



University of Tlemcen
Faculty SNV-STU
Departement of Biologie
Laboratory of applied molecular biology and immunology



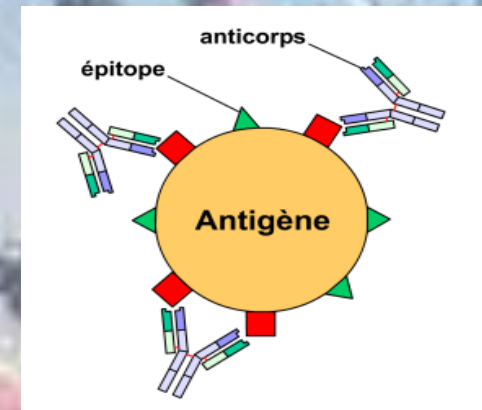
Anticorps monoclonaux: technique de production

Dr. Wafa NOUARI

Definitions

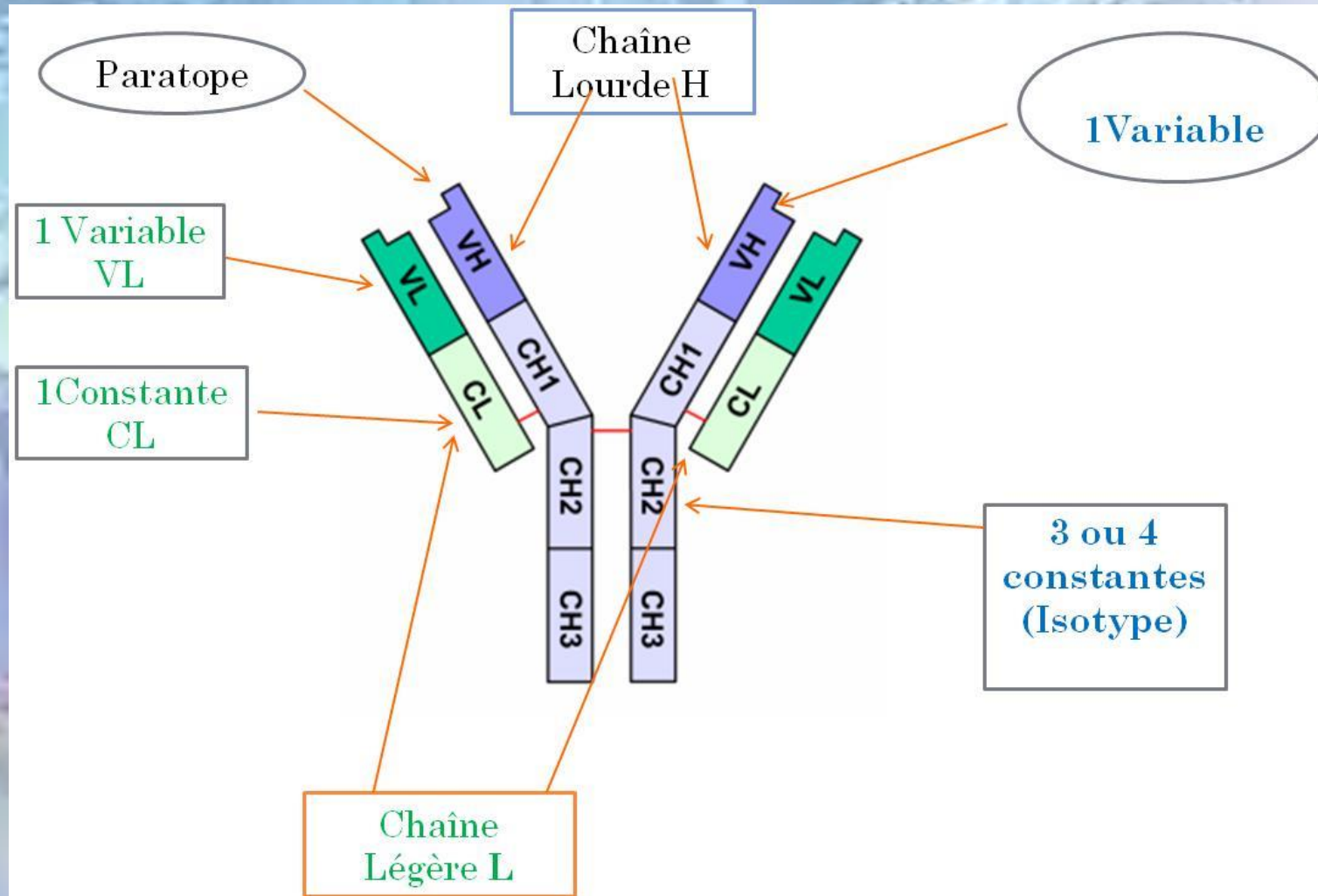
- ❑ Population **homogène d'anticorps** issus d'un **seul et unique clone de cellules B (plasmocytes)**.
- ❑ Ces anticorps ne reconnaissent qu'un **seul type d'épitope** sur un antigène donné.

❑ **Poids moléculaire: > 150 000 da**



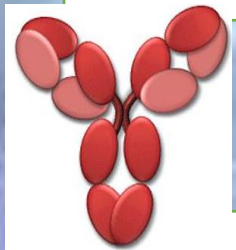
- ❑ Ils sont très largement utilisés en **biologie** et en **médecine**, à la fois comme outils de **diagnostic** et dans des buts **thérapeutiques**.

Structure



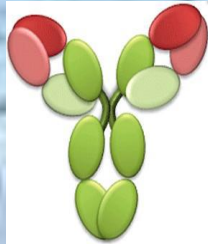
Nomenclature

- ❑ Les anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique se termine par un suffixe **MAB** (Monoclonal Antibody)



Ac Murins

- ❑ 1975, ils portent le suffixe **MOMAB**
- ❑ produits par la **technique des hybridomes**: former des hybrides entre les **lymphocytes B** de souris immunisées avec un antigène donné et des cellules de **myélome murin**.



Ac chimérique
Homme/souris

- ❑ 1984, **XIMAB**
- ❑ Constitués de **domaines variables murins** et de **domaines constants humains**.



Ac humanisé

- ❑ 1988-1991, **ZUMAB**
- ❑ Ils sont constitués d'une Ig humaine possédant uniquement les **parties hypervariables (CDR) murines**



Ac entièrement
humanisé

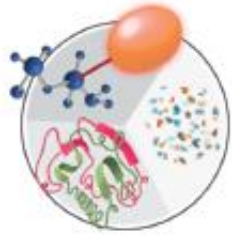
- ❑ 1994, **MUMAB**
- ❑ Développés grâce à la technologie **d'expression des gènes des Ig humaines dans des phages**

Technique de production

- ❑ La technique de production d'AcM repose sur la génération de cellules productrices d'AcM (**Hybridomes**) en **fusionnant** des cellules de **myélome** avec des **splénocytes producteurs d'anticorps** souhaités (par exemple des **cellules B**).



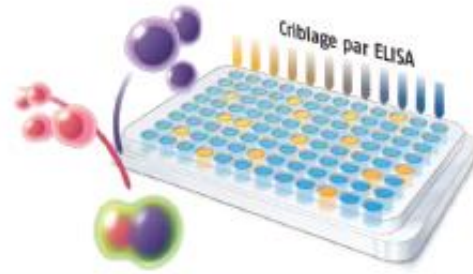
Etapes de développement des anticorps



Immunsation

- Injection des antigènes selon un protocole standard ou spécifique
- Evaluation de la réponse par titration du sérum
- Boost de la réponse si nécessaire
- Récupération et titration du sérum

Anticorps polyclonaux



Fusion

Criblage

- Extraction des cellules spléniques
- Fusion des cellules avec une lignée de myélome de souris
- Mise en culture
- Tests de screening primaire des surnageants sur plaque de criblage

Hybridomes



Clonage

- Sélection d'hybridomes producteurs d'anticorps
- Clonage par dilution limite des clones positifs
- Tests de screening des surnageants sur plaque de criblage
- Sélection de lignées d'hybridomes sécrétrices d'anticorps monoclonaux

Anticorps monoclonaux produits par les hybridomes



Immunisation de l'animal

Les sources d'antigènes:

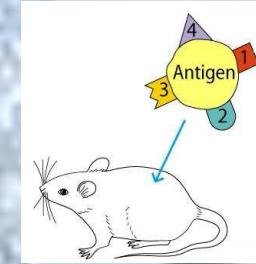
✓ degré de pureté : élimination des contaminants

L'immunisation de l'animal:

✓ dose et forme de l'antigène

✓ adjuvants

✓ voie et nombre d'injection



Souris

lapins

Moutons

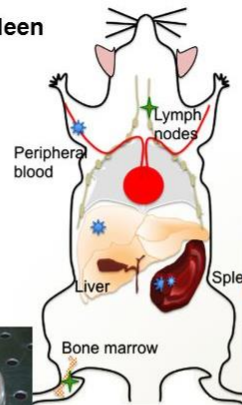
poules



□ Après immunisation (2 à 4 jours), le sang est examiné pour la production d'anticorps et les **splénocytes** producteurs d'anticorps sont ensuite isolés pour la production d'**hybridomes** *in vitro*.

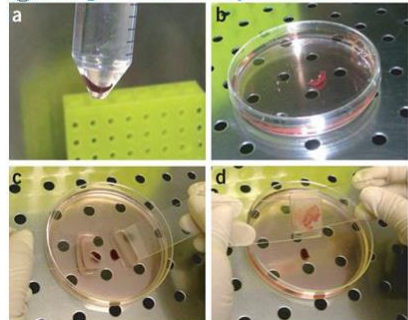


1. Removal of the spleen from mice



2. Splenocytes isolation

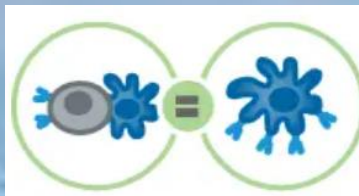
① using the microscope slides



② Using a syringe plunger and cell strainer



[Preparation of Mouse Spleen Single Cell Suspension - YouTube](#)



Fusion

- On fusionne les **plasmocytes sécrétant des anticorps dirigés spécifiquement** contre l'antigène choisi, avec des cellules de **tumeur: myélomes** (cellules immortelles).
- La fusion membranaire se fait grâce à l'addition de **Polyéthylène glycol (PEG)** et permet ainsi d'obtenir des **hybridomes**.
- Les **hybridomes** ont la capacité de se **multiplier** plus rapidement que les plasmocytes productrices d'anticorps et de développer indéfiniment des anticorps spécifiques.



- ❑ Les plasmocytes possédants l'enzyme HGPRT et sécrétant les Ig.

- ❑ Elles n'ont pas l'enzyme **HGPRT** (Hypoxantine-Guanine Phosphoribosyl Transférase).
- ❑ Elles ont perdu la capacité de produire des immunoglobulines.
- ❑ Elles n'apportent que leur propriété d'immortalité aux hybridomes

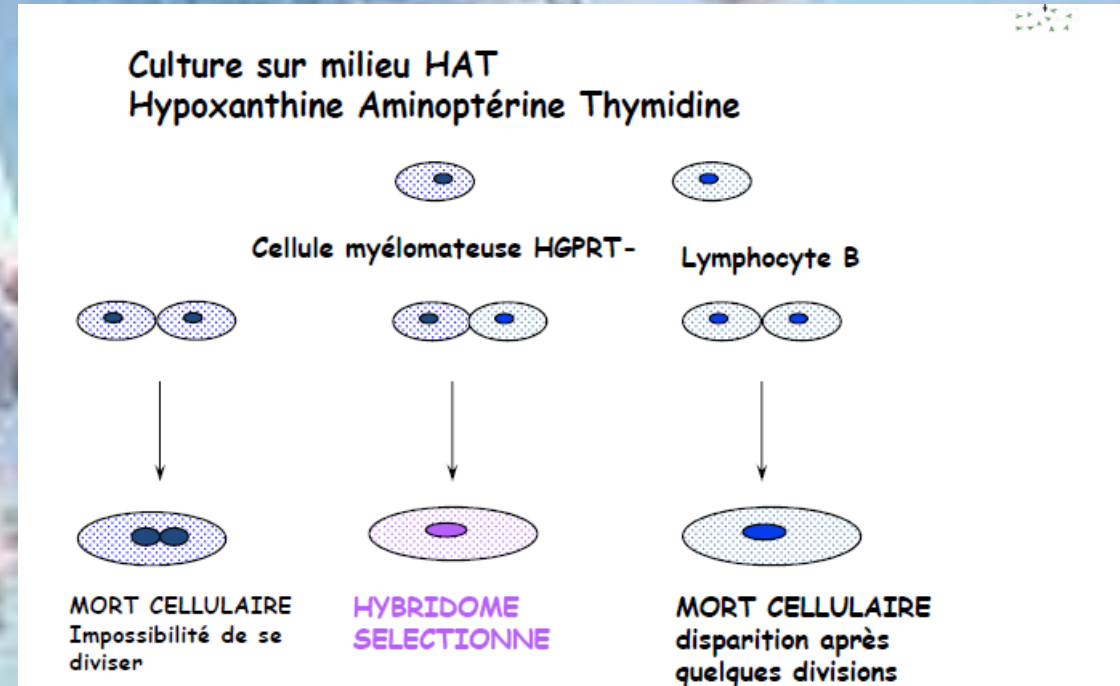
- ❑ **Fusion chimique (PEG)**: Fusion des membranes cytoplasmiques, rendement de fusion élevé, DMSO renforce la viabilité cellulaire.

- ❑ **Fusion physique (Électrofusion)**: Ouverture de pores dans la cellule par des pulses électriques, technique onéreuse, moins destructrice



Sélection des clones

- ❑ Seule une splénocyte sur 200 000 forme réellement un **hybride** viable avec une cellule de myélome.
- ❑ Le mélange de cellules fusionnées est placé dans un milieu HAT.
- ❑ L'**aminoptérine** est une molécule qui empêche les cellules du myélome de fabriquer leurs propres purines et pyrimidines ; ils ne peuvent pas utiliser l'**hypoxanthine** du milieu, alors ils meurent.



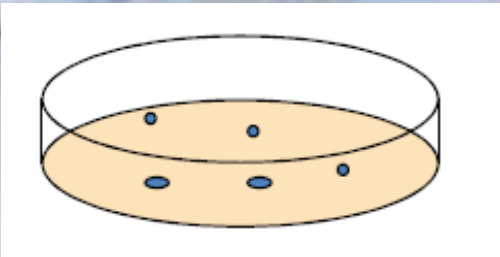


Clonage

❑ Les clones qui produisent l'anticorps souhaité sont cultivés **en culture de masse** dans des bioréacteurs ou grandes flacons

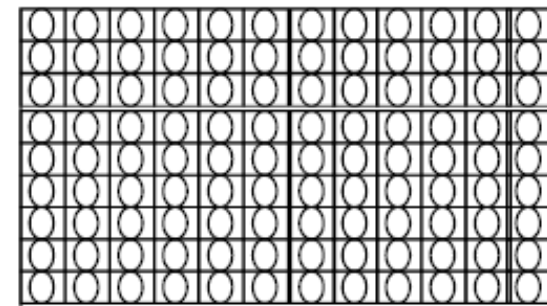
❑ Clonage dans l'agar, dans l'agarose

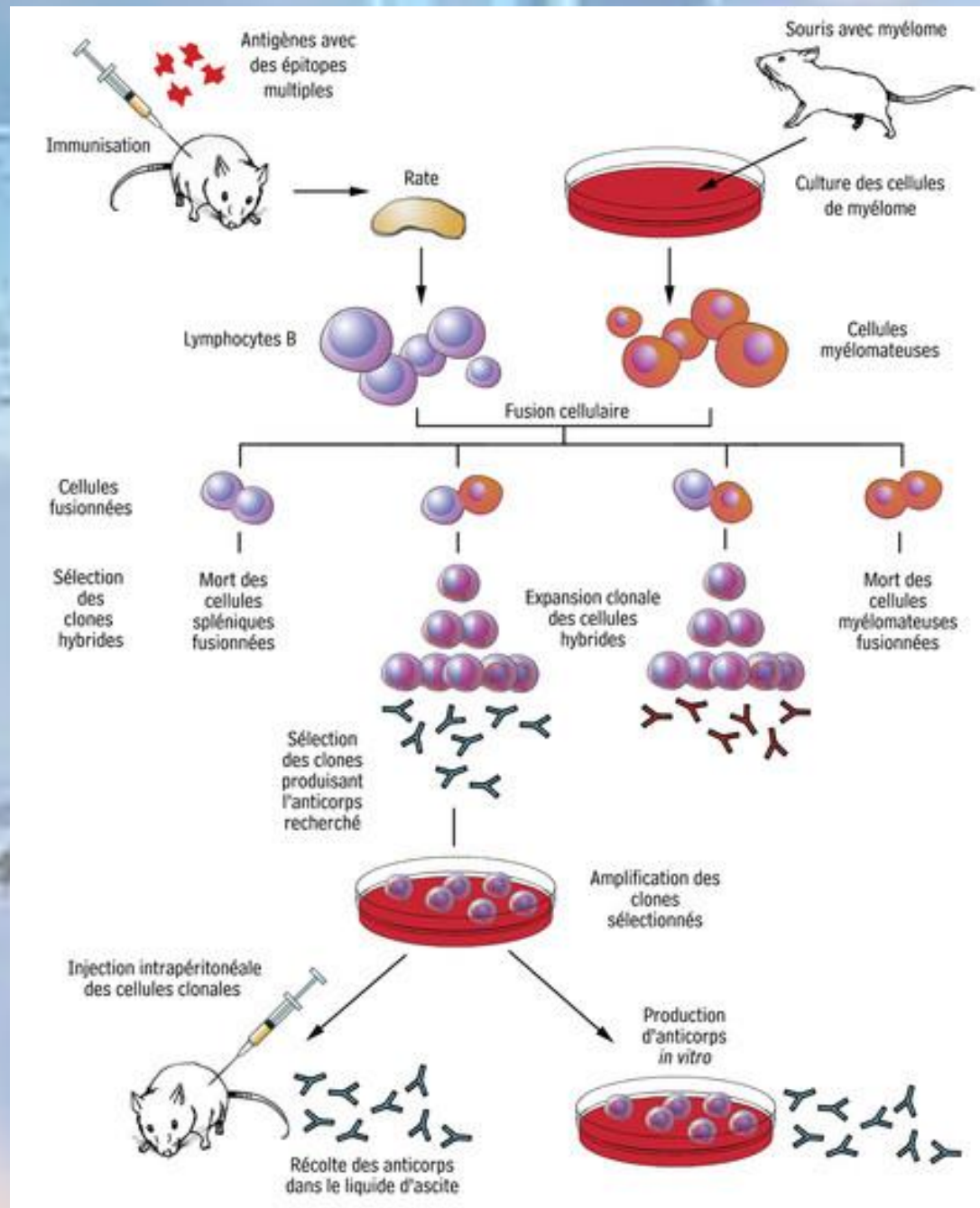
✓ On visualise directement les colonies cellulaires dans l'agar, que l'on remet en culture après dilution.



❑ Clonage par dilution limite

✓ La plus utilisée dans les laboratoires
✓ Réalisée directement dans une plaque de microtitration, Peu onéreuse, longue





Utilisation en thérapie

- ❑ Actuellement, **une vingtaine** d'anticorps monoclonaux sont **commercialisés** et au moins **400** sont en cours **d'évaluation** .
- ❑ Ces médicaments couvrent les domaines thérapeutiques de :
 - ✓ **l'oncologie**
 - ✓ **la transplantation**
 - ✓ **des maladies auto-immunes**
 - ✓ **la cardiologie**
 - ✓ **l'infectiologie**
 - ✓ **l'allergologie**

Utilisation en diagnostique

- Identifier et quantifier les hormones
- Typage des tissus et du sang
- Identifier les agents infectieux
- Identification des antigènes tumoraux et des autoanticorps