ET CLONER LES CELLULES PRODUISANT LES ANTICORPS

é IMMORTALISER ou PERENNISER :

- ◆ FUSIONNER LES CELLULES DE LA RATE DE LA SOURIS IMMUNISÉE AVEC UNE LIGNÉE IMMORTALISÉE : UN MYÉLOME DE SOURIS
- ◆ GENERER DES CELLULES HYBRIDES QUI SERONT PERENNES

## ➔ POURQUOI UN MYÉLOME DE SOURIS ?

4 CELLULES TUMORALES DE TYPE LYMPHOCYTES B  
(IMMORTELLLES)

4 PAS DE PROBLÈME D'ESPÈCE

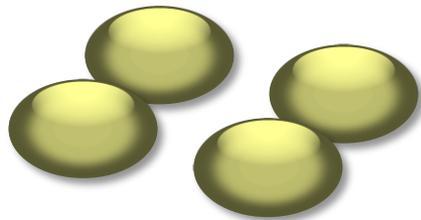
4 CELLULES B QUI NE PRODUISENT PAS D'ANTICORPS

4 CELLULES ONT UNE MUTATION AFFECTANT LA VOIE  
DE SYNTHÈSE DES PURINES ET PYRIMIDINES

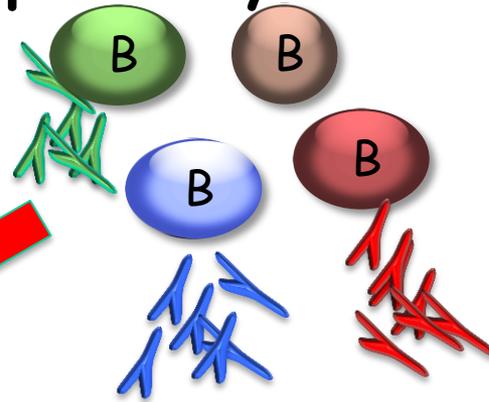
➔ L'AGENT FUSIONNANT EST LE POLYÉTHYLÈNE  
GLYCOL (PEG)

# Générer des cellules hybrides entre une cellule de myélome et un lymphocyte B : un hybridome

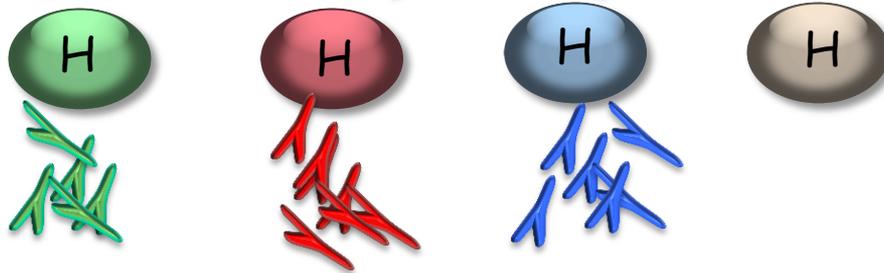
myélome



Lymphocytes B activés  
= plasmocytes



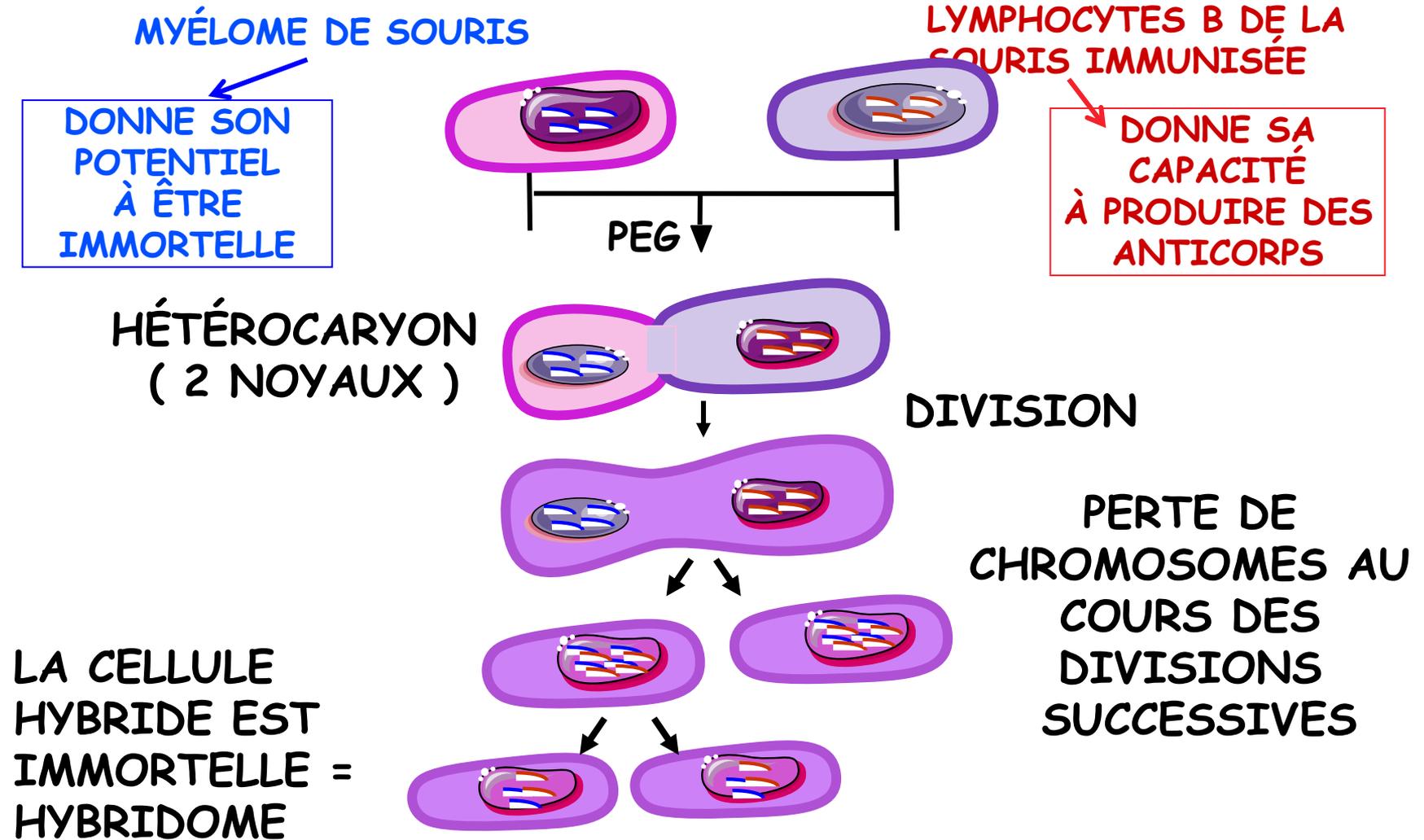
fusion



Produits de la fusion  
= hybridomes

# +ex : immortalisation par fusion membranaire

Utilise la capacité des membranes cellulaires à fusionner :



HYBRIDOME PRODUISANT UN SEUL TYPE D'ANTICORPS  
→ RECONNAÎT QU'UN SEUL ÉPITOPE

é SÉLECTIONNER :

LE MYÉLOME UTILISÉ A UNE MUTATION AFFECTANT LA VOIE DE SYNTHÈSE DES PURINES ET PYRIMIDINES

DEUX VOIES DE SYNTHÈSE DES NUCLÉOTIDES :  
(synthèse de l'ADN → la division)

- VOIE NORMALE = VOIE DE SYNTHÈSE DE NOVO
- VOIE DE DÉRIVATION = VOIE DE SYNTHÈSE DE SECOURS

- VOIE DE SYNTHÈSE NORMALE PEUT ÊTRE BLOQUÉE PAR L'AMINOPTÉRINE

Bloque la formation des bases azotées

# VOIE DE SYNTHÈSE DE SECOURS UTILISE UNE ENZYME : LA THYMIDINE KINASE (TK)



\*THYMIDINE KINASE (TK) PRODUITE PAR UN GÈNE: *tk*

\*CELLULES MUTANTES POUR CE GÈNE (*cellules tk-*)

- PAS DE THYMIDINE KINASE FONCTIONNELLE
- PAS DE VOIE DE DÉRIVATION POUR CES CELLULES

**DANS UNE CELLULE NORMALE (ici le LYMPHOCYTE B)  
LES 2 VOIES DE SYNTHÈSE EXISTENT**

**VOIE DE SYNTHÈSE  
NORMALE**

**VOIE DE SYNTHÈSE  
DE SECOURS**

**VIABLE**

**BLOCAGE PAR UN  
AGENT CHIMIQUE=  
AMINOPTÉRINE**



**VOIE DE SYNTHÈSE  
NORMALE**

**VOIE DE SYNTHÈSE  
DE SECOURS**

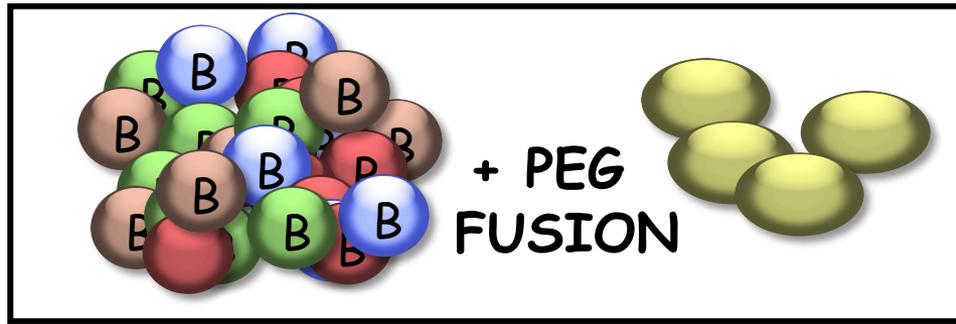
**VIABLE**



**MYELOME PERTE DE LA VOIE DE SECOURS (tk-)**

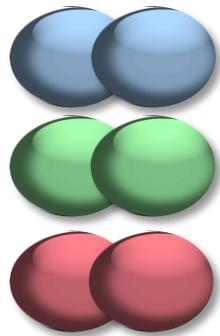


LYMPHOCYTES  
B (tk+)



MYELOME  
(tk-)

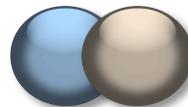
MÉLANGE DE CELLULES HYBRIDES CULTIVÉES EN PRÉSENCE  
D'AMINOPTÉRINE ET EN ABSENCE DE FACTEUR DE CROISSANCE POUR  
LES LYMPHOCYTES B



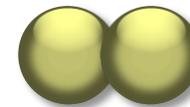
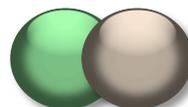
non viable en  
absence de  
facteur de  
croissance



non viable en  
absence de  
facteur de  
croissance

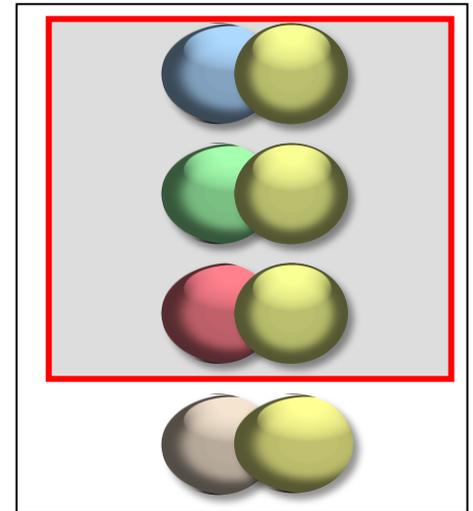


non viable en  
absence de  
facteur de  
croissance



non viable en  
présence  
d'aminoptérine

Plus de voie  
de synthèse  
de  
nucléotides

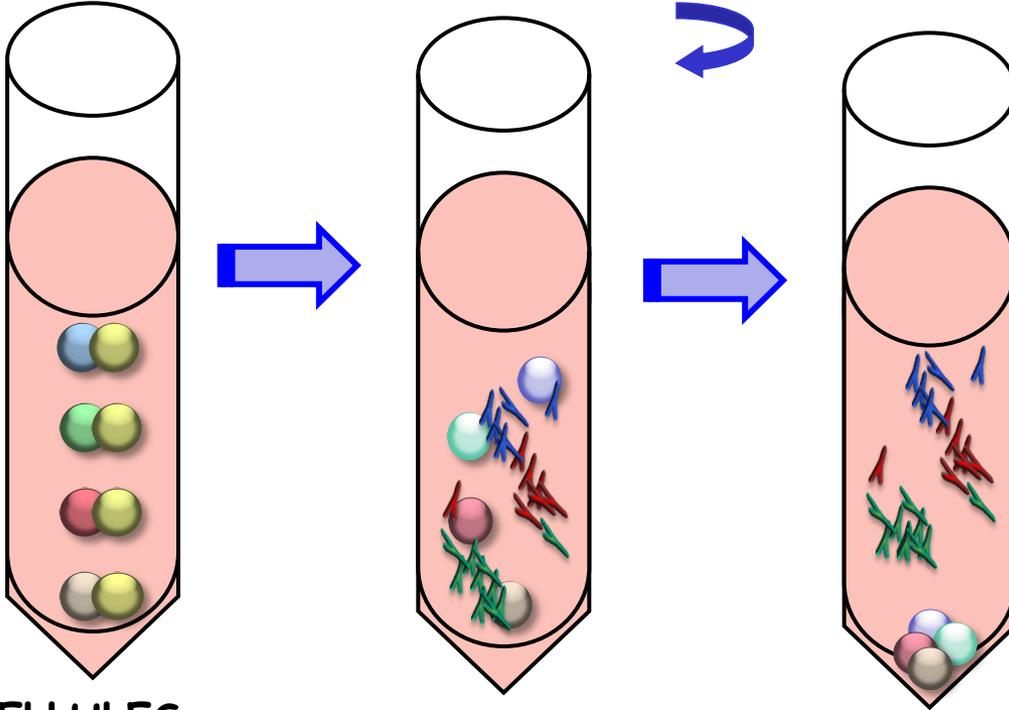


viables

Voie de synthèse  
apportée par la tk  
de la cellule B

# é CLONER : CLONAGE PAR DILUTION LIMITE

CENTRIFUGATION

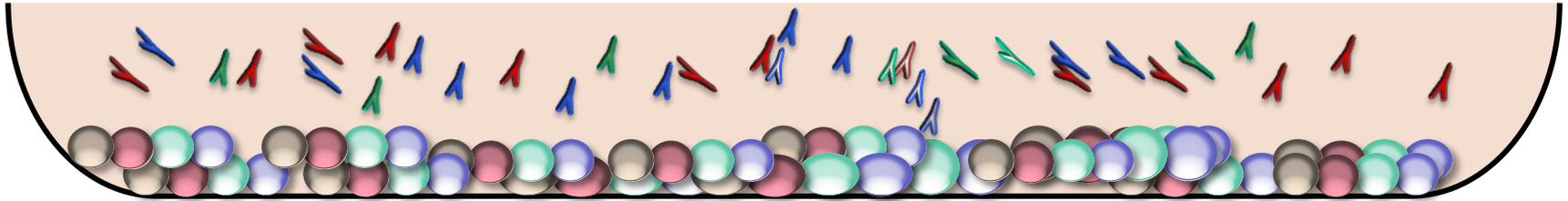


CELLULES  
EN COURS DE  
FUSION

MELANGE DE  
CELLULES  
HYBRIDES =  
HYBRIDOMES  
→ PRODUISENT ET  
SECRETENT  
DES ANTICORPS  
MONOCLONAUX

RECUPERE LE  
SURNAGEANT APRES  
CENTRIFUGATION =  
MELANGE D'ANTICORPS  
MONOCLONAUX

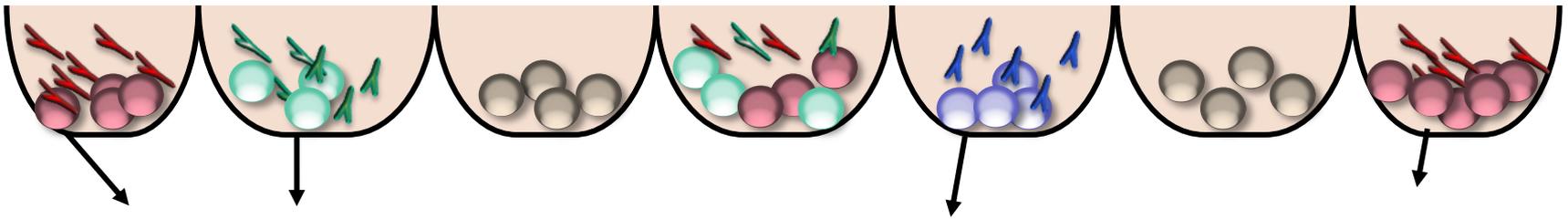
# MELANGE DE CELLULES DANS LA CULTURE



## CLONAGE PAR DILUTION LIMITE



## CELLULES ISOLEES = CLONES



AMPLIFICATION DES CELLULES CLONÉES = HYBRIDOMES  
CHAQUE HYBRIDOME VA PRODUIRE ET SÉCRÉTER UN ANTICORPS  
DIFFÉRENT = UN ANTICORPS MONOCLONAL

DEFINITION : UN HYBRIDOME EST UNE CELLULE HYBRIDE  
PROVENANT DE LA FUSION D'UN LYMPHOCYTE PRODUCTEUR  
D'ANTICORPS ET D'UNE CELLULE DE MYELOME

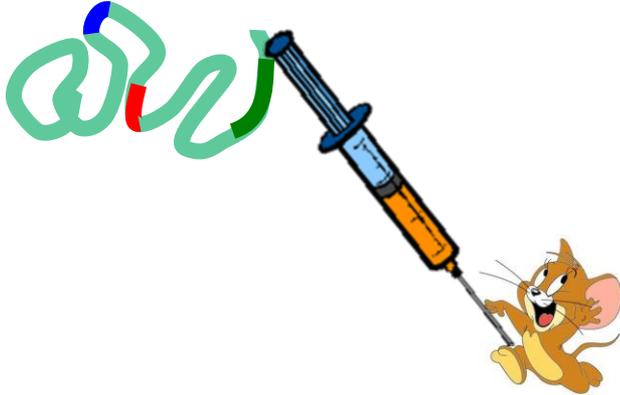
# D : ANTICORPS MONOCLONAUX et ANTICORPS POLYCLONAUX



- Les anticorps monoclonaux sont des anticorps produits par **un clone unique de lymphocytes B**.
- Ils sont conçus pour être **mono spécifiques**: ils reconnaissent un type unique de site antigénique (épitope), ils sont homogènes contrairement aux anticorps polyclonaux.

# IMMUNISATION

ANTIGÈNE



RATE

FUSION AVEC  
MYELOME +  
CLONAGE



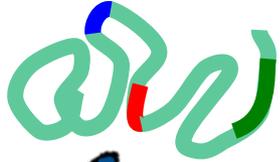
GENERATION  
D'HYBRIDOMES

CHAQUE HYBRIDOME  
PRODUIT  
DES ANTICORPS QUI  
RECONNAISSENT  
UN SEUL EPITOPE SUR  
L'ANTIGENE

→ anticorps monoclonal

# IMMUNISATION

ANTIGÈNE



LE SERUM CONTIENT UN  
MELANGE D'ANTICORPS  
RECONNAISSANT DES  
EPITOPES  
DIFFERENTS SUR LE MEME  
ANTIGENE

→ anticorps polyclonal

PRÉLÈVEMENT  
DE SANG



← SÉRUM

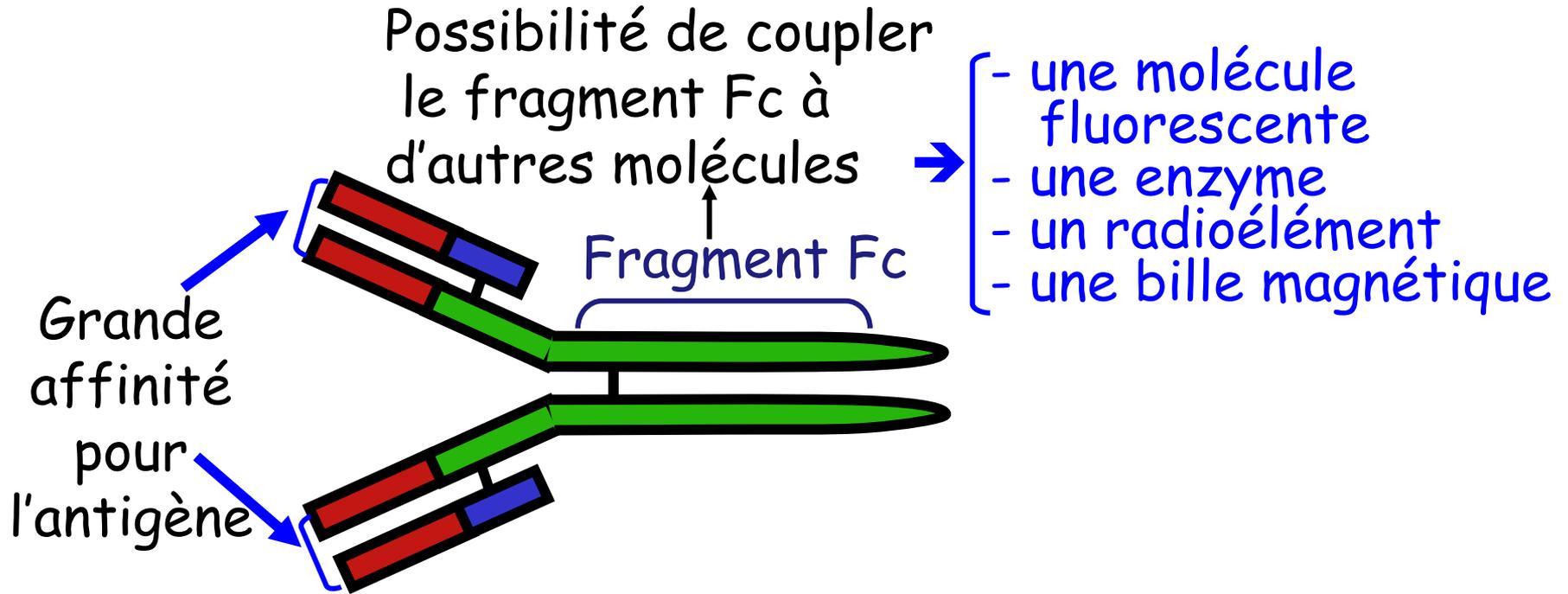
⇒ centrifugation



← SÉRUM

# E : LES ANTICORPS DES OUTILS BIOLOGIQUES

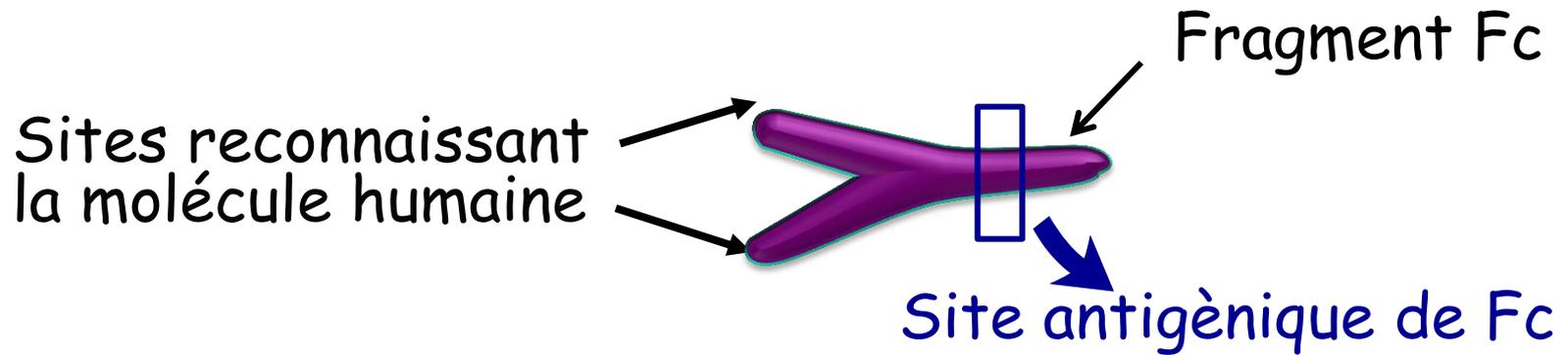
## □ UTILISE LES DIFFERENTES PROPRIETES DES ANTICORPS



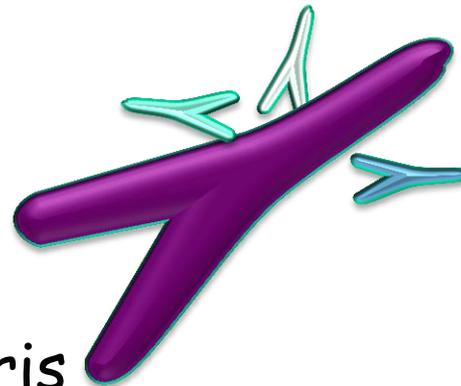
- ➡ Fragment Fc se colle sur des supports plastiques
- ➡ Fragment Fc fixe et active les protéines du complément
- ➡ Fragment Fc fixe la protéine A du staphylocoque
- ➡ **Fragment Fc est antigénique**

➡ Fragment Fc est antigénique et permet de générer des anticorps secondaires

➤ Anticorps de souris dirigé contre une molécule humaine :



Générer des anticorps reconnaissant le fragment Fc de l'anticorps de souris



Anticorps de souris



**IMMUNISATION**

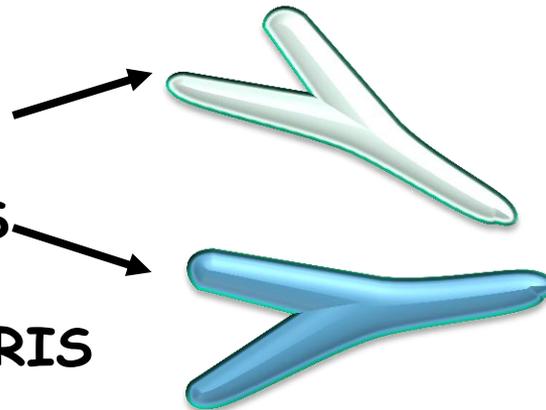


**PRÉLÈVEMENT  
DE SANG**

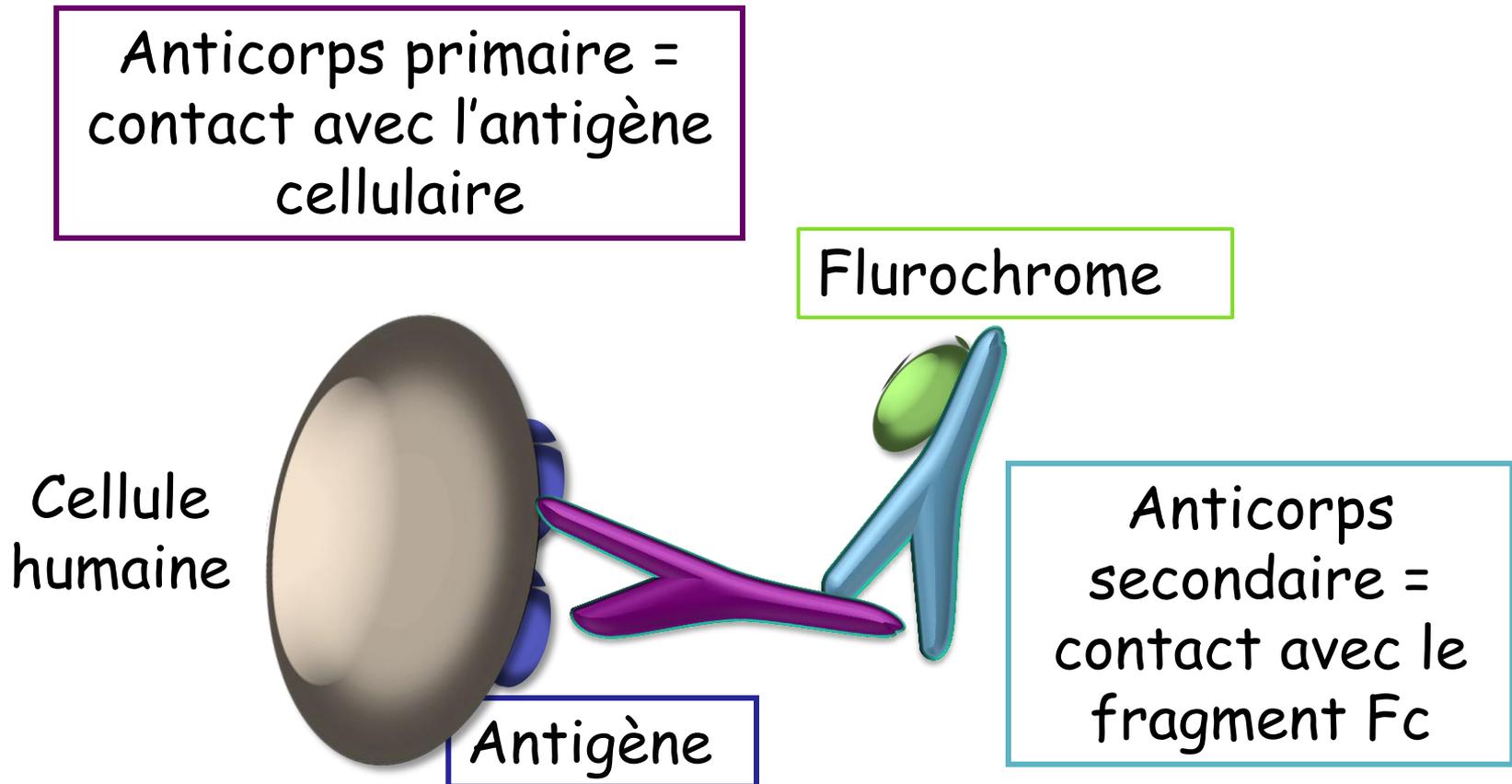


**SÉRUM**

**LES ANTICORPS  
PRODUITS  
RECONNAISSENT DES  
ÉPITOPES DIFFÉRENTS  
PRÉSENTS SUR  
LE FRAGMENT Fc DE SOURIS**



- Anticorps de lapin dirigé contre le fragment Fc des anticorps de souris couplé à une molécule fluorescente, sert d'anticorps secondaire



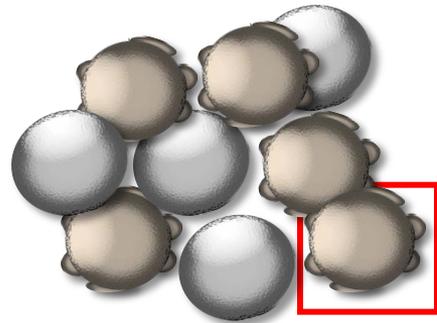
# 1 : POUR L'IDENTIFICATION D'UNE PROTÉINE DE MEMBRANE

a : méthode de marquage et d'analyse d'une population cellulaire

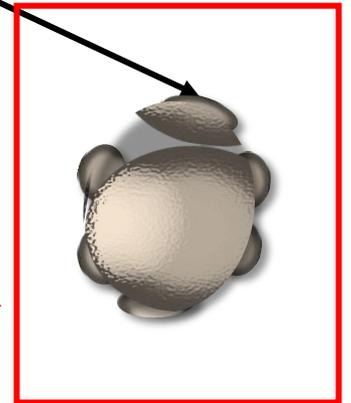
## 1. principe du marquage :

IDENTIFIER DES CELLULES DANS UNE POPULATION CELLULAIRE À L'AIDE D'ANTIGENES SPECIFIQUES EXPRIMES A LA SURFACE DE CES CELLULES

POPULATION CELLULAIRE HETEROGENE HUMAINE



ANTIGENES (ABSENT SUR LES CELLULES GRISES)



# MARQUAGE CELLULAIRE EN UTILISANT DES ANTICORPS MONOCLONAUX DE SOURIS SPECIFIQUES DE L'ANTIGENE HUMAIN

ANTICORPS  
SPECIFIQUE DE  
L'ANTIGENE :

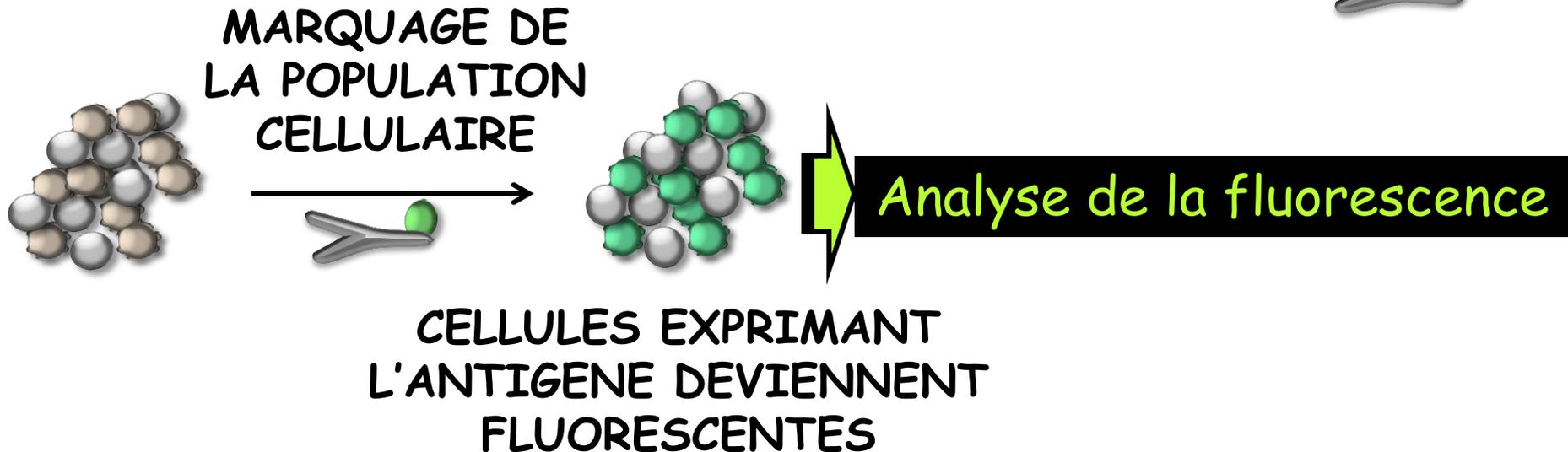
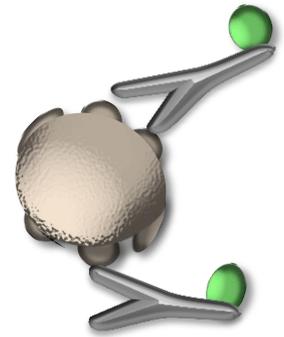


- PROPRIETES DES ANTICORPS UTILISEES :
- AFFINITE ET SPECIFICITE DE L'ANTICORPS POUR L'ANTIGENE
  - POSSIBILITE DE COUPLER L'ANTICORPS À UN FLUOROCHROME

## 4 MÉTHODE DIRECTE :

Anticorps couplé à un fluorochrome et mis en contact avec l'antigène cellulaire

L'ANTICORPS DE SOURIS  
COUPLE AU FLUOROCHROME  
DIRIGE CONTRE LA PROTEINE HUMAINE



## 4 MÉTHODE INDIRECTE :

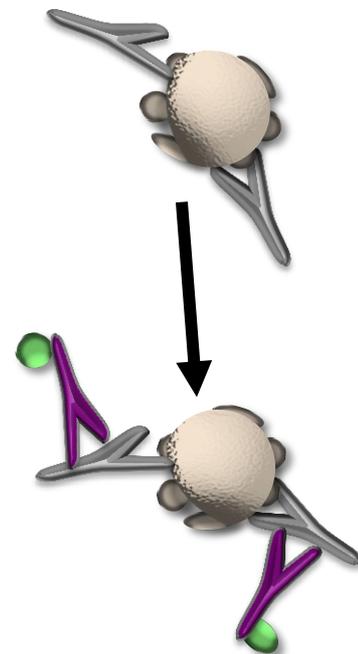
Anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et mis en contact avec le complexe anticorps-antigène cellulaire

✓ 1<sup>er</sup> ANTICORPS DE SOURIS NON COUPLE AU FLUROCHROME DIRIGE CONTRE LA PROTEINE HUMAINE

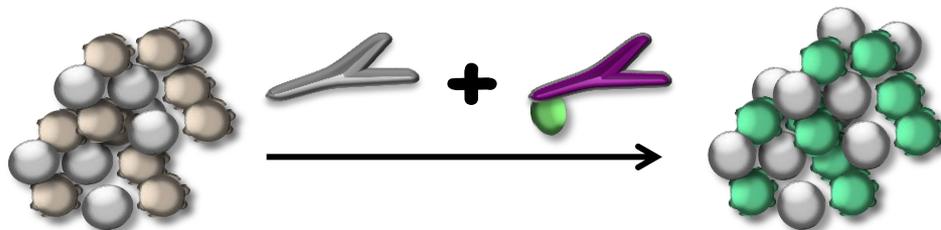
→ ANTICORPS PRIMAIRE 

✓ 2<sup>ème</sup> ANTICORPS DE LAPIN COUPLE AU FLUROCHROME DIRIGE CONTRE LE FRAGMENT Fc SOURIS

→ ANTICORPS SECONDAIRE 



Suspension cellulaire



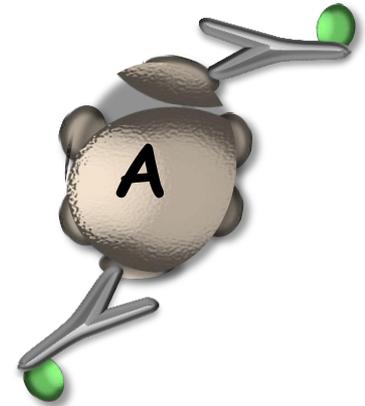
Analyse de la fluorescence

## 2. principe du double marquage

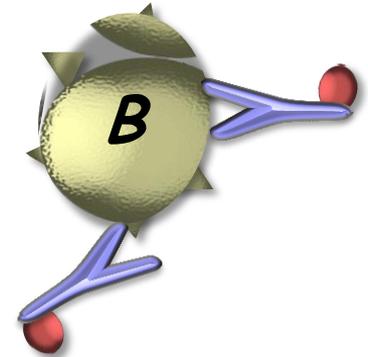
*Les anticorps permettent de discriminer les cellules A et B*

➔ Immunofluorescence pour la caractérisation des sous-populations cellulaires

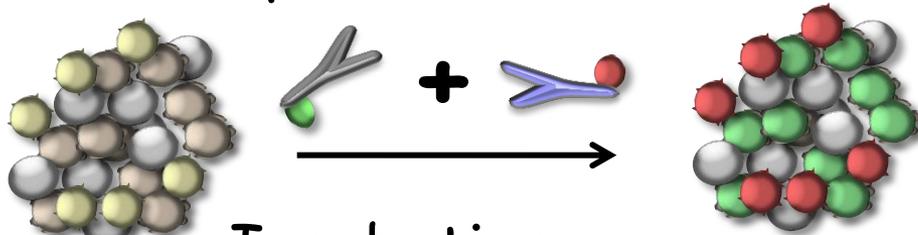
ANTICORPS DE SOURIS  
COUPLE AU FLUOROCHROME  
VERT DIRIGE CONTRE L'ANTIGENE A  
SUR LA CELLULE A



ANTICORPS DE SOURIS  
COUPLE AU FLUOROCHROME  
ROUGE DIRIGE CONTRE L'ANTIGENE B  
SUR LA CELLULE B



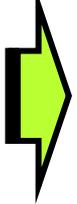
## Suspension cellulaire



Incubation avec  
les anticorps  
couplés



Analyse de la fluorescence → % de cellules rouges



Analyse de la fluorescence → % de cellules vertes

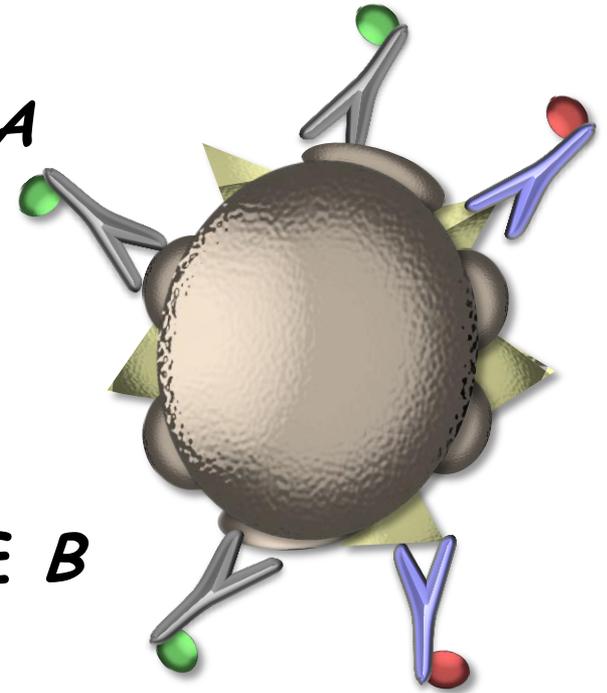
ANALYSE AU **CYTOMÈTRE DE FLUX** OU AU  
MICROSCOPE A FLUORESCENCE

## 2. principe du double marquage

*Les anticorps permettent d'analyser l'expression de deux antigènes différents sur une même cellule*

ANTICORPS DE SOURIS  
COUPLÉ AU FLUOROCHROME  
VERT DIRIGÉ CONTRE L'ANTIGÈNE A  
SUR LA CELLULE A 

ANTICORPS DE SOURIS  
COUPLÉ AU FLUOROCHROME  
ROUGE DIRIGÉ CONTRE L'ANTIGÈNE B  
SUR LA CELLULE A 



# b : analyse d'une population cellulaire par cytométrie de flux

## 1. Principe général de la cytométrie de flux

Appareil permettant d'analyser rapidement des suspensions cellulaires mono dispersées défilant devant une source lumineuse (Laser)

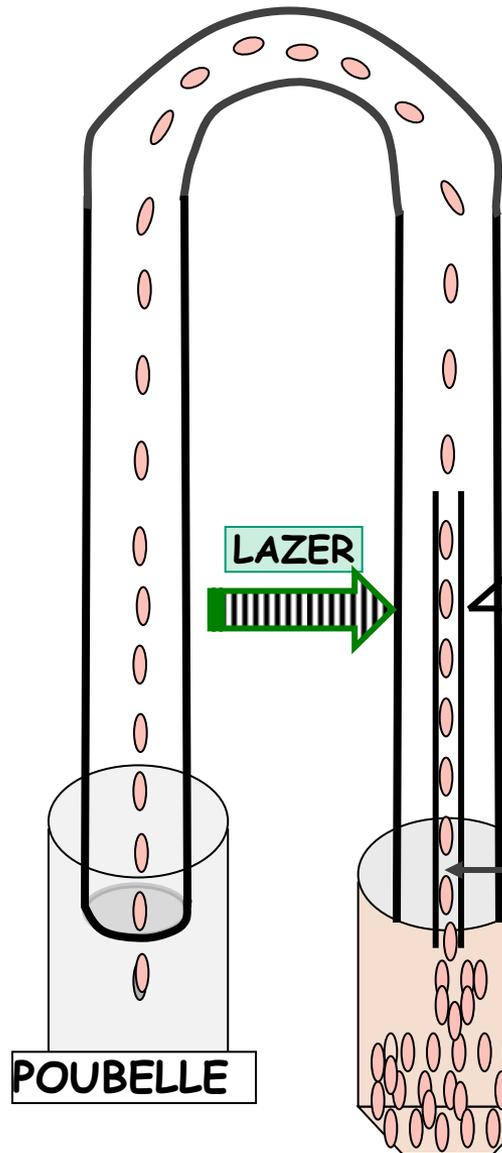


Le cytomètre de flux pour fonctionner nécessite la combinaison de plusieurs systèmes :

- Système fluide
- Système optique
- Système informatique

✓ Quelques utilisations de la cytométrie de flux :

- ➡ Immunofluorescence pour la caractérisation des sous-populations cellulaires
- ➡ Marquage spécifique de l'ADN pour la mesure du cycle cellulaire



**SYSTEME FLUIDIQUE  
PERMET D'INTRODUIRE ET  
DE CANALISER LES CELLULES**

**SYSTEME OPTIQUE  
EXCITATION ET  
EMISSION DES SIGNAUX**

**DETECTEUR  
DE FLUORESCENCE  
VERTE**

**DETECTEUR  
DE FLUORESCENCE  
ROUGE**

**DETECTEUR  
DE DIFFUSION  
DE LA LUMIERE**

**DÉTECTEUR  
DE DIFFUSION  
DE LA LUMIERE**

**SYSTEME ELECTRONIQUE  
CONVERTIR LES SIGNAUX OPTIQUES  
EN SIGNAUX ELECTRONIQUES  
+ NUMERISATION POUR UNE  
ANALYSE SUR ORDINATEUR**

**INFORMATIQUE**



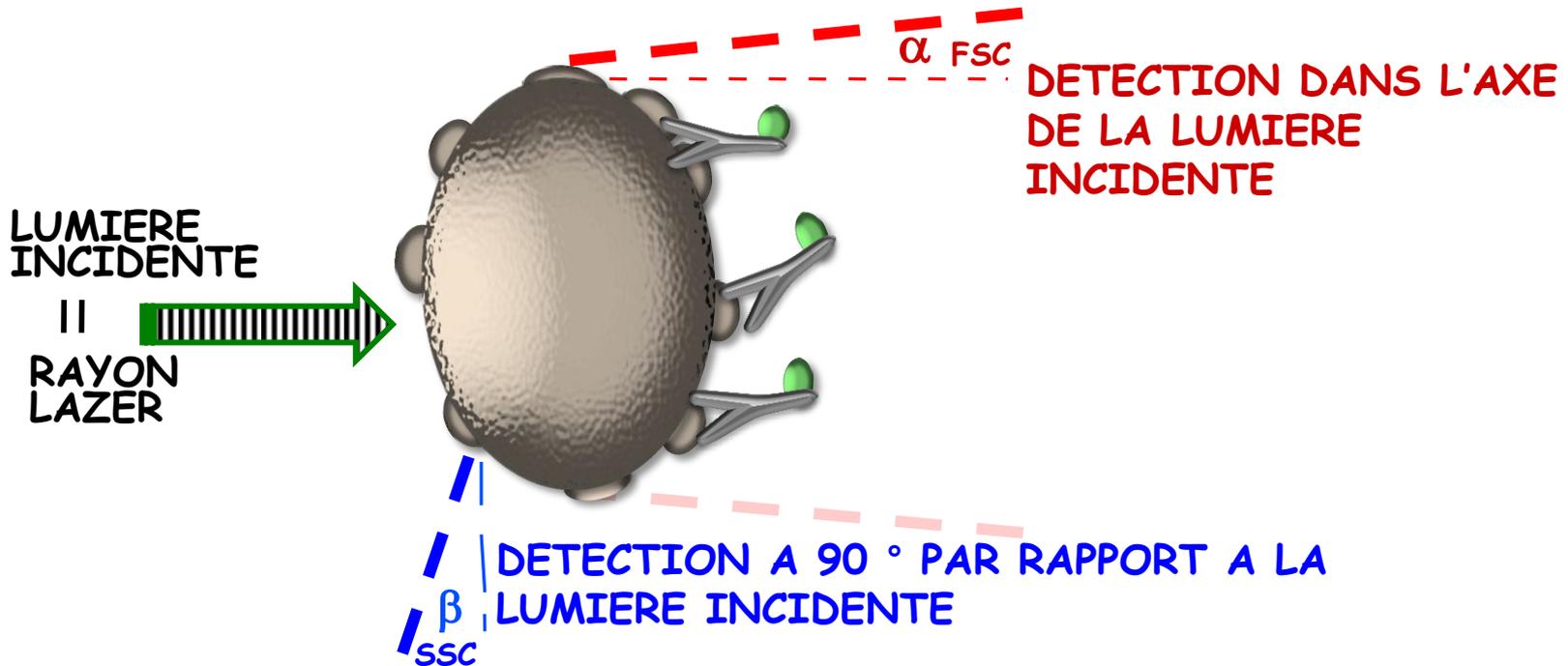
# CYTOMETRIE EN FLUX ANALYSE SELON DIFFERENTS PARAMETRES

- 1 : TAILLE DE LA CELLULE
- 2 : LA GRANULOSITE
- 3 : INTENSITE DE FLUORESCENCE

## 1 : TAILLE DE LA CELLULE (FSC) :

LA CELLULE PEUT DIFFRACTER LA LUMIERE INCIDENTE

- PROPORTIONNEL A LA TAILLE DE LA CELLULE
- DETECTION DANS L'AXE DE LA LUMIERE INCIDENTE



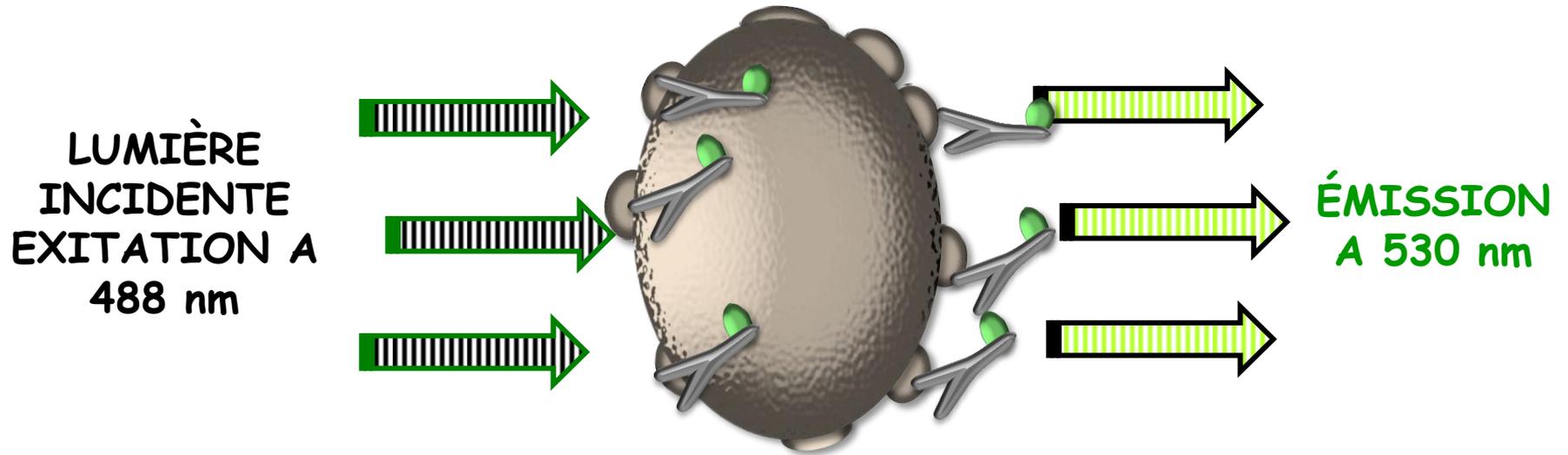
## 2 : LA GRANULOSITÉ (SSC) :

LA CELLULE PEUT REFFRACTER LA LUMIERE INCIDENTE

- DETECTION A 90 ° PAR RAPPORT A LA LUMIERE INCIDENTE

### 3 : INTENSITÉ DE FLUORESCENCE

ANTICORPS COUPLEE A UN FLUOROCHROME = EXEMPLE LA FLUOROSCEINE

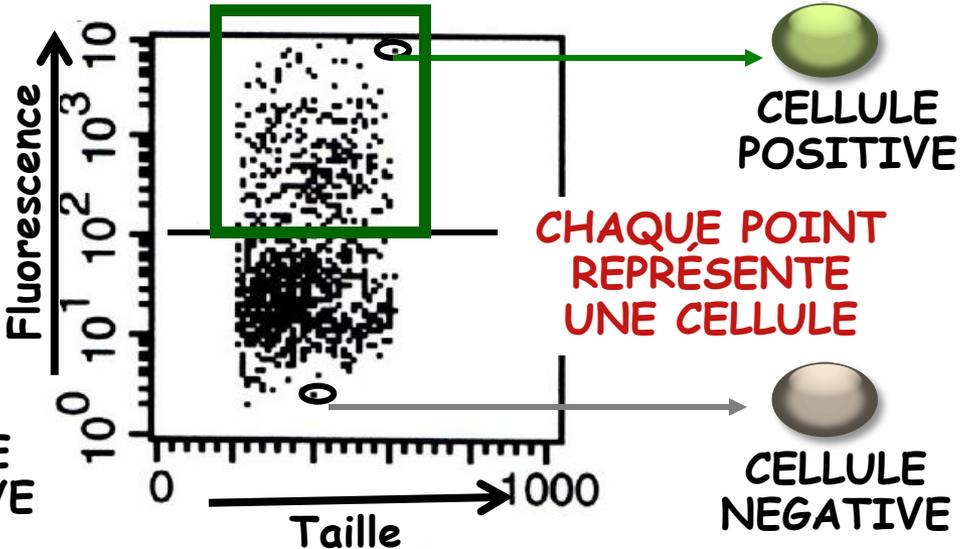
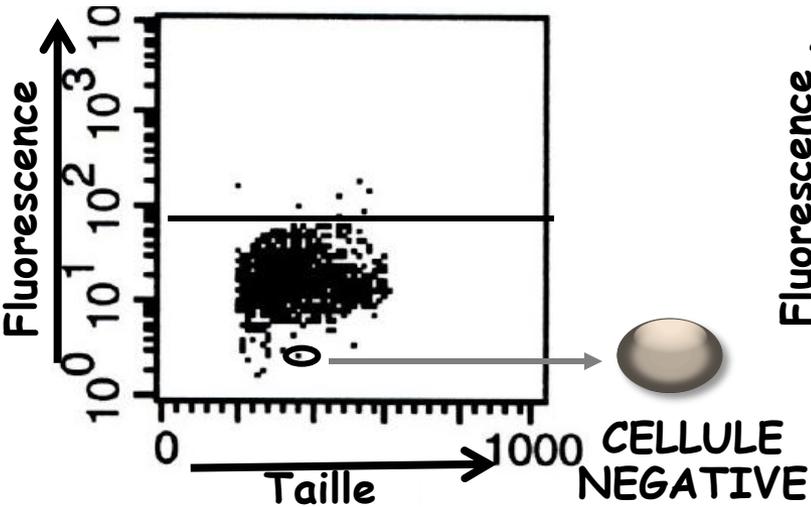


CONVERSION DES SIGNAUX OPTIQUES EN SIGNAUX ELECTRONIQUES    ▲    ANALYSE INFORMATIQUE

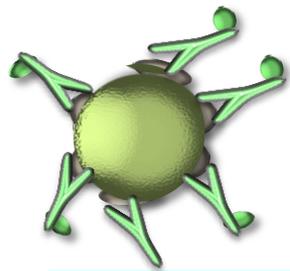
# Exemple d'analyse par cytométrie de flux :

ANTICORPS CONTROL 

ANTICORPS SPÉCIFIQUE 



ANTICORPS NON SPÉCIFIQUES ACCOLES A LA MEMBRANE



ANTIGENE RECONNU PAR L'ANTICORS SPÉCIFIQUE

FLUORESCENCE NON SPÉCIFIQUE

FLUORESCENCE SPÉCIFIQUE PROPORTIONNELLE A LA QUANTITE D'ANTIGENES PRESENTS A LA SURFACE DE LA CELLULE

➤ *quelques éléments comparatifs entre la cytométrie et la microscopie à fluorescence*

## Cytométrie de flux



Analyse de cellules vivantes

Rapidité : 500 à 1000 cellules /seconde

Bonne quantification de la fluorescence

Analyse sur plusieurs paramètres

Pas possibilité de travailler sur des tissus solides

Ne permet pas de détecter la partie de la cellule qui émet la fluorescence

## Microscopie à fluorescence



Analyse sur cellules fixées

Lent et fastidieux, nombre de cellules analysé faible

Limitée à la sensibilité de l'oeil (fluorescence: "négatives", "faibles", "moyennes", "fortes")

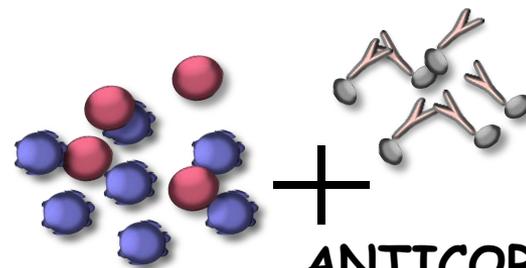
Possibilité selon le grossissement de voir la partie de la cellule qui émet une fluorescence

## c : méthode de séparation cellulaire utilisant les anticorps

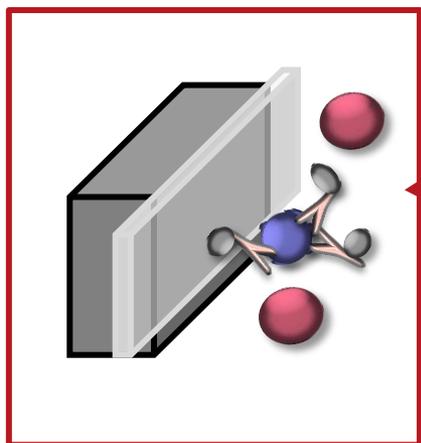
- *déplétion par le complément : l'anticorps active le complément qui lysera les cellules exprimant l'antigène*
- *séparation par « panning » : l'anticorps fixés sur le support plastique séquestre les cellules exprimant l'antigène*
- *tri par cytomètre de flux : utilise le marquage par des anticorps fluorescents pour trier les cellules*
- *séparation par tri magnétique : l'anticorps retient les cellules sur l'aimant grâce à son association aux billes magnétiques*

# 1. séparation par tri magnétique

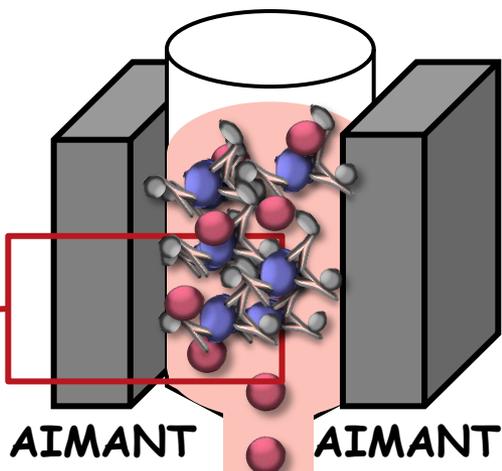
*l'anticorps retient les cellules sur l'aimant grâce à son association aux billes magnétiques*



**ANTICORPS  
DIRIGES CONTRE UN  
ANTIGENE SUR  
CELLULES BLEUES  
COUPLES À UNE  
BILLE MAGNETIQUE**



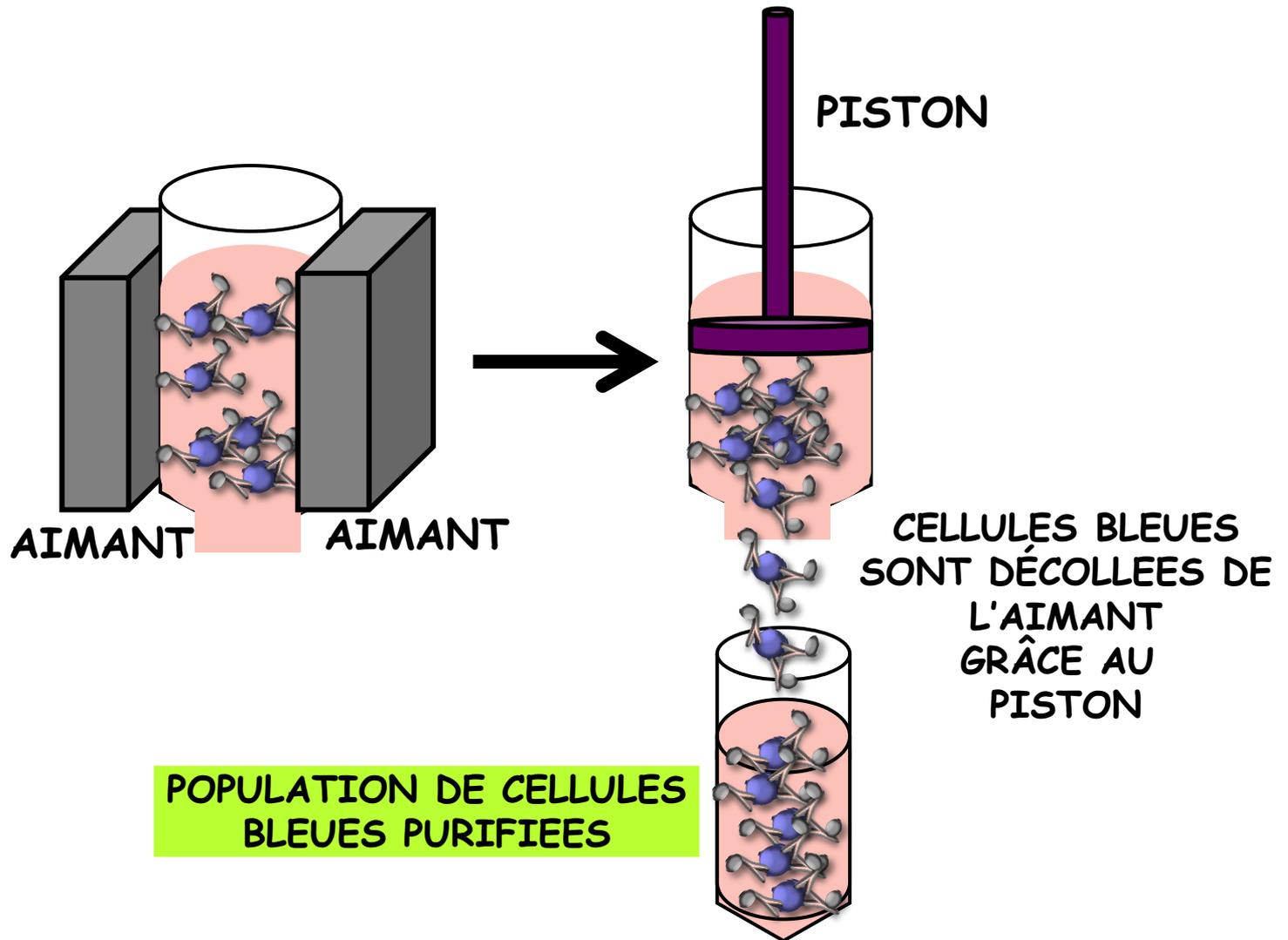
**CELLULES BLEUES  
SONT PIEGEES  
PAR L'AIMANT  
GRACE A LA  
BILLE MAGNETIQUE  
ASSOCIEE A  
L'ANTICORPS**



**CELLULES ROUGES  
PASSENT À  
TRAVERS LE TUBE  
DEVANT L'AIMANT ET NE  
SONT PAS RETENUES**

**POPULATION DE CELLULES  
ROUGES PURIFIEES**





**PROPRIETES DES ANTICORPS UTILISES :**

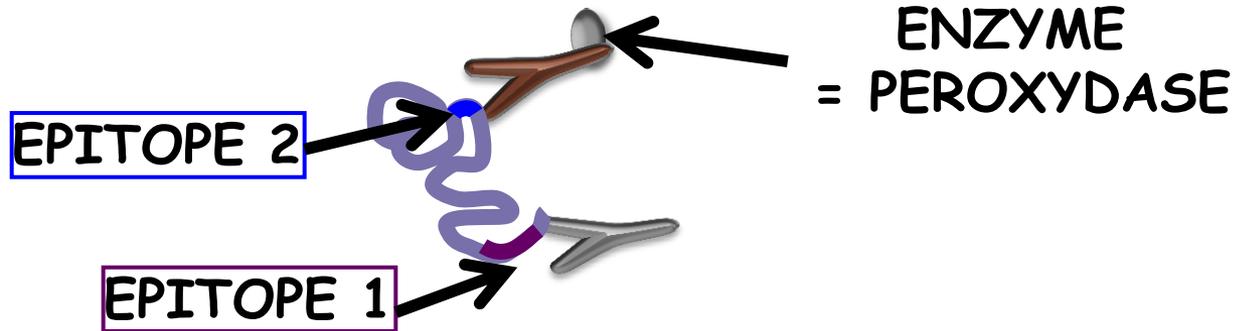
- AFFINITE ET SPECIFICITE DE L'ANTICORPS POUR L'ANTIGENE
- POSSIBILITE DE COUPLER LE FRAGMENT FC À UNE BILLE MAGNETIQUE

## 2: POUR L'IDENTIFICATION D'UNE PROTEINE SOLUBLE

a : méthode par dosage ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

### 1. principe

PROTEINE  
À DOSER



ANTICORPS DIRIGE  
CONTRE L'ÉPITOPE 1  
SUR LA MOLECULE



ANTICORPS DIRIGE  
CONTRE L'ÉPITOPE 2  
SUR LA MOLECULE ET  
COUPLÉ A UNE ENZYME



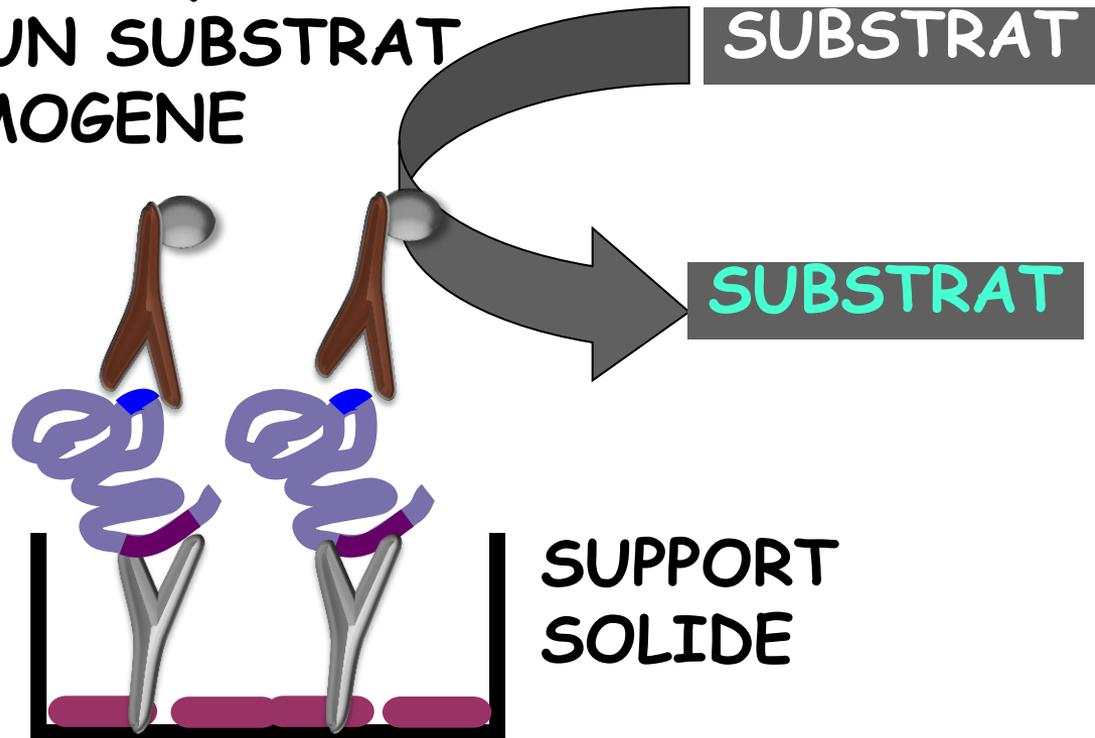
PROPRIETES DES ANTICORPS UTILISEES :

- AFFINITE ET SPECIFICITE DES ANTICORPS  
POUR DIFFERENT ÉPITOPE

- POSSIBILITE DE COUPLER LE FRAGMENT FC À UNE  
ENZYME

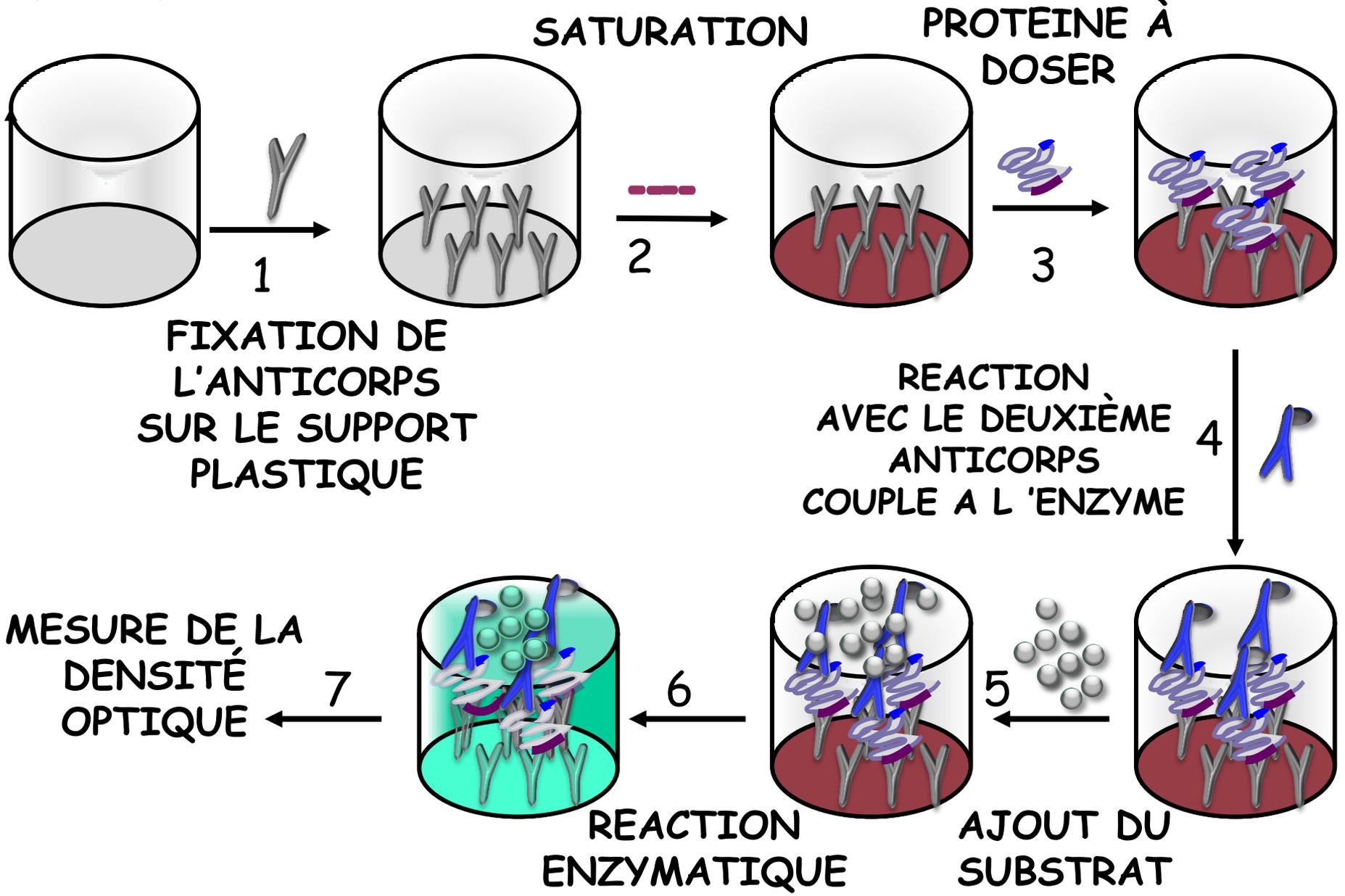
- FRAGMENT FC SE COLLE SUR DES SUPPORTS PLASTIQUES

REACTION  
ENZYMATIQUE  
AVEC UN SUBSTRAT  
CHROMOGENE



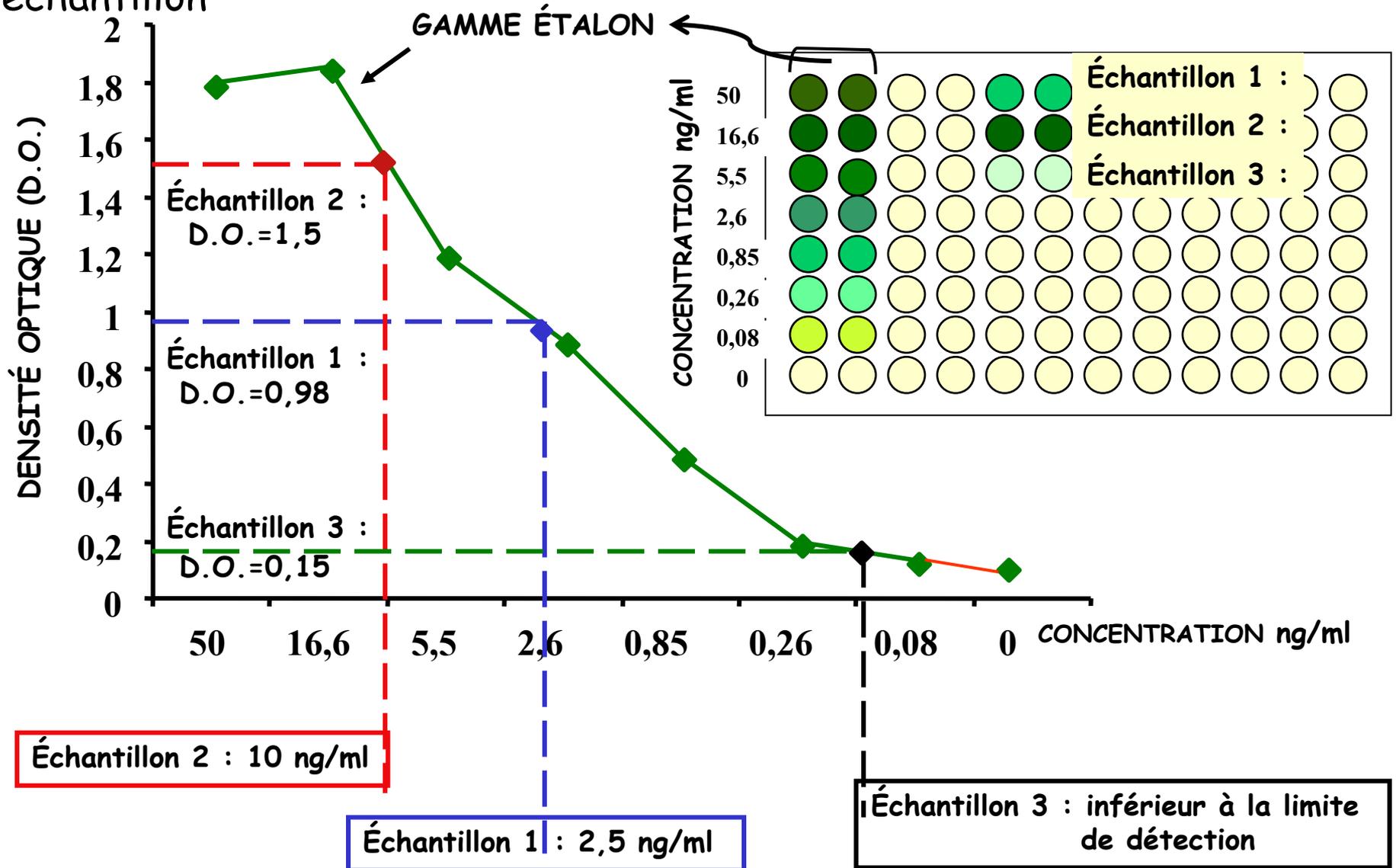
FIXATION SUR LE  
SUPPORT PLASTIQUE

➤ *principe*



## 2. exemple

A l'aide de la courbe étalon (densité optique en fonction de la concentration) on peut évaluer la concentration de la protéine dans l'échantillon



# Les anticorps monoclonaux en recherche et diagnostique

**Chromatographie d'affinité**

Chromatographie d'affinité  
Profil d'élution

Absorbance

Charge Lavage Elution

Volume

**B**

Marquage cellulaire

**Western Blot**

**Dosage ELISA**