

MASTER 1
BIOCHIMIE - IMMUNOLOGIE



INTRODUCTION A
L'IMMUNOTECHNOLOGIE

Pourquoi de l'immunotechnologie?

• DÉVELOPPEMENT DES IMMUNOTHÉRAPIES

- Traitement par anticorps polyclonaux, monoclonaux (immunopharmacologie)
- Thérapie cellulaire (basée sur les cellules dendritiques,...)
- Thérapie génique

• LES TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES OU D'IMMUNOANALYSE

(la base des méthodes diagnostiques)

- Sérodiagnostic par ELISA, agglutination, précipitation
- Immunoanalyse *in-situ*
- Analyse de la production d'anticorps
- Analyse cellulaire par cytométrie en flux.....

IMMUNOTECHNOLOGIE

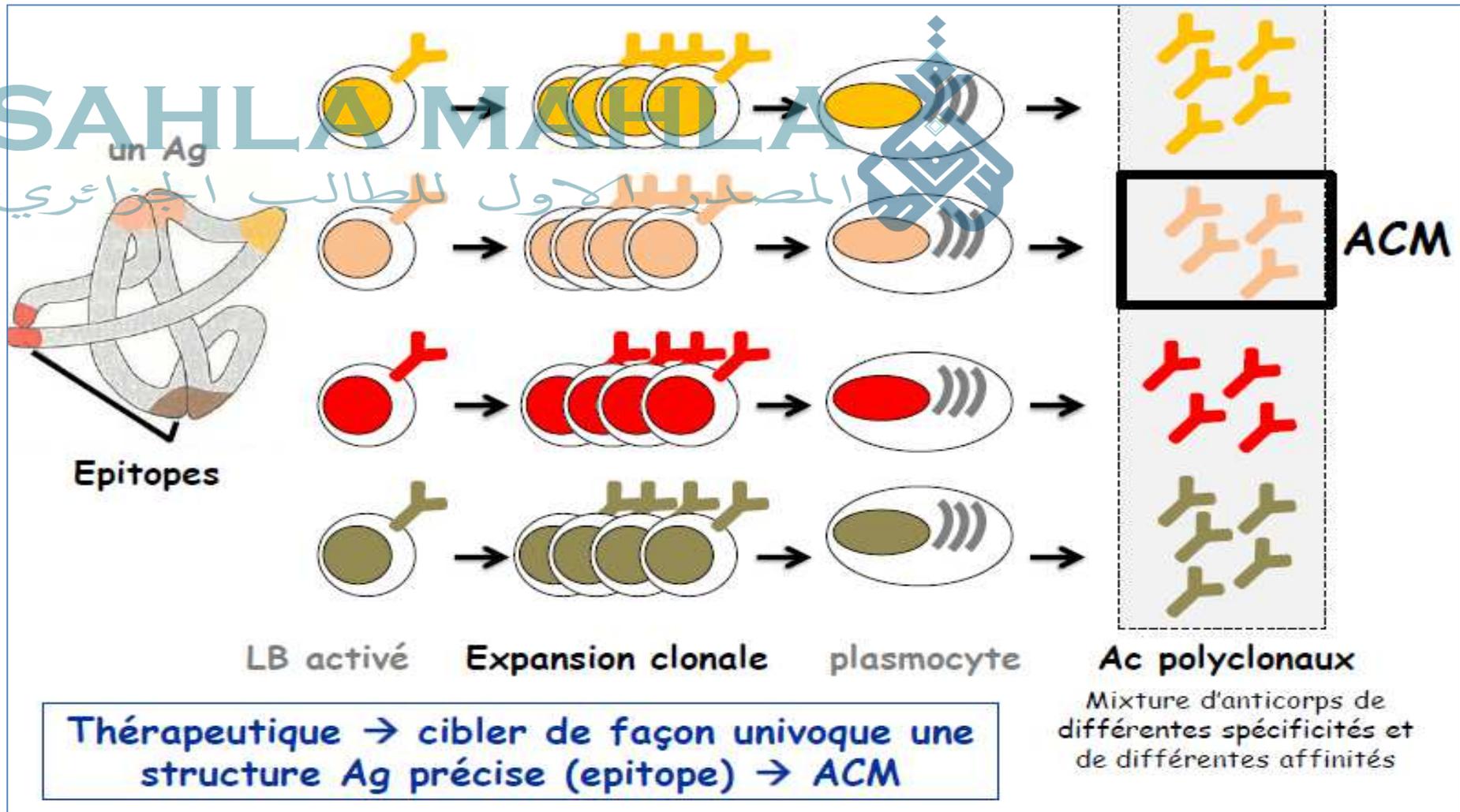
- Les outils et techniques en Immunologie et leurs apport dans les nouvelles technologies de préparations d'antigène/anticorps
- Permet de se familiariser avec les **techniques d'analyses** et **de diagnostic** (ELISA, Immunofluorescence, immuno-électrophorèse, BLOT, Cytométrie...)
- mais aussi dans le dépistage et le suivi thérapeutique de certaines pathologies.

Stratégies d'Immunothérapie

L'immunothérapie consiste à manipuler le système immunitaire d'un individu pour lutter contre sa maladie ou prévenir l'apparition de maladies

- **Immunothérapie passive:** anticorps monoclonaux ou polyclonaux
- **Immunothérapie active:** les vaccins ex anti-cancer...
- **Immunothérapie adoptive**

THERAPIE PRODUCTION D'ANTICORPS



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Protéines recombinantes

Sûreté

Fragments

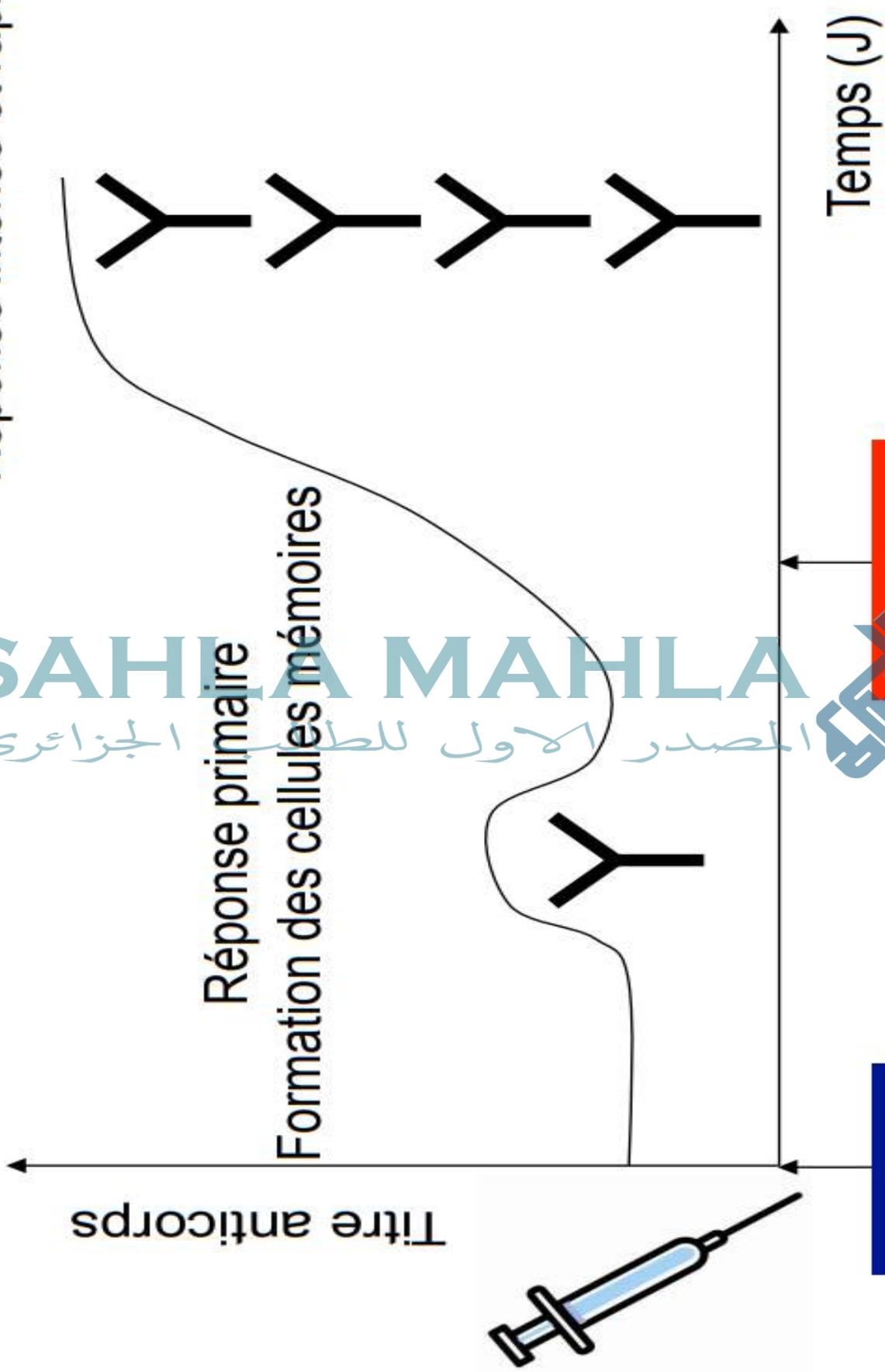
Immunogénicité

Vaccins inactivés

Vaccins vivants atténués

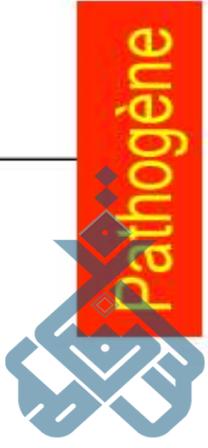
Nature du vaccin

Réponse secondaire
Réponse intense et rapide



Réponse primaire
Formation des cellules mémoires

SAHLA MAHLA
المصدر الاول للطبيب الجزائري



VACCIN

POURQUOI IMMUNOTECHNOLOGIE ?

THERAPIE

- Immunothérapie passive (Ac, cytokines..) /
Immunothérapie adoptive (transfert de cellules..)
- Immunothérapie active (vaccin...)

IMMUNOANALYSE

- Mise en évidence Ag (cellule, tissu, liquide biologique)
- Mise en évidence Ac (liquide biologique)

COMMENT?

□ A. Immunothérapie

- 1) Passive

28

Administration d'anticorps monoclonaux

Cible des Ag tumoraux : VEGF (Bévacizumab), EGFR (Cetuximab, Panitumumab)



SAHLA MAHLA

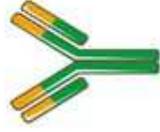
المصدر الاول للطالب الجزائري



Différentes approches immunothérapeutiques

PASSIVE

Fournir une immunité extrinsèque



Anticorps



Transfert adoptif



Cytokines, Adjuvants etc..

**Patient immunocompétent
ou immunodéficient**

ACTIVE ou VACCINATION

Activation des cellules immunitaires *in vivo* afin d'induire une réponse antitumorale ou de rendre efficace une réponse existante



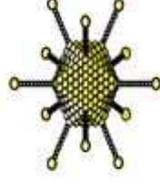
Cellules dendritiques
chargées



Cellules tumorales



Lysats tumoraux



Vecteurs viraux



Vecteurs liposomiques

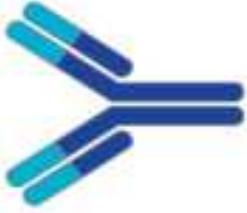
Protéines/ Peptides



SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطال الجزائري

Immunothérapie passive



anticorps monoclonaux

Immunothérapie active

non spécifique

molécules immunostimulantes
molécules inhibitrices de molécules immunosuppressives



spécifique

cellules tumorales
heat shock proteins
antigènes tumoraux (protéines/peptides, vecteurs viraux)
anticorps anti-idiotypiques

Immunothérapie adoptive

Isolément des cellules autologues



Injection au patient

- LT spécifiques
- clones lymphocytaires
- lymphocytes génétiquement modifiés

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري

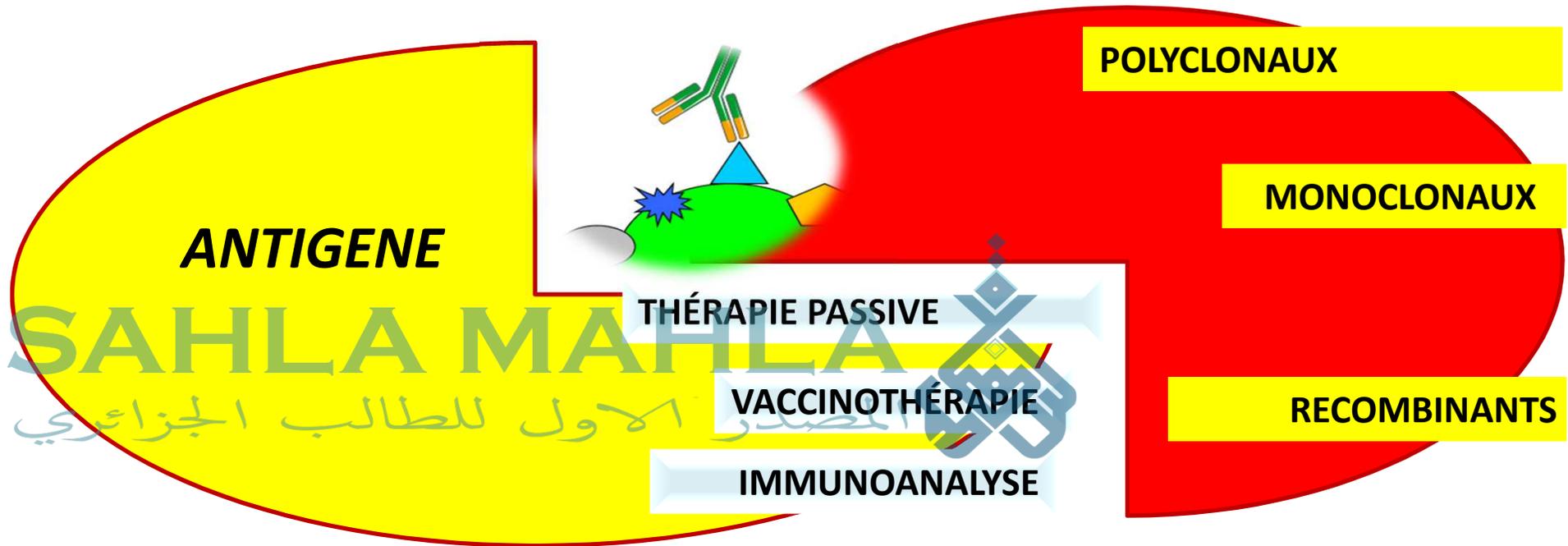


SAHLA MAHLA



DE L'ANTIGÈNEÀ L'ANTICORPS

- PREPARATION DES ANTIGENES ET DES ANTICORPS
POUR USAGE THERAPEUTIQUE ET DIAGNOSTIC



PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE?

- Mélange de molécules
- Peptides (mimotopes)
- Antigène recombinant
- Antigène particulaire

DEGRÉ DE PURETÉ ? Homogénéité?

PRODUCTION D'ANTICORPS?

- Choix de l'animal
- Choix de la dose
- Choix de l'adjuvant immunostimulant
- Choix voie d'administration

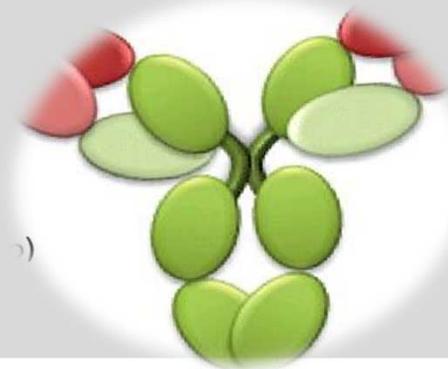
FORMAT?

- Molécules entières classique
- Fragments d'anticorps
- Nanobodies

DEGRÉ DE PURETÉ ?

FONCTION?

- Neutralisation
- Détection
- ADCC
- CDC



QUESTIONS : ANTIGENES

SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري



- Qu'est-ce qu'un antigène?
- Quels sont les critères et les propriétés d'un Antigène?
- Pourquoi les propriétés fonctionnels sont importantes?
- Qu'est ce qu'un épitope? Types?
- Comment obtenir ou préparer un Antigène?

RAPPEL / ANTIGENE

SAHLA MAHLA



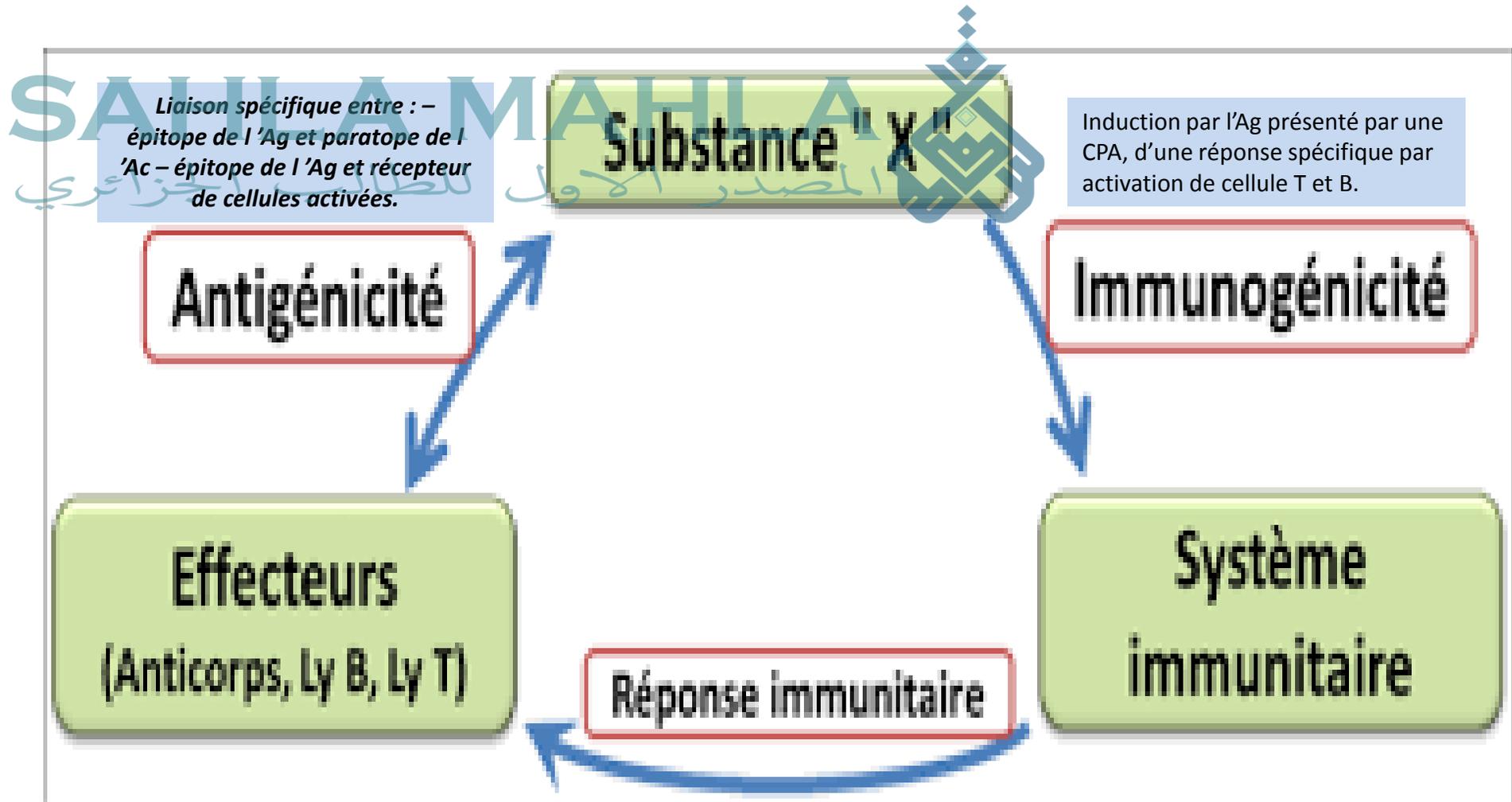
- **Définition.** Le terme d'antigène désigne une espèce moléculaire **étrangères** biologique (naturelle) ou synthétique / agents infectieux (bactérie, virus, parasite,...), reconnue par un récepteur spécifique du système immunitaire (ex. immunoglobulines, récepteurs des lymphocytes B ou T).

ANTIGENE / Nature chimique, Origine et Type des antigènes.

- Les antigènes peuvent être des protéines, des polysaccharides, des lipides, des acides nucléiques, des molécules de synthèse ou des molécules complexes (e.g. glycolipides, glycoprotéines).
- Parmi les Ags naturels provenant d'organismes vivants, on distingue selon les différences génétiques entre l'Ag et le receveur:
 - **Xénoantigène** : Ag déclenchant une réaction immunitaire chez un individu d'espèce différente de celle dont il est issu
 - des extraits bactériens - des extraits fongiques - des extraits de plantes -
 - **Alloantigène** : Ag déclenchant une réponse immunitaire chez un individu de même espèce mais génétiquement différent.

ANTIGENE : PROPRIETES FONCTIONNELLES

Immunogénicité / Antigénicité



ANTIGENE : PROPRIETES FONCTIONNELLES

Immunogénicité / Antigénicité

L'**immunogénicité** peut être définie comme étant le pouvoir d'un antigène à induire **une réponse immunitaire** chez un individu donné et dans des **conditions appropriées**.

La plupart des antigènes induisent **une réponse lymphocytaire B** faisant appel aux lymphocytes T auxiliaires (ou helper) et sont appelés antigènes **thymodépendants** (e.g. protéines).

Certaines structures répétitives peuvent induire des **réponses lymphocytaires B** sans l'intervention des lymphocytes TH et sont appelées antigènes **thymo-indépendants** (e.g. antigènes poly-osidiques: structure polymérique).

IMMUNOGENICITE

- L'immunogénicité n'est pas un caractère qualitatif mais quantitatif ;
 - Il y a des Ag forts et des Ag faibles.
 - Caractéristiques moléculaires des antigènes
 - Le système biologique de l'hôte.
- ➔ Savoir si une molécule est immunogène ou non dépend des conditions utilisées pour l'immunisation : on sait qu'une molécule est immunogène dans telles conditions et ne l'est pas dans d'autres.

IMMUNOGENICITE

• L'expression du pouvoir immunogène d'une substance est donc influencée par plusieurs facteurs...il convient de définir très précisément :

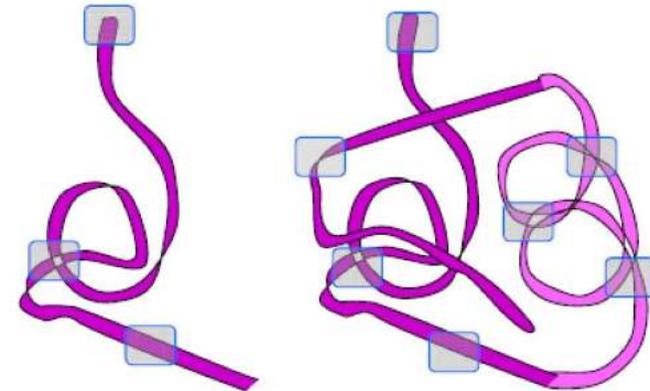
- Taille/Structure
- Composition chimique hétérogène
- Dégradation
- La dose
- Utilisation d'adjuvant
- La voie d'administration,
- L'espèce animale, l'âge (Etat physiologique) et les caractéristiques génétiques

IMMUNOGENICITE : petites molécules???

- Une molécule est d'autant plus immunogène qu'elle a un **poids moléculaire élevé**

- La plupart des petites molécules étrangères ne stimulent pas la formation d'anticorps. Cependant, elles peuvent donner lieu à la formation d'un Ac spécifique lorsqu'elles sont liées à des macromolécules

Un antigène = plusieurs épitopes.



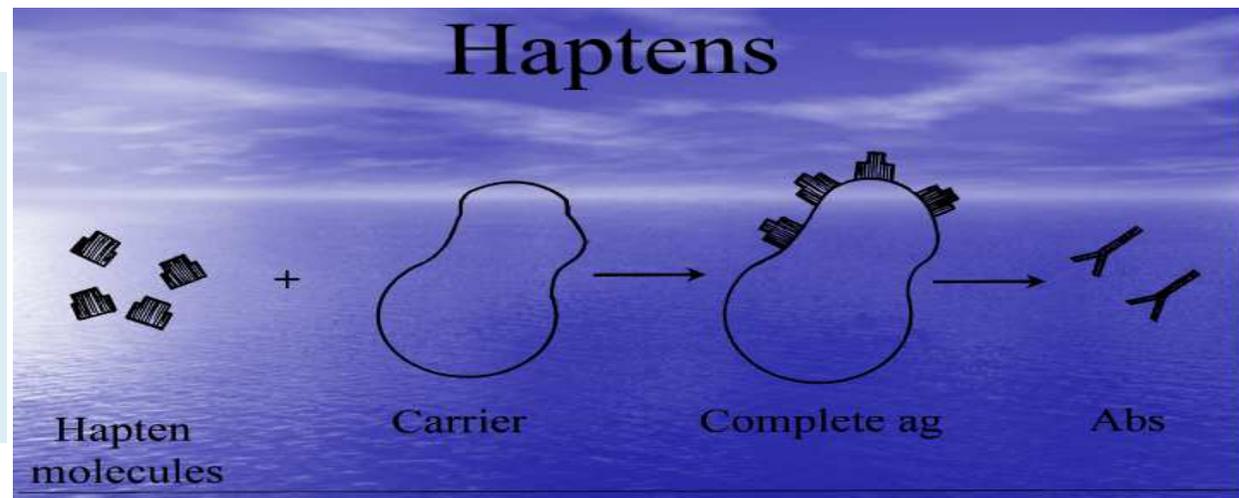
Plus la molécule est grande et complexe, plus les épitopes sont nombreux et différents.

HAPTENES

- Les molécules de faible poids moléculaire sont **antigéniques**, c'est-à-dire capables de se lier à un anticorps, mais **ne sont pas immunogènes**.
- Ces molécules appelées haptènes (du grec *haptein*, lier) doivent nécessairement être **couplées à des protéines** ou des groupements glucidiques porteurs appelés « *carriers* » pour devenir immunogènes.
- c'est la molécule porteuse qui déterminera si l'antigène est T-dépendant ou T-indépendant
- Les *carriers* les plus utilisés sont l'hémocyanine, l'ovalbumine et l'albumine bovine.

Exemple de Haptènes

- Hormones stéroïdiennes (dosage d'hormones par anticorps)
- Médicament (allergies médicamenteuses)



POUR ETRE IMMUNOGENE.....

SAHLA MAHLA

البحر
الاول
الطاب
الجزائري

IMMUNOGENICITE =

POIDS MOLECULAIRE +

COMPOSITION/HETEROGENEITE

CHIMIQUE + NIVEAU

D'ORGANISATION

IMMUNOGENICITE / Composition et hétérogénéité chimique

Etude des polymères synthétiques

- homopolymères des synthèse (1 seul aa) : **peu immunogènes**
- copolymères (2 ou + aa) : **+ immunogènes**
- copolymère + aa aromatiques : **++ immunogènes**

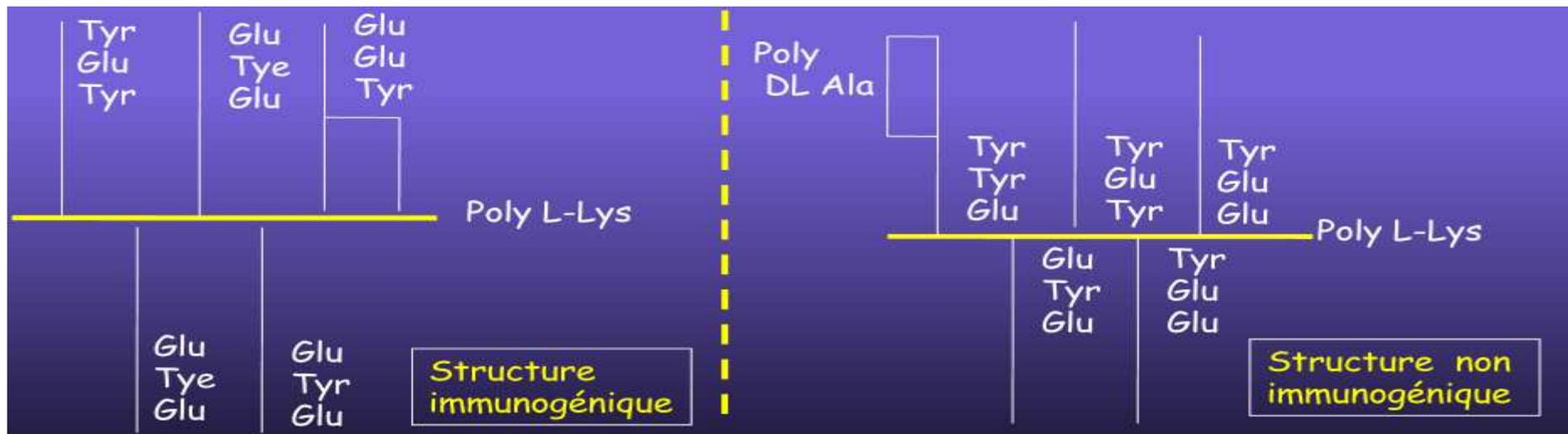
TAILLE vs
Composition / Hétérogénéité chimique

Copolym. ac. glu + lysine = immunogène / 30 -40 kD.
idem + tyrosine : immunogène à 10 -20 kD

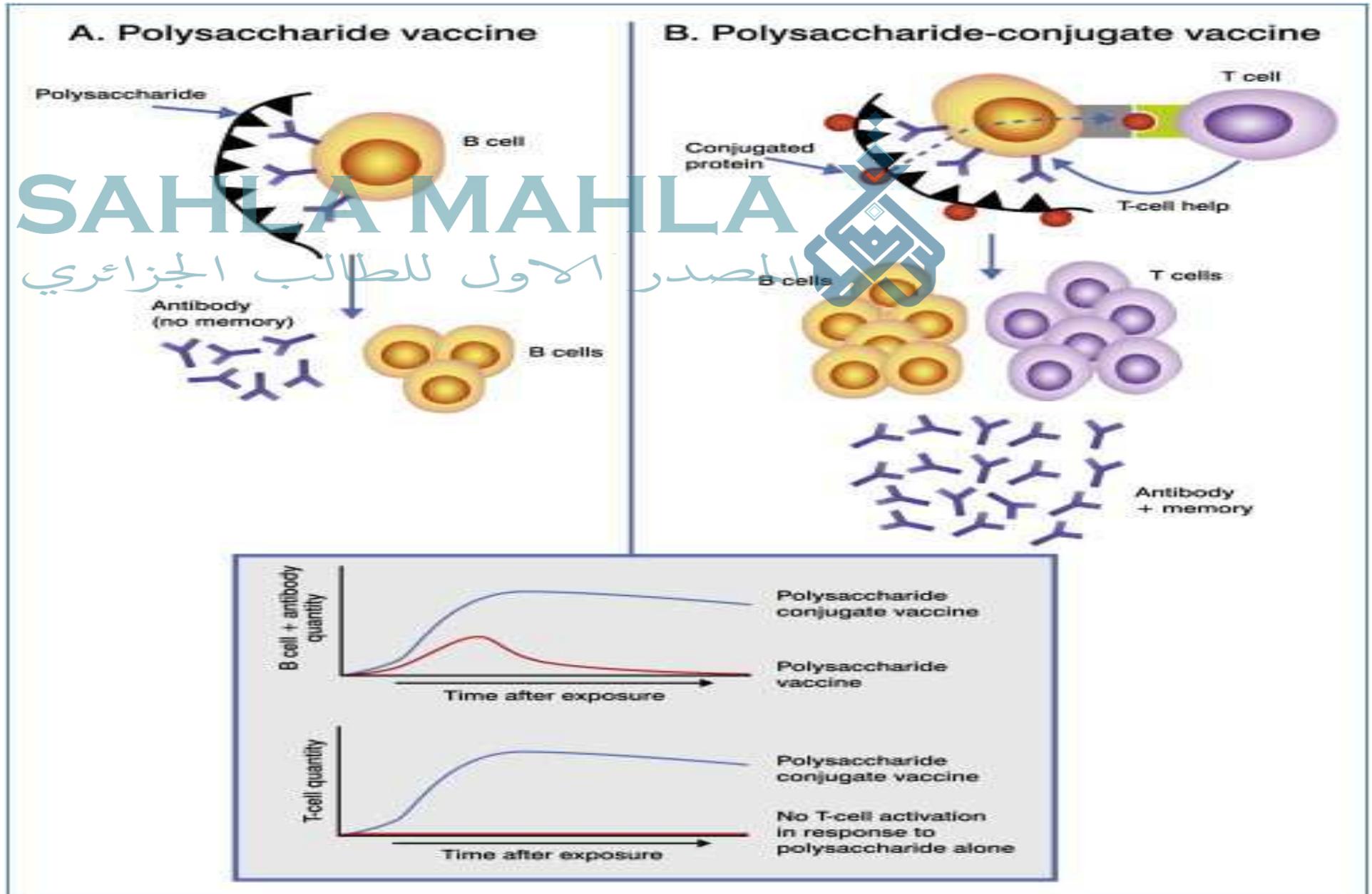
IMMUNOGENICITE/ Rôle de la position spatiale des résidus

- L'utilisation de polypeptides ayant un squelette central unique mais des chaînes latérales a montré que l'expression de l'immunogénécité pouvait dépendre de la position vers l'extérieur de certains résidus.

→ **MEILLEURE accessibilité** de motifs structuraux indispensables à l'activité immunogénique.



IMMUNOGENICITE /POLYSACCHARIDE



IMMUNOGENICITE / Apprêtement **association CMH (Caractère dégradable)**

- Les molécules résistantes à l'apprêtement sont de mauvais immunogènes

ex : aa L (Lévogyres) / D (Dextrogyres)

Dans la nature : formes L bien dégradés par les enzymes des APC

- Molécules solubles = peu immunogènes (moins bien phagocytées) (Forme physique)

Rôle de l'individu dans l'immunogénicité

Pour une même molécule, les réponses vont varier en fonction :

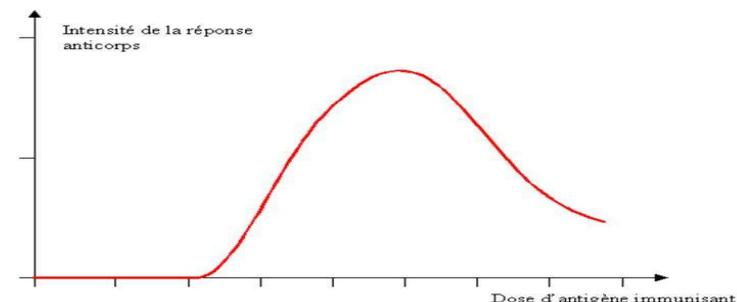
✓ Paramètres génétiques (génotype) propres à l'individu / Etat physiologique

✓ Répertoire B et T de l'individu

→ (Contrôle du type de réponse immunitaire par les gènes (du CMH, du BCR, du TCR, des protéines de la régulation immunitaire...))

✓ Facteurs contingents liés à la manière dont l'antigène

est présenté naturellement ou expérimentalement au système immunitaire (présence d'adjuvants, doses injectées, sites et modalités de l'injection, etc.).



EN RESUME

- **PARAMETRES DU POUVOIR IMMUNOGENE**

SAHLA MAHLA

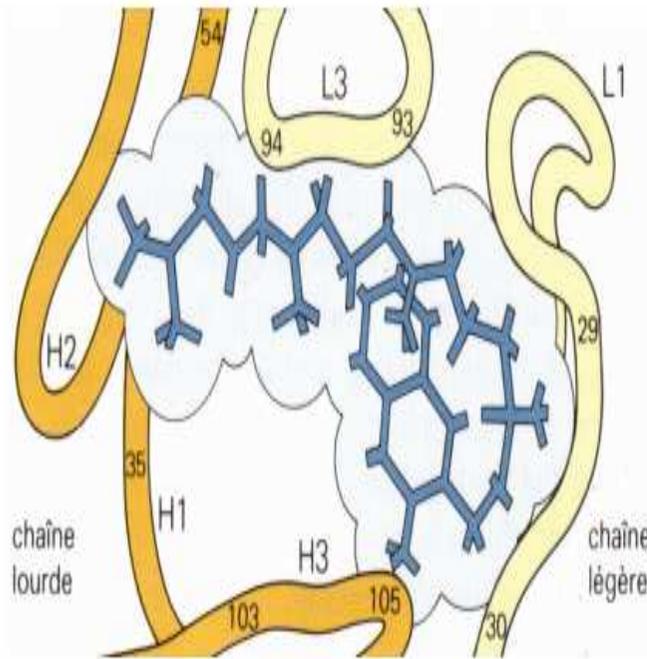


La notion d'immunogénicité est relative : le pouvoir immunogénique dépend de :

- facteurs intrinsèques ou **paramètres structuraux** liés à la molécule d'antigène,
- de facteurs liés à **l'organisme** dans lequel on l'introduit,
- facteurs liés aux **conditions expérimentales de l'immunisation.**

ANTIGENICITE/EPITOPES

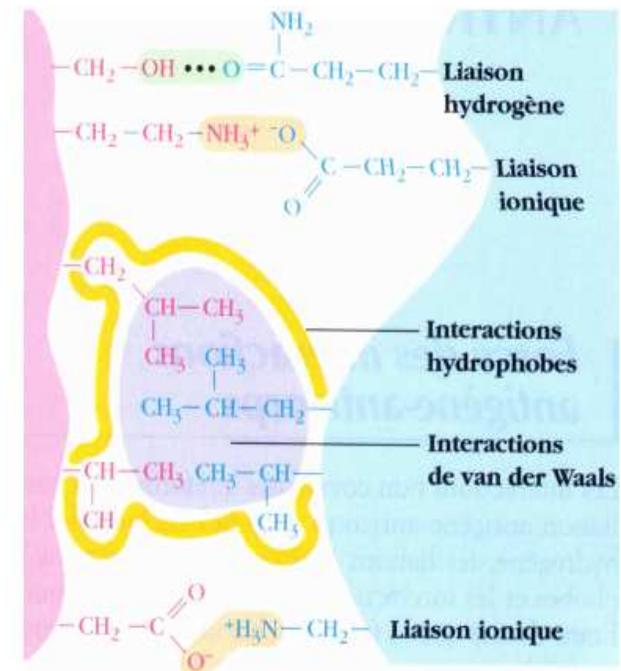
- L'antigénicité est la capacité de liaison spécifique entre un épitope et
 - un paratope
 - un récepteur cellulaire.
- Liaison spécifique: grande complémentarité spatiale



Epitope ou déterminant antigénique = La plus petite structure chimique qui entre en contact avec le paratope de la molécule de reconnaissance du système immunitaire

Un antigène peut être constitué d'une mosaïque d'épitopes.

Les liaisons mises en jeu

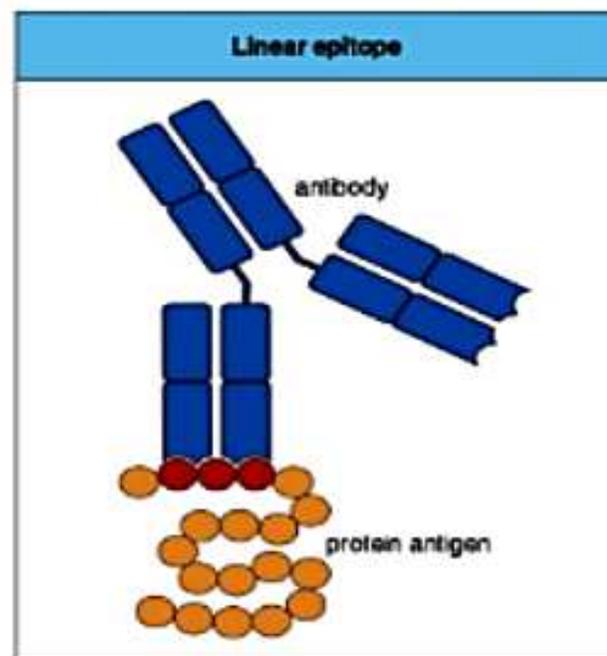


LES DIFFERENTS TYPES D'EPITOPES

EPITOPES SEQUENTIELS

- Epitopes séquentiels : reconnaissance d'une séquence d'acides aminés (qui se suivent sur la protéine), indépendamment de la structure tertiaire du segment considéré

– *les anticorps dirigés contre des épitopes séquentiels les reconnaîtront même si la protéine native est dénaturée*

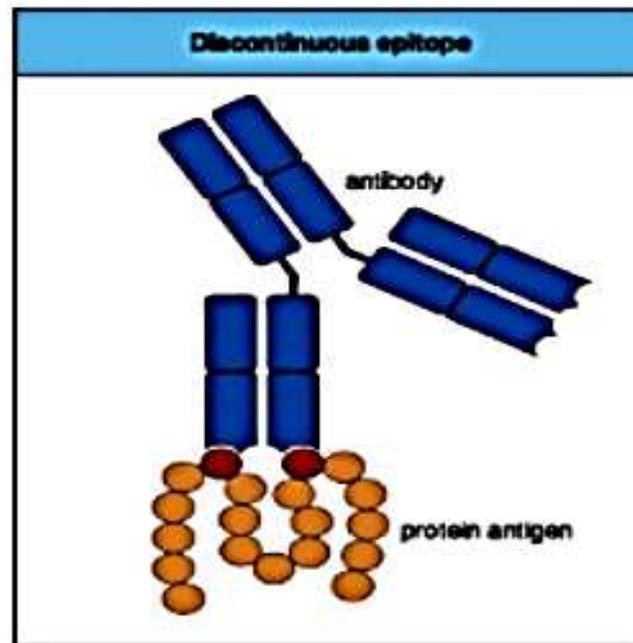
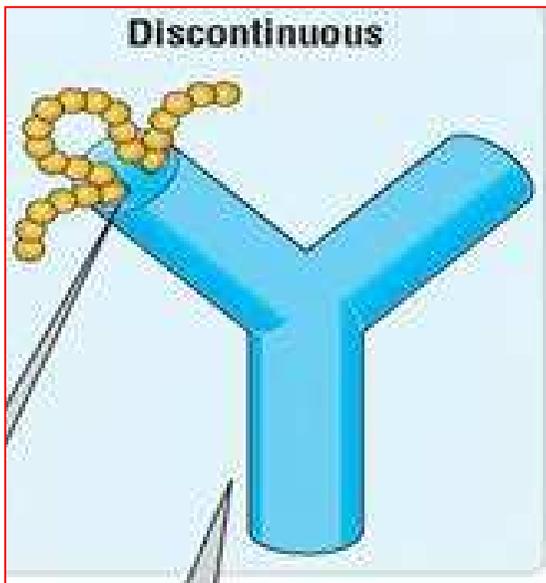


LES DIFFERENTS TYPES D'EPITOPES

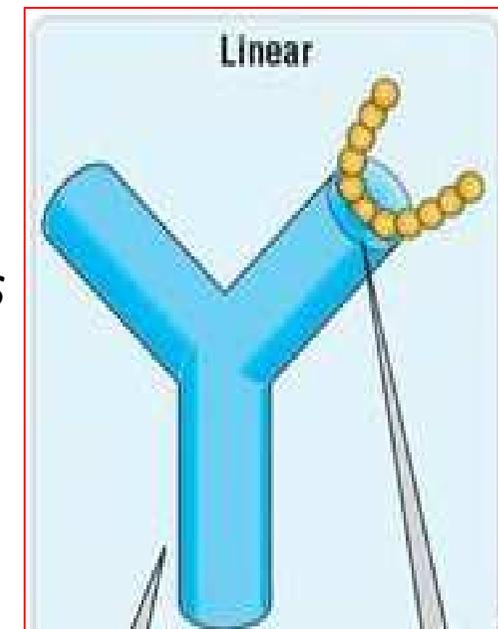
EPITOPES NON SEQUENTIELS (CONFORMATIONNEL)

Epitopes non séquentiels: reconnaissance d'acides aminés non contigus dans la structure primaire mais que la structure tertiaire de la protéine fait entrer en interaction étroite avec le site Fab de l'anticorps : on parle aussi d'épitopes conformationnels

- *les anticorps dirigés contre des épitopes non séquentiels (conformationnels) ne reconnaissent plus ces derniers si la protéine est dénaturée*



VS



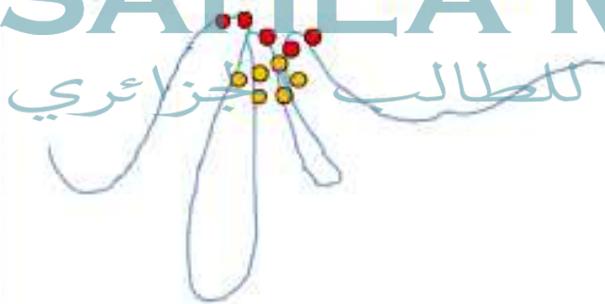
Epitopes linéaires versus épitopes conformationnels

<https://slideplayer.fr/slide/4381975/>

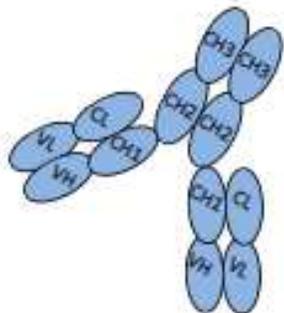
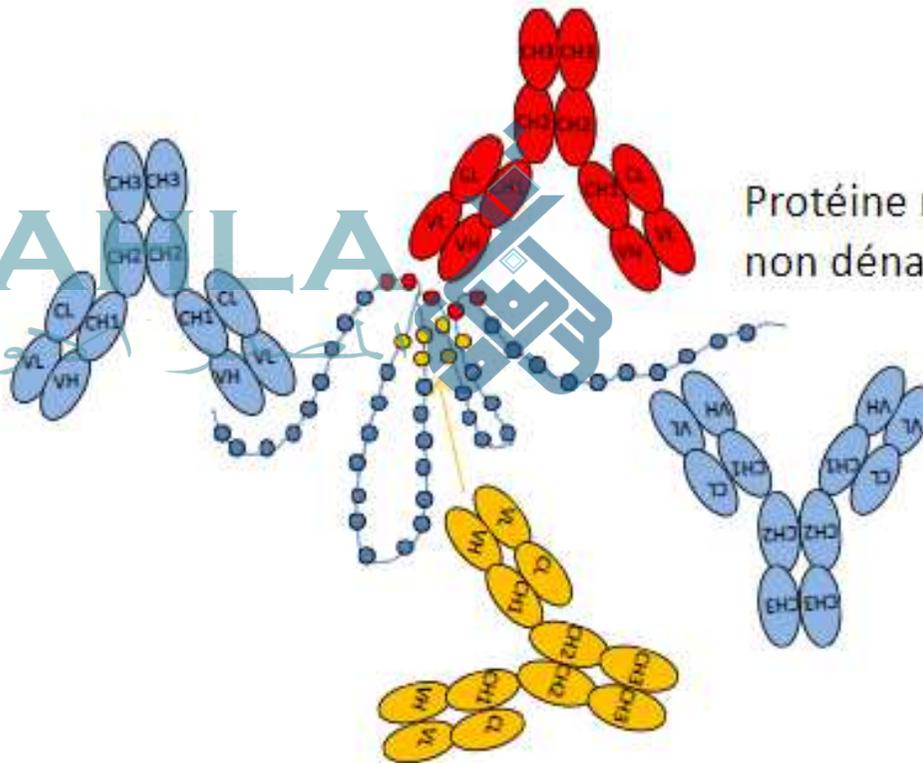
Epitopes linéaires



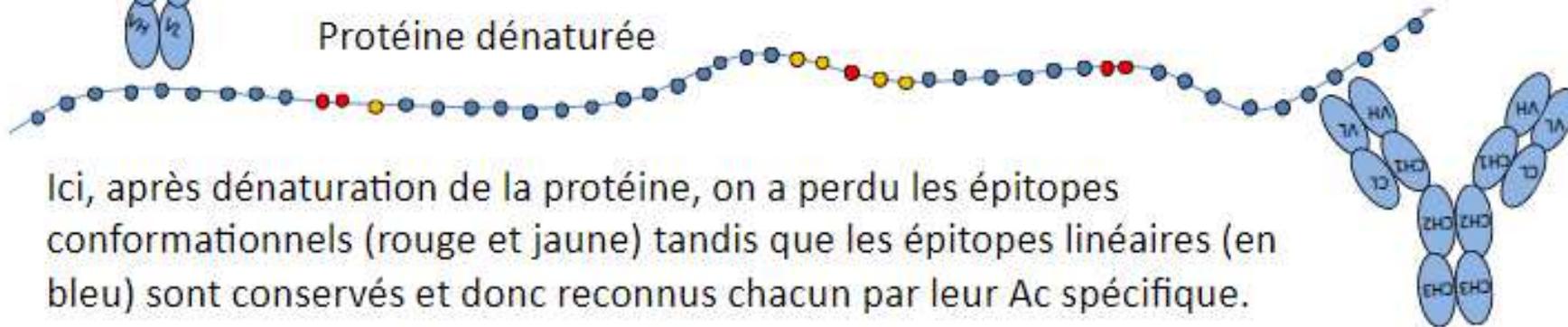
Epitopes conformationnels



Protéine native non dénaturée



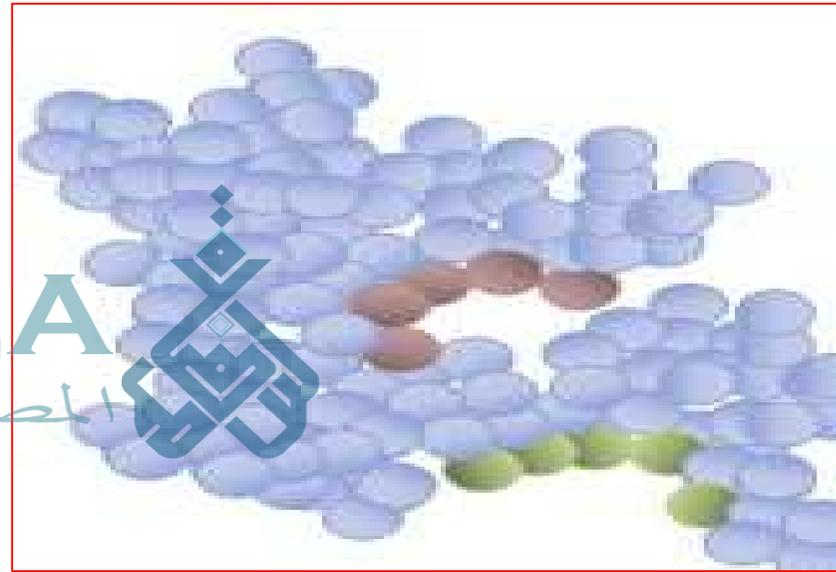
Protéine dénaturée



Ici, après dénaturation de la protéine, on a perdu les épitopes conformationnels (rouge et jaune) tandis que les épitopes linéaires (en bleu) sont conservés et donc reconnus chacun par leur Ac spécifique.

NOTION EPITOPE CRYPTIQUE

Les **épitopes cryptiques** ont pour particularité d'être **inaccessibles** aux récepteurs spécifiques du système immunitaire parce qu'ils sont enfouis au sein d'une molécule, d'une cellule ou d'un tissu.



VALENCE

Le nombre d'épitope qui s'appelle **valence** de l'antigène augmente en fonction du PM.
ex. myoglobine 17 Kd-v=3;
BSA 70 Kd-v =6; Hémocyanine
6 500 Kd -v=75.

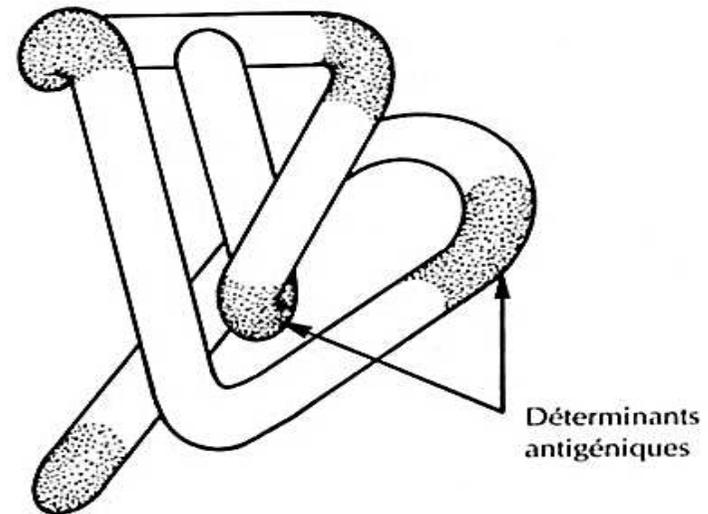
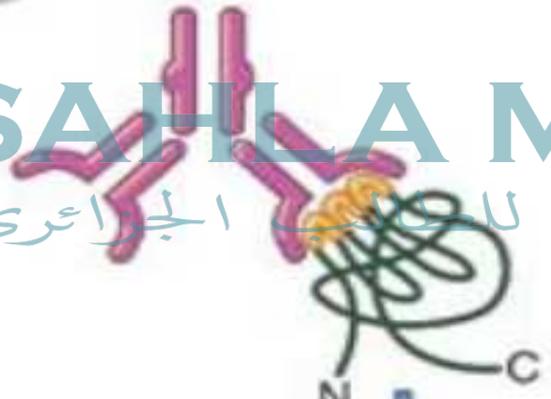


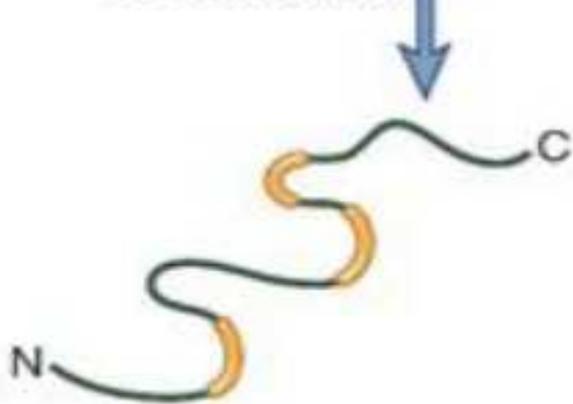
Figure 4.4
Localisation des déterminants antigéniques sur une protéine globulaire.

Déterminant conformationnel

A



Dénaturation



Déterminant perdu après dénaturation

Déterminant séquentiel

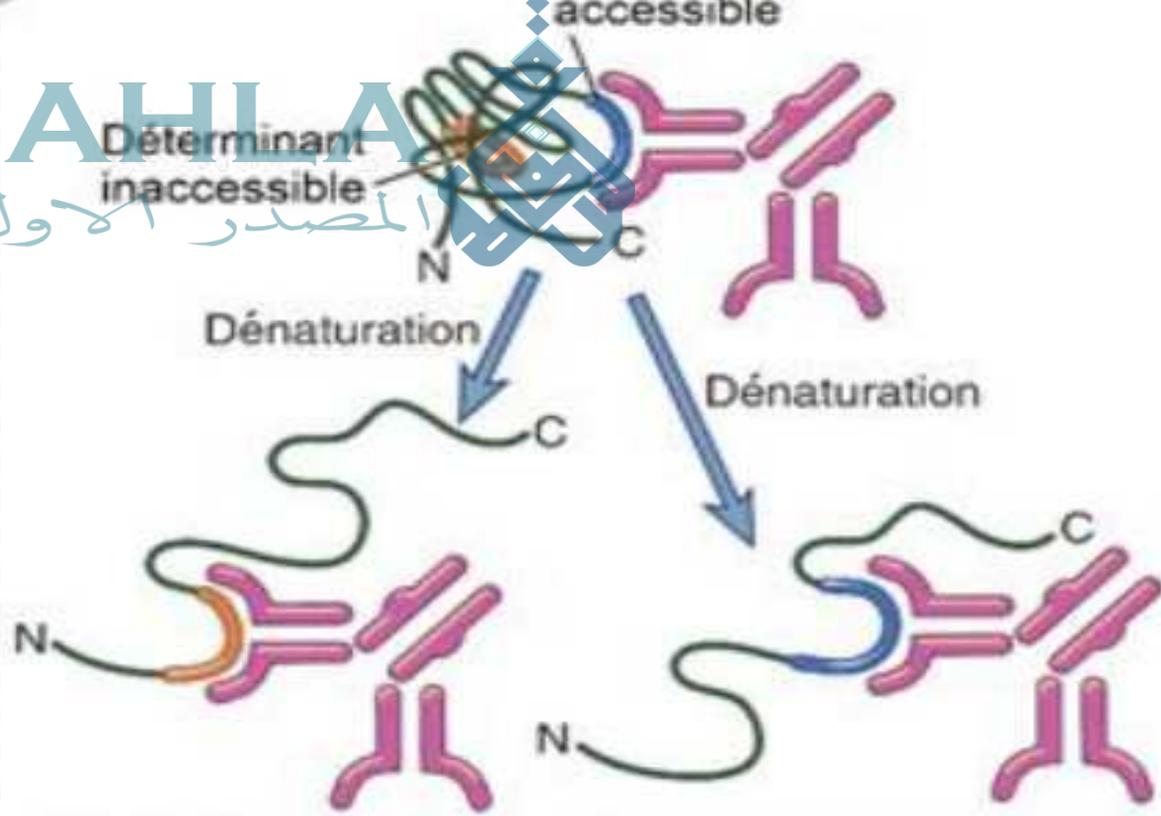
B

Déterminant accessible

Déterminant inaccessible

Dénaturation

Dénaturation

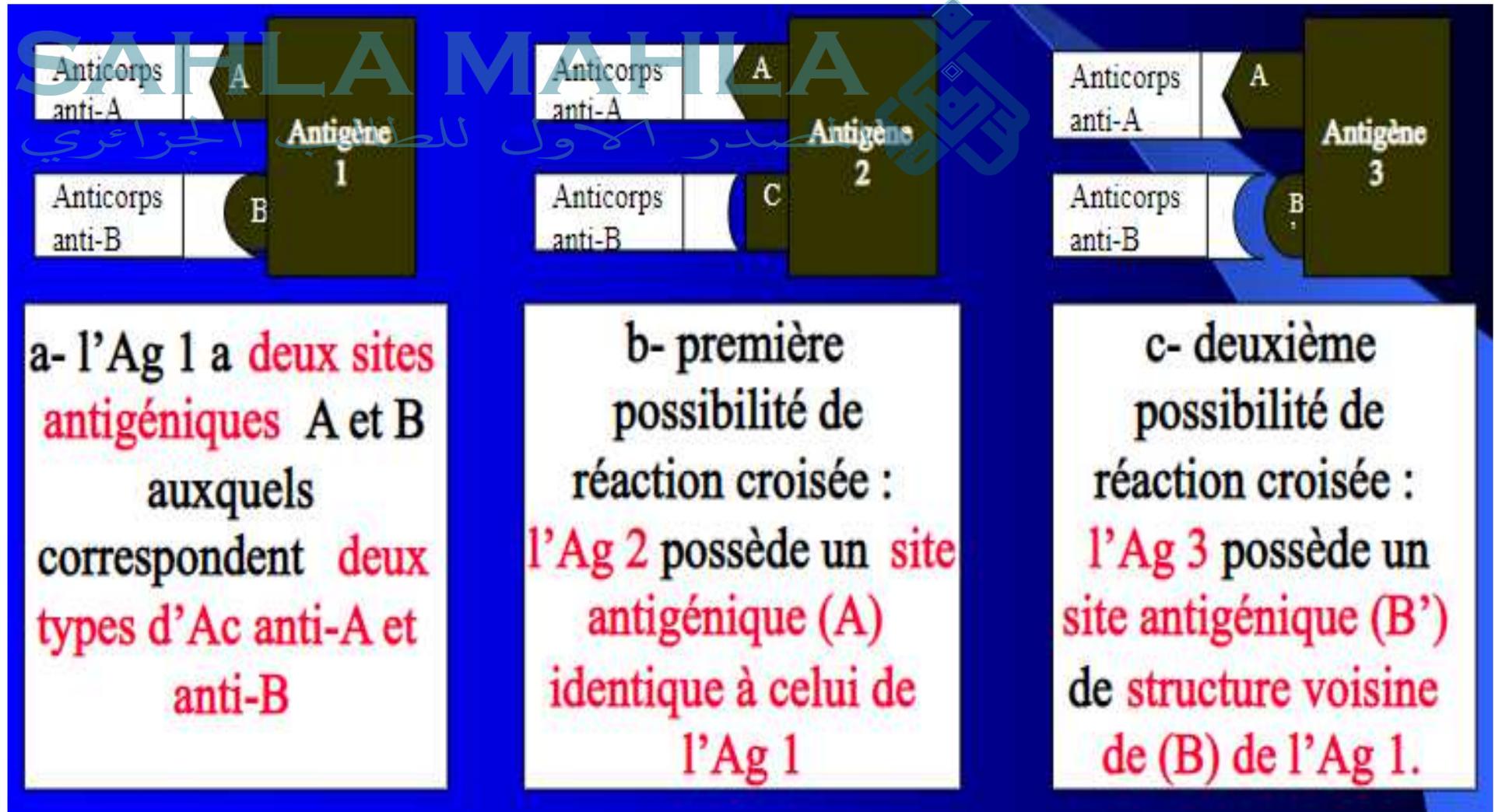


Ig lie le déterminant antigénique rendu accessible dans la protéine dénaturée

Ig lie le déterminant antigénique sur la protéine native et dénaturée

SAHILA MAHLA
المصدر الاول للكتاب الجزائري

NOTION DE REACTIVITE CROISEE



Remarque

ANTIGENE MIMETIQUE

- Un antigène mimétique possède un épitope stéréochimique (mimotope) dont la structure peut être **proche** de **ou identique** à celle d'un autre épitope porté par une molécule différente.
- Ce type d'antigènes peut être à l'origine de réactions croisées.

A **mimotope** is often a peptide, which mimics the structure of an epitope.

Because of this property it causes an antibody response similar to the one elicited by the epitope.

An antibody for a given epitope antigen will recognize a mimotope which mimics that epitope.

REACTIVITE CROISEE: AVANTAGE /INCONVENIENT ??

SAHLA MAHLA



- **(+)** La réactivité croisée facilite l'immunité contre les souches pathogènes apparentées
→immunité multiprotectrice aux agents pathogènes apparentés.
- **(-)** Immunoalyse faux positif →le potentiel de réactivité croisée peut compliquer le diagnostic d'allergies spécifiques

PREPARATION DES ANTIGENES??

- Préparation vaccinale (Immunothérapie active)
- Préparation antigénique pour protocole d'immunothérapie passive



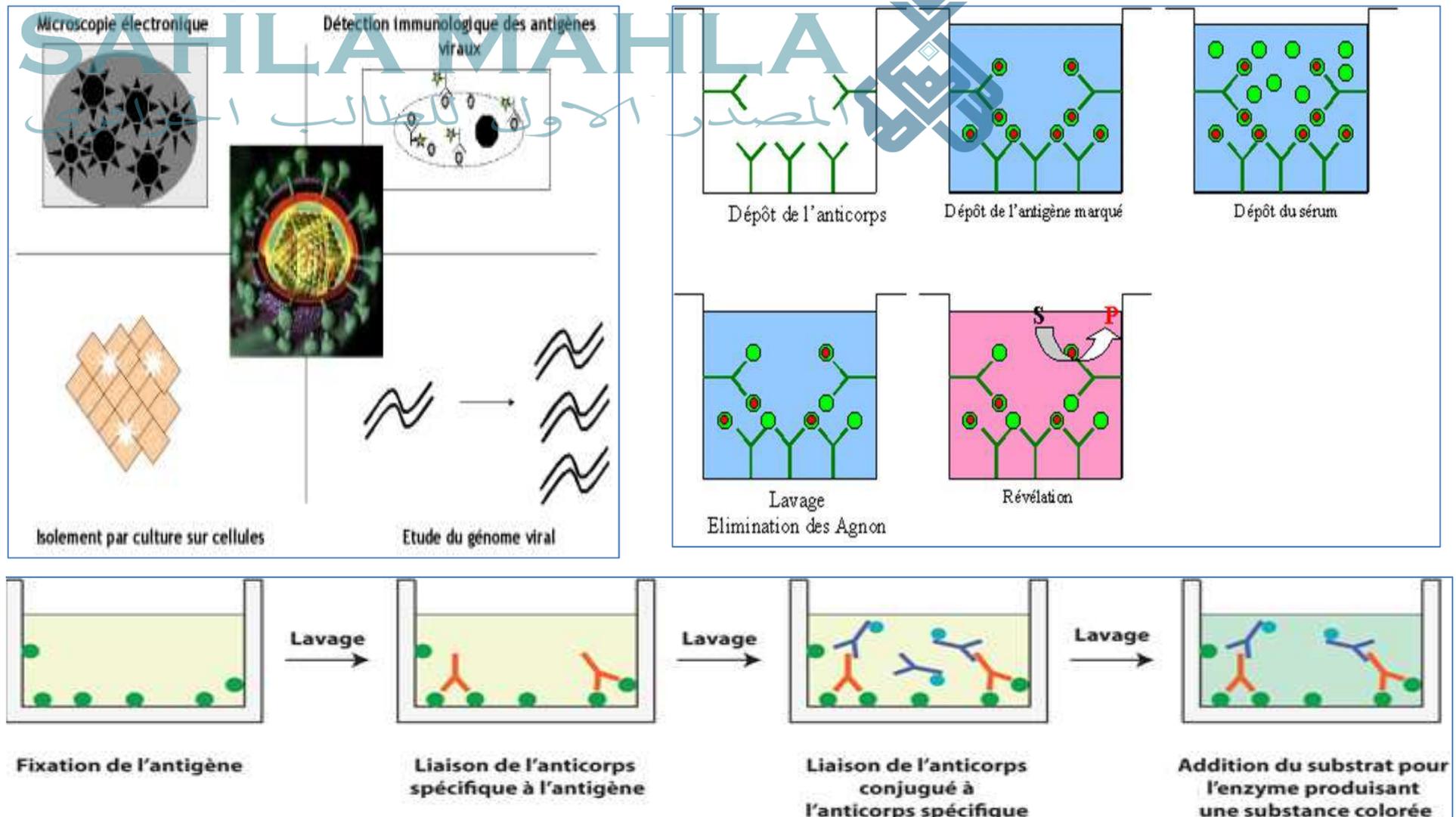
Plateforme		Exemple de vaccins homologués
Vaccin inactivé		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre la grippe • Vaccin contre la poliomyélite • Vaccin contre la rage
Vaccin sous-unitaire		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre l'hépatite B • Vaccin contre le zona
Vaccin à particule pseudo-virales		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre les virus du papillome humain (<i>Gardasil^{MD}</i>)
Vaccin à vecteur virale		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre le virus Ebola
Vaccin à ADN ou à ARN		

Polyosidiques	Anatoxines
	Recombinants
Polyosidiques conjugués	
	Autres

PREPARATION DES ANTIGENES??

- Détection des antigènes ou des anticorps à l'aide de tests immunologiques (ELISA simple ou sandwich, WB, ELISPOT, CF...)

• EXEMPLES



PREPARATION D'ANTIGENE

- Isoler l'antigène à partir d'un mélange biologique et peut être détoxifié: chaleur, uv, agent chimique, rayonnement gamma... → **Extrait antigénique brut/purifié (natif/atténué)**

(voir TD1)

- Préparer par génie génétique un **Ag recombinant**

(voir TD2)

- **Immunogène mais moins toxique**
- **Surexpression**
- **Reproductibilité**

- Préparer (identifier) des peptides mimotopes. ex. Criblage de banque de peptide → **Peptides mimétiques (synthétique)**

Eviter d'extraire et purifier les Ag → problème de quantité disponible et de contamination possible.

PREPARATION DE L'ANTIGENE

A. Source de l'antigène:

Si antigène **solubles extracellulaires** dans un liquide biologique / Milieu de culture

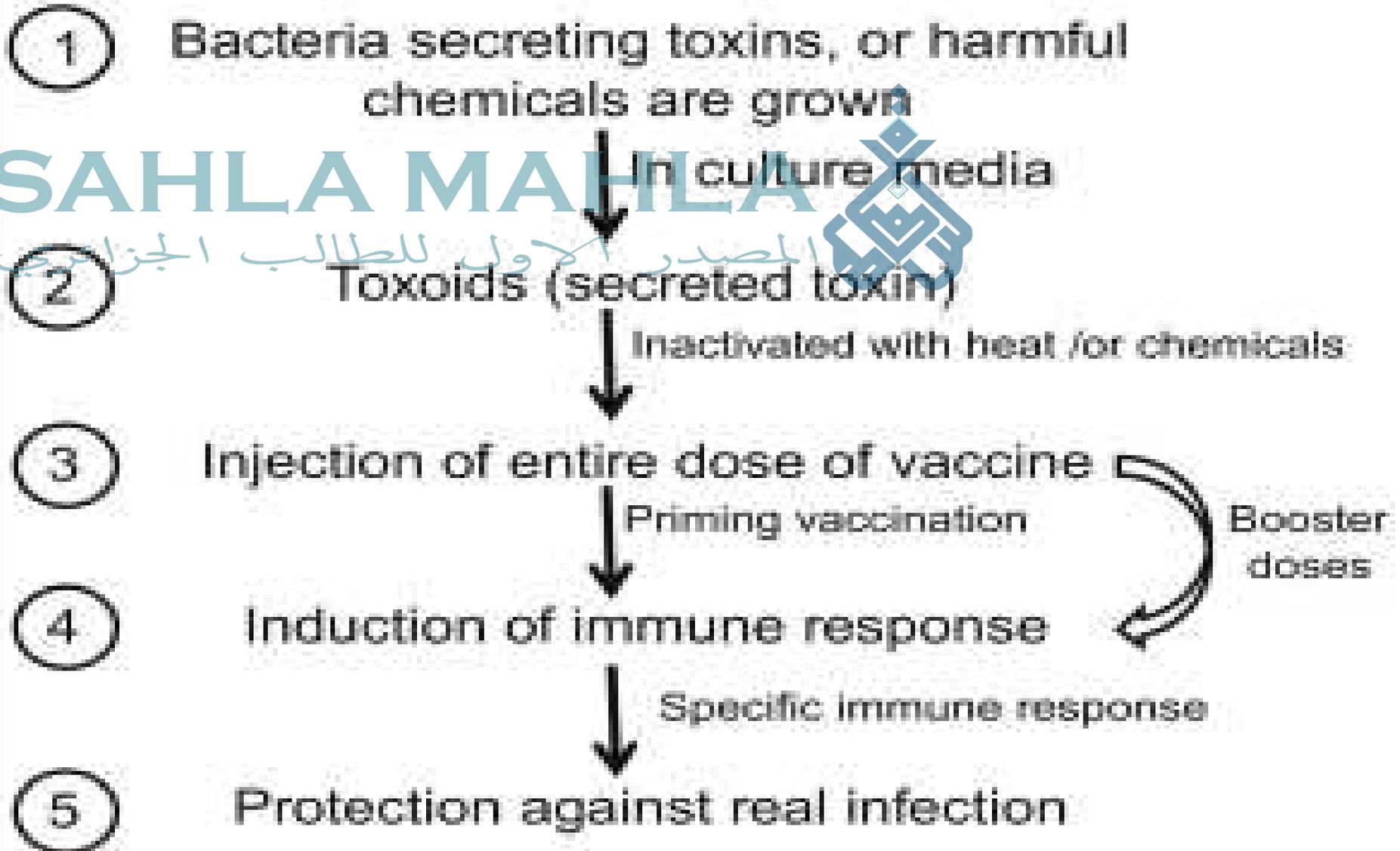
Si antigène **intracellulaires soluble ou insoluble ou antigène de surface** dans des cellules, bactéries, parasites, virus...

- **La lyse osmotique:** + milieu hypotonique. Souvent + un détergent non ionique (ex: TritonX100) (pour faciliter la rupture des cellules)
- **Pas d'effet sur les cellules avec une paroi cellulaire** => + lysozyme: digère les parois bactériennes
- **Dans beaucoup de cas, un traitement mécanique** est nécessaire: broyage en présence de sable, l'utilisation d'un homogénéiseur ou d'un sonicateur.

Le lysat obtenu est ensuite centrifugé (Soluble/insoluble)???

B. Détoxification de l'antigène ex. Préparation d'une anatoxine tétanique inoffensive par **détoxification** de la toxine tétanique, diphtérique, toxines des venins...

Toxoids *(voir TD1)*



Le parcours du vaccin : un processus complexe de fabrication

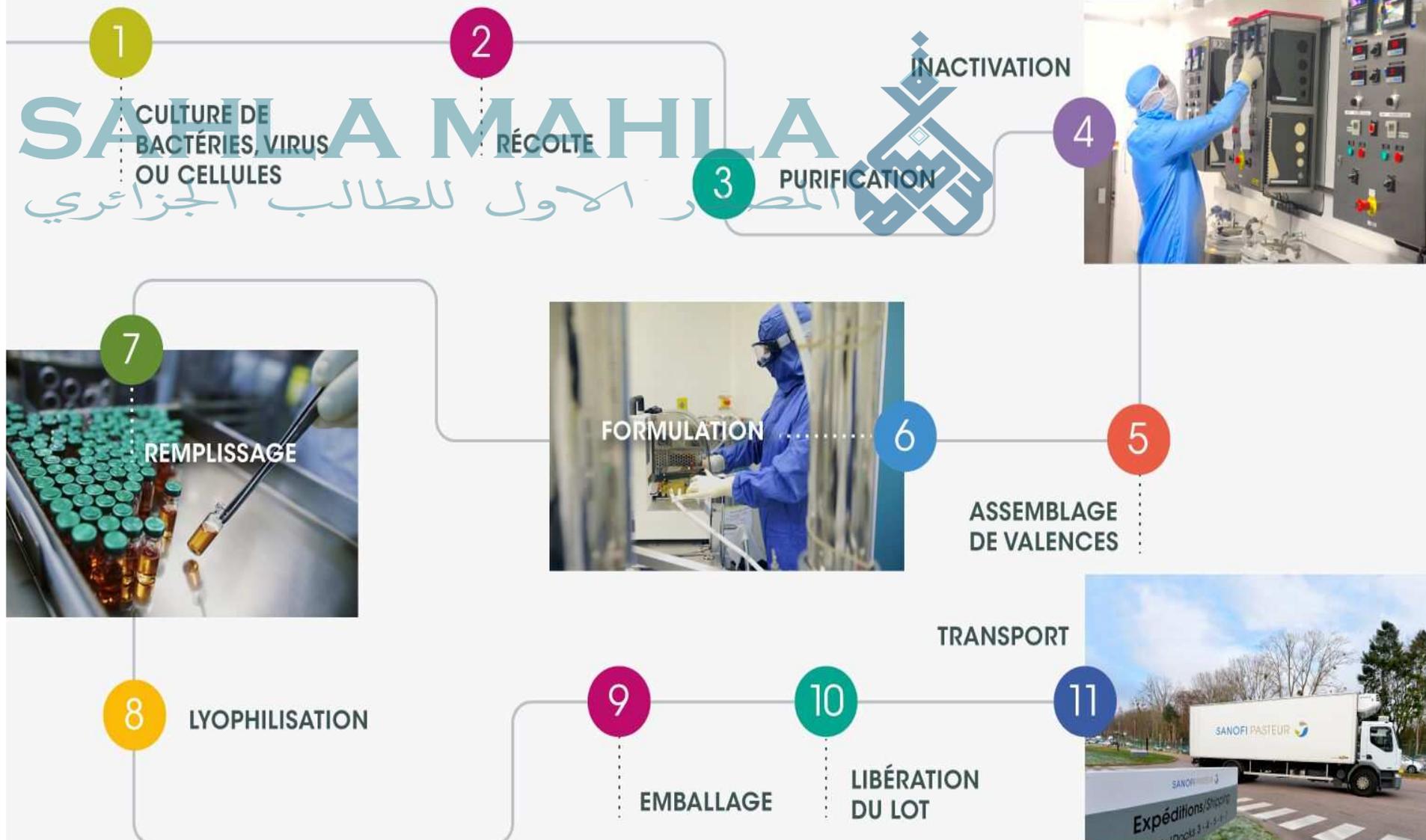


Schéma de base :
Production de protéines recombinantes
ex Les antigènes / Les anticorps recombinants

TD2

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



1- Gène d'intérêt

2- Vecteur
De clonage

3- Vecteur
d'expression

4- Cellule Hôte

5- Production
protéine

6- Stratégie
d'extraction et
de purification

7- Caractérisation
fonctionnelle

PRINCIPALES DIFFICULTÉS

- 
- Taux d'expression de la protéine, Cinétique
 - Modifications post-traductionnelles, repliement, glycosylation
 - Procédés de purification
 - Stabilité, solubilité
 - Considérations économiques: équipements disponibles, coûts de production

ANTIGENE/ Peptide synthétique

Les différentes méthodes d'identification/localisation des épitopes :

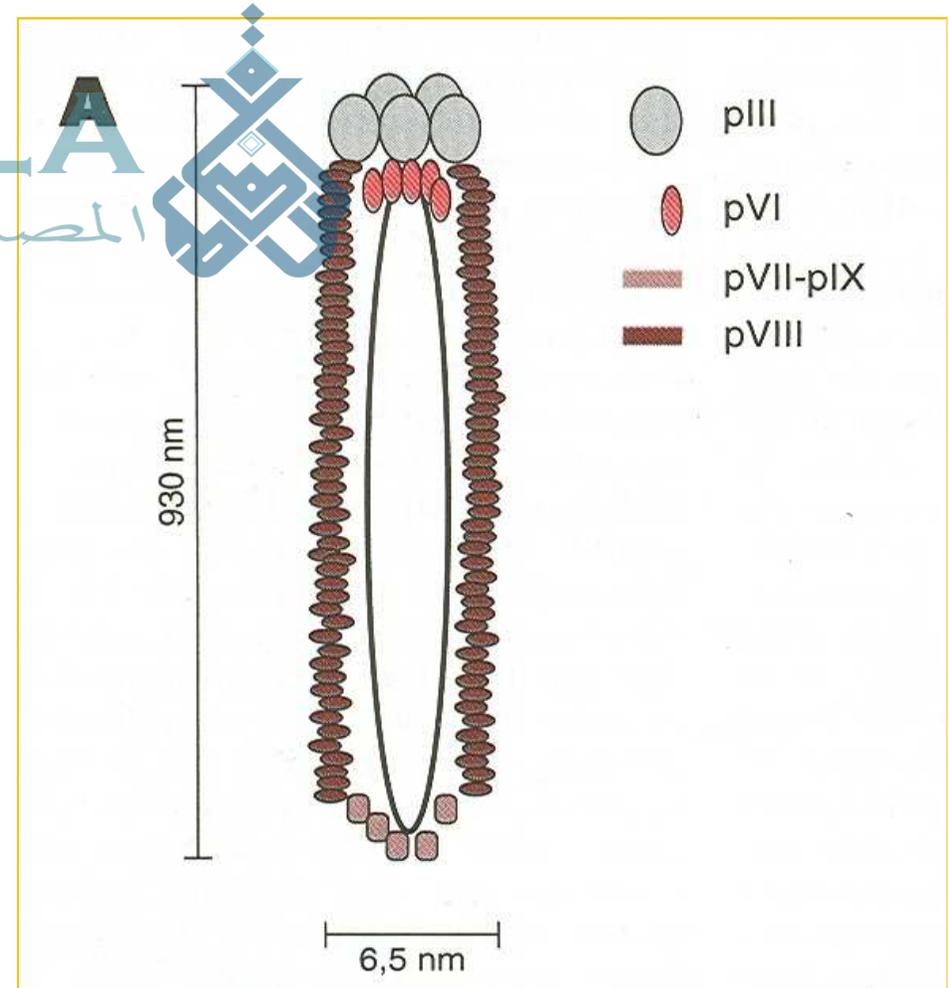
- **Méthodes de surface «display» (bibliothèque) / (Banques peptidiques aléatoires ou BPAs)**
- Mutagénèse dirigée de l'antigène et mesure de l'affinité résiduelle / Compétition pour la liaison Ag/Ac monoclonaux / Résonance plasmonique de surface
- Méthodes basées sur la cristallographie / Résonance magnétique nucléaire (structure 3D Ag-Ac)
- Méthode de spectrométrie de masse (Hydrolyse enzymatique)

CRIBLAGE DE BANQUE DE PEPTIDE

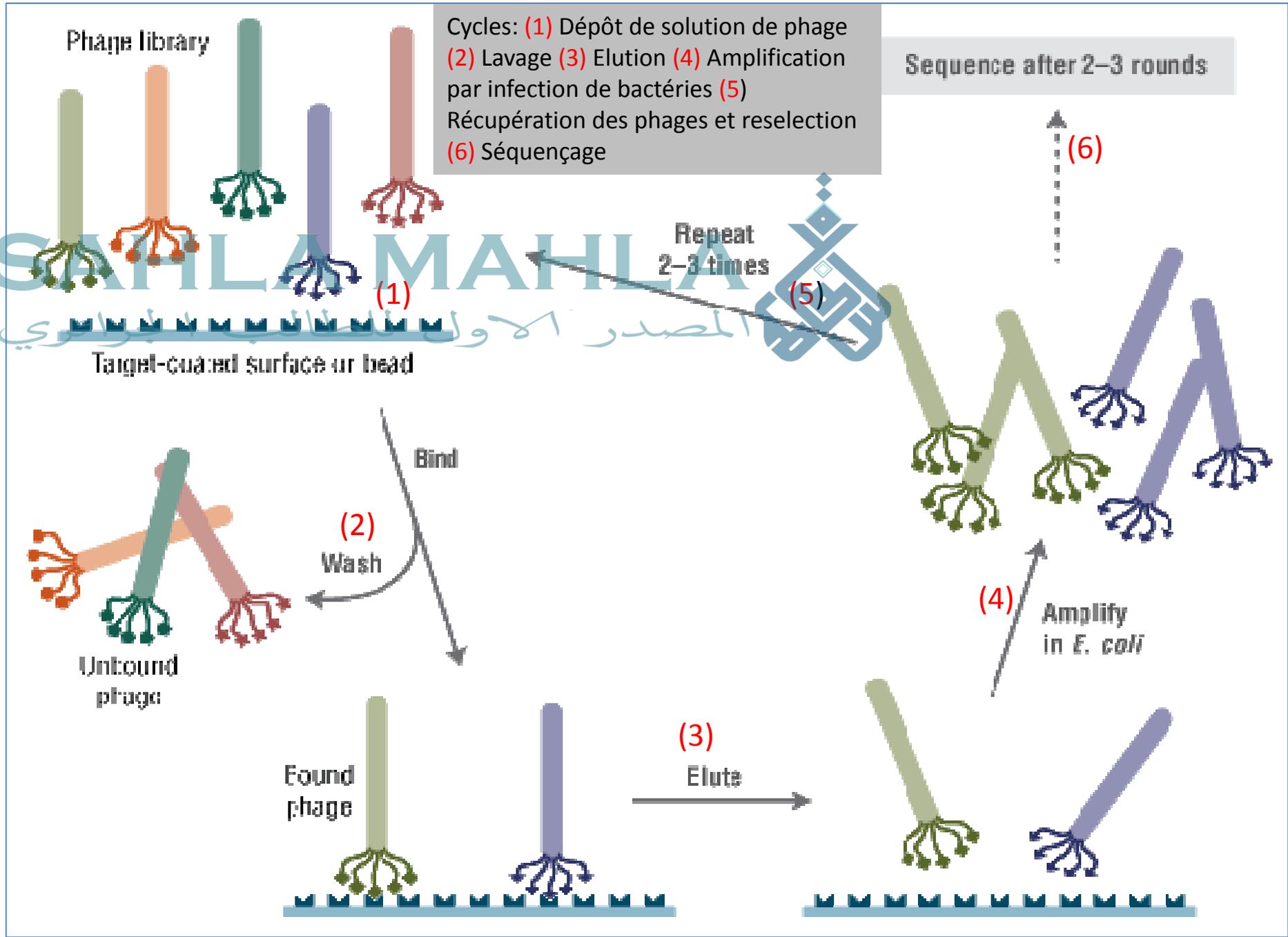
- Les banques peptidiques réalisées à la surface des bactériophages filamenteux / ou de bactéries permettent de rechercher parmi des millions de séquences exprimées à leur surface celles qui ont une affinité pour une (ou des) molécule(s) donnée(s).
- La méthodologie du **Bacterial/phage display**, c'est à dire la présentation de peptides à la surface de phages filamenteux ou de bactéries, est un puissant outil de synthèse combinatoire et de sélection

PRINCIPE DU PHAGE DISPLAY

Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface, en *fusion avec le domaine amino-terminal de leurs protéines pIII ou pVIII*, des molécules telles que des peptides aléatoires



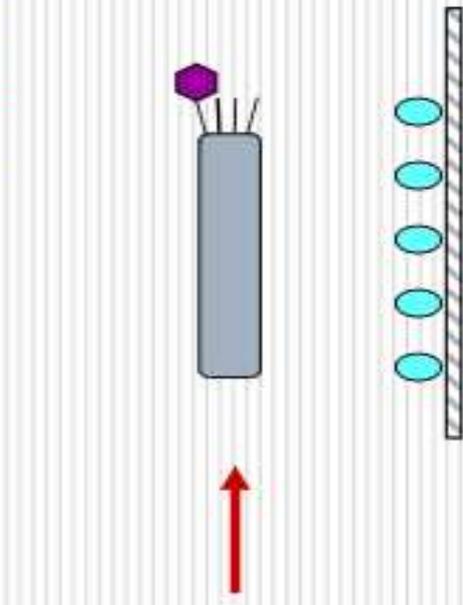
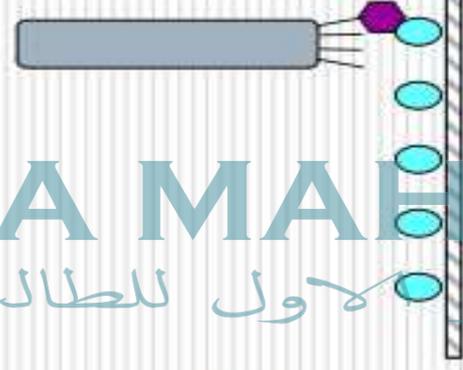
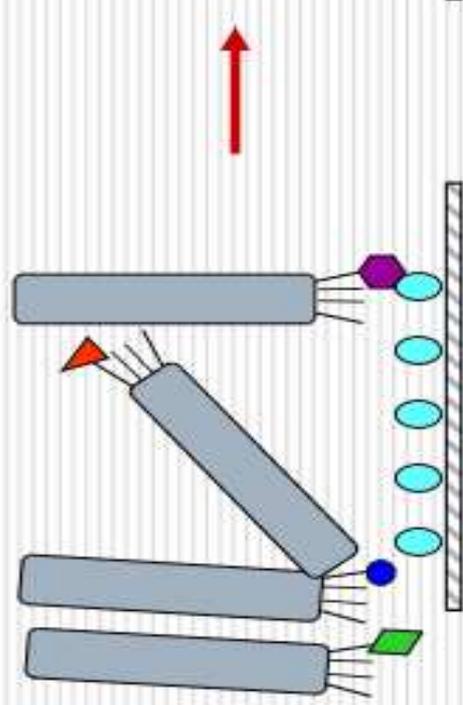
Les gènes *pIII* ou *pVIII*, codent respectivement les protéines de capside mineures et majeures



SAHILA MAHLA
 المصدر الأول

Le phage display

Banque de phage
M13 avec PIII rec
ou PVIII rec



Sélection

Lavage

Elution

Amplification et re-sélection

SAHLA MAHLA
المصدر كاول للطالب الجزائري

ANTIGENE/ Peptide synthétique

- Généralement les peptides synthétiques sont purifiés, couplés à des protéines porteuses.

TABLE 3-1 MOLECULAR WEIGHT OF SOME COMMON EXPERIMENTAL ANTIGENS USED IN IMMUNOLOGY

Antigen	Approximate molecular mass (Da)
Bovine gamma globulin (BGG)	150,000 **
Bovine serum albumin (BSA)	69,000 **
Flagellin (monomer)	40,000
Hen egg-white lysozyme (HEL)	15,000
Keyhole limpet hemocyanin (KLH)	>2,000,000
Ovalbumin (OVA)	44,000
Sperm whale myoglobin (SWM)	17,000
Tetanus toxoid (TT)	150,000

USTHB/FSB

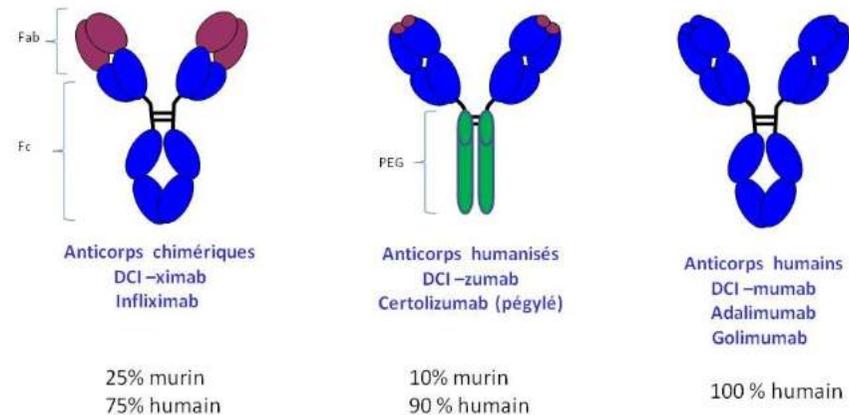


TECHNOLOGIE DES ANTICORPS

TECHNOLOGIE DES ANTICORPS

- ANTICORPS POLYCLONAUX
- ANTICORPS MONOCLONAUX
- ANTICORPS RECOMBINANTS

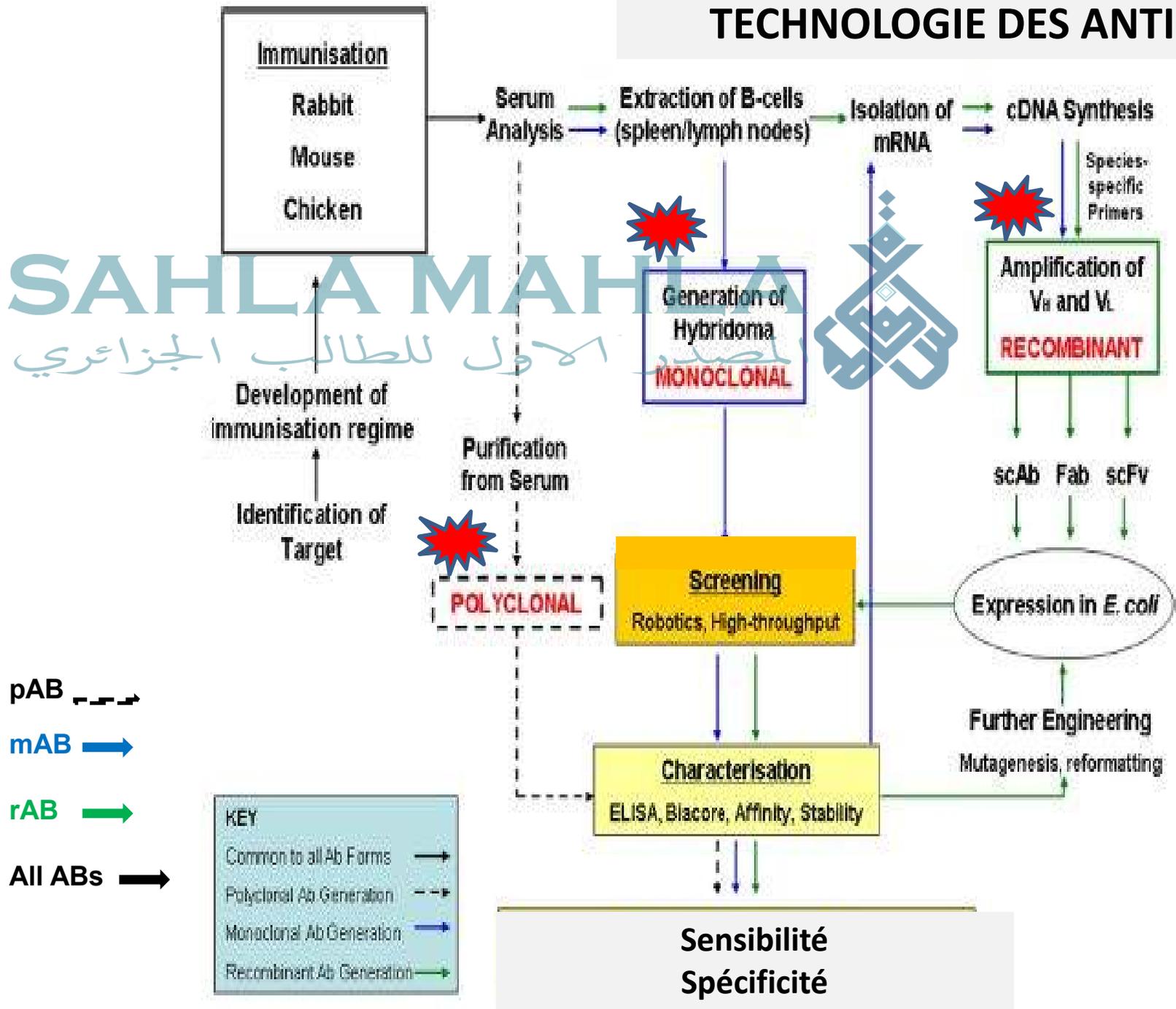
- Chimérique
- Humanisé
- Humain



Humanisation



TECHNOLOGIE DES ANTICORPS



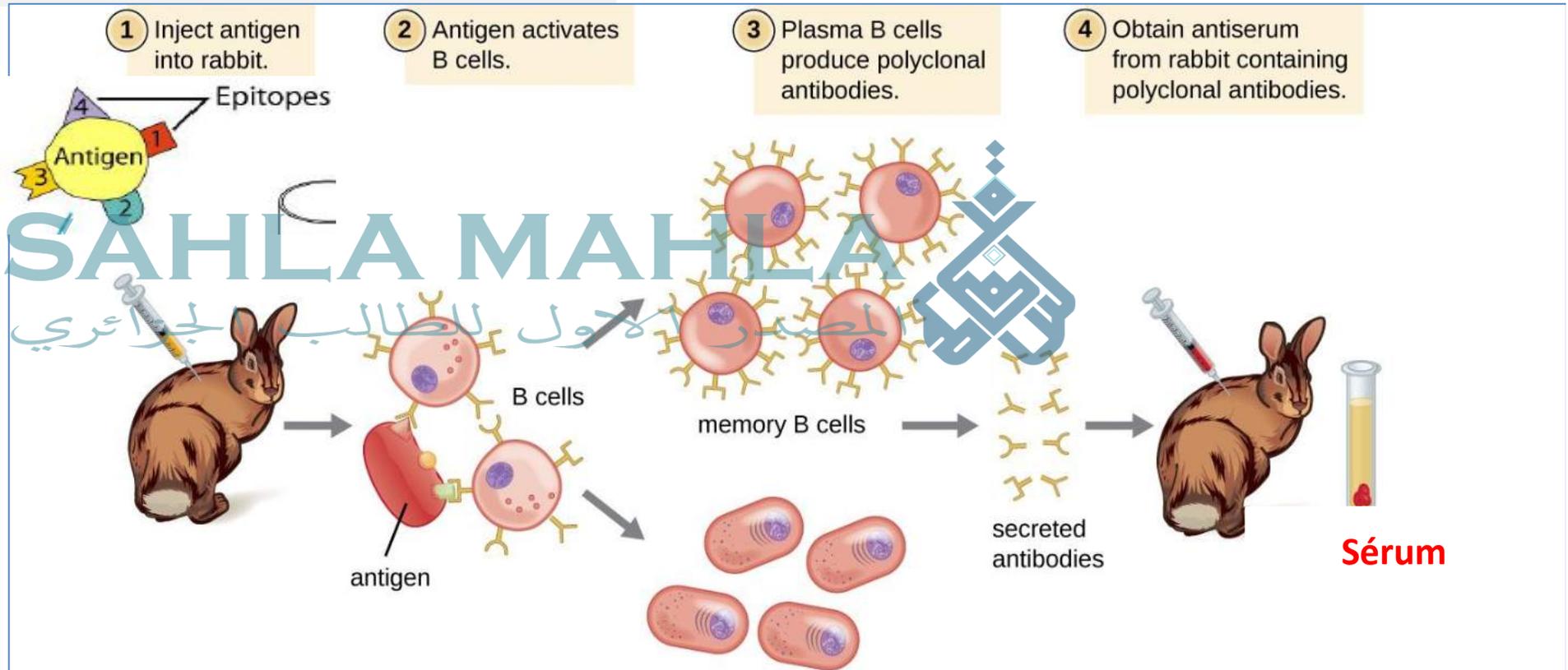
Production et caractérisation des anticorps



TECHNOLOGIE DE PRODUCTION DES ANTICORPS

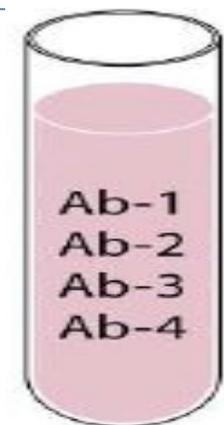
- Polyclonaux
 - Monoclonaux
 - Recombinants

ANTICORPS POLYCLONAUX



Les anticorps polyclonaux sont un mélange hétérogène d'anticorps produits par des cellules différentes. La sensibilité et la spécificité de ces anticorps sont ainsi très différentes les unes des autres.

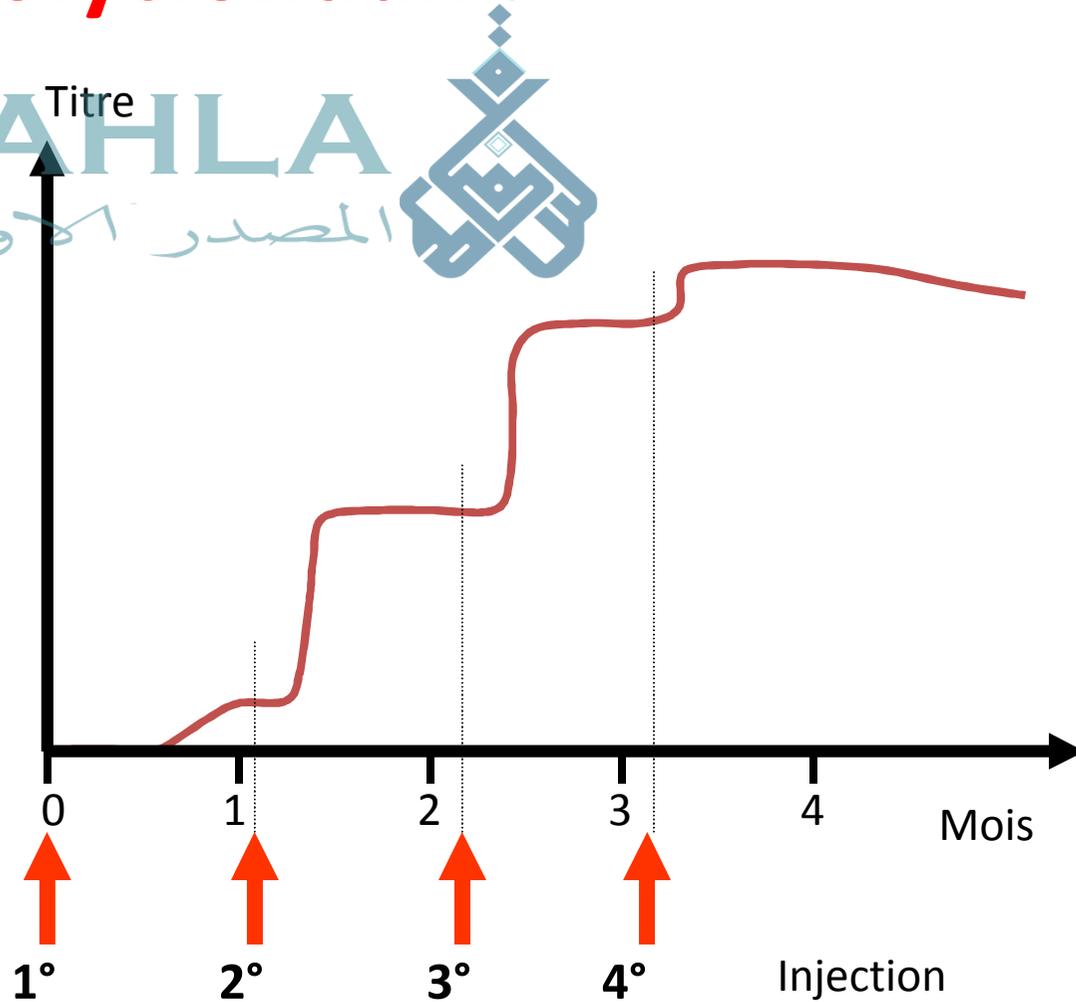
Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène



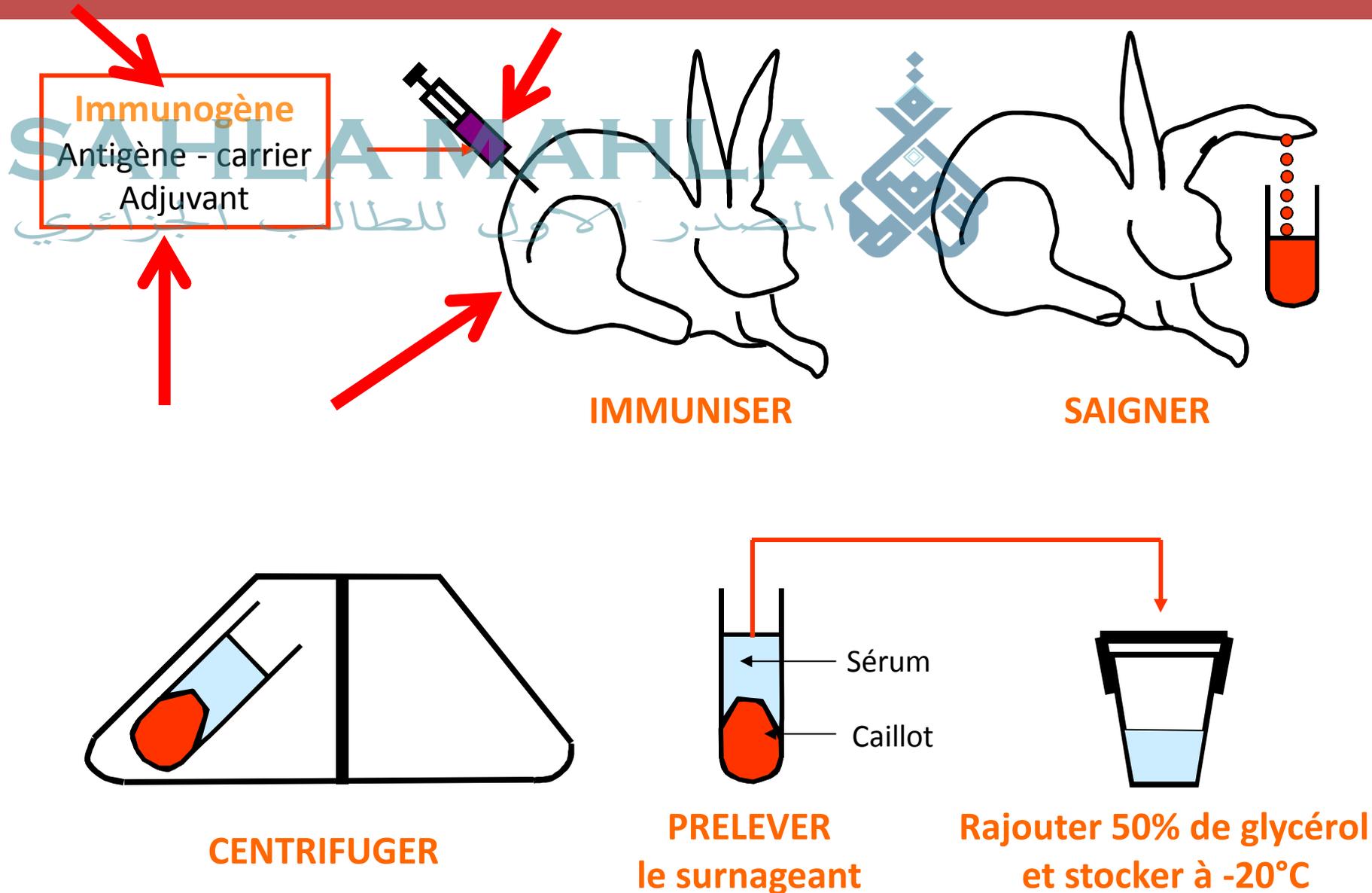
Comment obtenir des anticorps polyclonaux ?

Il faudra injecter un antigène à un animal à plusieurs reprises, puis à recueillir le sérum contenant les anticorps après prélèvement sanguin

- **Avantages** : simple, peu couteux.
- **Inconvénients** :
 - risques de réactions croisées (signal non spécifique) ;
 - quantités limitées de sérum



Préparation d'antisérums (polyclonaux) -1



PRODUCTION D'ANTICORPS

PROTOCOLE d'IMMUNISATION

SAHLA MAHLA



Le protocole d'immunisation doit tenir compte de plusieurs facteurs importants:

- le choix de l'espèce animale à immuniser,
- la nature et la qualité de l'immunogène,
- le choix de l'adjuvant d'immunisation,
- la voie d'administration et le nombre de sites d'injection,
- la dose à injecter
- le calendrier des injections.

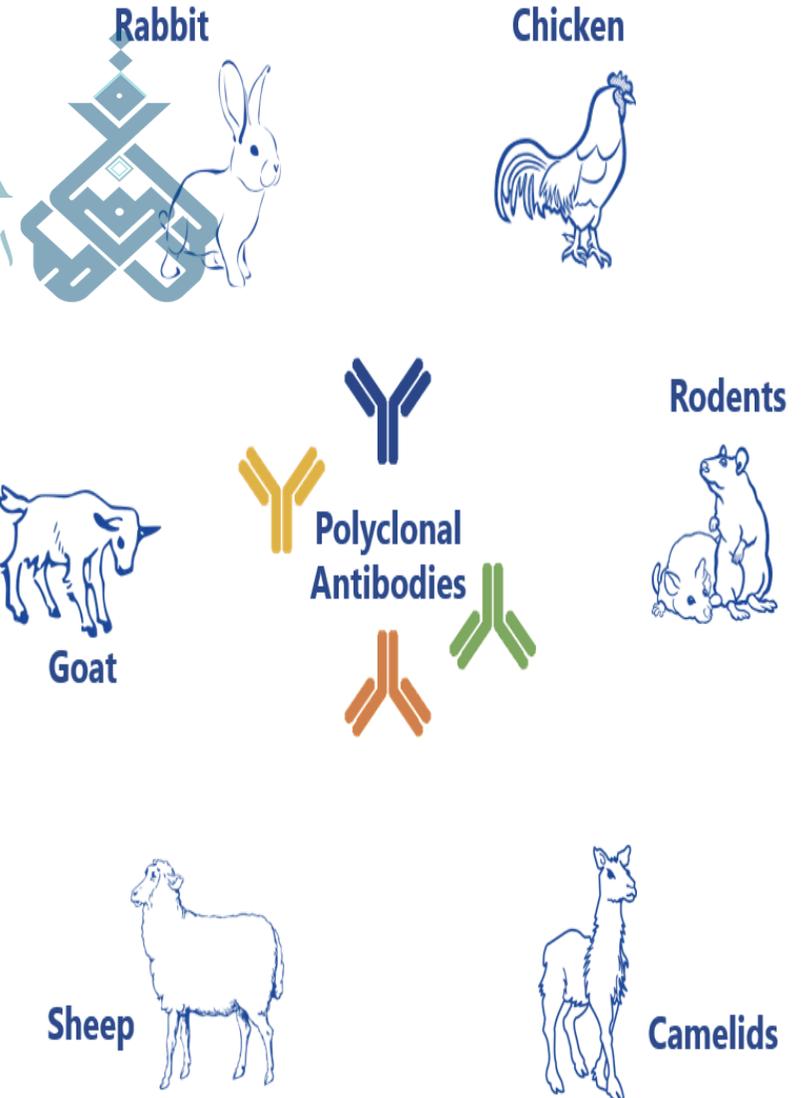
CRITERES DE CHOIX DE L'ANIMAL

- Quantité nécessaire d'anticorps ou antisérum

Les gros animaux sont plus couteux (achat, élevage, etc.) et sont souvent moins faciles à manipuler.

- La quantité d'antigène disponible est aussi un facteur très important
- La relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène et l'espèce utilisé pour produire l'anticorps
- Utilisation prévue des anticorps (Ex ELISA)

- **Remarque.** Des individus/souches différents (es) d'une même espèce peuvent réagir différemment (variabilité génétique influençant la présentation de l'antigène dans les molécules du CMH et les mécanismes régulateurs de la réponse immunitaire).



- SAHLA MAHILA
مركز الدراسات والبحوث الزراعي
- Ag – sérum Ac igG (origine humaine)- Ac anti IgG d origine humaine développé chez la chèvre –Enzyme

AUTRES CRITERES DE CHOIX (suite)

- Exempts de maladies (statut sanitaire contrôlé et quarantaine)
- Elevés dans des conditions codifiées (locaux respectant température, hygrométrie, surface et hauteur réglementaires)
- Non stressés avant et pendant le protocole
- Euthanasiés en fin de protocole

Chèvre, Mouton, Ane, Cheval....

SAHLA MAHLA

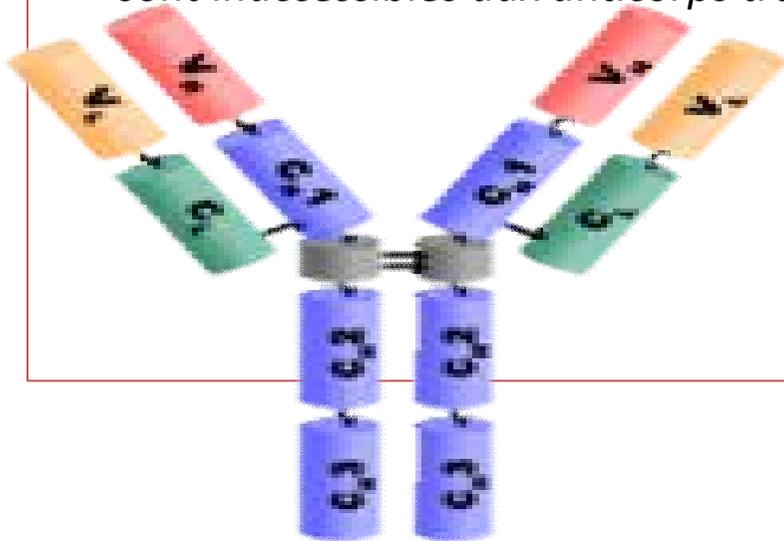
Ils sont choisis pour la production de **grandes quantités d'anticorps**, généralement pour une **production commerciale** afin de minimiser les dérives inter-lots.

Ils sont également préconisés pour la production d'anticorps contre des protéines de rongeurs ou de lapins (éloignement phylogénique).

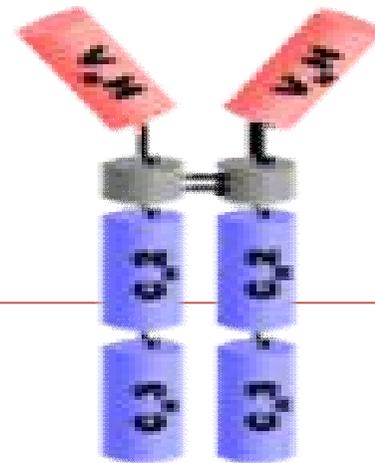


Production spéciale d'anticorps de dromadaire

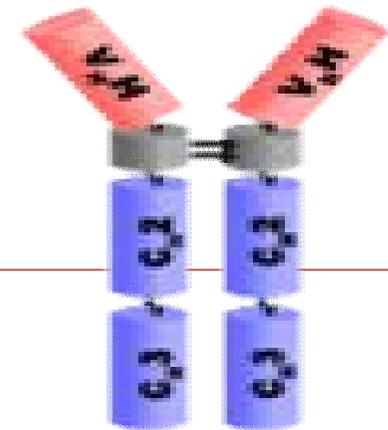
- L'IgG est composée de trois sous-classes, IgG1, IgG2 et IgG3 : IgG2 et IgG3 sont constitués uniquement de *chaînes lourdes (HcAb)* tandis que l'IgG1 a la *structure typique des IgG*
- Les IgG (HcAb) produits par les camélidés ont une MM de 100 kDa, et le domaine fonctionnel de reconnaissance lui ne représente que 12-15 kDa.
- Ces anticorps dénommés **HcAb** pour heavy chain only antibodies lient leurs cibles avec une très forte affinité grâce à un seul domaine variable (également dénommé VHH/nanobodies) et cela malgré l'absence des chaînes légères.
- Cette taille réduite permet à ces anticorps particuliers de reconnaître des épitopes qui sont inaccessibles aux anticorps traditionnels.



Camelid IgG1



Camelid IgG2



Camelid IgG3

IMAGE REPRISE DU NET



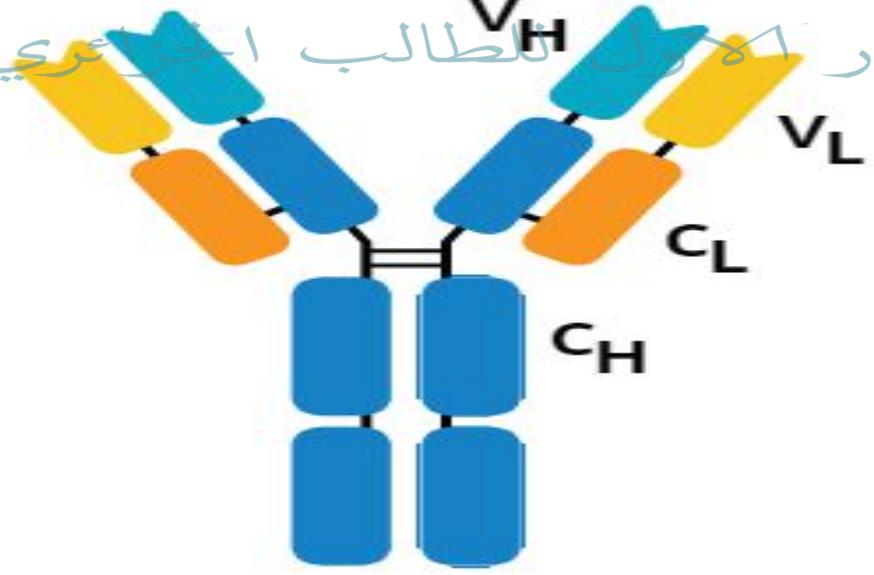
Fab Fragment



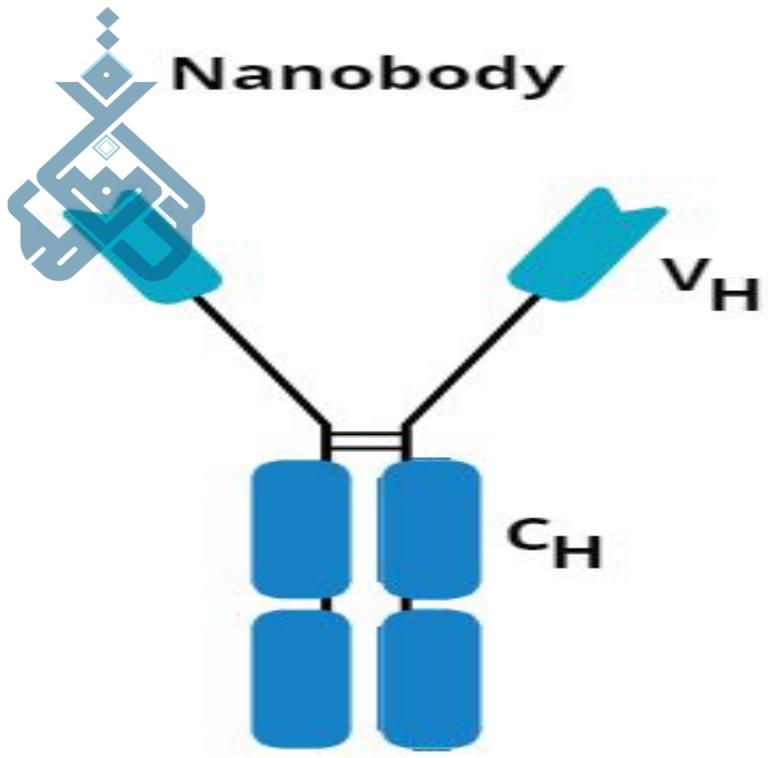
Nanobody

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الخريجي



IgG



HCab

Legend

- C_H Constant Domain, Heavy
- C_L Constant Domain, Light
- V_H Variable Domain, Heavy

PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX/POULE

La production des IgY est réalisée à partir des **jaunes d'œuf**, ce qui est en soit une **solution alternative au prélèvement sanguin invasif.**

La production d'anticorps en **grande quantité** correspond à peu près à celle d'un grand mammifère, tel le mouton ou la chèvre

Les IgY **incapables d'initier** la cascade du complément chez les mammifères

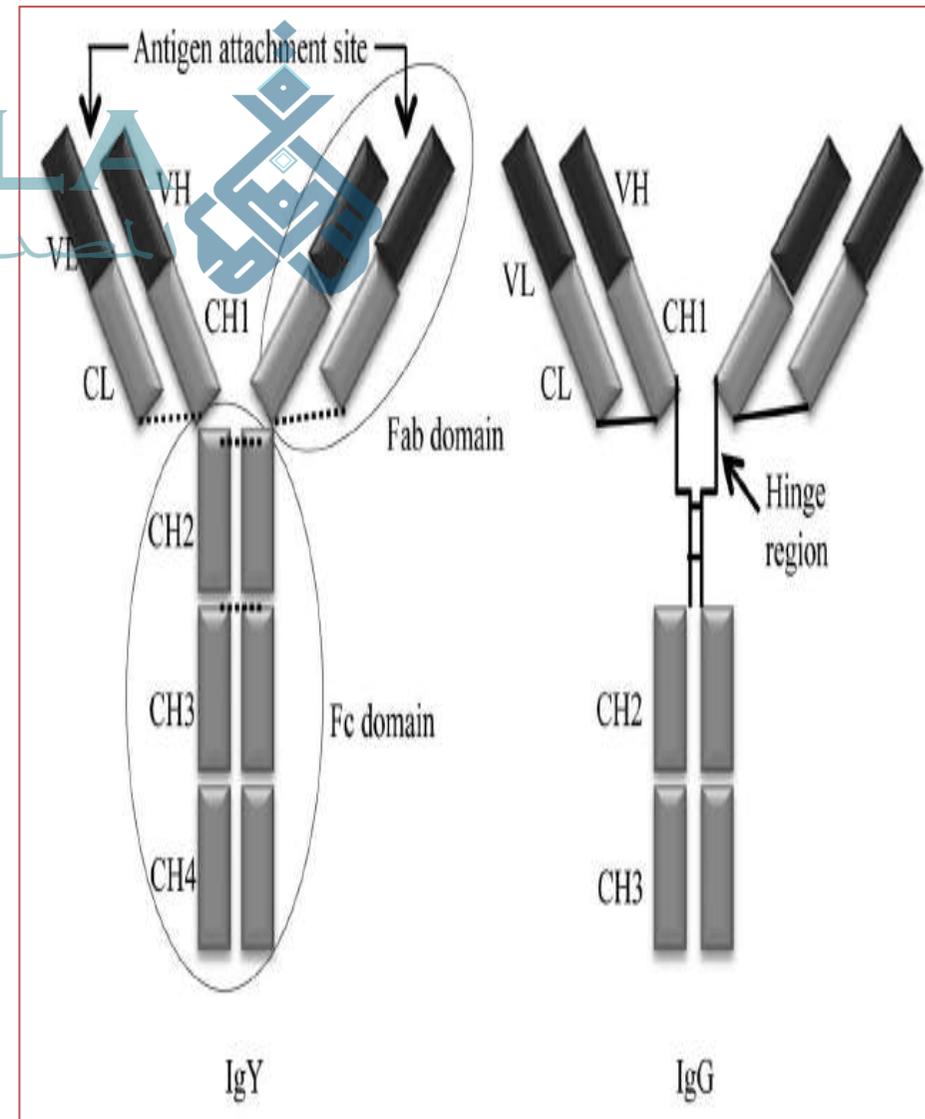
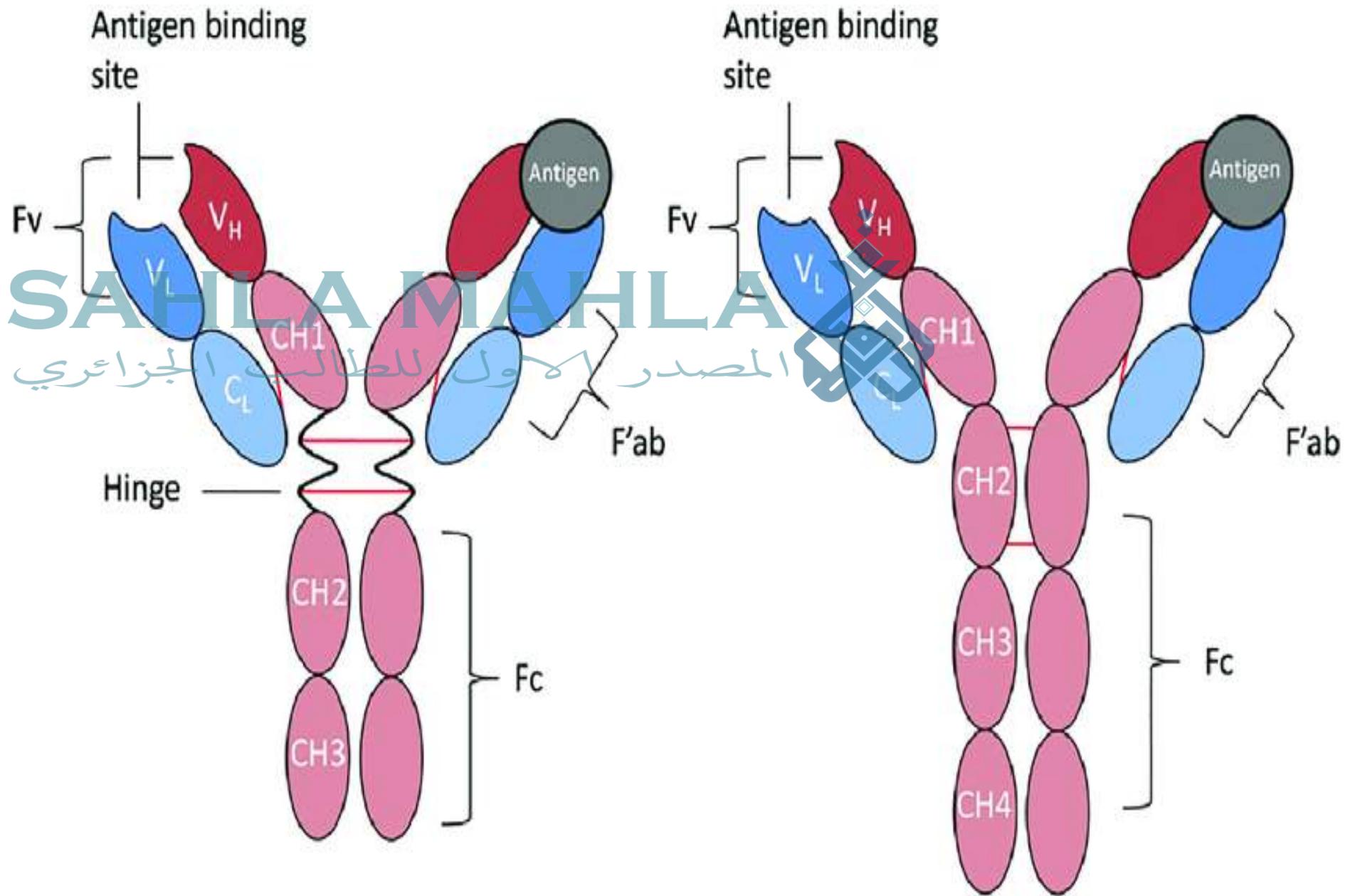


IMAGE REPRIS DU NET



Mammalian IgG

Avian IgY

ADJUVANT

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



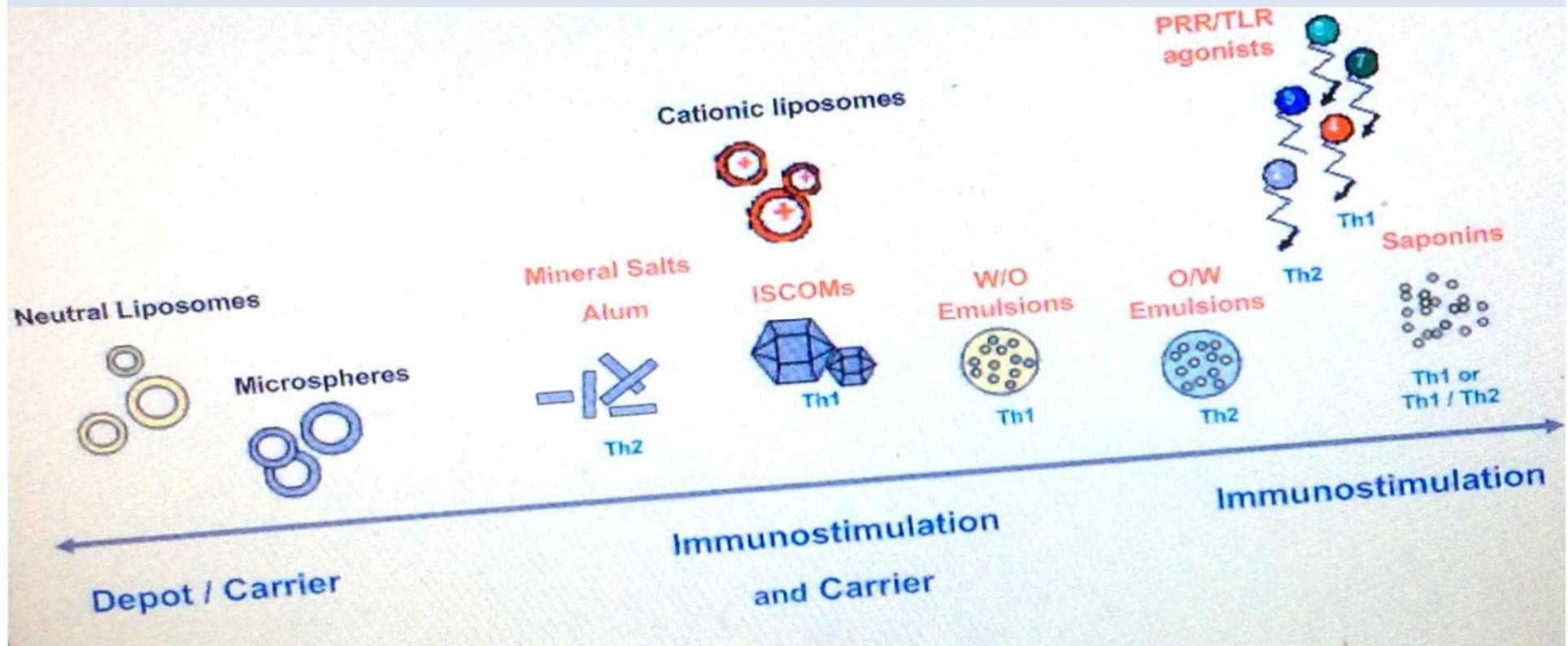
- Un adjuvant est une substance ajoutée à la préparation antigénique afin d'augmenter l'immunogénicité sans intervenir sur sa spécificité.

POURQUOI A-T-ON BESOIN D'UN ADJUVANT?

- **Immunogénicité réduite** ou nulle des nouveaux antigènes (protéines purifiés ou recombinantes, peptides, polysaccharides purifiés...) → **Amplification de la réponse immune** (aspect quantitatif)
المصدر الاول للطلاب الجزائري
- **Modulation de la réponse immunitaire** (Th1, Th2, CTL...) (Aspect qualitatif)
- **Maintien de la réponse immunitaire** dans le temps (mémoire)
- **Diminution de la dose d'antigène**
- **Diminution du nombre et de la fréquence des rappels**

Mode d'action :

- **Effet dépôt** : lent relargage de l'ag au point d'injection (Prolongeant la présence de l'antigène)
- **Induction d'un environnement pro-inflammatoire** (recrute les CPA) / Augmente les signaux de co-stimulation (via les TLR)
- **Orienté vers une réponse humorale et/ou cellulaire**



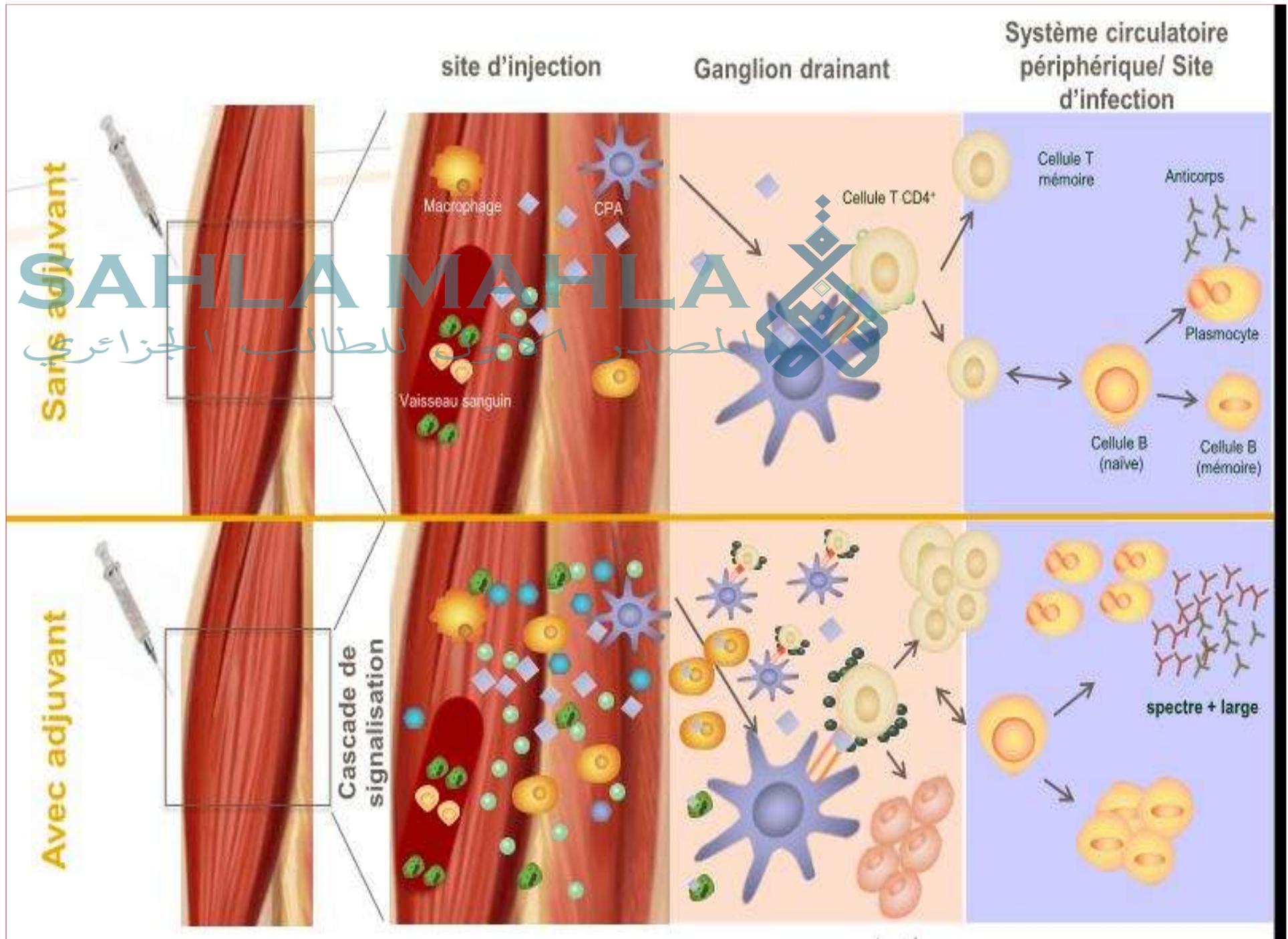


IMAGE REPRIS DU NET

Tableau I: Origine et propriétés des principaux adjuvants

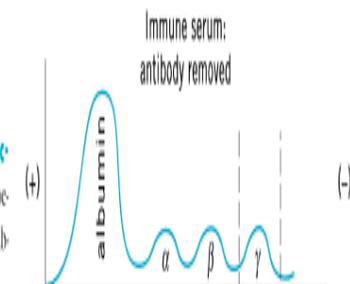
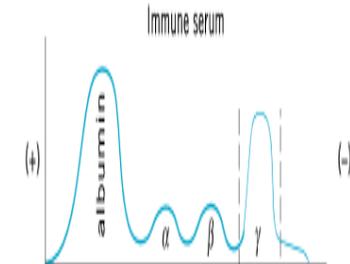
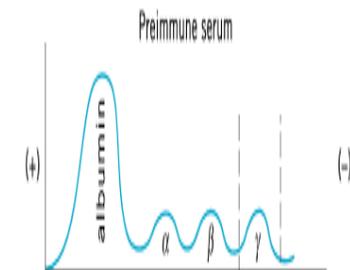
ADJUVANT	ORIGINE OU COMPOSITION CHIMIQUE	EFFETS SUR LA RÉPONSE IMMUNE
➔ alum	minérale	stimulation de la réponse en anticorps (Th2)
➔ adjuvant incomplet de Freund et adjuvants huileux	émulsions eau dans huile (huiles minérales ou végétales + agents de surface)	importante production d'anticorps ; fortement inflammatoires
➔ adjuvant complet de Freund	émulsion eau dans huile + mycobactéries entières inactivées	réponse mixte humorale et cellulaire
<i>Syntex Adjuvant Formulation et formulations apparentées</i>	émulsions huile dans eau à base de squalène et de copolymères synthétiques	stimulation de la réponse en anticorps
➔ monophosphoryl lipide A	composant bactérien dérivé du lipopolysaccharide	stimulation préférentielle de la réponse de type Th1
➔ muramyl dipeptide et dérivés	composants de paroi des mycobactéries	stimulation préférentielle de la réponse en anticorps
oligonucléotides CpG	motifs moléculaires propres aux génomes procaryotes	induction de réponses de type Th1
cytokines	protéines généralement utilisées sous forme recombinante	action directe et spécifique, mais dépendant de la dose et de l'espèce cible

PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX

PRELEVEMENTS

PRELEVEMENTS

- On prélève des échantillons de sang pour évaluer le **niveau de production d'anticorps**.
- Lorsque le **titre** est suffisamment **élevé**, on effectue une **saignée** et on récupère l'antisérum (**immun-sérum**); à partir duquel on peut **purifier** les anticorps.



4-1 Antibody activity in the γ -globulin fraction of serum. The electrophoretic pattern of rabbit serum before immunization (top), after immunization (middle), and after absorption of the antibody with specific antigen.

Purification des immunoglobulines

Précipitation

- Sulfate d'ammonium
- Sulfate de sodium
- Rivanol / Acide caprilyque

IgG TOTAUX

Chromatographie d'échange d'ions

- DEAE cellulose
- DEAE Sephadex

IgG TOTAUX

Chromatographie d'affinité

Chromatographie d'affinité spécifique du fragment Fc pour les IgG
Chromatographie d'affinité spécifique de l'Ag

IgG TOTAUX
IgG Spécifiques

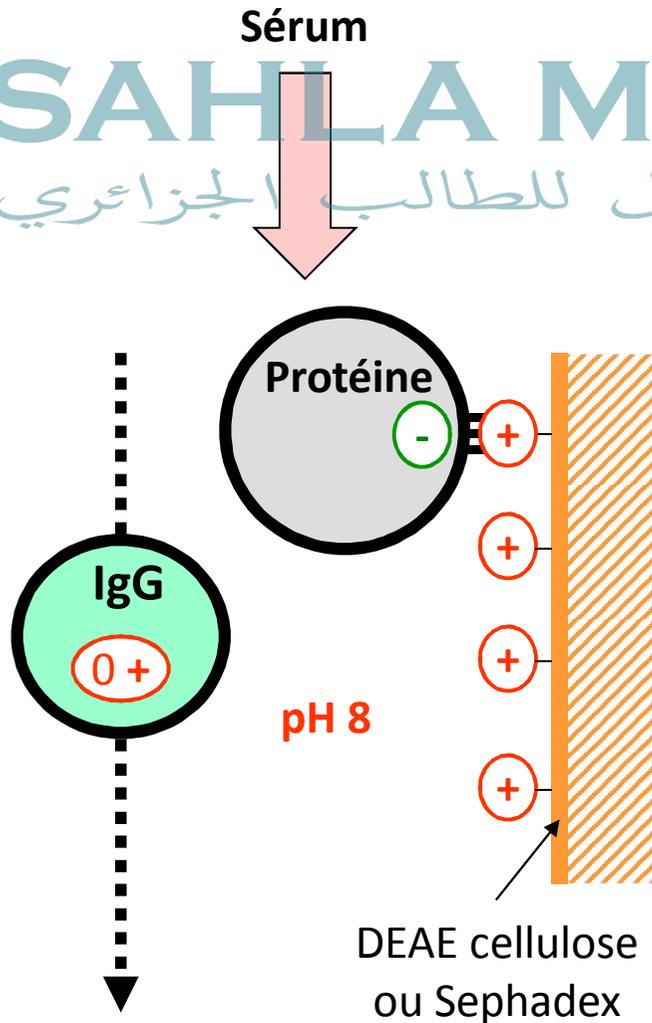
Préparation de fragments

- Digestion à la pepsine \Rightarrow $F(ab')_2$
- Digestion à la papaïne \Rightarrow Fab

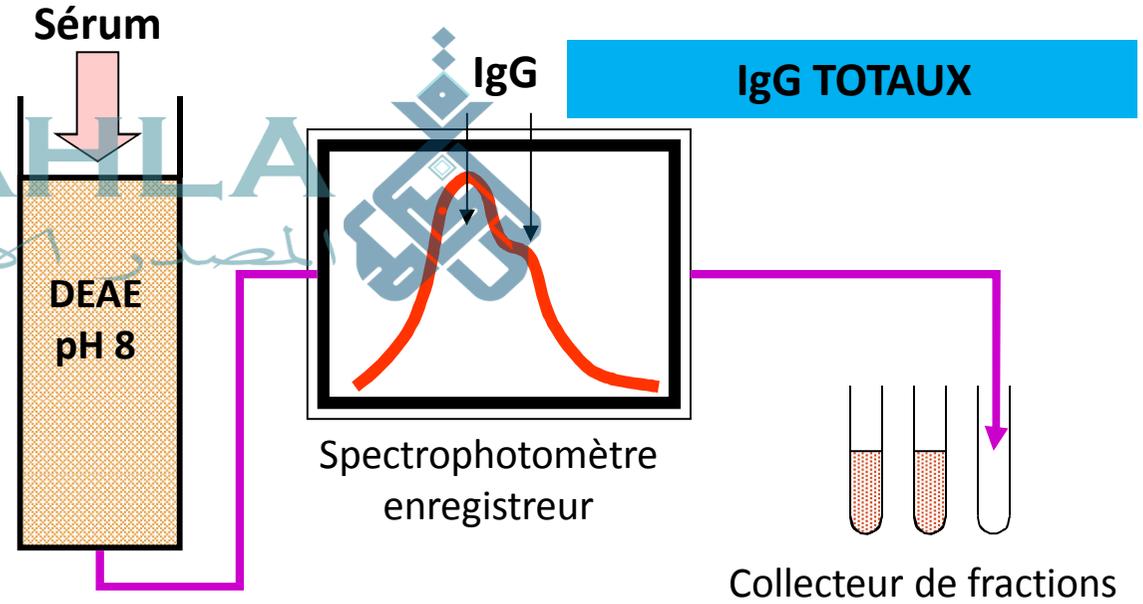
Réduire l'immunogénicité qui peut provoquer des chocs anaphylactiques (molécule entière)

Chromatographie d'échange d'ions

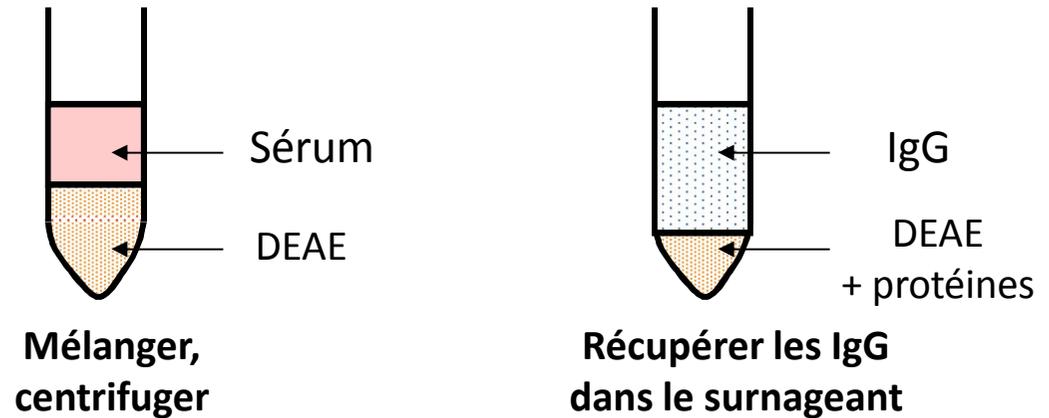
PRINCIPE



Chromatographie sur colonne

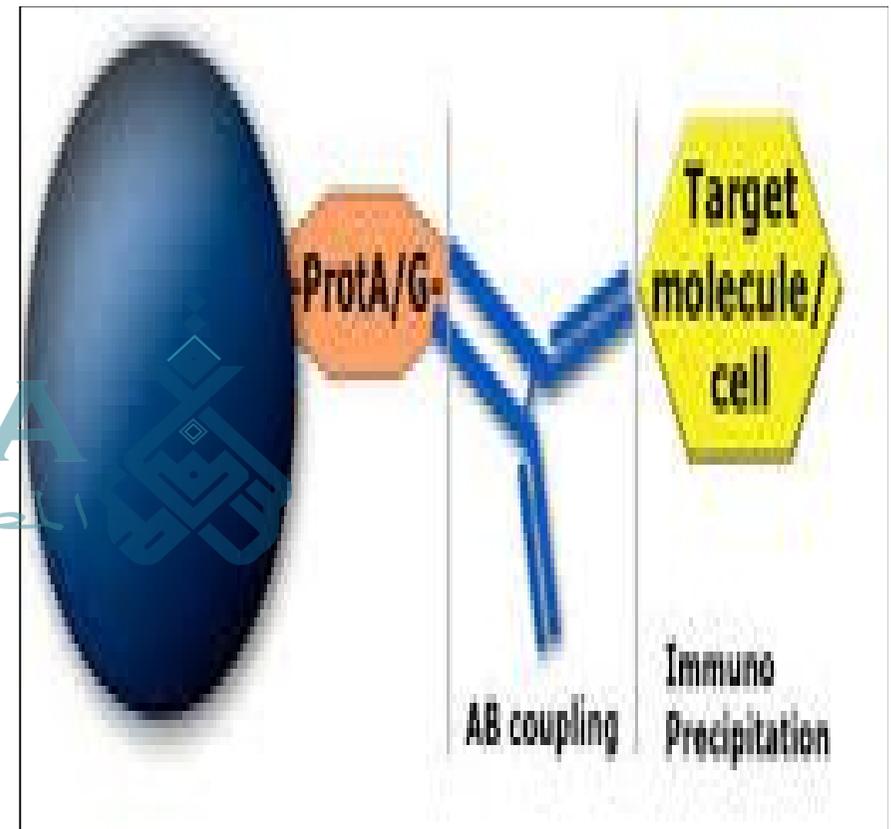
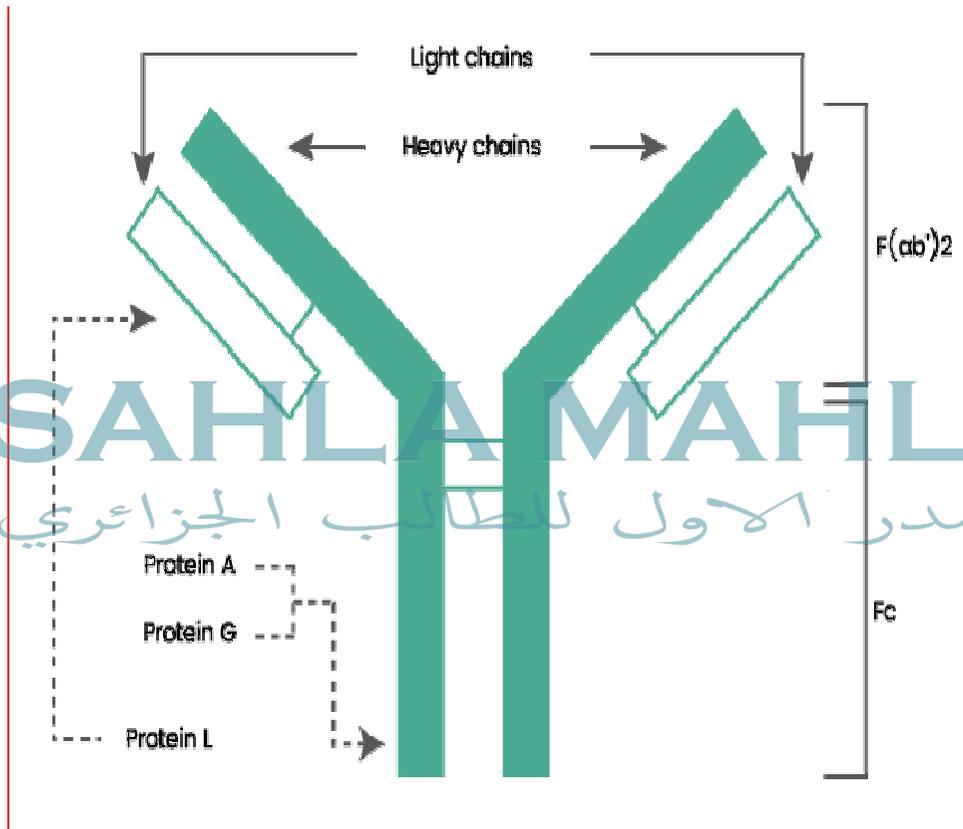


Méthode « batch »



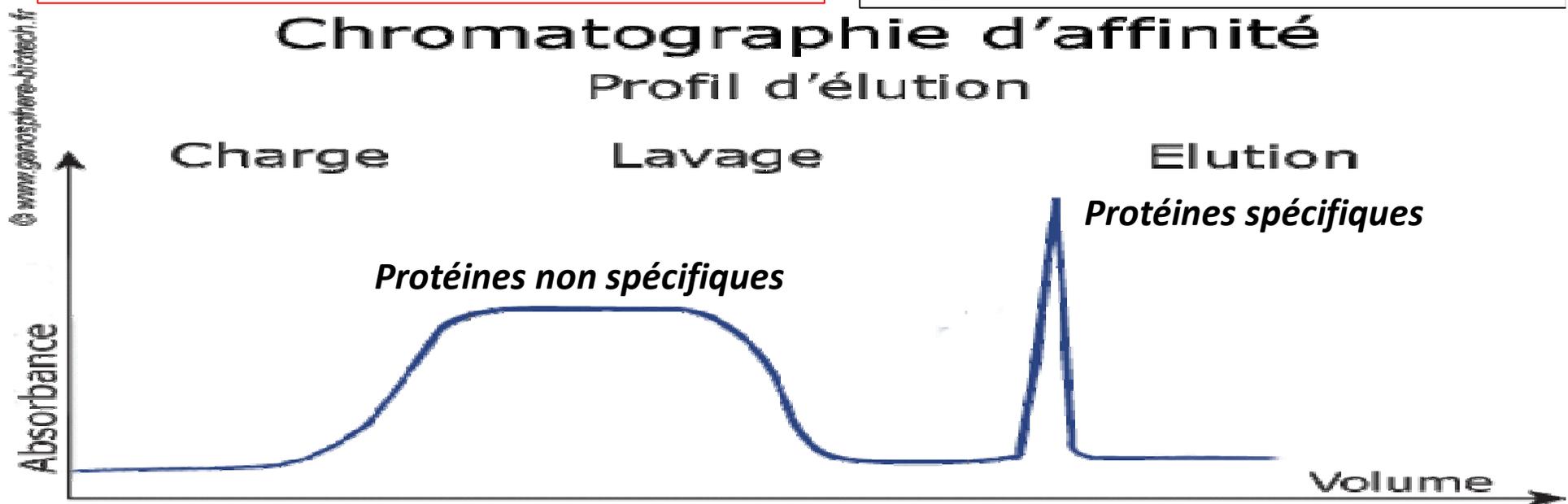
Purification d'anticorps à l'aide de protéines se liant aux anticorps

- La **Protéine A**, la **protéine G** et la **Protéine L** sont des protéines natives et recombinantes d'origine microbienne qui se lient aux immunoglobulines de mammifères (Ig).
- La **protéine A** et la **protéine G** se lient avec haute affinité et haute spécificité à la région Fc d'immunoglobulines de diverses espèces de mammifères, et notamment les IgG.
- La **protéine L** se lie aux immunoglobulines via la chaîne légère kappa.
- Ces protéines qui se lient aux anticorps peuvent être utilisées pour *purifier*, *immobiliser* ou détecter des immunoglobulines.



Chromatographie d'affinité

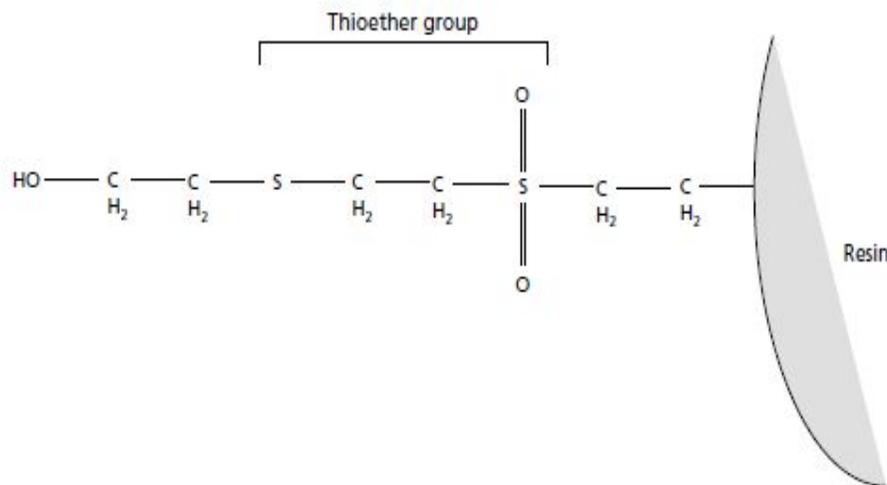
Profil d'élution



PURIFICATION IgY/IgM/IgE

La **chromatographie d'adsorption thiophile** (TAC) est une technique de purification de groupement spécifique, dépendant de la concentration en sel

TAC est basée sur le principe que certaines protéines (**IgE, IgY et IgM**) en présence de forte concentration en sel peuvent se lier à un ligand immobilisé qui contient des **groupements sulfoné à proximité de groupement thioether**. Les protéines fixées sont ensuite éluées en diminuant les concentrations en sel.



Thiophilic Resin

Add Salt



Filter/Centrifuge



Load



Wash



Elute in neutral
buffer (pH 7.0)

TECHNIQUE DE PURIFICATION DES ANTICORPS

Immunoglobulines cibles	Ligand d'affinité
Ig spécifique (quelle que soit la classe) IgG	Ag Immobilisé Protéine A Protéine G Protéine L (chaîne légère)
Fragment d'IgG (Avec chaîne Kappa)	Protéine L
IgM	Ligand Thiophile
IgY	Ligand Thiophile

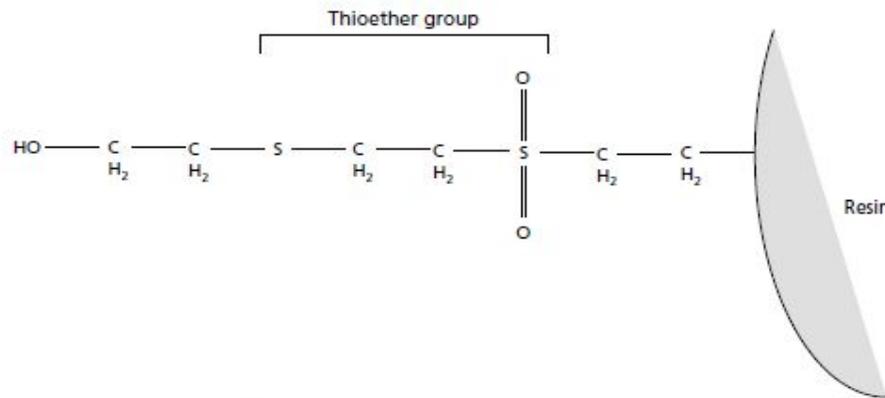


Figure 22. Structure of Thiophilic Resin.

Thiophilic Resin

Add Salt



Filter/Centrifuge



Load



Wash



Elute in neutral
buffer (pH 7.0)

FRAGMENTATION D'ANTICORPS

L'activité des anticorps est portée par une région ne représentant que 2% de la molécule d'anticorps. Le reste de la molécule peut être à l'origine d'effets non désirés :

- dans les techniques de détection, l'anticorps entier peut créer des interactions non spécifiques (bruit de fond)
- utilisé à usage thérapeutique, l'anticorps présente une immunogénicité qui peut provoquer des chocs anaphylactiques

FRAGMENTS D'ANTICORPS

- ❖ Les immunoglobulines peuvent être coupées en fragments par traitement enzymatique.
- ❖ La papaïne coupe l'immunoglobuline en 3 fragments d'environ 50 kDa chacun: $2 F_{ab}$ et $1 F_c$.
- ❖ Puisque les fragments F_{ab} contiennent les paratopes, ils retiennent leur capacité à lier l'antigène.
- ❖ Le fragment F_c est facilement cristallisable. Il ne contient pas de sites de reconnaissance de l'antigène.
- ❖ La pepsine coupe l'immunoglobuline à la base, en dessous du pivot, produisant un fragment $F_{(ab)_2}$. Le fragment $F_{(ab)_2}$ contient les 2 paratopes.
- ❖ Les fragments F_{ab} et $F_{(ab)_2}$ sont à l'occasion utilisés dans des essais immunologiques au lieu de l'immunoglobuline entière.



Les fragments $F_{(ab)2}$ ont une affinité apparente plus importante et conserve leur **propriété précipitante**, du fait de leur bivalence.

Les fragments F_{ab} sont monovalents. Ils sont particulièrement recommandés pour atteindre des cibles difficiles quand la diffusion des molécules est un facteur limitant.

Marquage d'anticorps

Les marquages proposés :

■ Marquages enzymatiques (peroxydase, phosphatase alcaline, glucose oxydase, b-galactosidase)

■ Marquages fluorescents (fluorescéine, rhodamine, cyanine, phycoérythrine)

■ Biotinylations

■

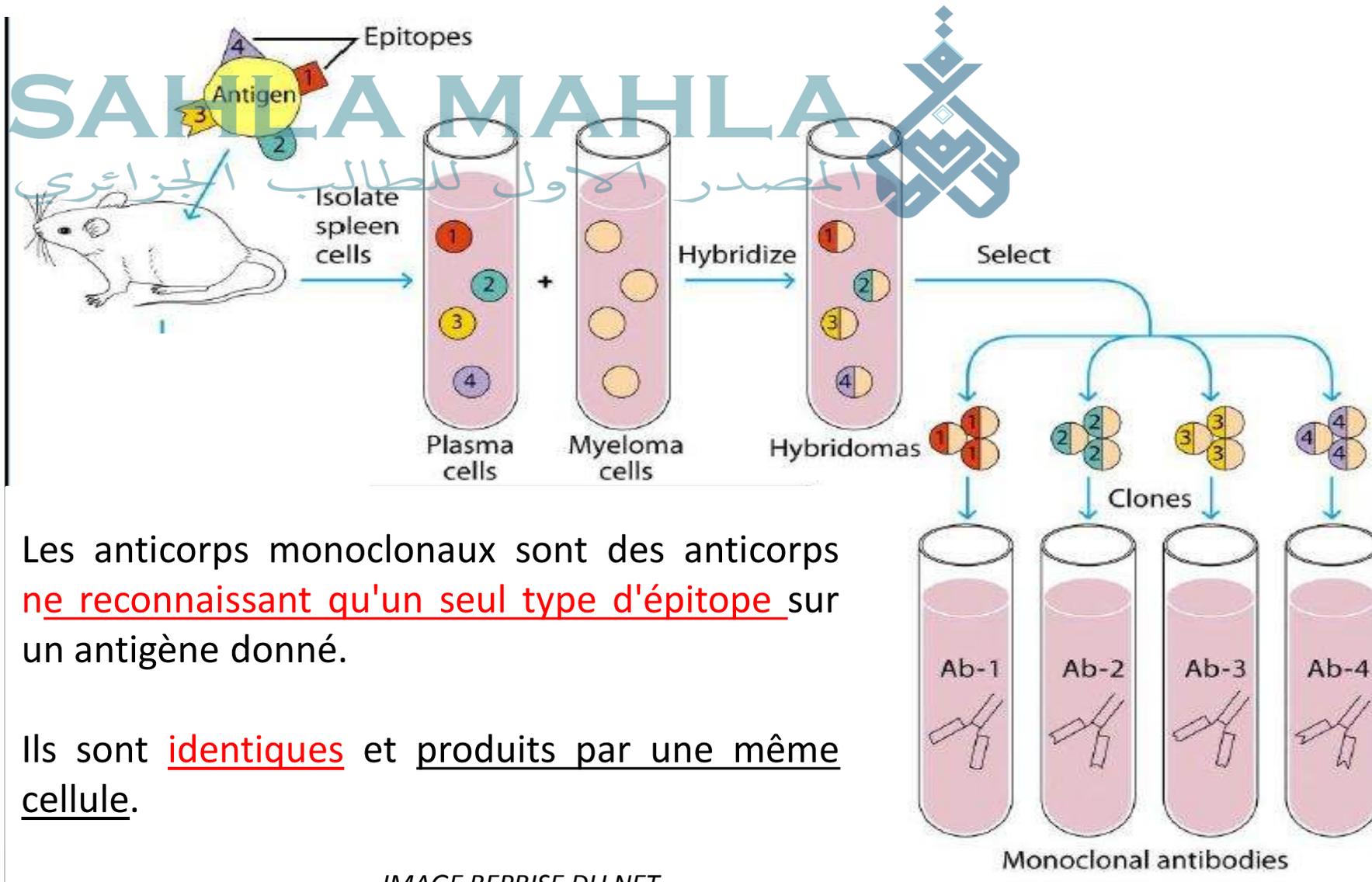
EVOLUTIONS TECHNOLOGIQUES DES ANTICORPS



TECHNOLOGIE DE PRODUCTION DES ANTICORPS

- Polyclonaux
- **Monoclonaux**
 - Recombinants

ANTICORPS MONOCLONAL



Les anticorps monoclonaux sont des anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné.

Ils sont identiques et produits par une même cellule.

ANTICORPS MONOCLONAUX

Anticorps monoclonaux

● Population homogène d'anticorps issus d'un « seul et unique » clone de cellules B

Les **anticorps monoclonaux** sont des anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné. Ils sont par définition tous identiques et produits par un seul clone de plasmocyte.

Avantage

- Spécificité
 - Affinité
 - Production massive et constante
- Reproductible
Illimitée dans le temps

Techniques utilisant des anticorps

→ En diagnostic :

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطايعي Immunoblot



- Immunofluorescence
- Agglutination et hémagglutination
- Réaction de fixation du complément
- Immunochromatographie
- Immunoprécipitation

- Cytométrie de flux
- Radio-Immuno-Assays (RIA)
- Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

→ En thérapeutique :

- Immunothérapie

Exemples d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

Anticorps	Cible	Mécanisme	Indication
omalizumab	IgE	Blocage de la liaison au FcεRI des mastocytes et des basophiles	Asthme allergique
éculizumab	C5	Blocage de la formation du complexe d'attaque membranaire du complément	Hémoglobinurie nocturne paroxystique, Syndromes hémolytiques et urémiques atypiques
canakinumab	IL-1β	Neutralisation de l'IL-1β	syndrome de Muckle-Wells (maladie auto-inflammatoire)
ustékinumab	IL-12, IL-23	Neutralisation de l'IL-12 et de l'IL-23 par reconnaissance de la portion p40 commune	Psoriasis

(i)

Formation de complexes spécifiques antigène-mAb



SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري

(ii)

Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)

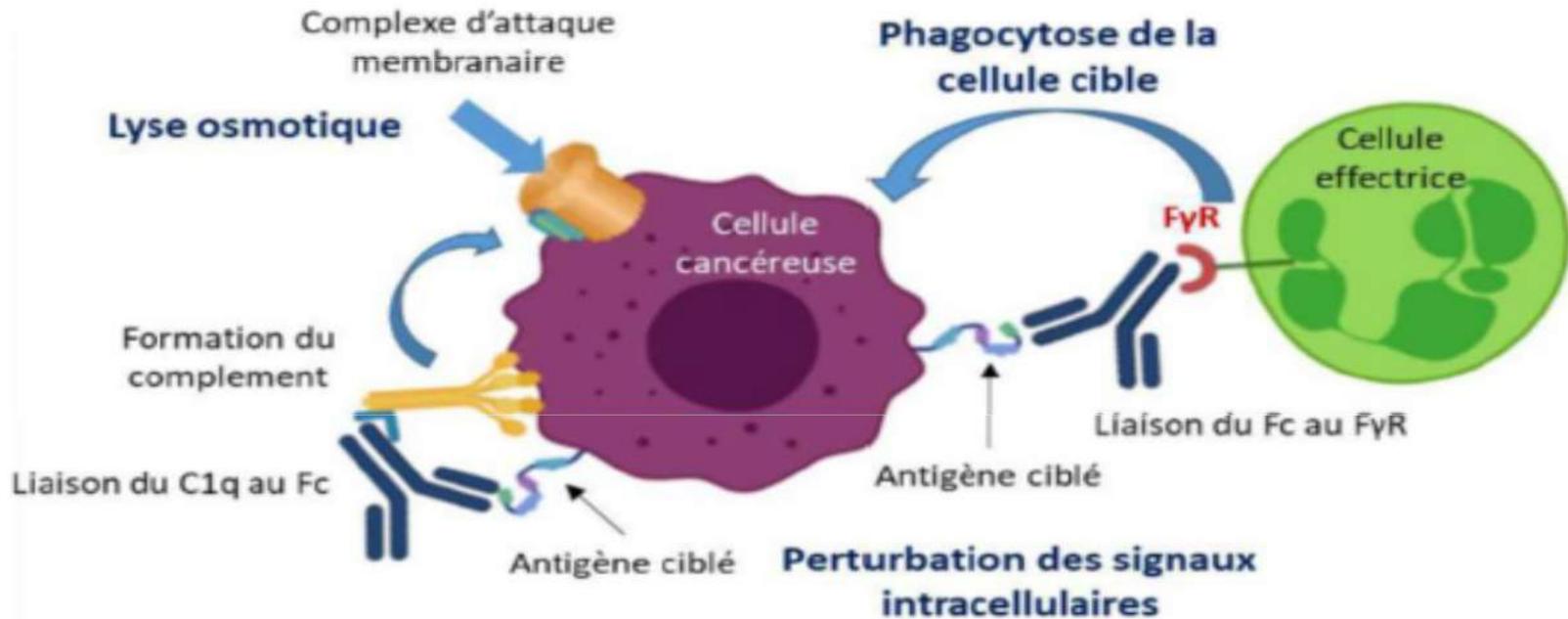
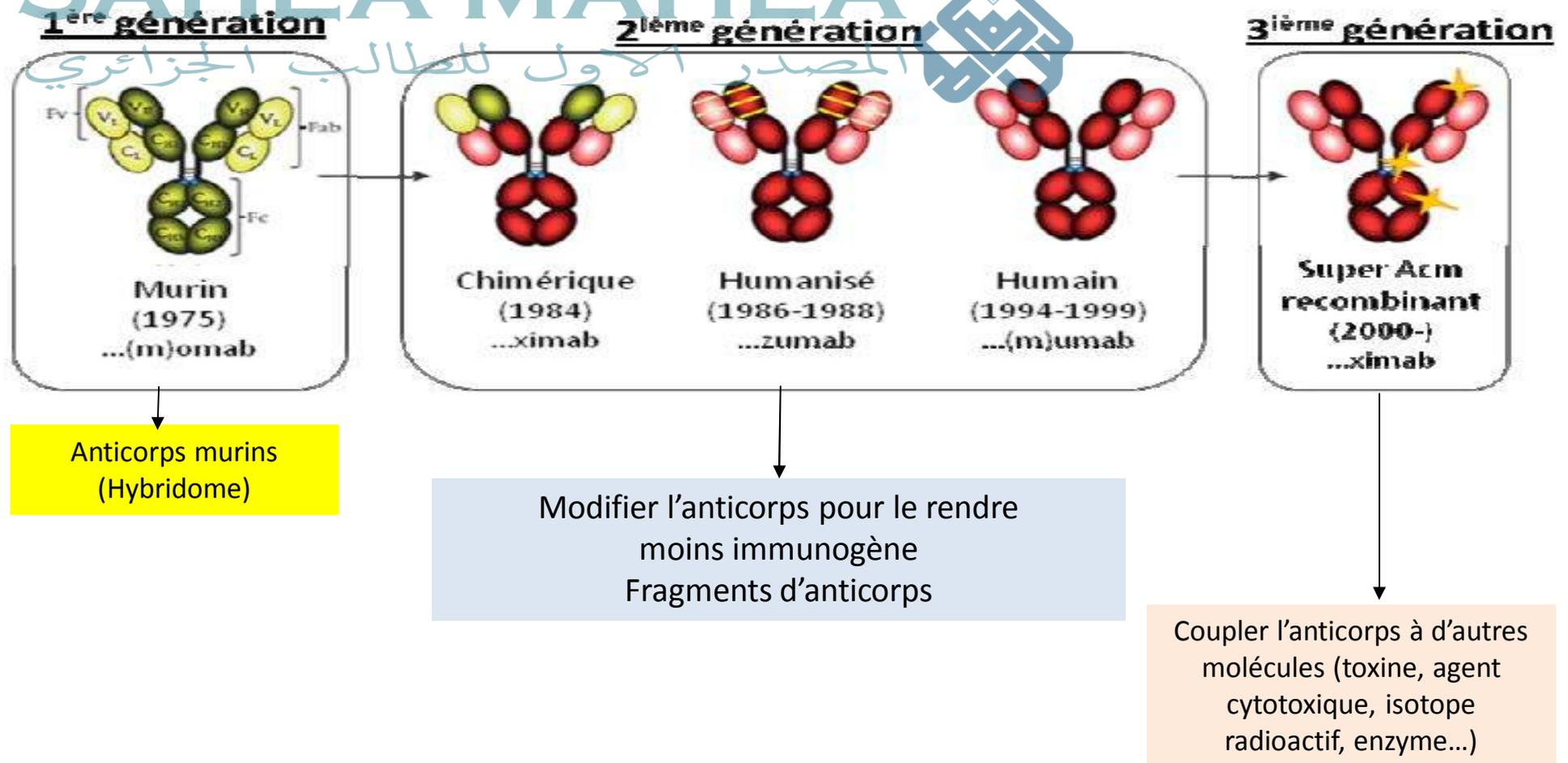


Figure 4 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux.

MÉTHODE DE PRODUCTION Anticorps monoclonaux



INGENIERIE DES ANTICORPS : ANTICORPS MONOCLONAUX (PREMIERE GENERATION (murin))

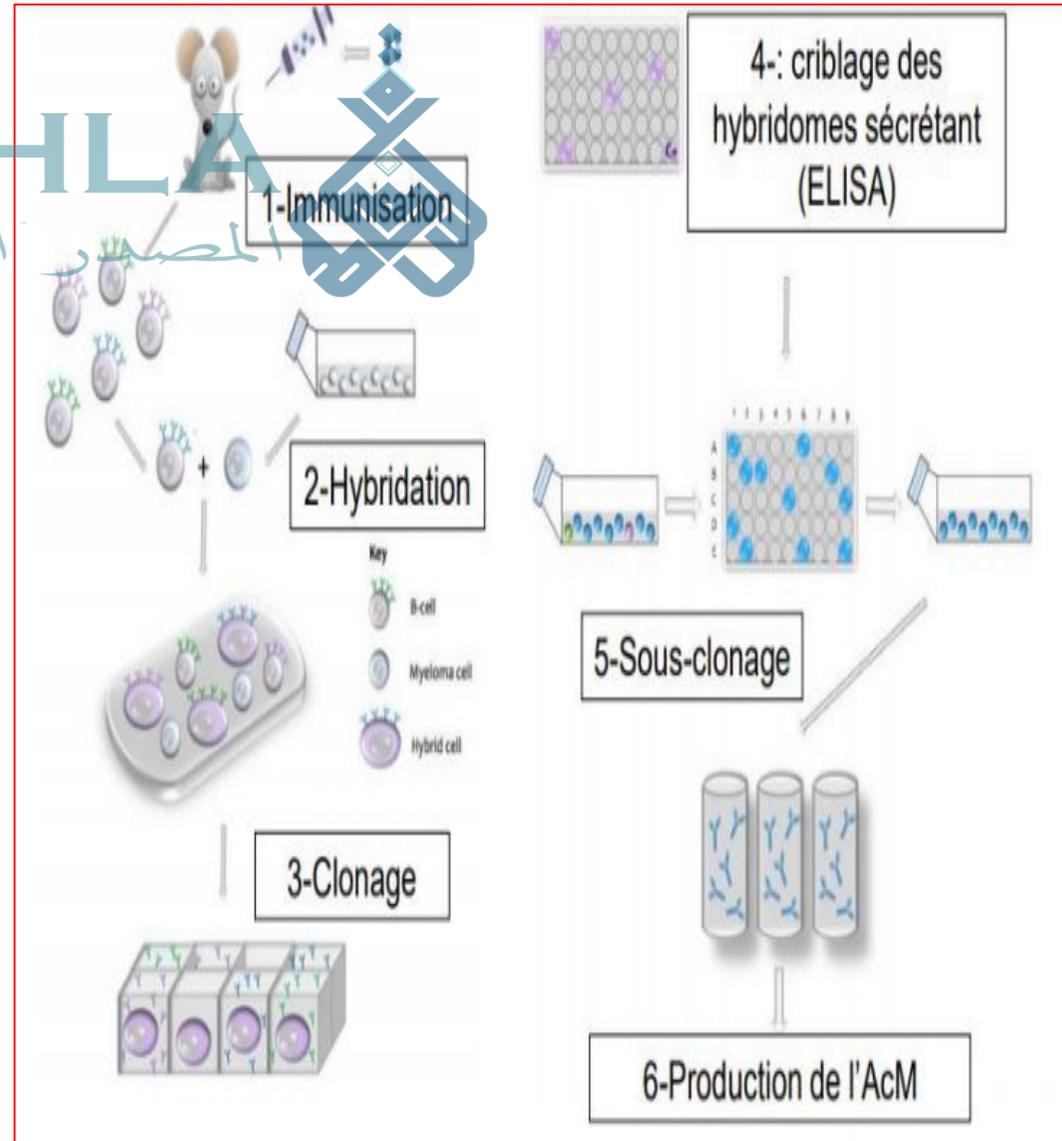
SAHLA MAHLA

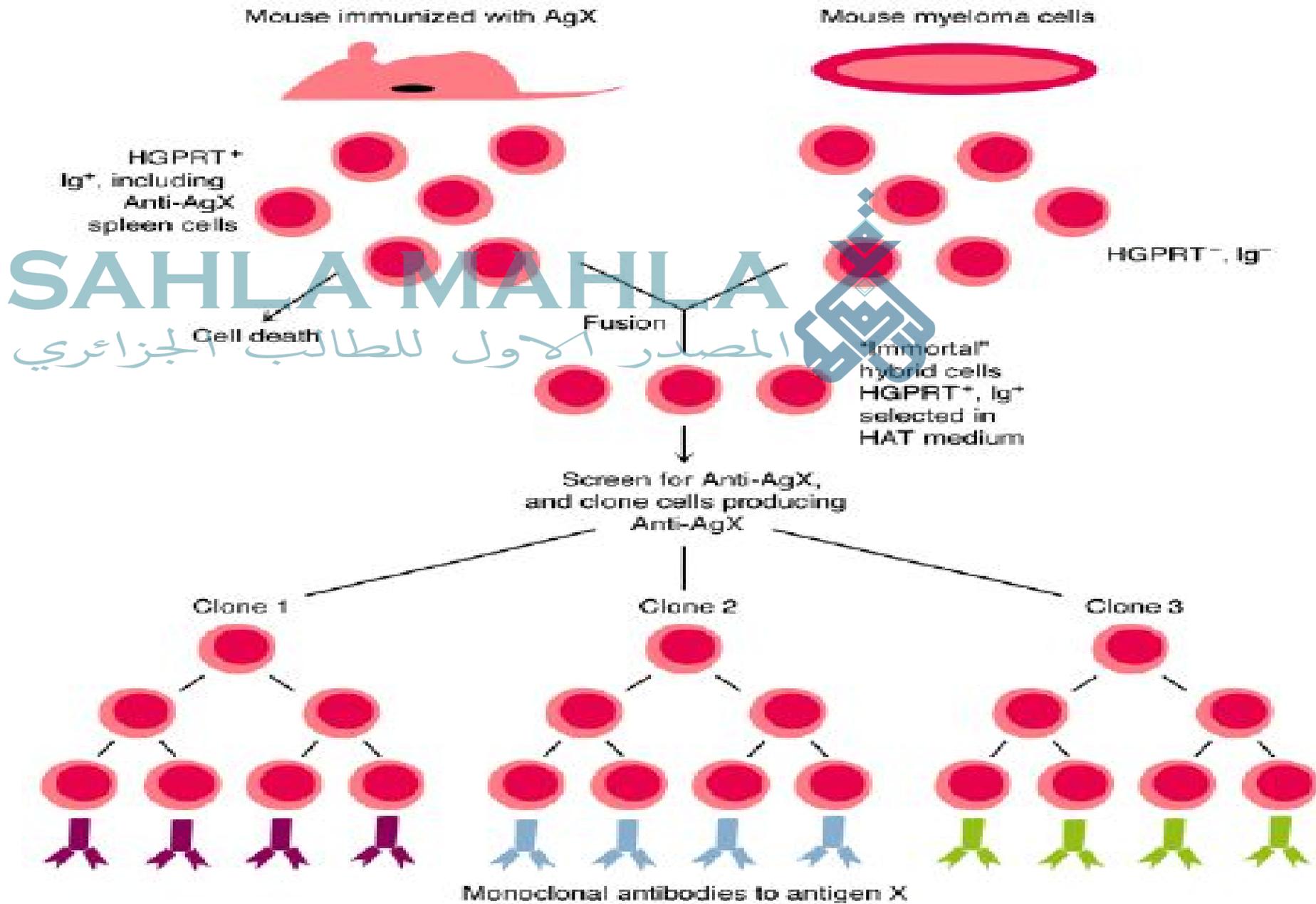
المصدر الأول للطلاب الجزائري

- Le principe général de la production d'hybridome repose sur la fusion de lymphocytes B, secrétant des anticorps mais ne se multipliant pas *in vitro*, avec des cellules de myélome lymphoïde, ayant la capacité de se multiplier rapidement et indéfiniment *in vitro* dans un milieu de culture.

LES ETAPES PRINCIPALES DE LA PRODUCTION

- Immunisation
- Hybridation
- Sélection des cellules hybrides et Clonage
- Criblage des hybridomes sécréteurs/Screening
- Production de l'anticorps monoclonal (Amplification)





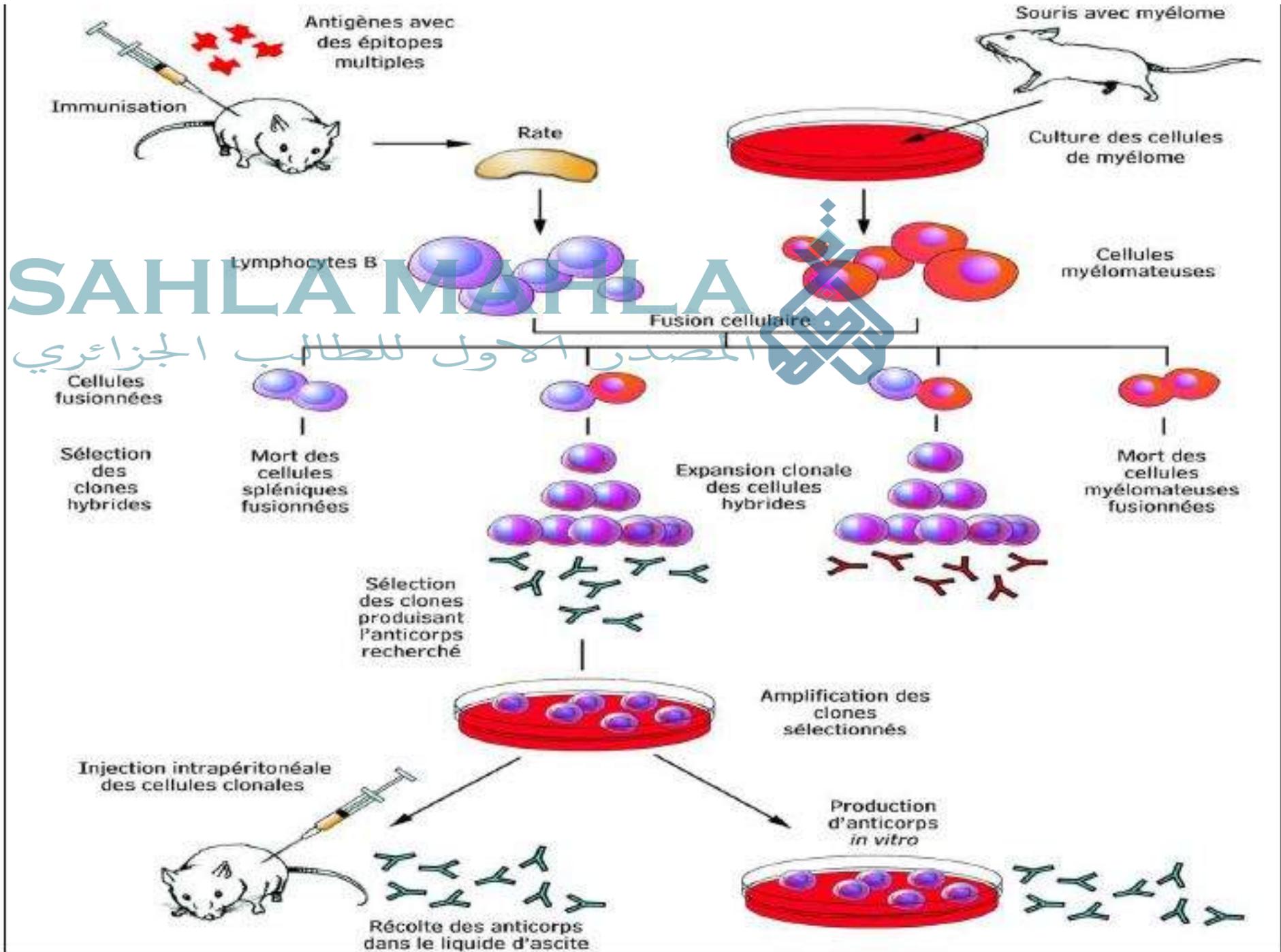


IMAGE REPRISE DU NET

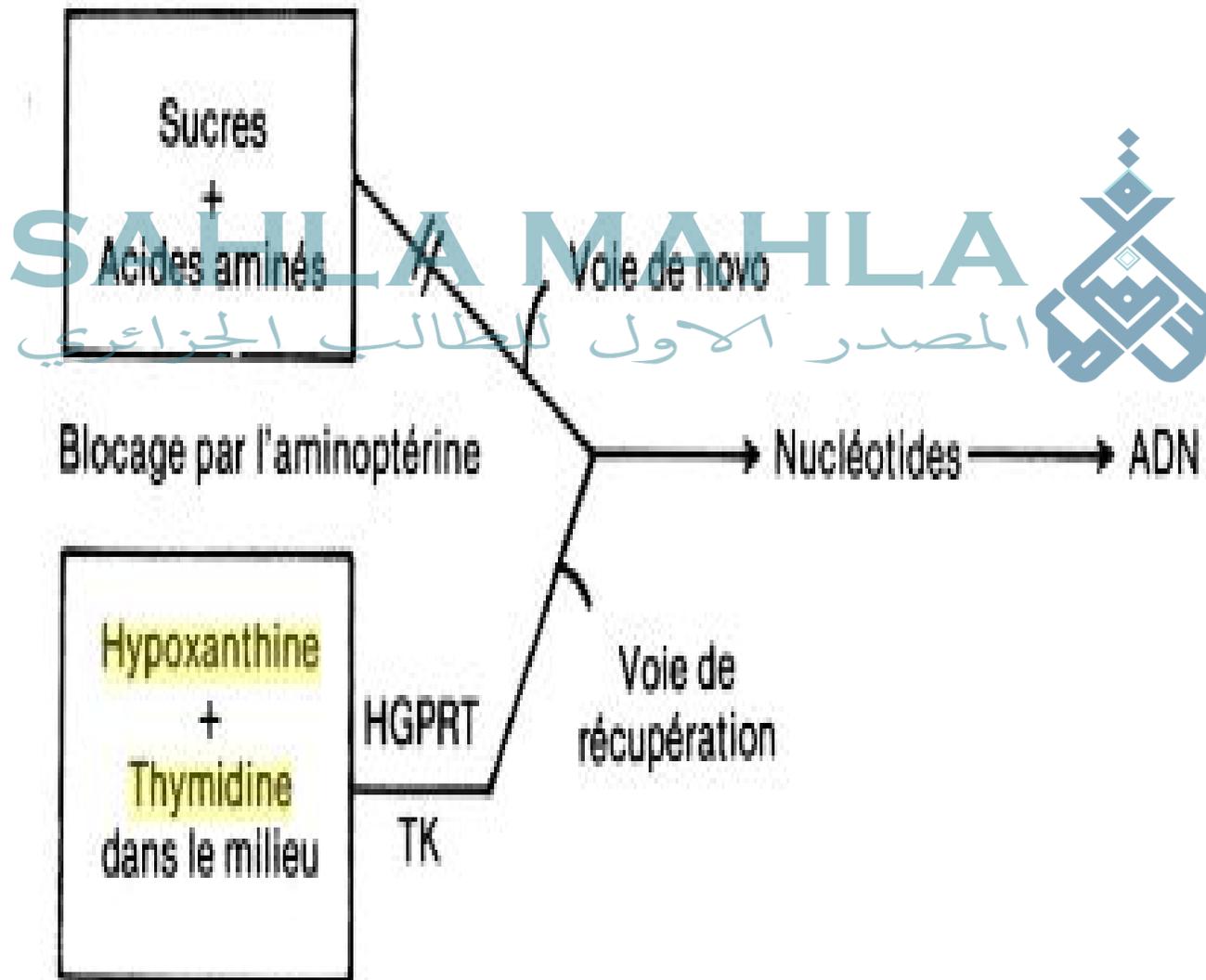


Figure 20-14 Les nucléotides requis pour la réplication de l'ADN proviennent de deux voies biochimiques. La voie *de novo* est bloquée par l'aminoptérine présente dans le milieu HAT. L'**hypoxanthine** (précurseur des purines) et la **thymidine** (précurseur des pyrimidines) sont disponibles par la voie de récupération, mais il faut la présence des enzymes **thymidine kinase (TK)** et **hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT)**.

FUSION DES CELLULES

Fusion chimique: Poly Ethylène Glycol (PEG)

- – fusion des membranes cytoplasmiques
- – rendement de fusion élevé
- – DMSO renforce la viabilité cellulaire

Fusion physique : Electrofusion

- – Ouverture de pores dans la cellule par des pulses électriques
- – technique onéreuse
- – moins destructrice

Crible des Anticorps monoclonaux

Ensemencement des hybridomes sur microplaques de culture

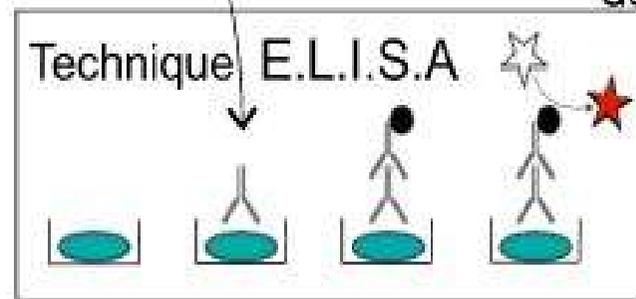


dilution limite : répartition à une cellule unique par puits

survie en milieu HAT

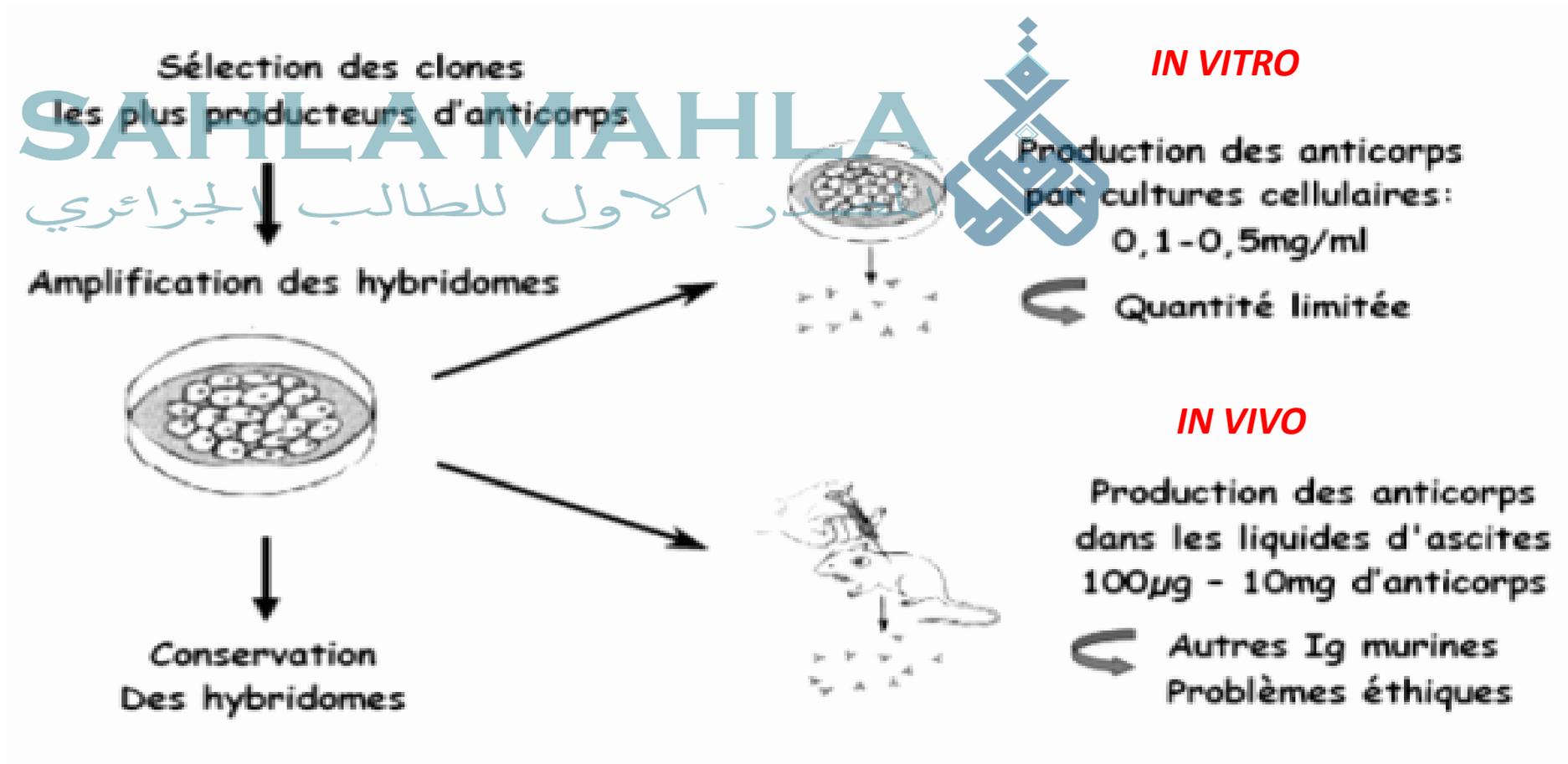
CRIBLE DES ACm
pour chaque hybridome qui survit, tester individuellement la spécificité antigénique de l'anticorps produit dans le surnageant de culture

AC secondaire couplé à une Enzyme de détection



antigène (immunogène de départ) ACm produit par 1 hybridome

La production des Anticorps monoclonaux



AMPLIFICATION *IN VIVO* : Production en ascites

- Injection des hybridomes dans le péritoine de souris
- Développement d'une tumeur : ascite
- Prélèvement des anticorps par ponction de liquide d'ascite
- Purification du liquide d'ascite nécessaire
- Rendement élevé 20 g/l
- C'est la souris qui régule les conditions de culture !

Anticorps polyclonaux vs. monoclonaux

	ANTICORPS POLYCLONAUX	ANTICORPS MONOCLONAUX
CARACTERISTIQUES	<p>-un mélange complexe d'immunoglobulines isolées du sérum sanguin</p> <p>- Ces anticorps reconnaissent une série d'épitopes différents.</p> <p>- Ils possèdent une large gamme de sélectivités et affinités.</p> <p>→ <i>Ceci peut donner lieu à des réactivités croisées ou à des interférences dans un essai immunologique</i></p>	<p>-anticorps spécifique sécrété par les hybridomes produits grâce aux méthodes de la technologie des hybridomes (impliquant des cultures cellulaires)</p> <p>- Il se lie à un épitope particulier .</p> <p>-Les anticorps monoclonaux sont plus spécifiques et possèdent des propriétés plus reproductibles.</p> <p>-Ils sont les anticorps de choix pour les essais analytiques</p>

AUTRES GENERATIONS DES ANTICORPS : 2^{ÈME} GENERATION



Acm de souris

Acm chimériques
Homme-souris

Acm humanisés

Acm intégralement
humains

Année(s) de découverte	1975	1984	1988-1991	1994-1999
Segment clé	-(m)omab	-ximab	-zumab	-(m)umab

HYBRIDOME

TRANSFECTANTS CELLULAIRES

Ac. MONOCLONAL

Ac. MONOCLONAL RECOMBINANT

Immunogènes
Faible demi-vie
Peu efficaces



Moins immunogènes
Demi-vie accrue
Plus efficaces

TECHNOLOGIE DE PRODUCTION DES ANTICORPS

SAHLA MAHLA

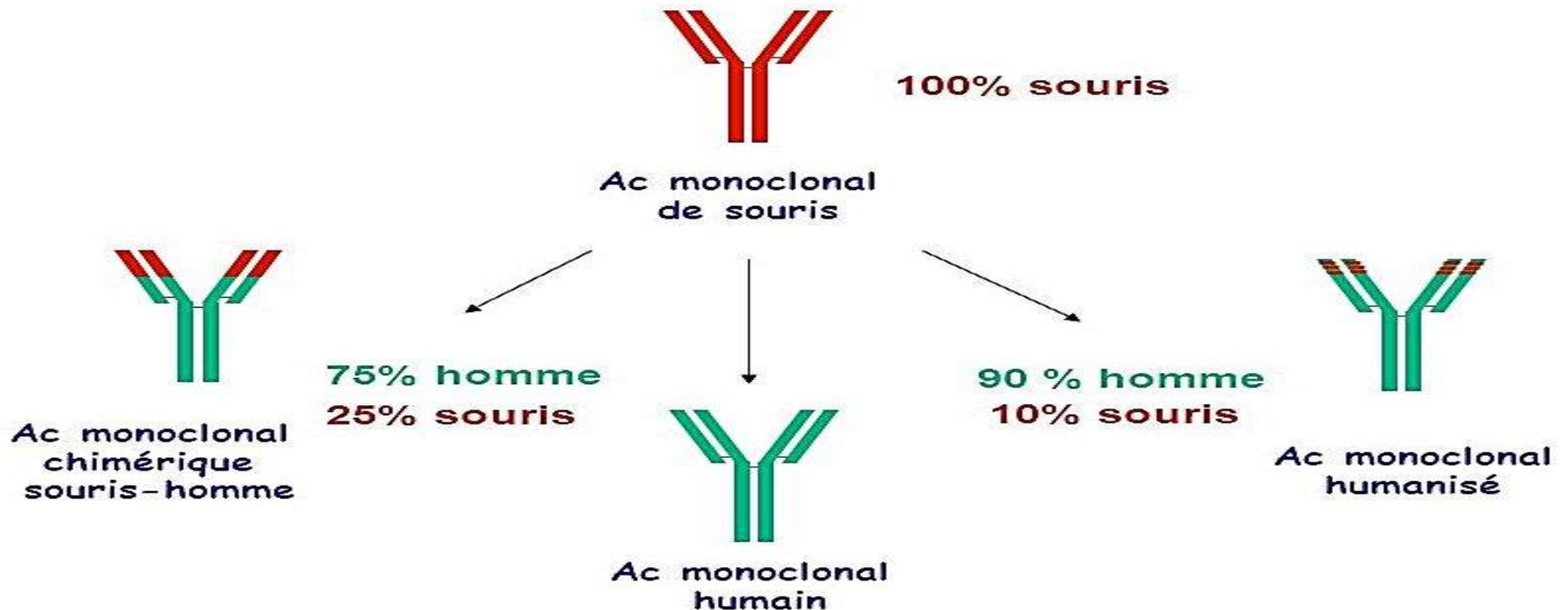
• Polyclonaux

المصدر الإجمالي الطالب الجزائري

• Monoclonaux



• Recombinants



ANTICORPS MONOCLONAUX MURINS

Echec thérapeutique pour les raisons essentielles suivantes:

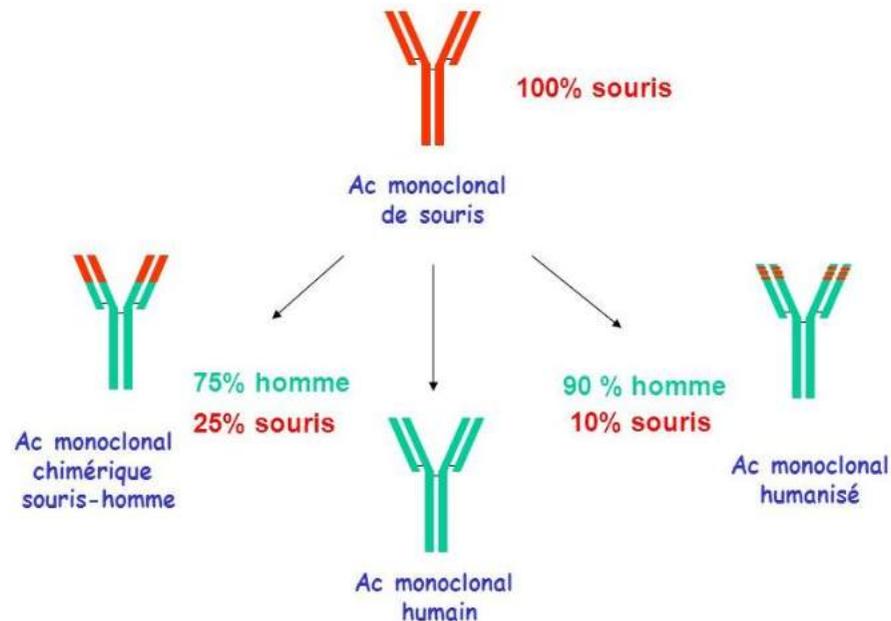
HAMA : anticorps humain anti-anticorps murin, human anti-mouse antibody → la formation d'anticorps humains anti-anticorps murins

∅ Fort pouvoir immunogène lié à l'origine murine de ces Ac

∅ Faible capacité à coopérer avec les systèmes immunitaires humains pour mettre en place les différentes propriétés effectrices de l'Ac

∅ Neutralisation et clairance accélérée des AcM

Les différentes formes des Ac monoclonaux:



Nomenclature des « MABs »

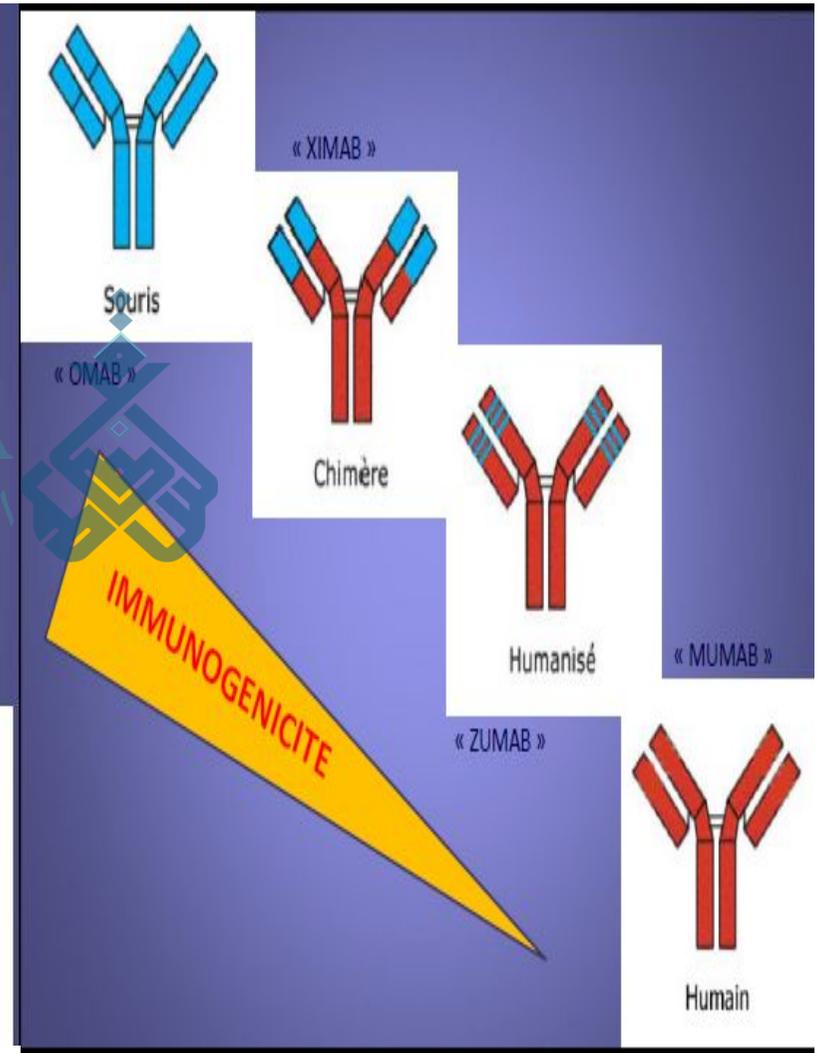
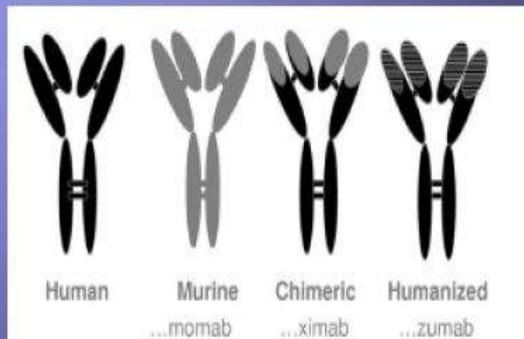
Le suffixe « MAB » pour Monoclonal AntiBody

« Momab » = Ac murins **!HAMA!**

« Ximab » = Ac chimériques

« Zumab » = Ac humanisés

« Mumab » = Ac humains

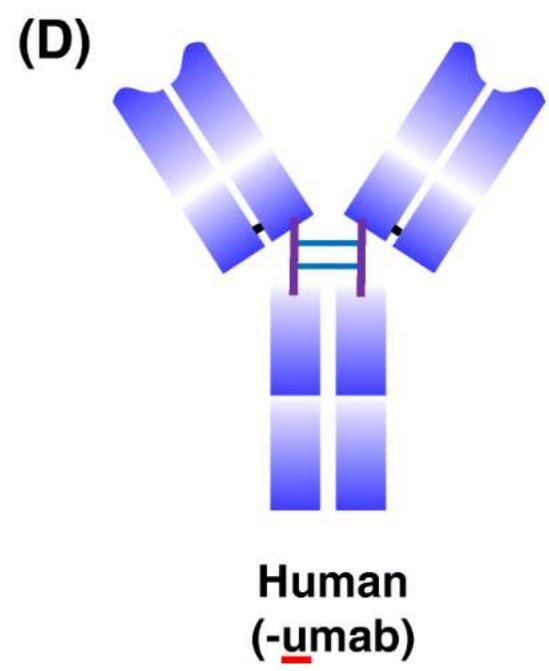
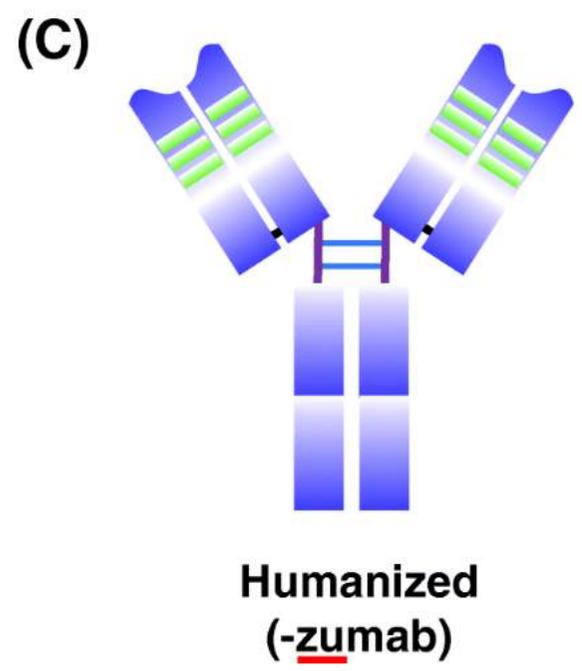
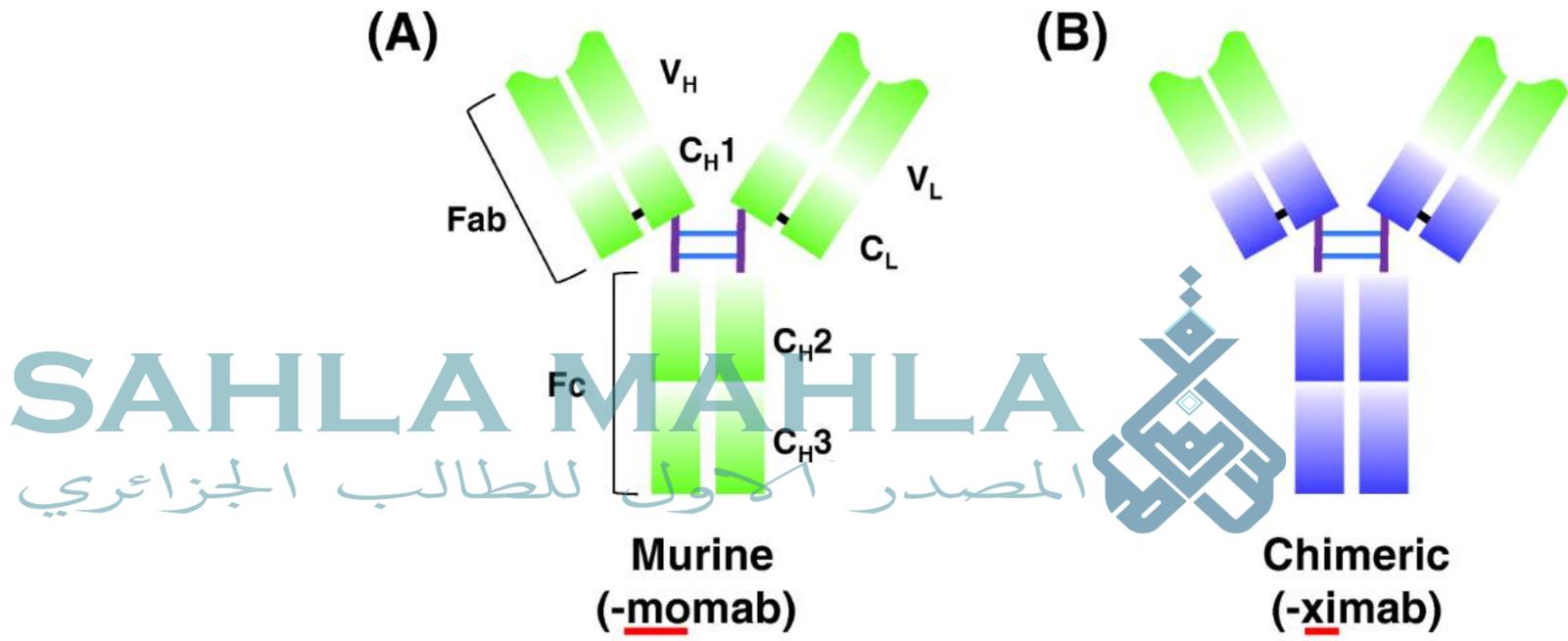


On peut distinguer plusieurs classes dans les anticorps monoclonaux recombinés

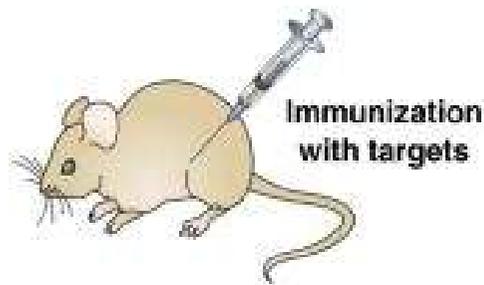
→ Production d'anticorps humains anti-souris ou **HAMA** (Human Anti-Mouse Antibodies) conduisant dans certains cas à des chocs anaphylactiques

Les anticorps monoclonaux en thérapeutique

Xavier Gérard



(A) Mouse hybridoma



Harvest splenocytes, generate hybridomas



Screening

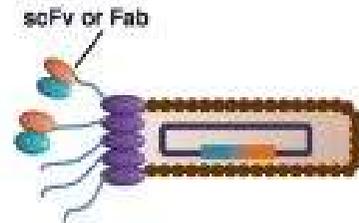


Mouse mAb

Chimerization

CDR graft

(B) Phage display



Phage-displayed Ab libraries

Biopanning with targets (3-5 cycles)



Screening



Construction of Human IgG



Chimeric mAb



Humanized mAb

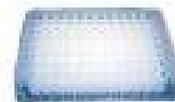
(C) Transgenic mouse



Harvest splenocytes, generate hybridomas

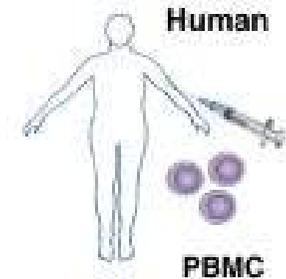


Screening

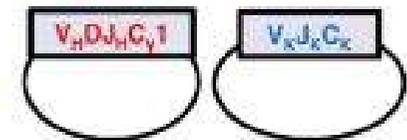


Human mAb

(D) Single B cell



Sort B cells with labeled antigens



PCR, construct V_H and V_L

SAMLA MAHLA
المصدر الأول للطلاب الجامعي

SAHLA MAHLA

صدر الأول للطالب الجزائري

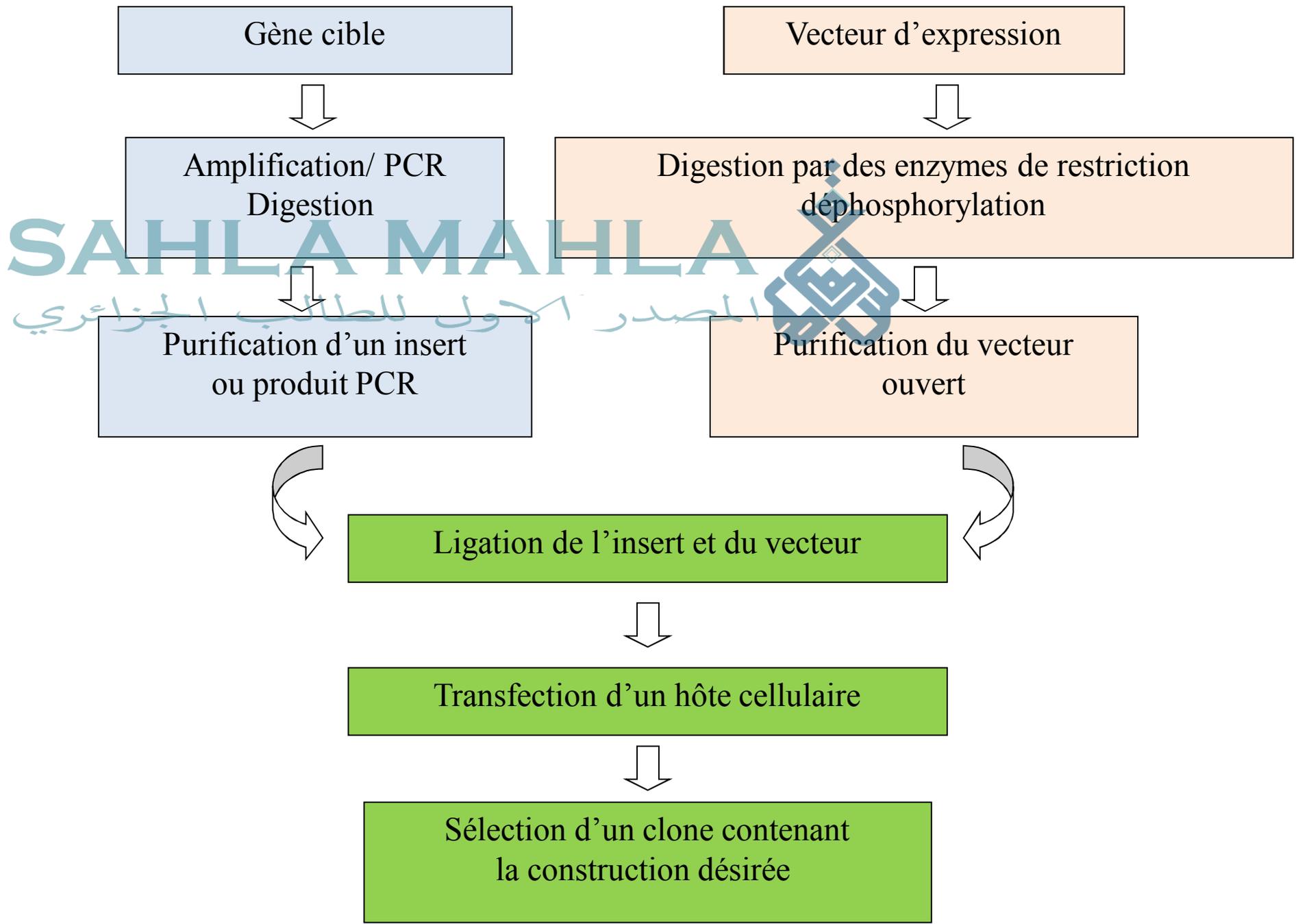


• COMMENT OBTENIR LES ANTICORPS RECOMBINANTS?

- *EXEMPLES CHIMERIQUE, scFv....*

Principe Général

Introduction dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote, par l'intermédiaire d'un vecteur ou d'une recombinaison génétique d'un ADN codant une protéine d'intérêt (Anticorps)





Expression hétérologue



Lyse cellulaire/ Surnageant de culture



Purification à homogénéité



Tests de fonctionnalité

SAHLA MAHLA

للطلاب الجزائري



ANTICORPS RECOMBINANT

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



- Comment obtenir un anticorps Chimérique???

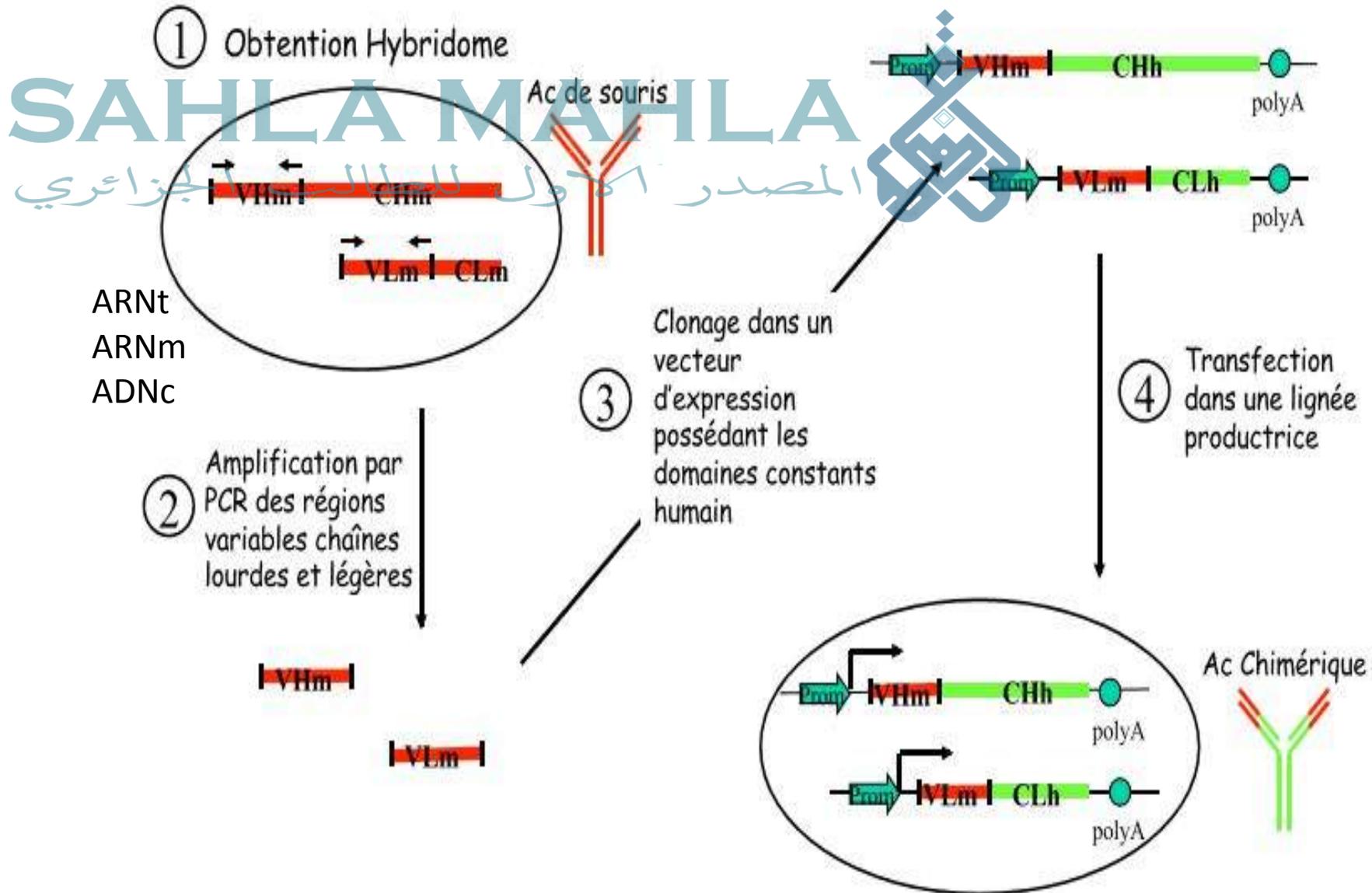
ANTICORPS CHIMERIQUE

- Environ **75% de séquences humaines** et un **fragment Fc totalement humain**.
- **Diminution** considérablement **l'immunogénicité** chez l'homme
- Assure une **bonne interaction de l'anticorps avec les FcRs humains**, améliorant ainsi la demi-vie et les fonctions effectrices.

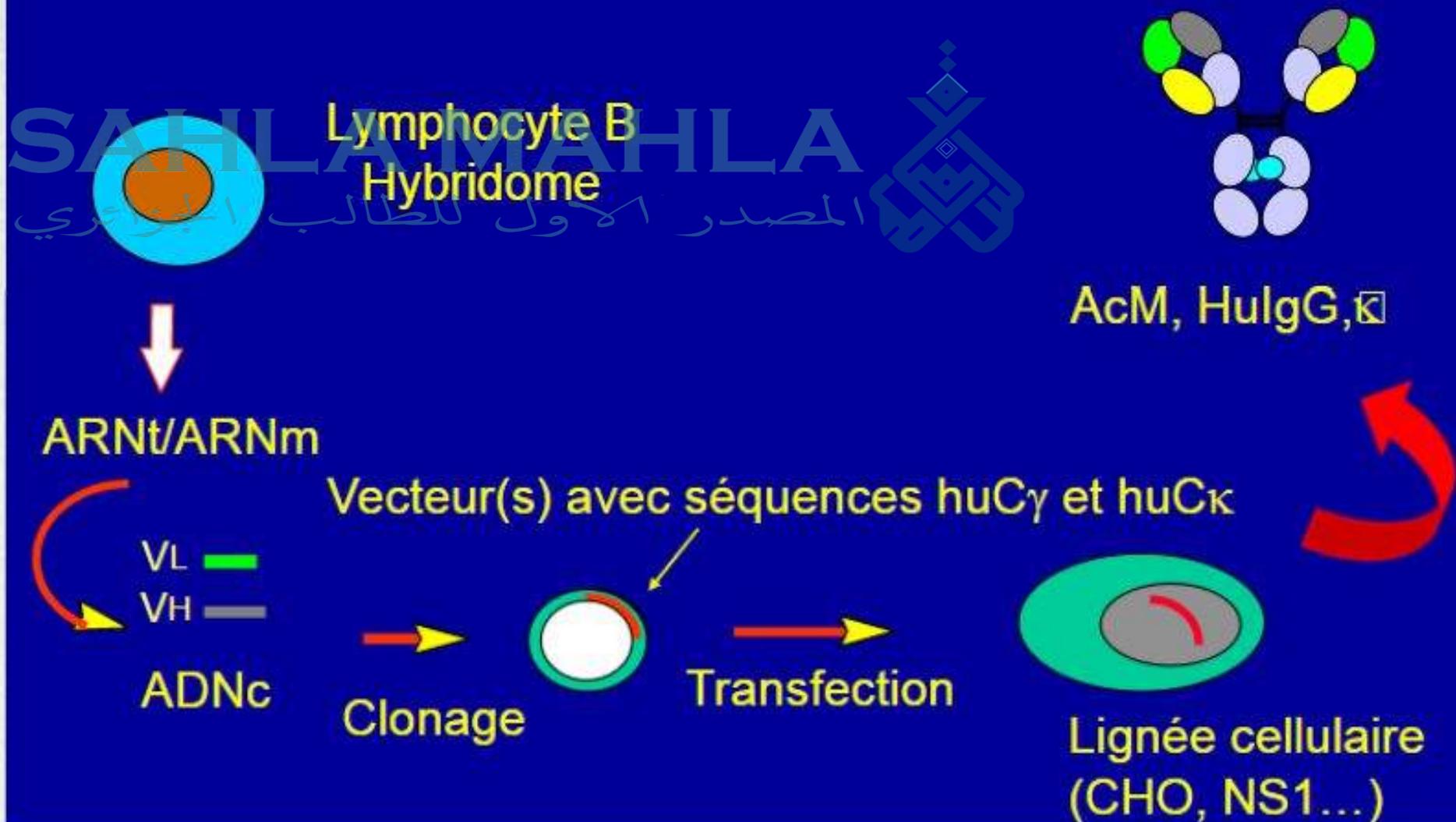
Malgré la proportion réduite de séquences murines, ces anticorps induisent encore des **réactions immunitaires de type HACA** (Human Anti-Chimeric Antibodies), responsables d'effets indésirables chez les patients.

Modification des anticorps

Chimérisation des anticorps



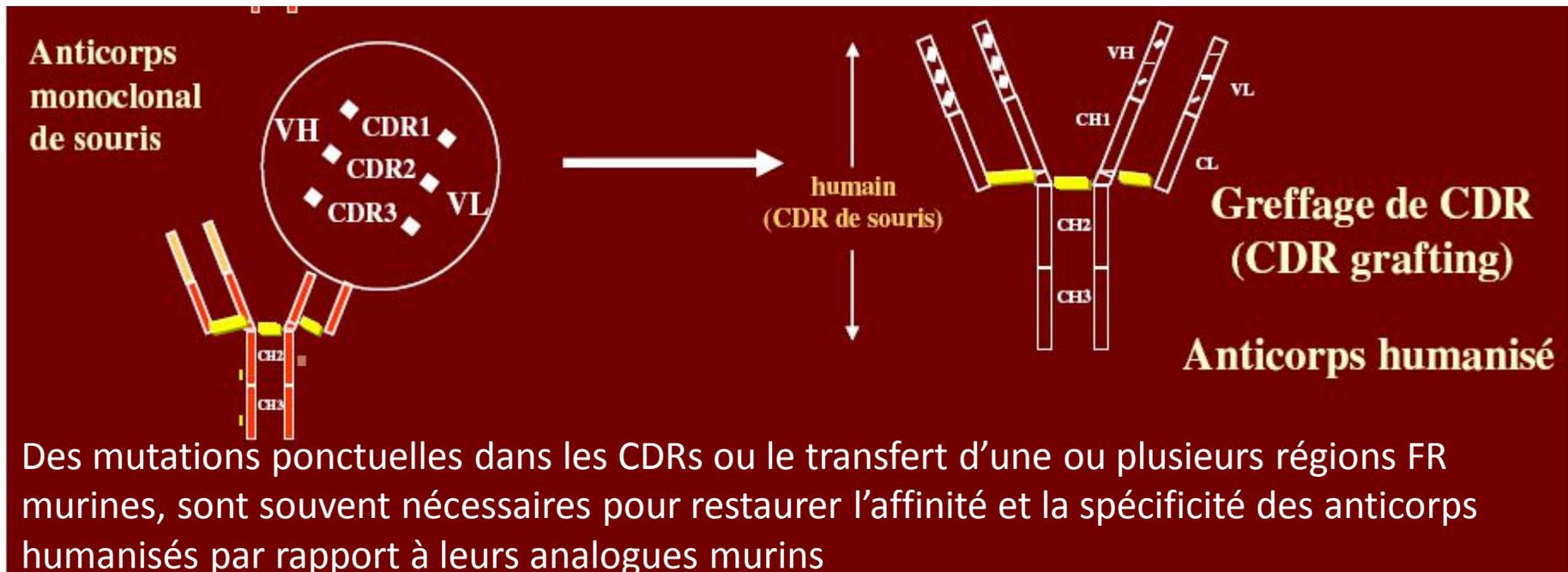
Génération d'un AcM recombinant huIgG, κ



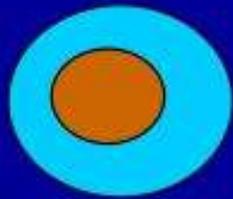
ANTICORPS HUMANISE

- 10% de séquences murines
- Ces anticorps peuvent être construits *via le greffage des régions hypervariables murines sur un squelette d'anticorps humain (CDR grafting)*.

CDR-Grafting : Transfert par biologie moléculaire des résidus parentaux critiques à la reconnaissance de l'antigène sur des régions charpentes (framework – FR) germinales humaines.



Génération d'un AcM recombinant humanisé hulgG1, κ



Hybridome B de souris

ARNt/ARNm

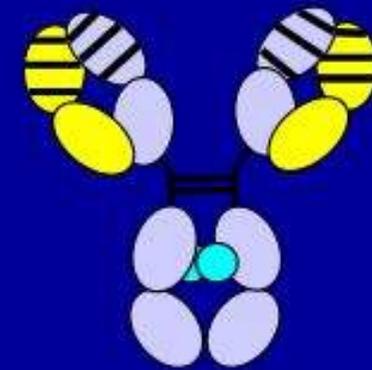
VL
VH

huVL
huVH

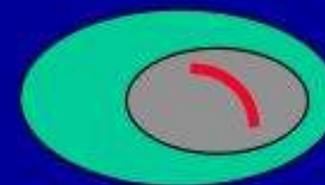
1. Séquençage
2. Comparaison V humains
3. Modélisation 3-D/cristal
4. Détermination CDR/FR contact
5. Greffe CDR
6. Mutations ponctuelles FR

Clonage

Transfection



AcM, HulgG1, κ



Lignée cellulaire
(CHO, NS1...)

Vecteur avec séquences huC γ 1 et huC κ

ANTICORPS RECOMBINANT

- Comment obtenir un fragment d'anticorps simple chaine scFv???

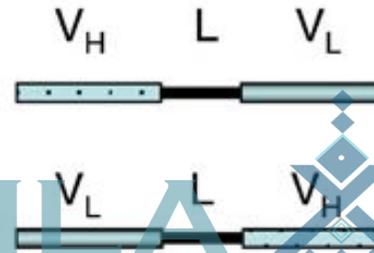
L = 15



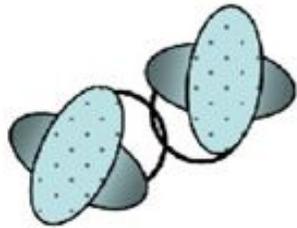
FRAGMENTS DES ANTICORPS RECOMBINANTS

Création de
molécules modifiées
aux propriétés
nouvelles

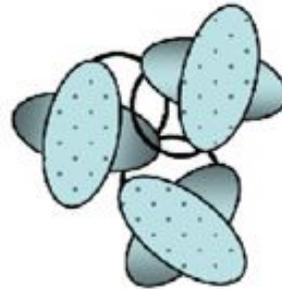
scFv



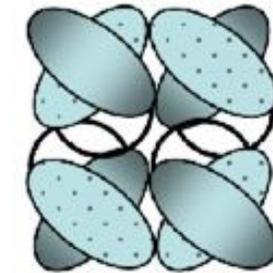
Diabodies



Triabodies



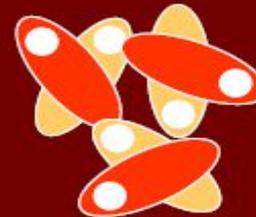
Tetrabodies



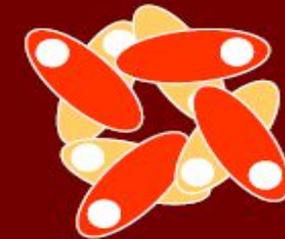
scFv



Bi-scFv



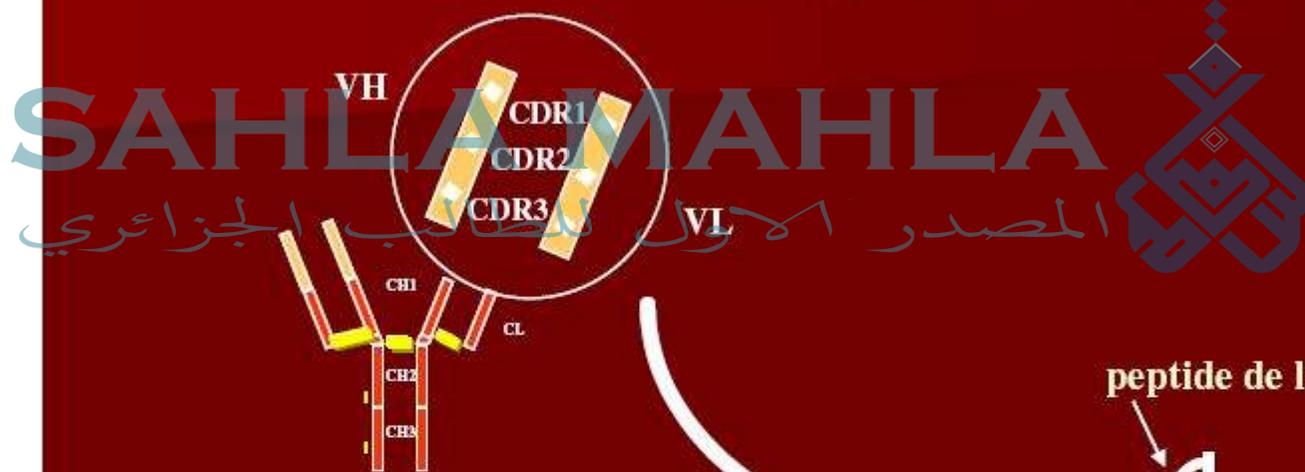
Triabody



Tetrabody

ANTICORPS RECOMBINANT

scFv:single chain fragment variable

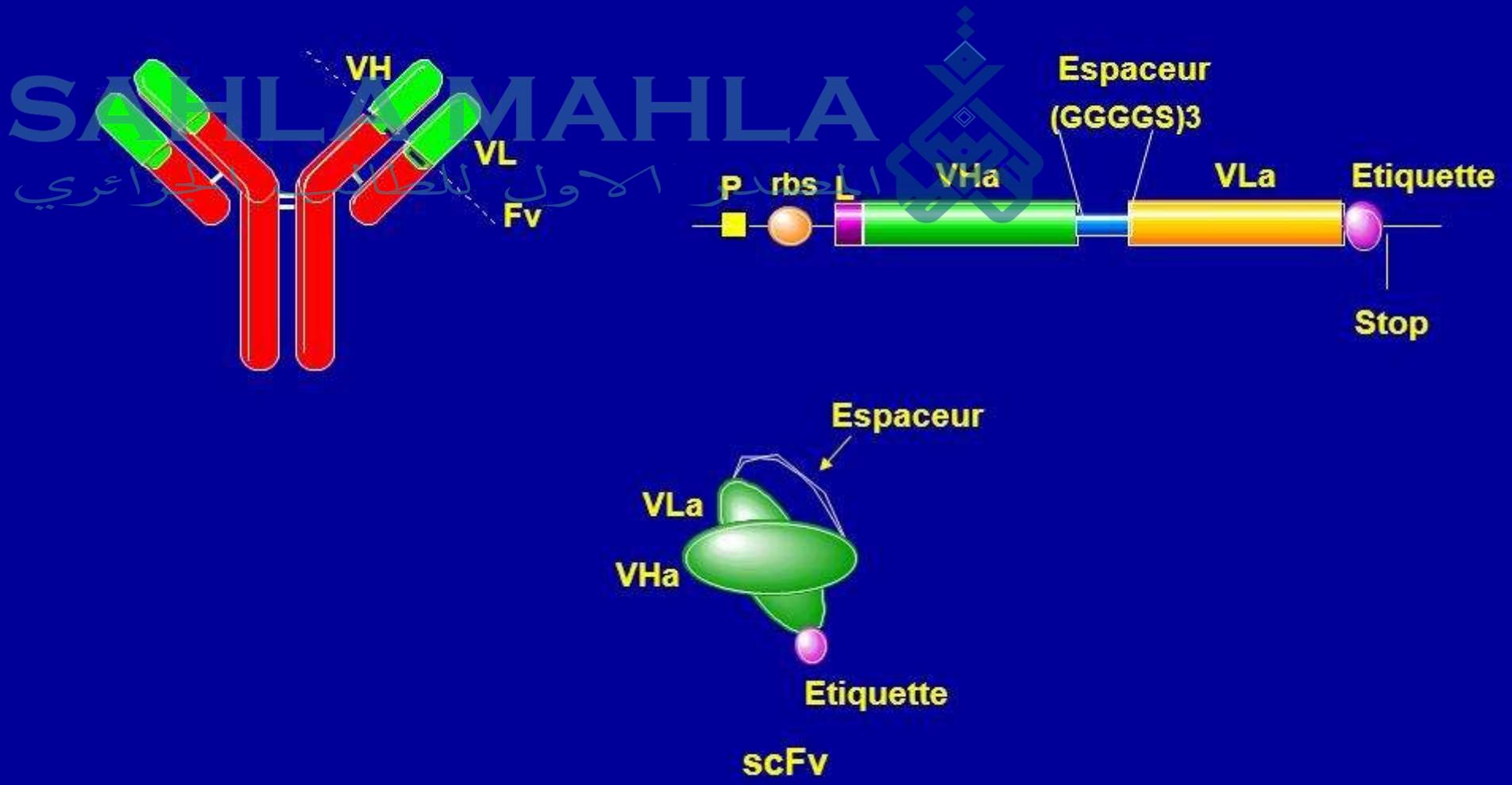


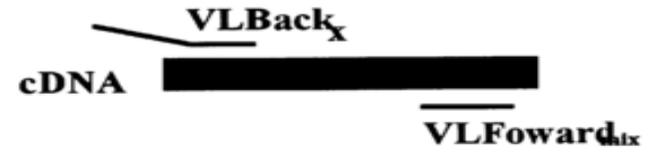
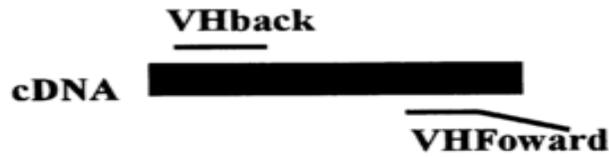
Isolement des gènes VDJ (VH) et VJ (VL)
Expression chez l'hôte (bactérie,
cellule d'insecte, cellule de mammifère,...)



**Fragment Fv
simple chaine
recombinant
(scFv)**

Expression bactérienne de fragments d'anticorps: les « single chain Fv (scFv) »



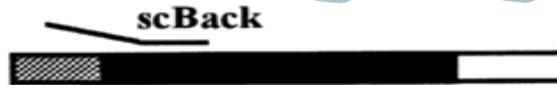


**AMPLIFICATION DE CHAQUE
REGION VARIABLE**

Primary PCR

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطلاب الجزائري



Régions chevauchantes codant le linker

ASSEMBLAGE PUIS AMPLIFICATION



OE-PCR (Overlap Extension PCR)

**Single chain Fv DNA
fragment with
restriction sites**

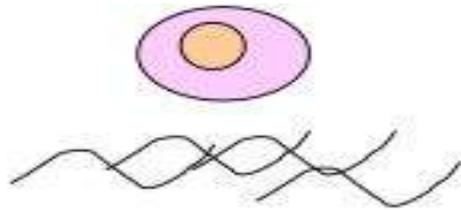


5' GGCCNNNNNGGCC3'
3' CCGGNNNNCCGG5'

***Sfi* I Digest**

**Digested single chain
Fv DNA fragment
ready for ligation
into pComb3HSS**



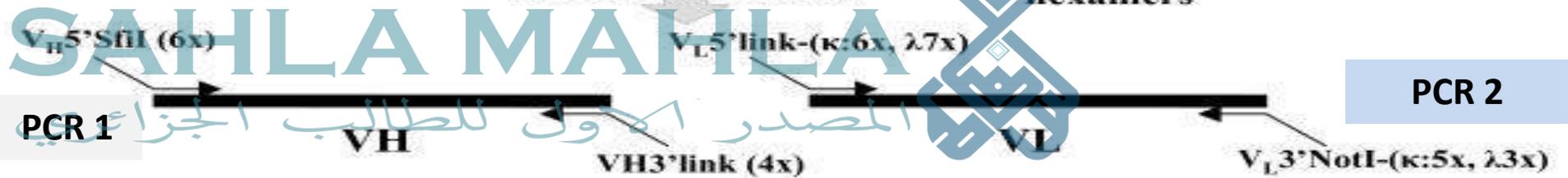


PBL from 140 donors

Total RNA

cDNA synthesis with oligo dT and random hexamers

75 PCR amplifications



PTfw

Linkage by overlap extension without primers and pull-through PCR with pull-through primers

PTrv

SfiI

NotI

VH

(G₄S)₃ linker

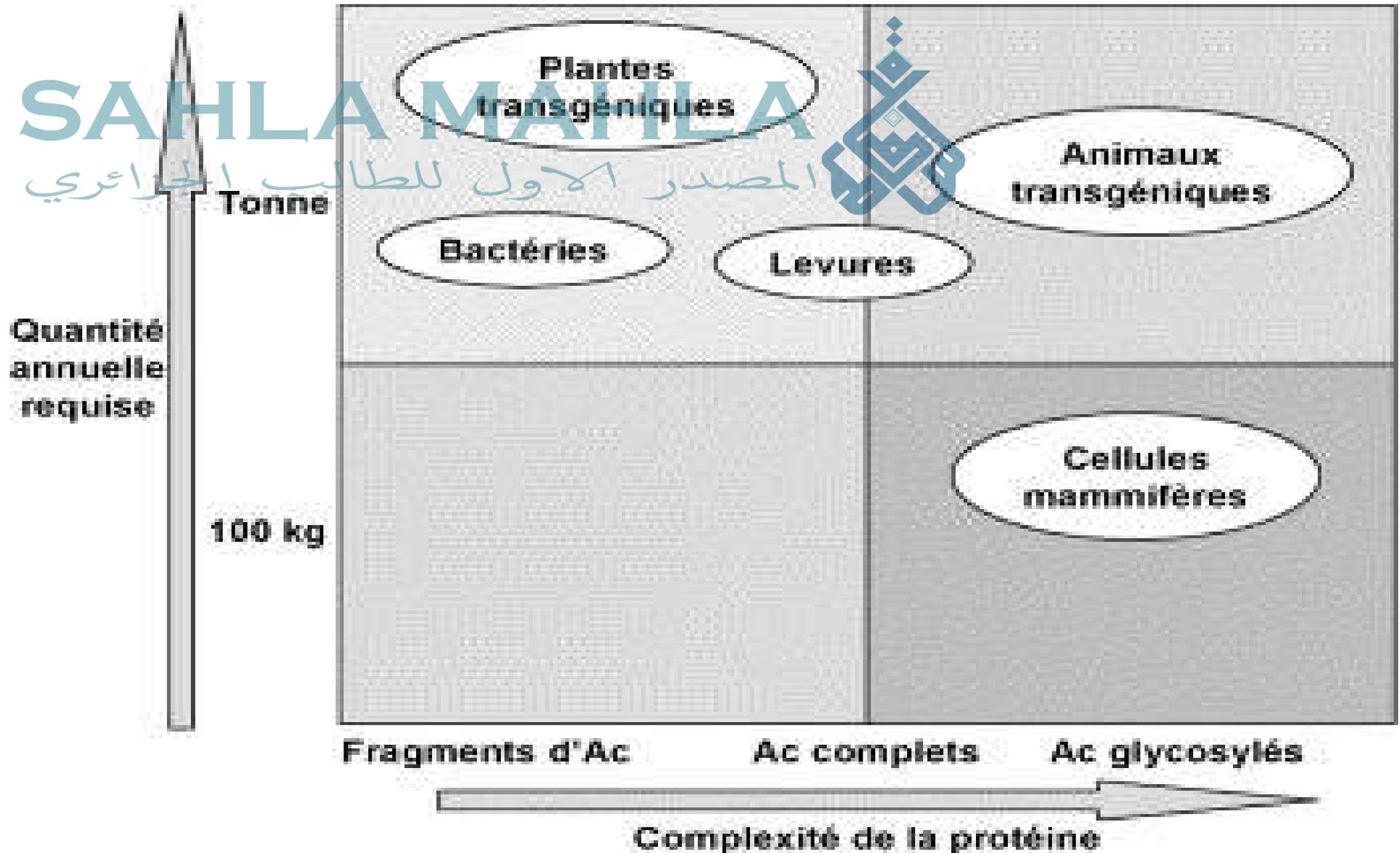
VL

GGTGGTGGTGGCAGCGGGGGGGGGGGCTCTGGTGGTGGTGGATCC
G G G G S G G G S G G G S G G G S



Ligated into pMod1, digested with *SfiI* and *NotI* and transform into *E. Coli* TG1

CHOIX DU SYSTÈME D'EXPRESSION



PROBLÈMES GÉNÉRAUX

1- Instabilité du vecteur

2- Absence ou insuffisance d'expression de la protéine

3- Protéolyse

4- Toxicité

5- Modifications post-traductionnelles absentes ou incomplètes

6- Absence ou mauvais repliement de la protéine

7- Formation de corps d'inclusions

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري

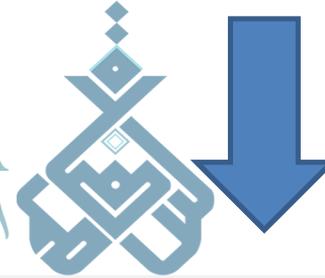
- Comment obtenir un anticorps Humain???

ANTICORPS HUMAINS

SAHLAMAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري

Banques combinatoires de fragments
d'anticorps pour la réalisation de sélection *in vitro* comme le **phage display**



SOURIS TRANSGENIQUES

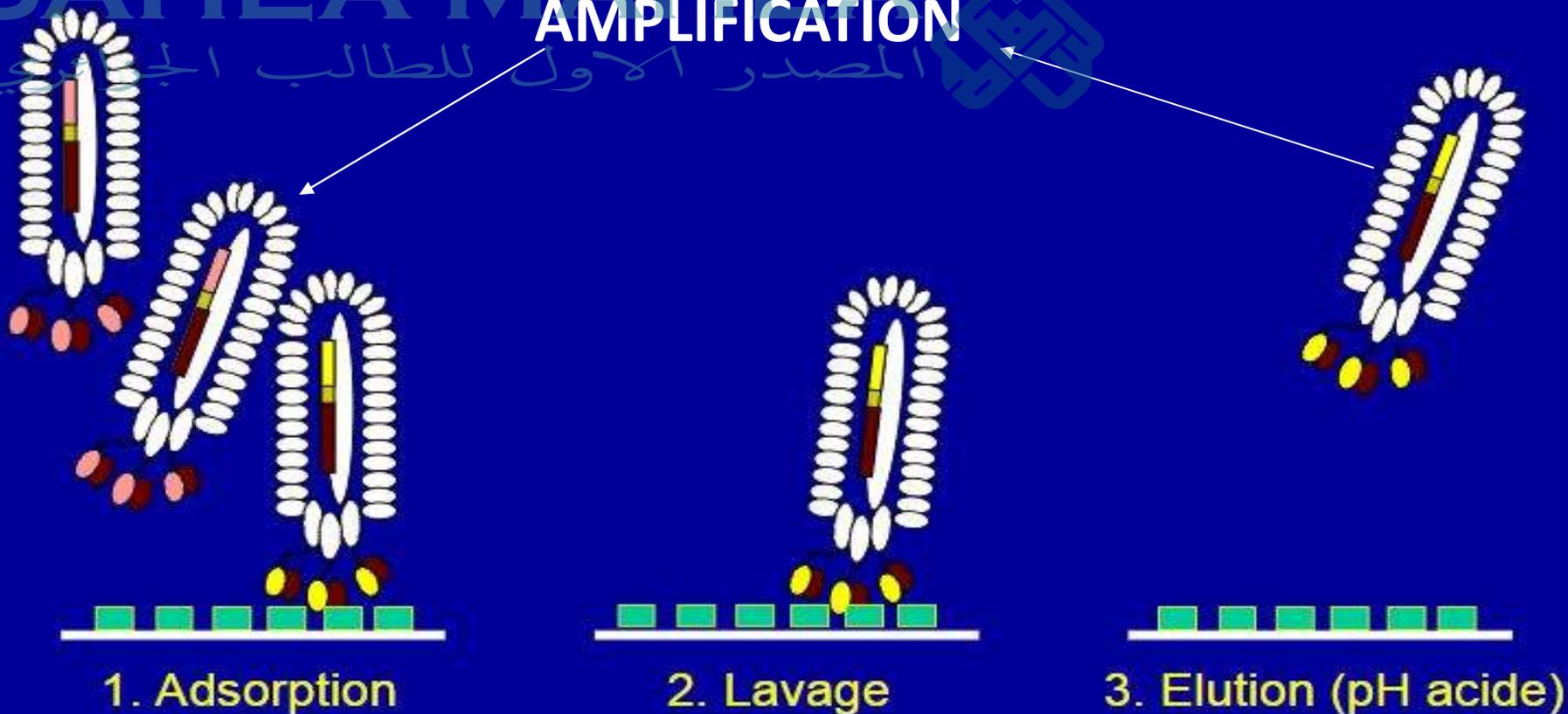
∅ Sélection par la **technique de phage display** d'Ac présentant une forte affinité pour un Ag donné à partir d'une banque de lymphocytes B humains prélevée sur des donneurs non immunisés/immunisés

∅ **Souris transgénique** : Remplacement des gènes du répertoire murin par les gènes codant pour les immunoglobulines humaines et on immunise secondairement la souris avec l'Ag d'intérêt.

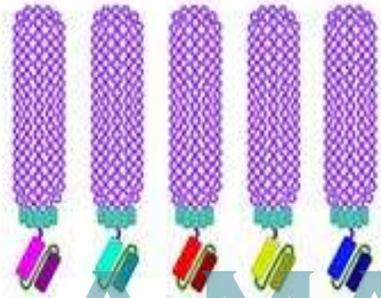
TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY D'ANTICORPS

Génération d'AcM humains: sélection de VH/VL humains par criblage de banques de phages filamentueux (« Phage display »)

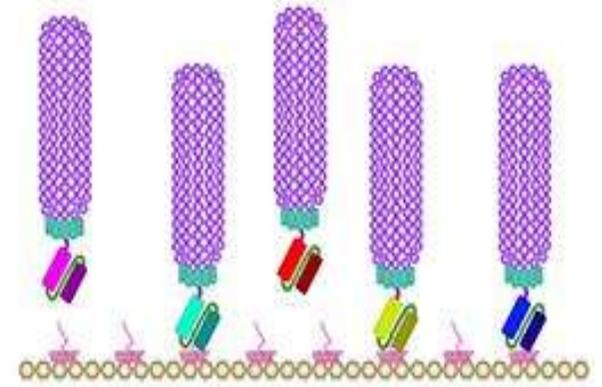
AMPLIFICATION



Antibody phage display library

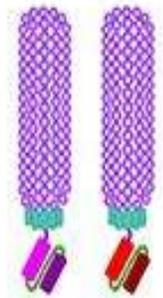


Screening of phage on immobilized antigen

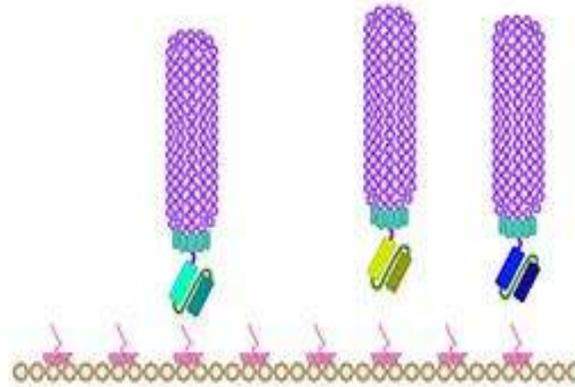


Repeat for 3-5 rounds to enrich library

Wash unbound phage



Elution of Surface-bound phage



Amplify phage for subsequent round

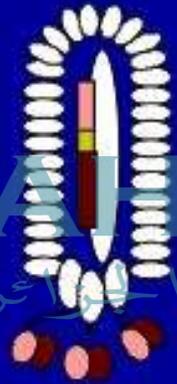
Screening

SAHLA MAHLA

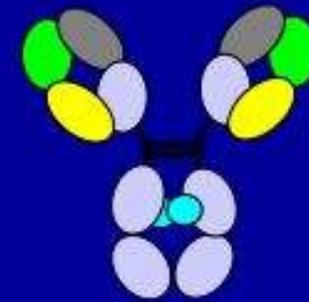
الأول للطالب الجائري

**TECHNIQUE DE PHAGE DISPLAY
D'ANTICORPS
ETAPES**

Génération d'un AcM recombinant humain IgG1, κ à partir d'un phage sélectionné



Phage sélectionné



AcM, HuIgG1, κ

PCR

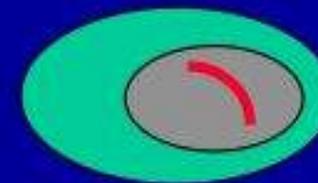
huVL 
huVH 

ADNc

Vecteur avec séquences huC γ 1 et huC κ

Clonage

Transfection



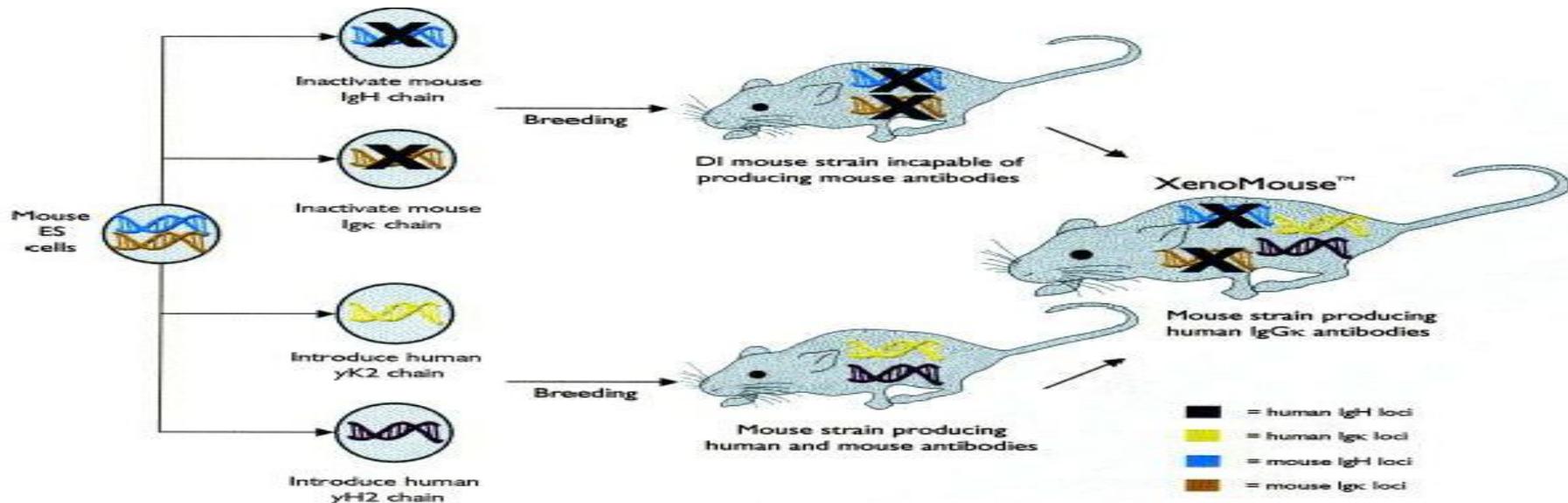
Lignée cellulaire
(CHO, NS1...)

SOURIS TRANSGENIQUE

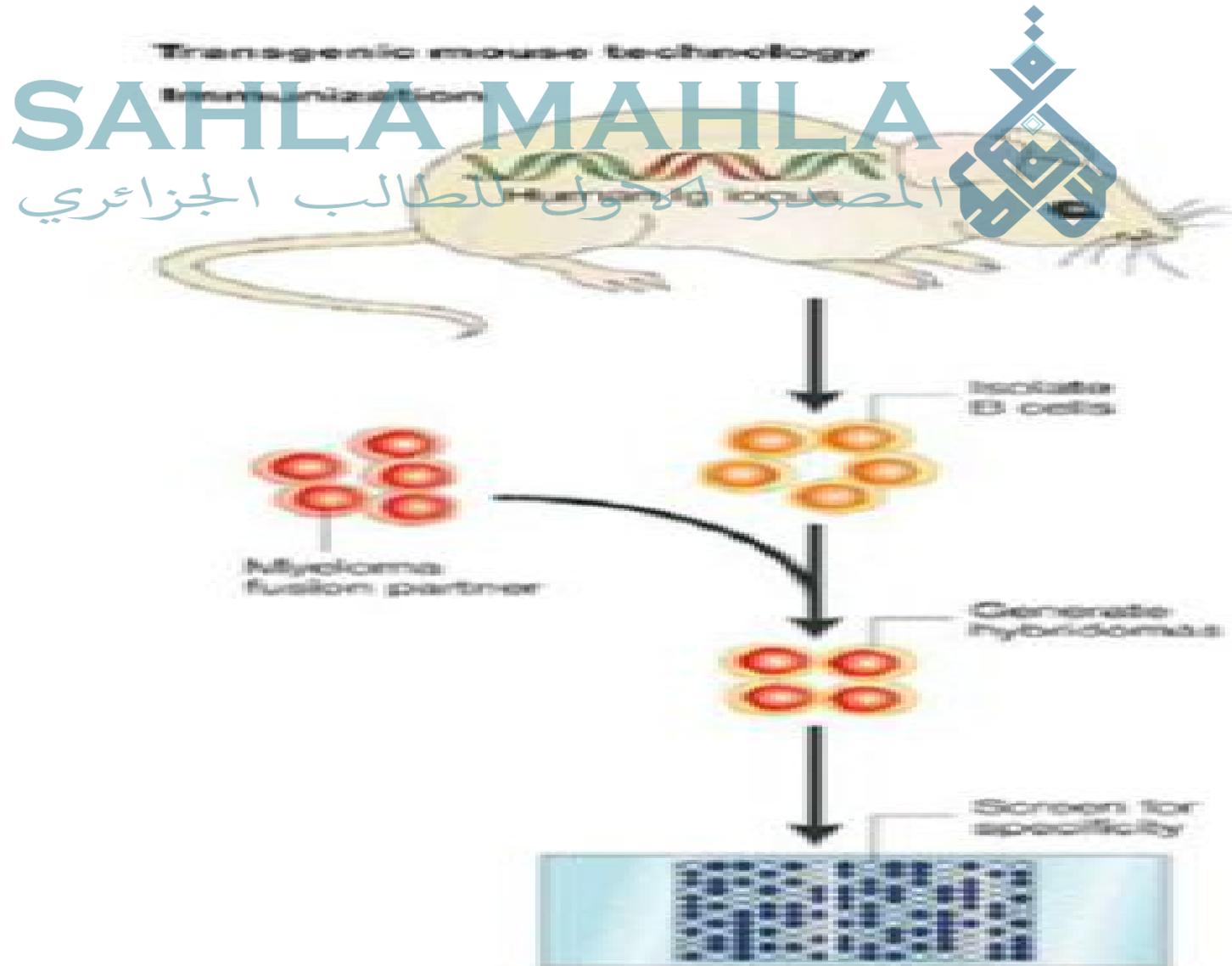
Chez des souris, les **gènes codant les immunoglobulines murines** sont substitués par les **gènes codant les Ig humaines** (Lonberg, 2005).

Après **l'immunisation de ces souris transgéniques**, l'obtention d'anticorps humains se fait simplement par la **technique classique des hybridomes**, avec la fusion d'un LB murin, mais qui exprime un anticorps humain, et un myélome.

Ainsi 7 anticorps humains issus de souris transgéniques sont actuellement sur le marché : Denosumab et Panitumumab (Amgen), Golimumab et Ustekinumab (Centocor), Canakinumab (Novartis), Ofatumumab (Genmab), Ipilimumab (Bristol-Myers Squibb).



ANTICORPS HUMAIN



CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS ANTICORPS

TYPES D'ANTICORPS MONOCLONAUX	COMPOSITION	TECHNOLOGIE	INCONVENIENTS
MURINS	Ig MURINE	Technique des hybridomes	Immunogénicité / HAMA Demi-vie courte Mauvaises propriétés effectrices
CHIMERIQUES	VH ET VL MURIN CH ET CL HUMAIN	Chimérisation	Immunogénicité / HACA
HUMANISES	Ig HUMAINE CDR MURIN	CDR Grafting (Greffage des CDR)	L'affinité de l'anticorps humanisé n'est pas toujours aussi élevée que l'anticorps d'origine
HUMAINS	Ig HUMAINE	Technique des hybridomes - Phage Display - Souris transgénique	Techniques lourdes / Production

USTHB/FSB

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري

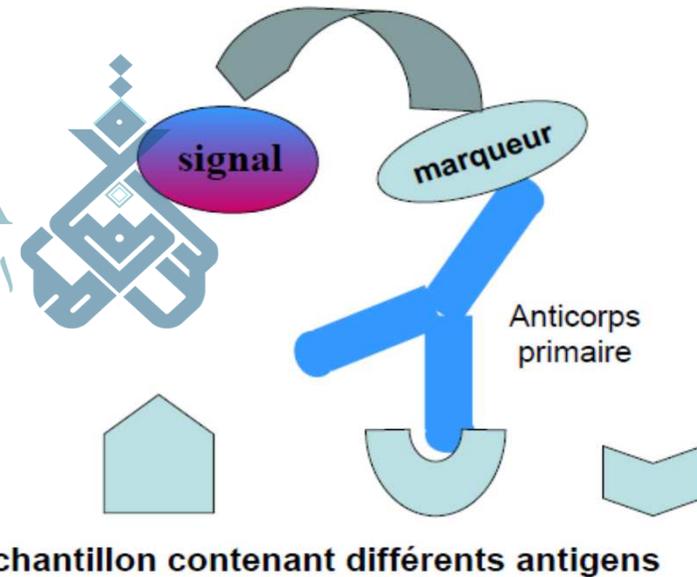


TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES APPLICATIONS

MASTER 1
BIOCHIMIE-IMMUNOLOGIE

INTRODUCTION

- Les techniques développées en immunologie sont basées sur la réaction entre un **Ag** et son **Ac** spécifique



OBJECTIF

- **Mettre en évidence des antigènes (Ag) à l'aide d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux**
 - Cellulaire tissulaires
 - Présents dans les liquides biologiques (sérum, LCR, urines...)
- **Mettre en évidence des anticorps (Ac) à l'aide d'antigène**
 - Présent dans le sérum/plasma pu d'autres liquides biologiques (LCR, Salive...)

APPLICATIONS

- Recherche et dosage d'anticorps pour le diagnostic de maladies infectieuses (sérologie bactérienne) : en parasitologie (toxoplasmose...) et en virologie (virus de l'hépatite B, virus du SIDA , COVID-19...)
- également recherche d'Ac en auto immunité...
- Dosage spécifique de certaines protéines plasmatiques : IgE (totales et spécifiques), ferritine, dosages hormonaux (hCG),
- dosages de médicaments, recherche de marqueurs tumoraux: alpha-foetoprotéine...
- recherche d'Ag bactériens, viraux, fongiques, parasitaires
- **Immunologie des greffes /Typage HLA/Suivi d'une transplantation**

PRINCIPE

TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

SAHLA MAHLA

BUT:

المصدر الاول للطالب الجزائري



- Détection d'un antigène ou un anticorps dans un milieu : **méthode qualitative**
- Dosage d'un antigène ou d'un anticorps dans un milieu : **méthode quantitative**

Méthodes:

- Détection d'un signal visible **directement** : méthodes de précipitation et agglutination
- Détection d'un signal visible **indirectement** :
 - marqueur radio-isotopique
 - marqueur enzymatique - marqueur luminescent
 - marqueur fluorescent

SYSTÈME DE REVELATION DU SIGNAL

SAHLA MAHLA

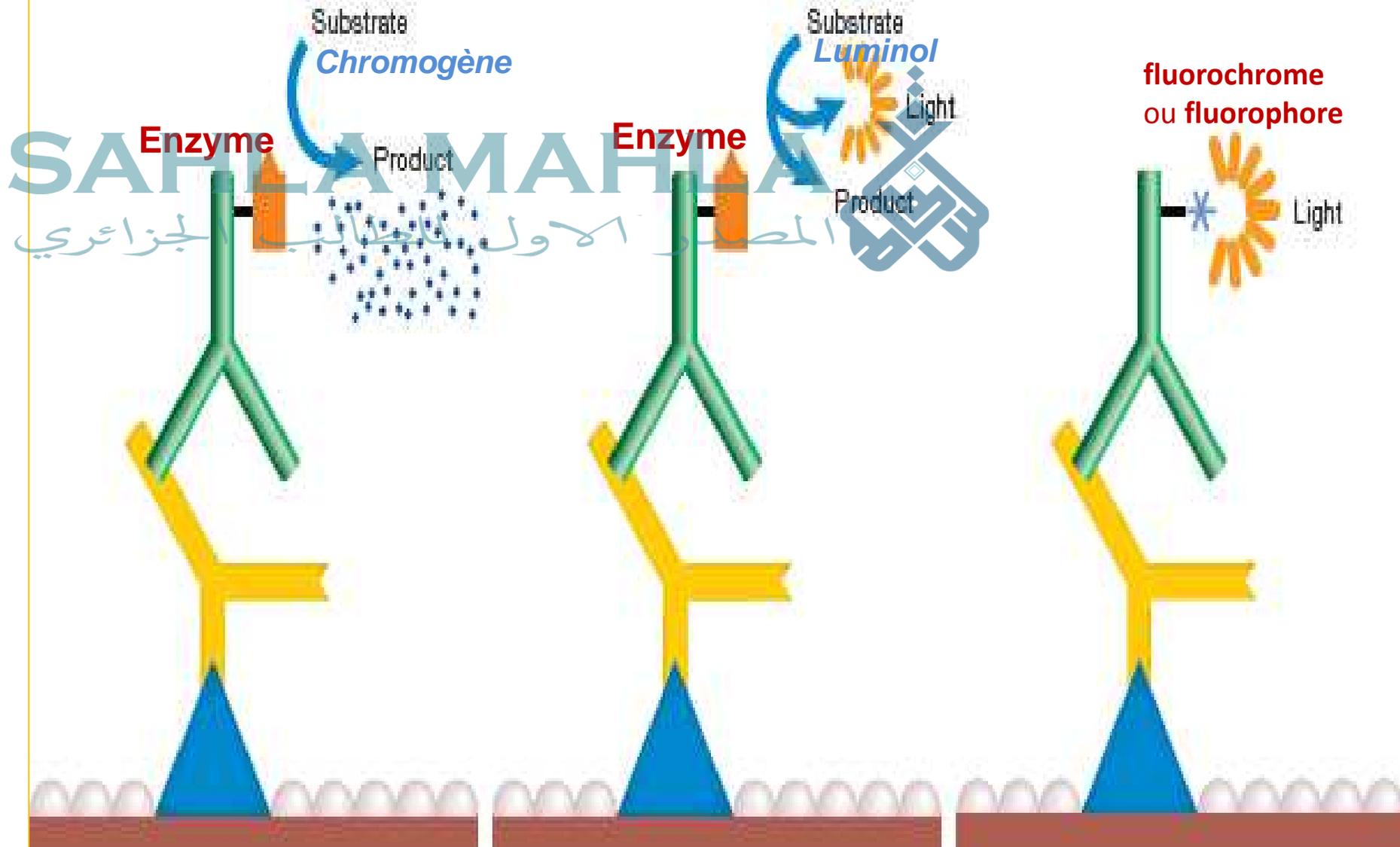


- **MARQUAGE ENZYME** → Méthode Immunoenzymatique
 - Substrat + Chromogène → Colorimétrie
 - Substrat + Luminol → Chemiluminescence
- **Marquage Fluorophore** → Méthode Immunofluorescence
FLUOREMETRIE
- **Marquage radioisotope** → Méthodes RIA

A. Colorimetric

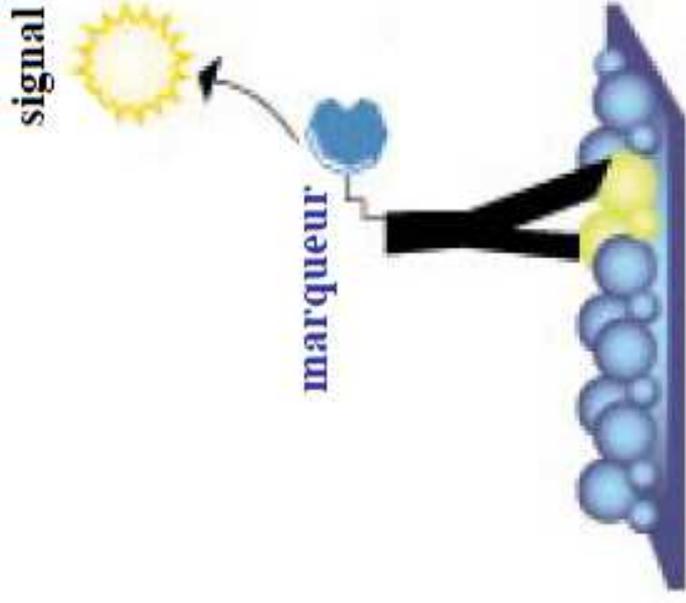
B. Chemiluminescence

C. Fluorescence

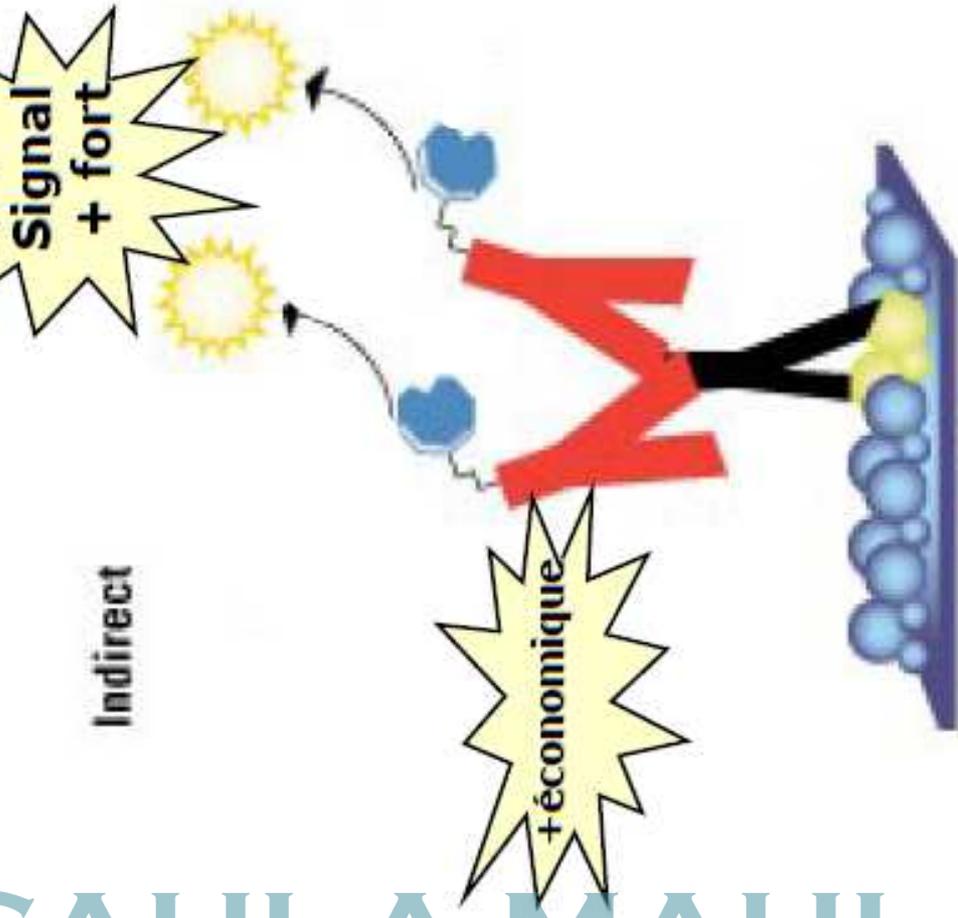


marquage direct (Ac I_{aire}) ou indirect (Ac II_{aire})

Direct



Indirect



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

Inconvénients des méthodes directes :

- 1) nécessité de coupler le marqueur à l'anticorps sp
- 2) amplification limitée

PRINCIPE DES TECHNIQUES

Composé coloré

Marquage enzymatique

*ELISA, ELISPOT,
WB, IHC*

Composé fluorescent

Marquage fluorescent

*IF, CMF,
FluoroSPOT,*

Emission de lumière

luminescence

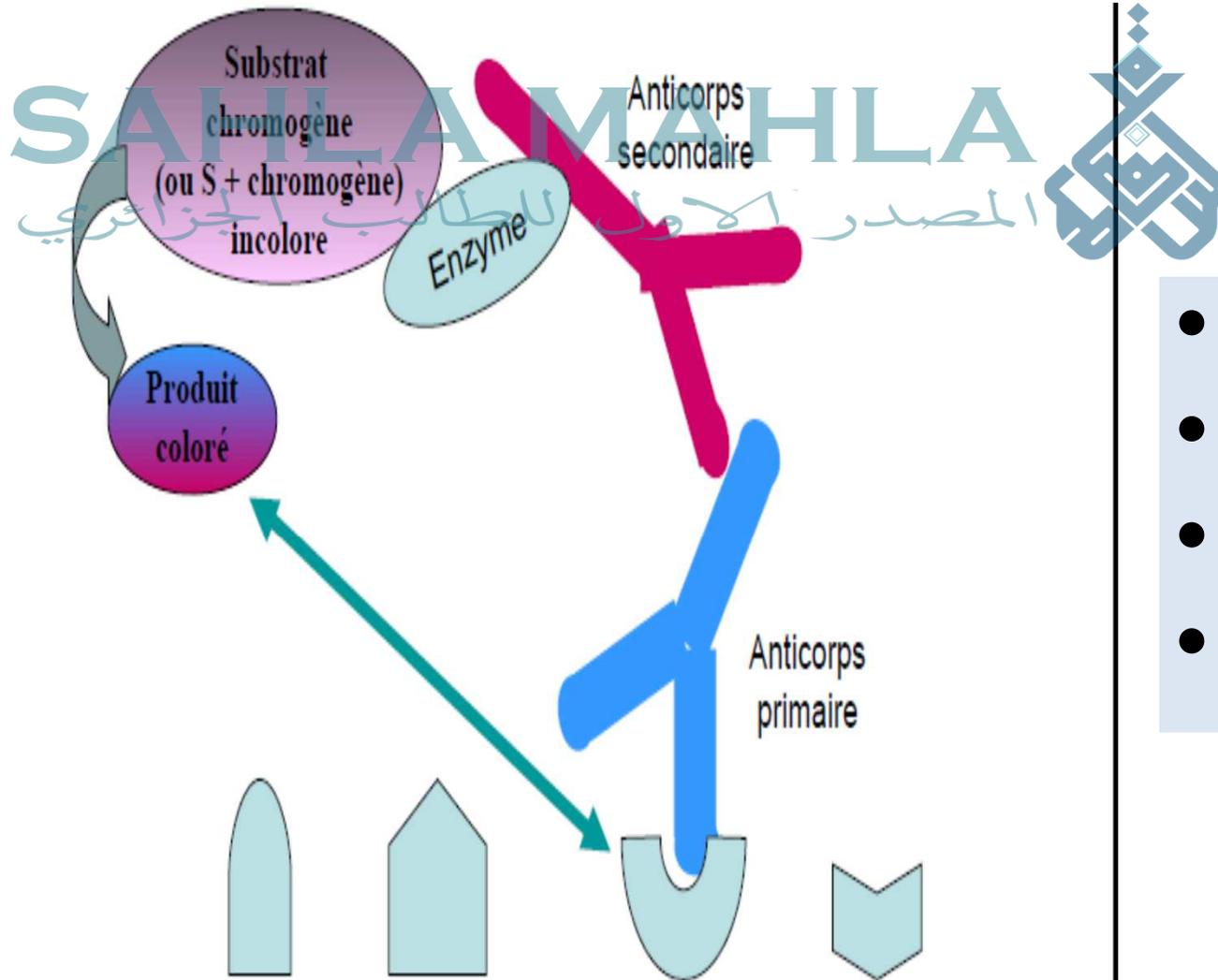
WB

Composé radioactif

Marquage radioactif

RIA

TECHNIQUES IMMUNO-ENZYMATIQUES



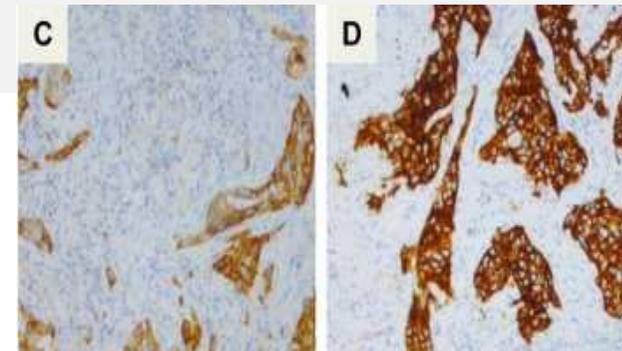
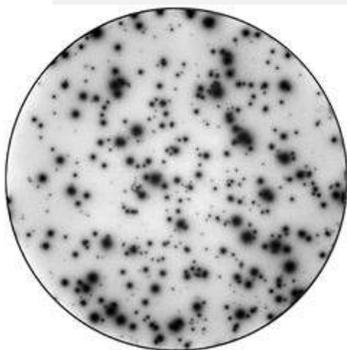
- ELISA
- ELISPOT
- WB
- IHC

TECHNIQUES IMMUNO-ENZYMATIQUES

- Dans les techniques immuno-enzymatiques en **phase liquide**, le produit coloré doit demeurer soluble et rester **déTECTABLE** par spectrophotométrie. Ex ELISA



- Dans les techniques en **phase solide** (e.g. membranes synthétiques, cellules, tissus), le **produit coloré précipite au site précis de la réaction antigène-anticorps** et est détecté macroscopiquement ou microscopiquement/par imagerie. Ex WB, IHC, ELISPOT



TECHNIQUES IMMUNO-ENZYMATIQUES

1- Peroxydase

Chromogène incolore substrat

chromogène oxydé coloré



3,3-diamino-benzidinel (3,3' DAB).



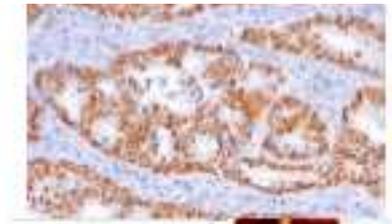
Un **chromogène** est une **molécule incolore** capable de former un **produit coloré** à la suite d'une **réaction chimique**.



3,3',5,5'-TETRAMETHYL BENZIDINE(TMB)



Ortho-Phenvlenediamine (OPD)



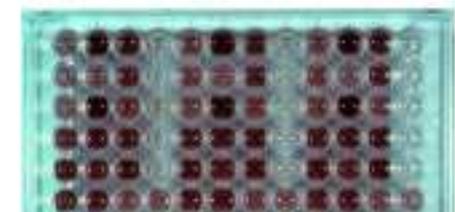
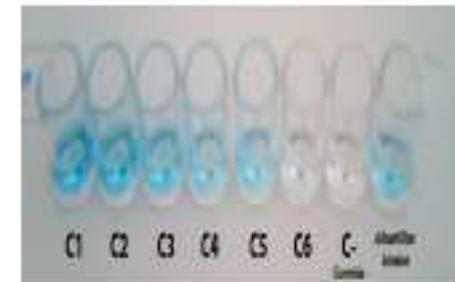
IHC



Elispot

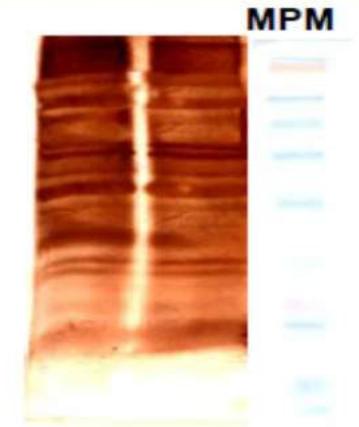
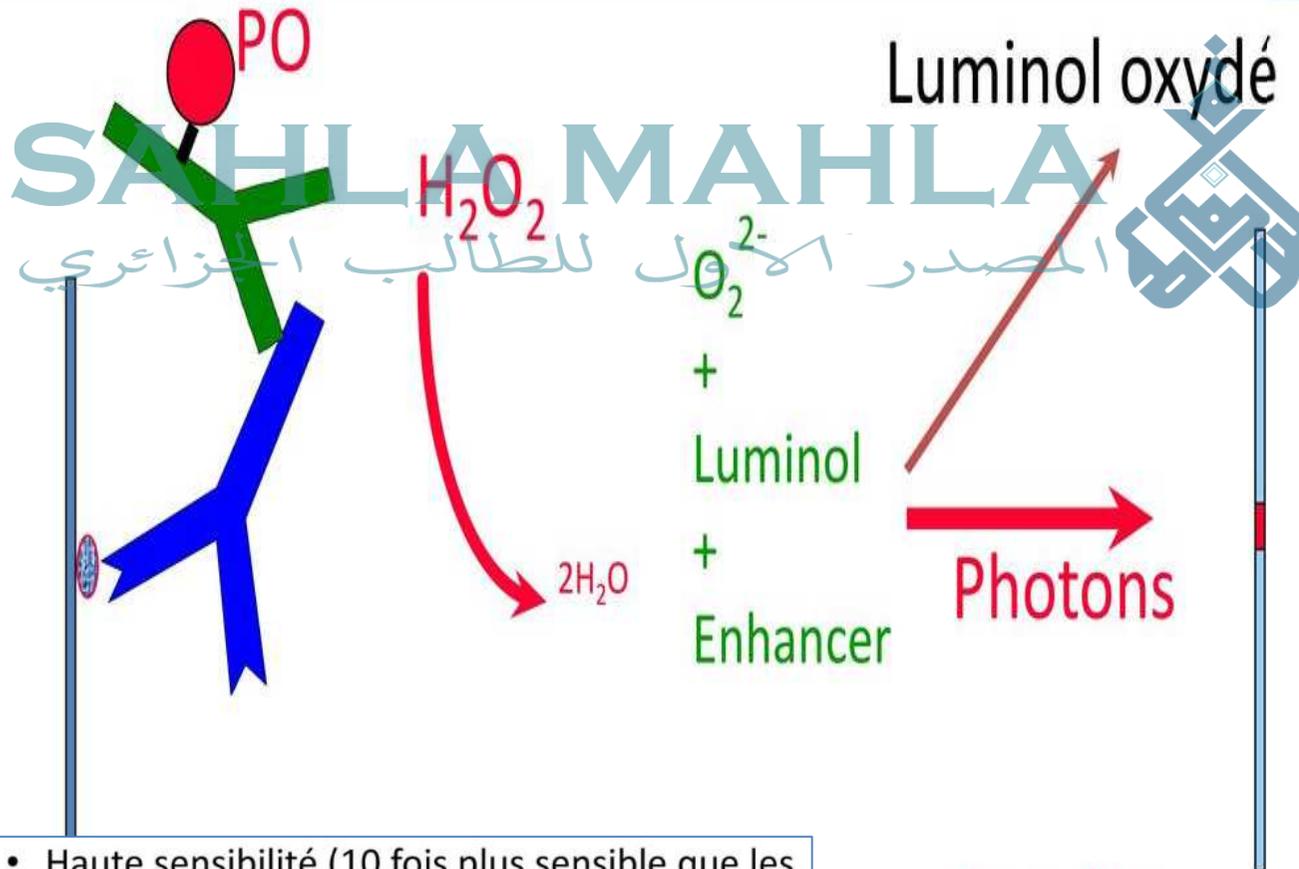


WB

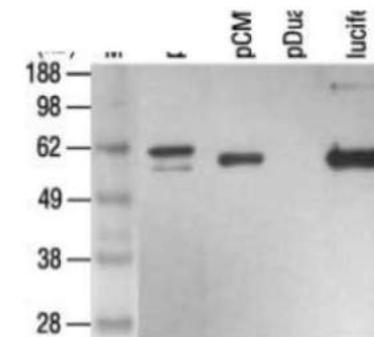


REVELATION PAR CHEMILUMINESCENCE (ECL) REVELATION DE L'ACTIVITE PEROXYDASE

Cette méthode appelée détection améliorée de la chimiluminescence (enhanced chemiluminescent, ECL)



Révélation colorimétrique



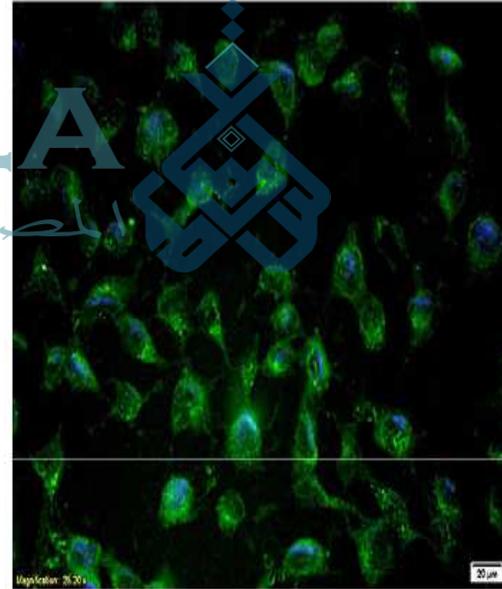
Révélation par émission de lumière et impression de films photographiques : Electrochemiluminescence (ECL)

- Haute sensibilité (10 fois plus sensible que les méthodes colorimétriques)
- Détection rapide
 - 10 s à 1 mn pour un film,
 - 5 à 10 mn pour la caméra
- Faible bruit de fond

Hyperfilm
ECL
Ou caméra

IMMUNOFLUORESCENCE

- **Technique d'immunofluorescence :**
1 fluorochrome est fixée sur un Ac ou Ag.
- **Le + utilisé:** FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate, dérivé de la fluoresceine) : **fluorescence verte**
- **Le + utilisé pour 2nd marquage:** TRITC (Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate, dérivé de la Rhodamine) : **fluorescence rouge-orangé**
- **Contre colorant pour immunofluorescence:** DAPI (Di Aminido Phenyl Indo, réactif spécifique de l'ADN) : **fluorescence bleue**



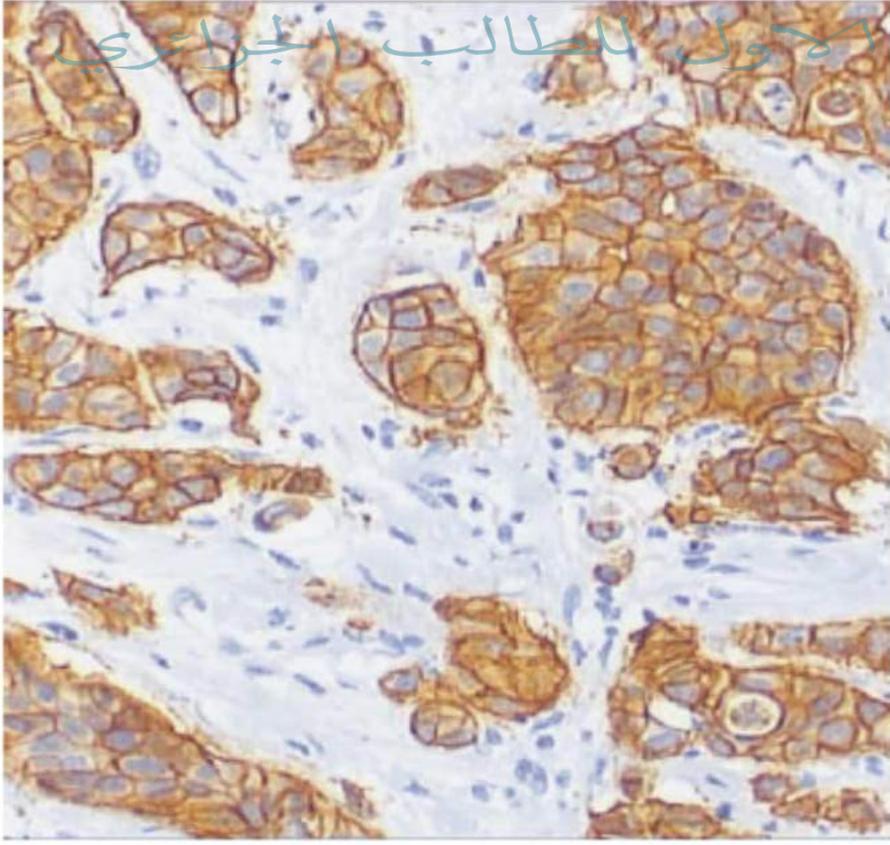
Cultured endothelial cells

Vert: Ac anti-NOS 3-FITC

Bleu: Noyau marqué avec DAPI

IF
CMF
FLUOROSPOT

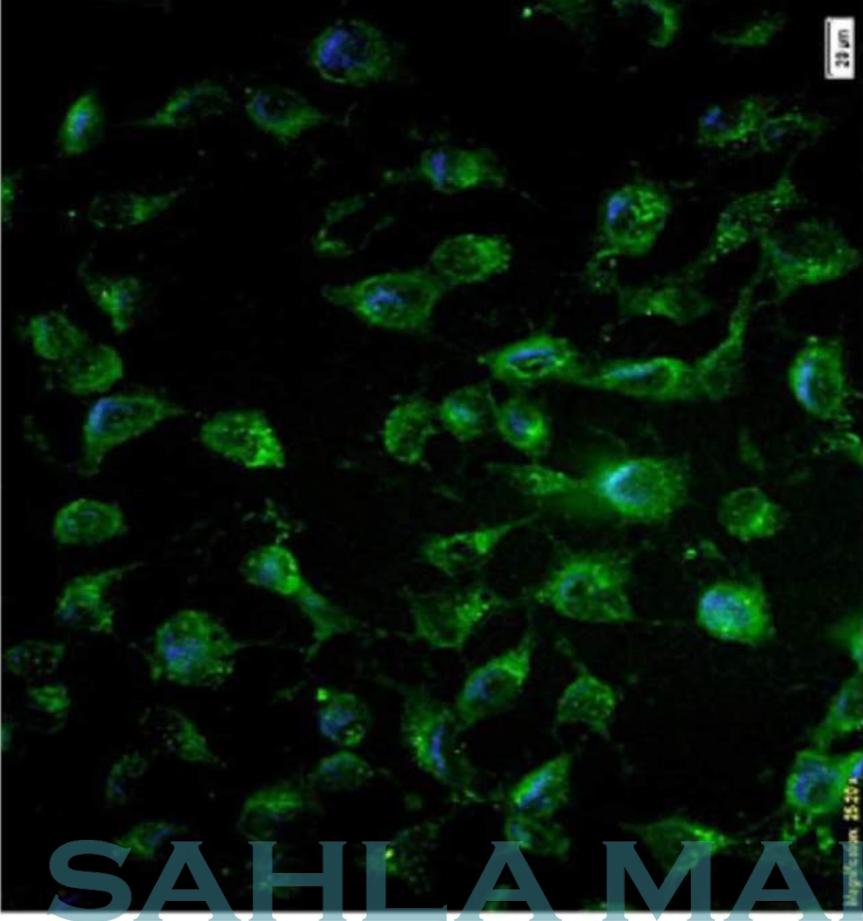
*La lecture nécessite l'utilisation d'un **microscope à fluorescence** ou d'un **cymomètre en flux**; ou un **scanner à fluorescence** (blot).*



Tumeur du sein

**Marron: Ac anti-HER2 (oncogène)
(DAB)**

**Violet: Noyau coloré avec
hématoxyline**



Cultured endothelial cells

Vert: Ac anti-NOS 3-FITC

Bleu: Noyau marqué avec DAPI

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجراحي



Radioimmunologie (RIA : Radio Immuno Assay)

Méthodes utilisant un marqueur
- Ag ou Ac marqué par un isotope
- De moins en moins utilisée
(déchets radioactifs, agrément)

Les isotopes radioactifs utilisés

- ^{125}I : émetteur γ par CE, (c'est le plus utilisé)
- ^{57}Co : émetteur γ par CE,
- On utilise pour la détection UN COMPTEUR GAMMA

ELISA

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

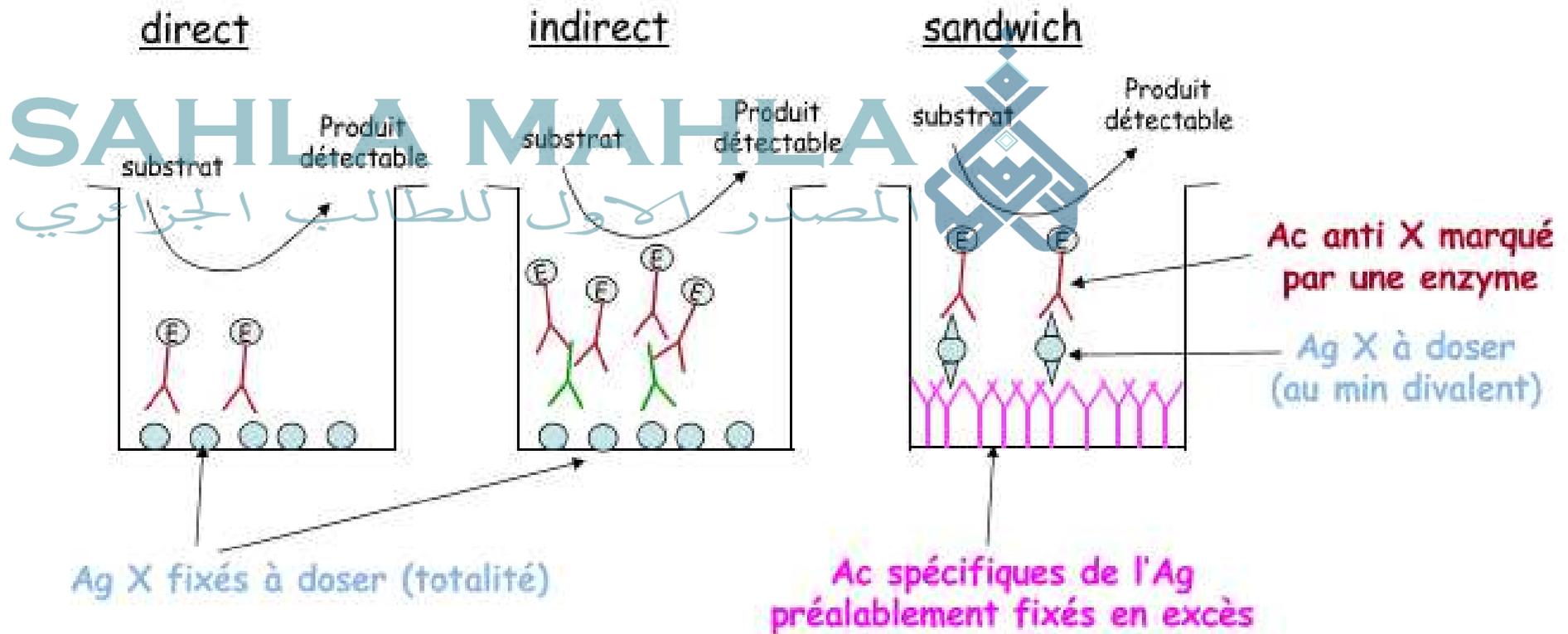
Principe:

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction **antigène-anticorps** grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

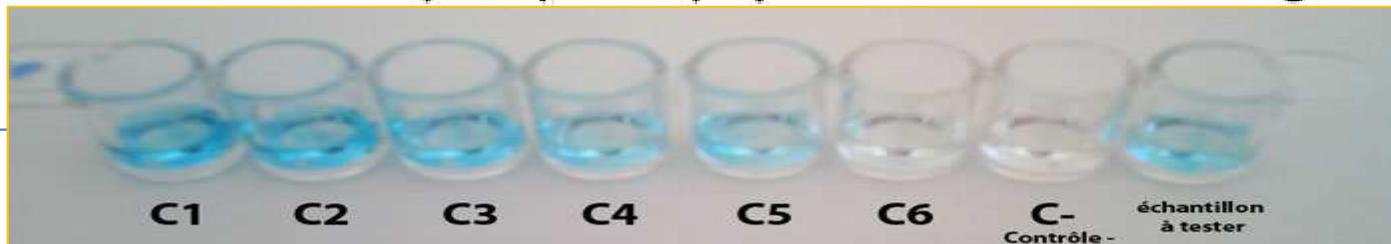
LES DIFFÉRENTS TYPES D'ELISA

- ELISA SIMPLE direct
- ELISA SIMPLE indirect
- ELISA Sandwich

METHODE D'IMMUNOMARQUAGE : ELISA



L'activité enzymatique est proportionnelle au titre de l'Ag.



IMMUNISATION DES SOURIS A LA BSA

BSA = Bovin Serum Albumine (Sérum Albumine Bovine)

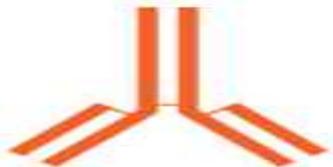
BSA = Antigène (Ag)



Enzyme (peroxydase)

Anti-IgG (anti chaîne γ)

anticorps
conjugué



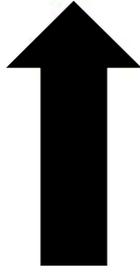
Anti-BSA (= anticorps IgG à doser)



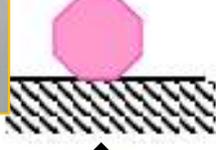
Antigène (BSA)

Peroxydase de raifort (horseradish peroxidase ou HRP)

1/ **Sensibilisation (coating)** des plaques avec l'Ag préparé dans le tampon PBS pH7,4 (ex: 20µg/ml) (100µl)



Incubation 1h à 37°C puis 1 nuit à +4°C dans chambre humide

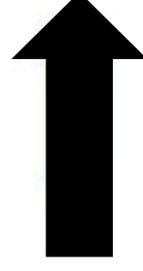


Lavages avec tampon PBS-Tween20 (3 à 5 fois)

2/ **Saturation des sites non spécifiques** avec lait écrémé (5%) ou BSA (3%) dans PBS (200µl)



Incubation 2h à 37°C (ou 25°C) dans chambre humide



Lavages avec tampon PBS-Tween20 (3 à 5 fois)



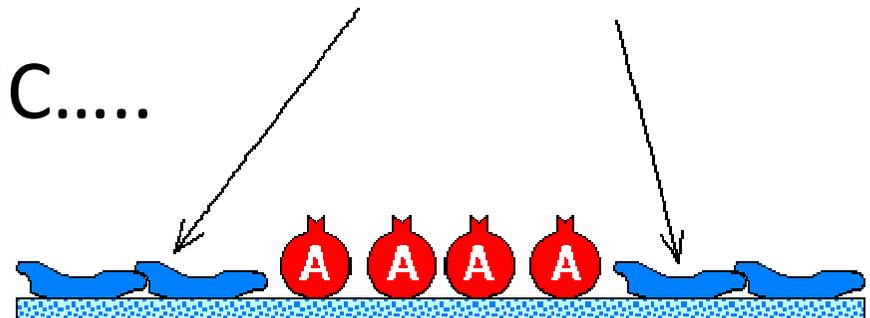
NOTION DE SATURATION

■ Cette étape est indispensable pour limiter les interactions non spécifiques ultérieures entre les anticorps et le support.

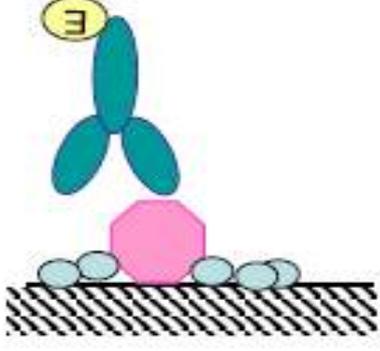
■ Le blocage est réalisé dans une solution de protéines concentrées (Lait écrémé, BSA)

LA MEMBRANE EST BLOQUEE
AVEC DES PROTEINES "INERTES"

■ Méthodes: ELISA, WB, IHC.....



3/ **Addition du conjugué** (ligand spécifique marqué avec l'enzyme)
(marquage direct)



Incubation 1h30' à 37°C
(ou 25°C) dans
chambre humide

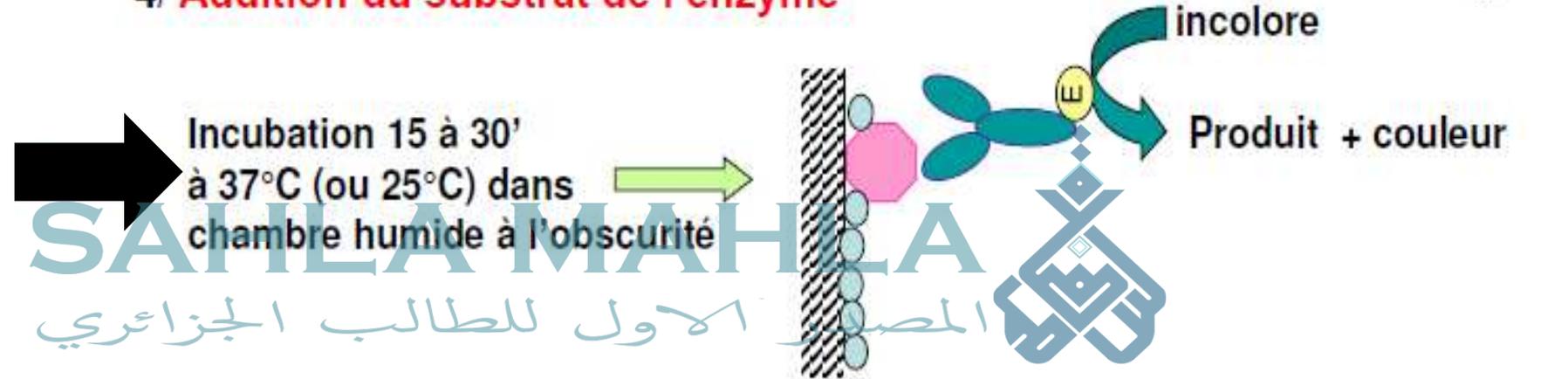
Lavages avec tampon PBS-Tween20 (3 à 5 fois)

Rq: pr marquage indirect cette étape est précédé par l'incubation du ligand spécifique (non marqué) pd 1h à 37°C puis une nuit à +4°C

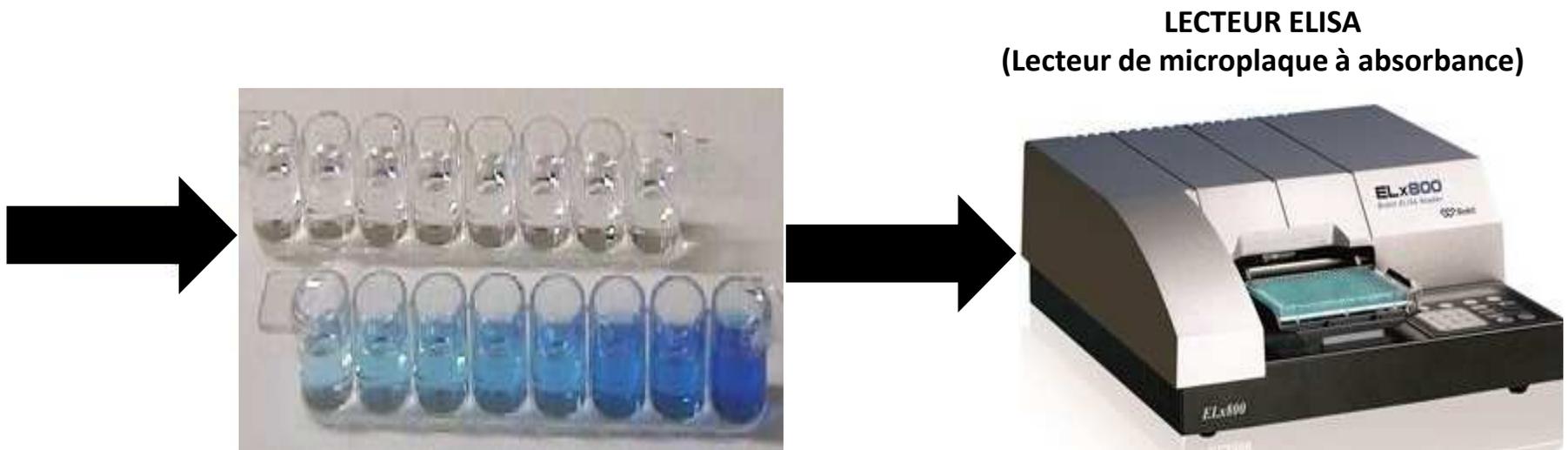
=> lavage

=> **+ conjugué** (ligand non sp anti-Fc marqué avec une enzyme)

4/ Addition du substrat de l'enzyme



5/ Arrêt de la réaction (+ acide fort HCl ou H₂SO₄)



SEROLOGIE HIV

Etape n° 1:

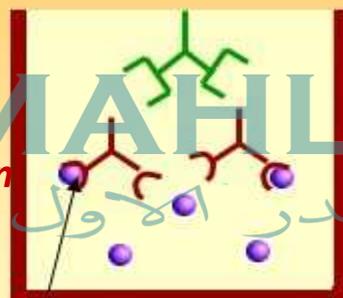
On prépare un puits dans lequel est adsorbé l'antigène.



Gp120

Etape n° 2:

On introduit le sérum à tester.

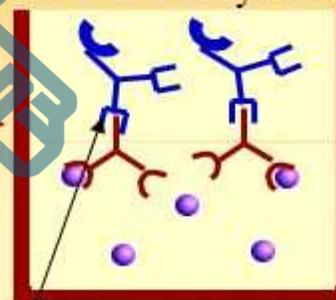


Fixation de l'anticorps sur son antigène

Lavage

Etape n° 3:

On introduit un anticorps spécifique de la partie constante de l'anticorps anti-Gp120 conjugué à une enzyme.

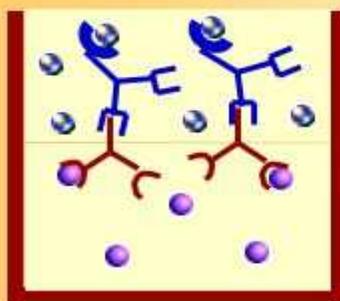


Fixation de l'anticorps à Ac anti-Gp120

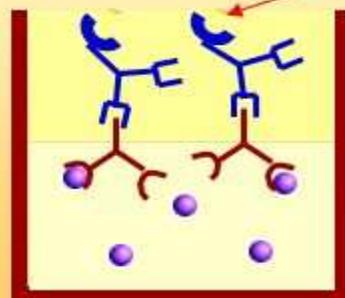
Lavage

Etape n° 4:

On introduit le substrat de l'enzyme: le chromogène incolore.



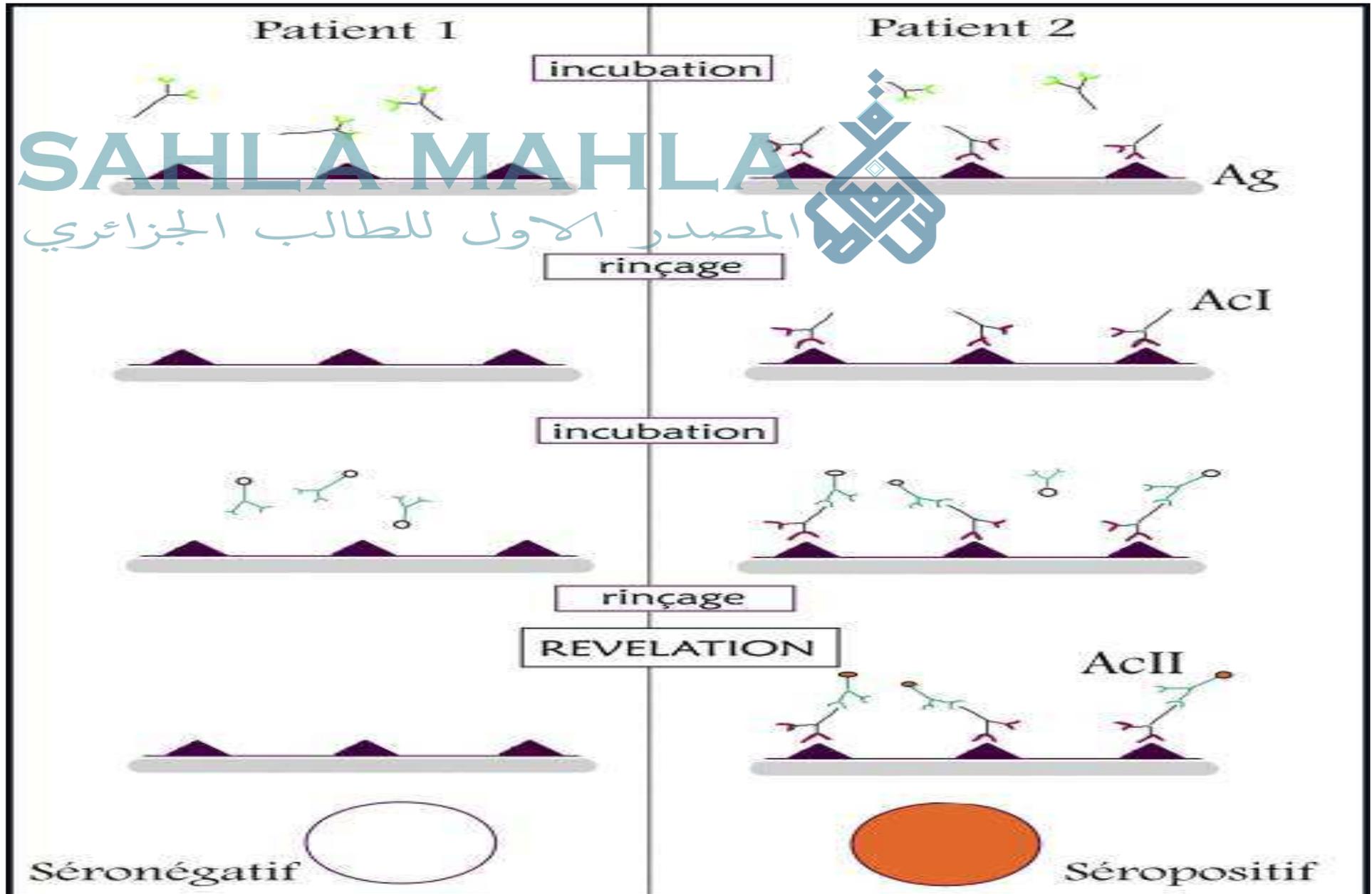
Lavage



Apparition d'une coloration dont l'intensité sera mesurée au spectrophotomètre.

Le test est positif
Il y a séropositivité

APPLICATIONS



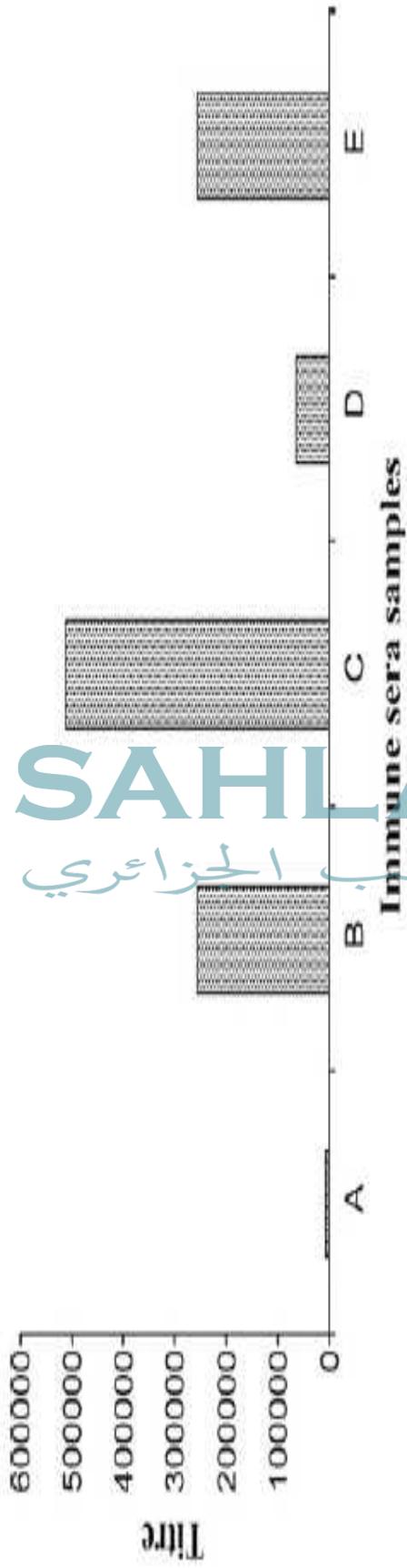


Fig. 1. Effect of various dose-rates of 2 kGy dose of gamma radiation on immunogenic properties of Aah venom. A: Pre-immune sera, B: 195 Gy/h, C: 765 Gy/h, D: 1788 Gy/h, E: Native venom immune sera. ELISA plates were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of native venom.

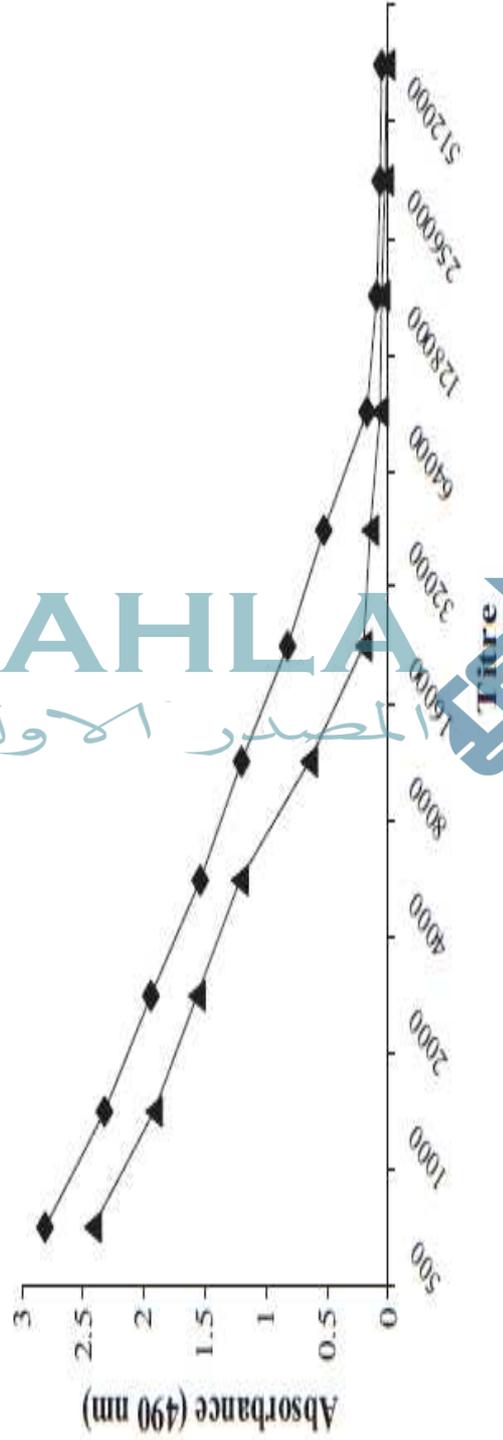


Fig. 2. Reactivity of rabbit irradiated venom (765 Gy/h) antisera with Aah venom. (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (◆) and Bot venom (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (▲).

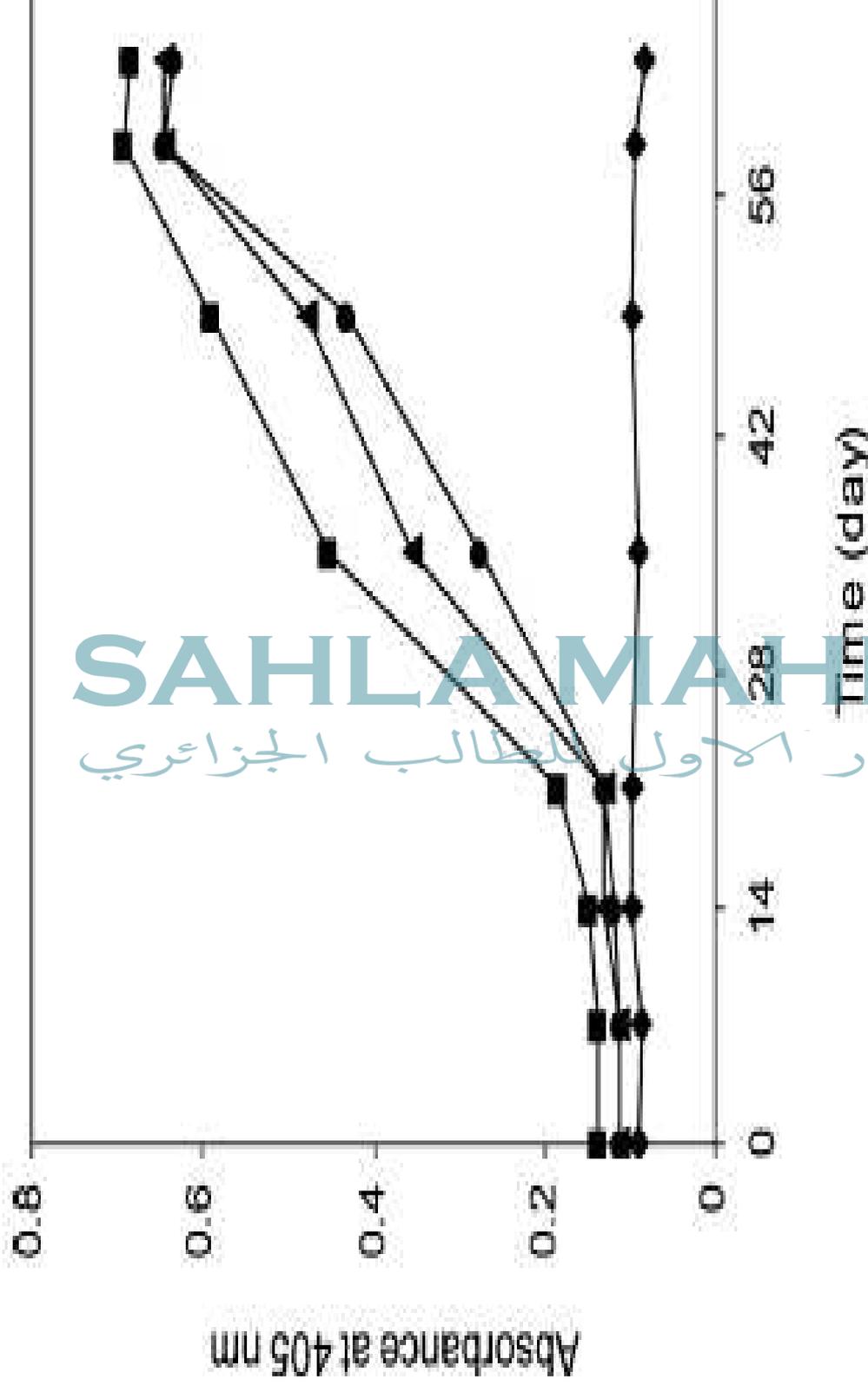


Fig. 1. Dromedary anti-AahG50 immune response during the immunization program. Pooled sera from four immunized dromedaries were examined by ELISA at 1/5000 (■), 1/10,000 (▲) or 1/20,000 (●) dilution, using 1 µg/ml AahG50 coated plates. Symbol (◆) non-immune serum used as negative control. Each value is the mean of three independent experiments in duplicate with non-specific binding < 15%.

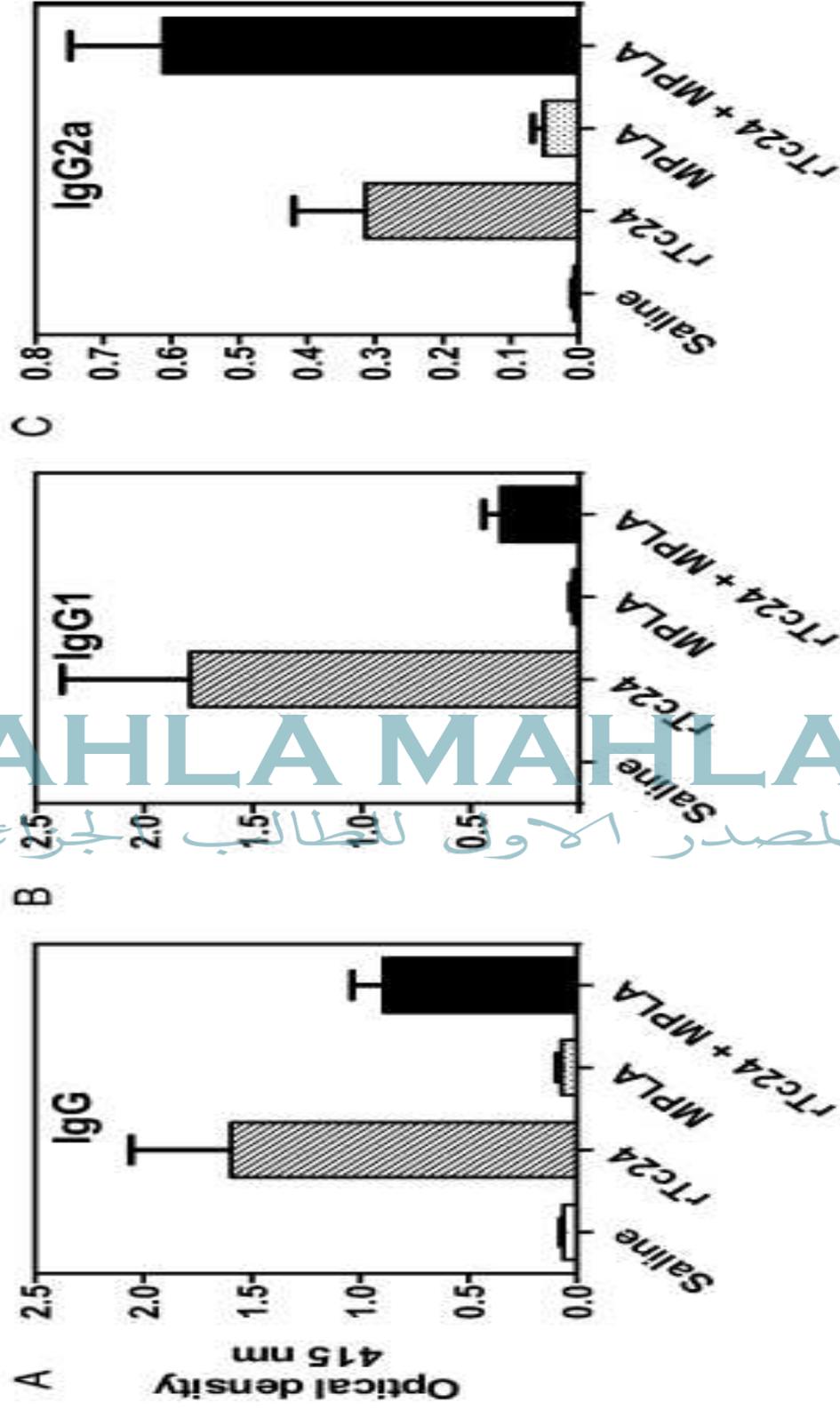
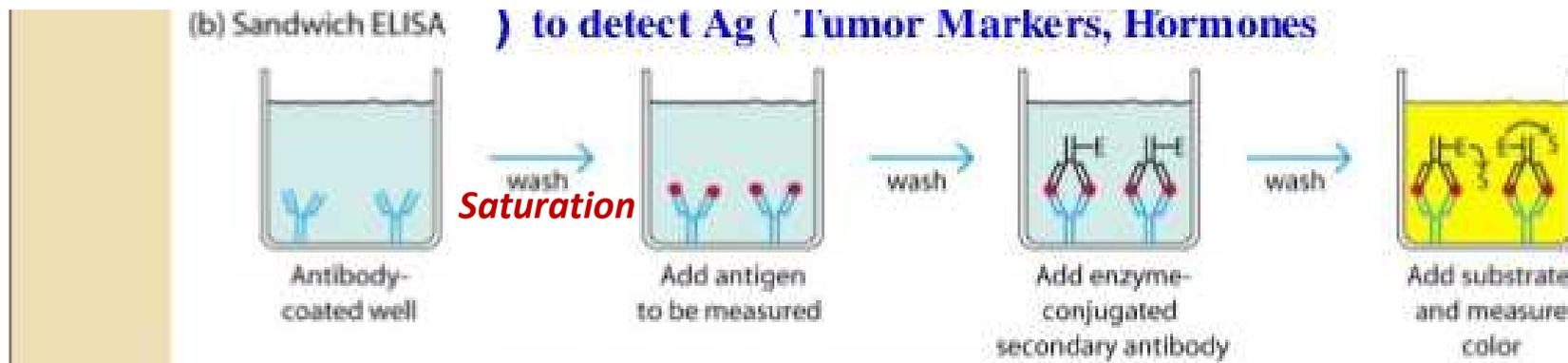


Fig. 3. Antibody response in mice immunized with rTc24 antigen from *E. coli*. Groups of mice ($n = 5-6$ per group) were immunized with the indicated vaccine formulations, or as controls, saline solution or the MPLA adjuvant alone. Two weeks after the last immunization, blood was collected and the levels of IgG (A), IgG1 (B), and IgG2a (C) were measured in serum samples. Data are presented as mean \pm SEM.

ELISA SANDWICH

- La première étape consiste à fixer sur le support, **l'anticorps de capture**
- Lors de la deuxième étape, on dépose **l'échantillon possédant l'antigène à identifier**
- Dans une troisième étape, on fixe **l'anticorps de détection** marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché.
- La dernière étape, on dépose **une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et le chromogène**

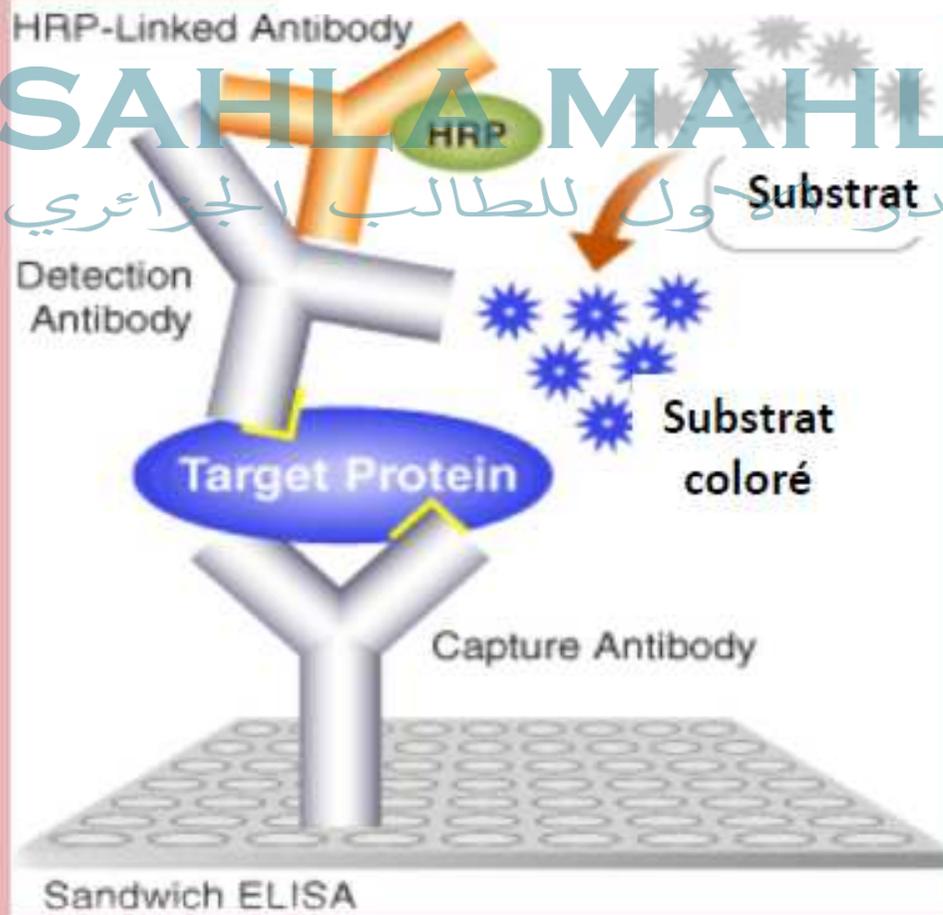


Dosage d'une hormone par ELISA

Taux circulant

Principe:

Ex. FSH, LH, TSH et HCG...



Kit ELISA



Substrat coloré, dosable au spectrophotomètre

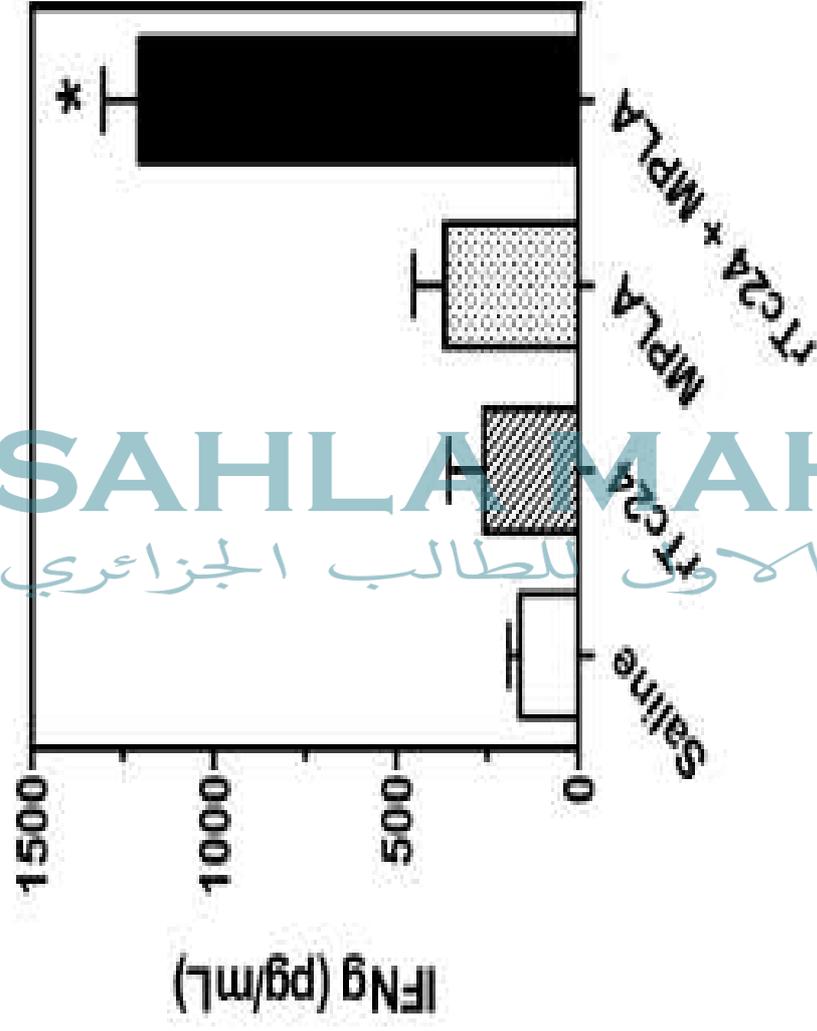


Fig. 4. IFN γ production from splenocytes of mice immunized with rTc24 antigen from *E. coli*.

Groups of mice ($n = 5-6$ per group) were immunized with the indicated vaccine formulations, or as controls, saline solution or the MPLA adjuvant alone. Two weeks after the last immunization, spleens were collected and splenocytes were stimulated with rTc24 to measure antigen-specific IFN γ secretion in the culture medium by ELISA. Data are presented as mean \pm SEM. * indicates a significant difference with the saline control group (ANOVA, $F = 22.7$, $P < 0.0001$, Dunn's post hoc test $P < 0.05$).

ELISA

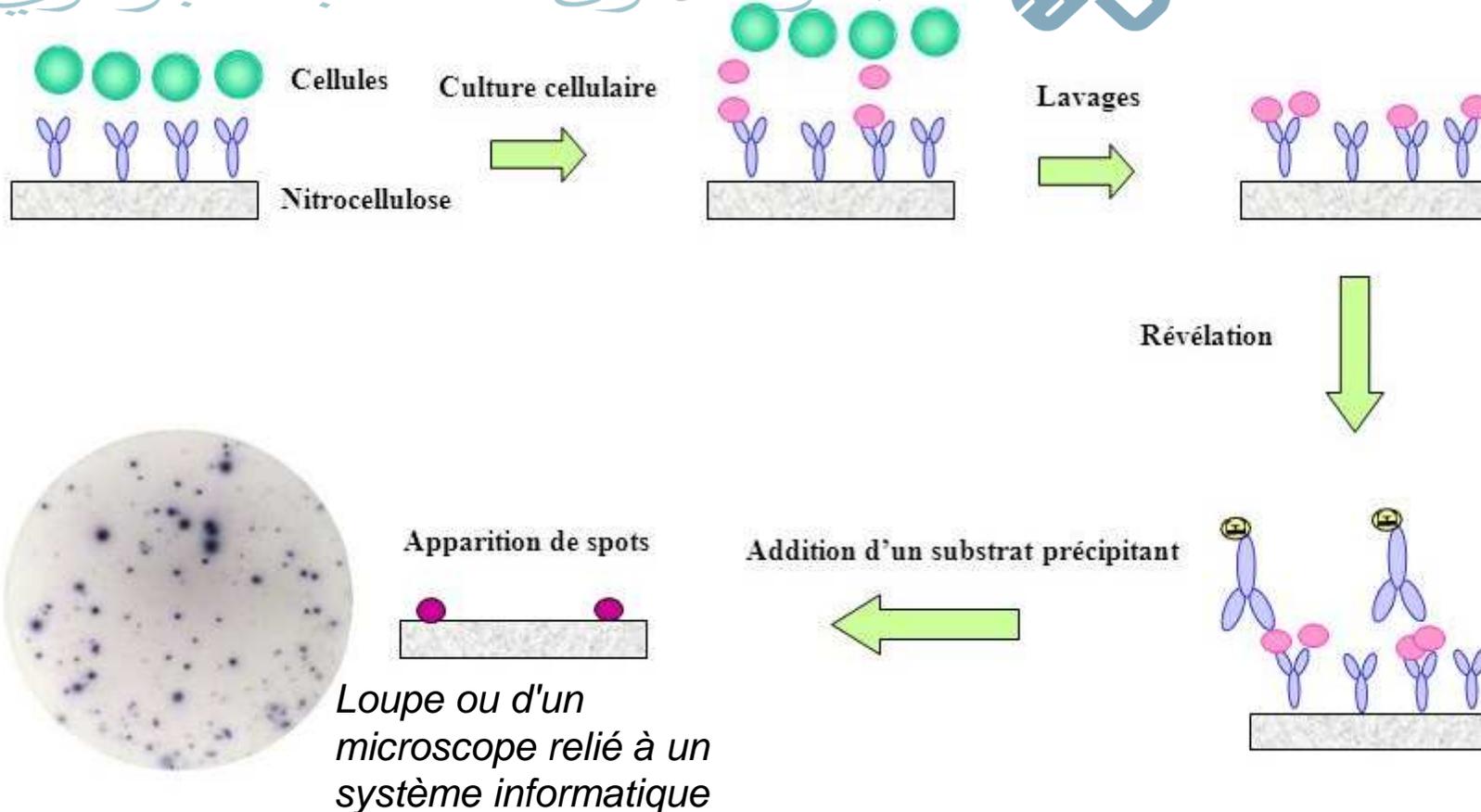
- Applications:
 - ⇒ Dosage des protéines : la β_2m , drogues, hormones (insuline, glucagon...), médicaments, enzymes (énolase, lipase...), les facteurs rhumatoïdes, vitamines, IgE...
 - ⇒ Diagnostic sérologique : parasitaire, bactériologique par titrage d'anticorps (Brucella, Salmonelle, Treponema...), virologique (HIV, rubéole, hépatite A-B, varicelle, herpès, grippe...)
 - ⇒ Maladies auto-immunes : recherche et dosage des FR, des Ac anti-ADN, anti-histones, anti-Dsg1/3...



TECHNIQUE APPARENTEE: ELISPOT

La technique ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) permet de **détecter individuellement des cellules** produisant une **protéine sécrétée** spécifiquement (ex.. cytokine, granzyme, immunoglobuline). Même étapes et principe que l'ELISA

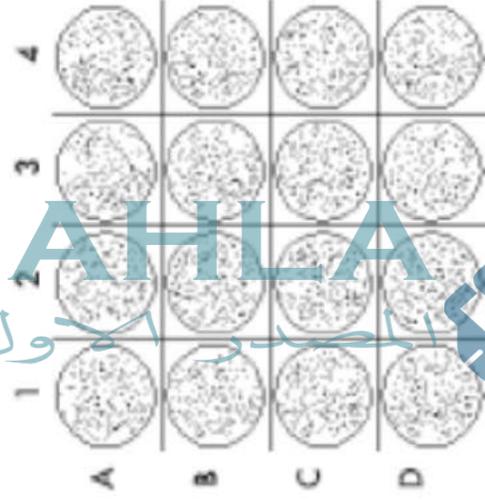
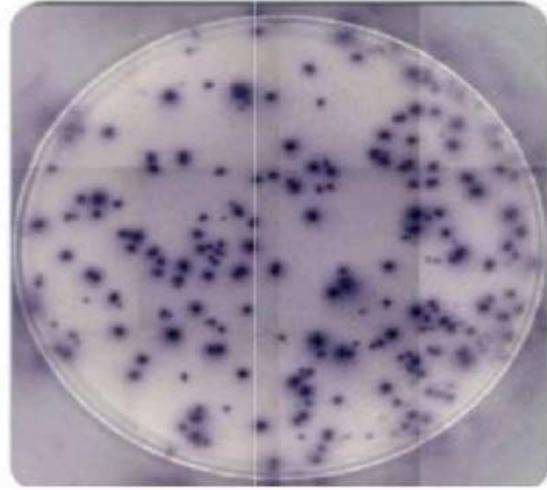
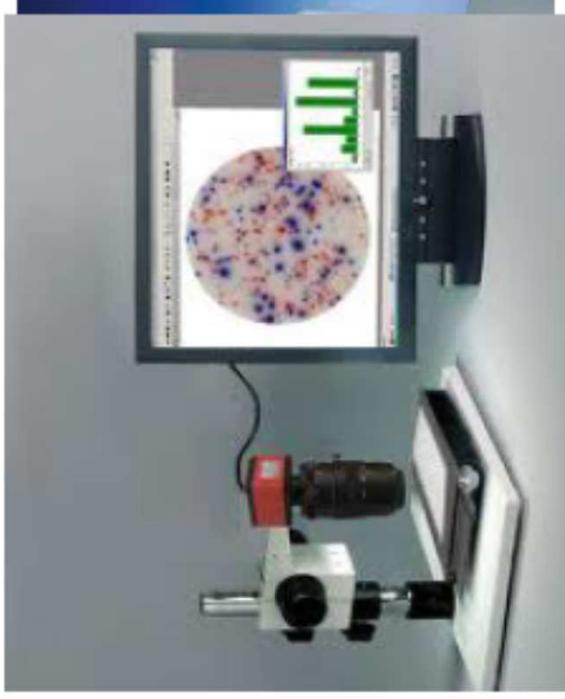
المصدر الأول للطلاب الجزائري



ELISPOT READER

الطبيب الأول للطالب الجزيئي

SAHLA MAHLA



	1	2	3	4
A	599	601	649	605
B	509	649	631	598
C	584	607	609	618
D	619	550	605	625

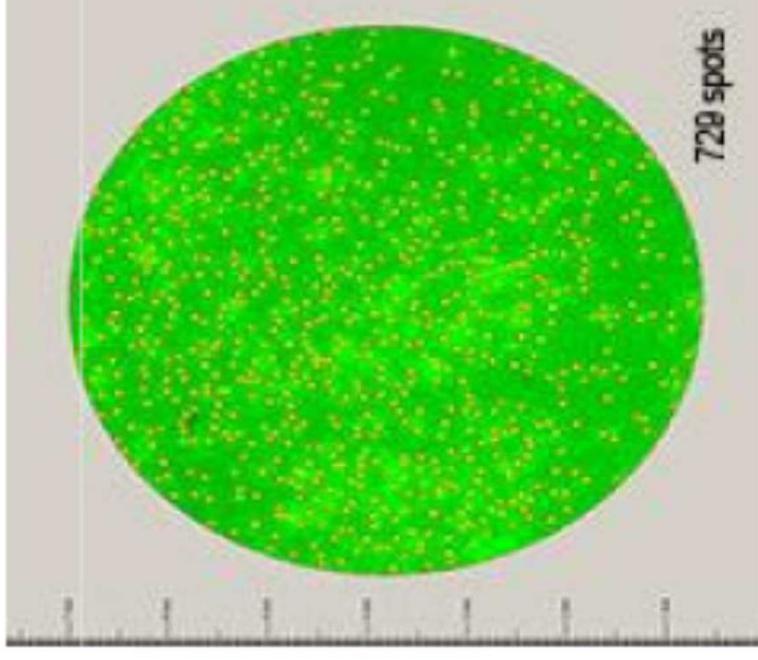
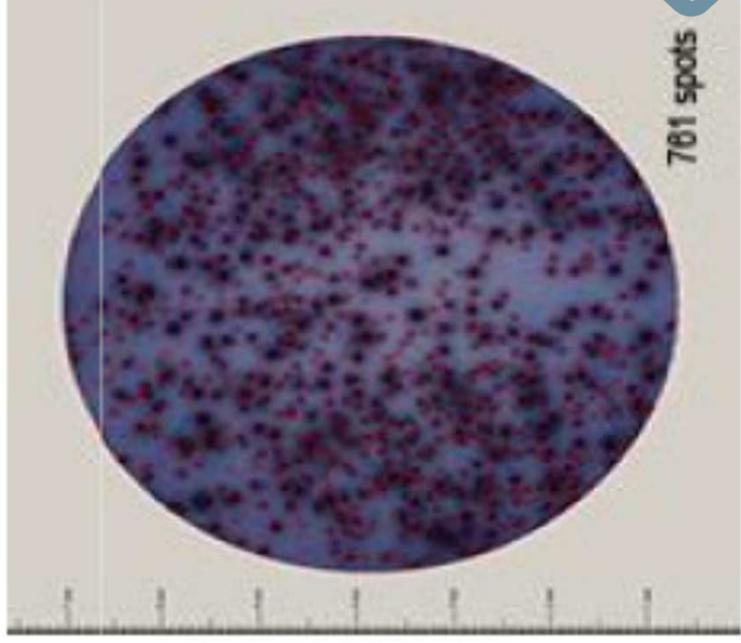
Zeiss digital image

Spot number by well location

Zeiss KS Elispot imaging system

* FluoroSpot assay: version modifiée de l'ELISPOT. Utilise des Ac marqués avec un fluorochrome

Ex: IFN- γ -assay : La sensibilité des 2 méthodes est la même.



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Pourquoi utiliser la technique du Western Blot (Immunoempreinte) ?

- La **protéine d'intérêt** est-elle **présente** dans mon échantillon ?
 - Est-ce que le **traitement de mon échantillon** par un agent « X » **augmente** ou **réduit** le **niveau d'expression** de ma protéine ?
 - Le **niveau d'expression** de la protéine est-il différent selon le **type de tissu** ou le **type de cellule** ?
 - Mon échantillon est-il sain ou pathologique ? Le Western Blot permet de **détecter** par exemple la **maladie HIV**, etc.

Comment ça marche?

SDS-PAGE

- **Séparation** des protéines d'un échantillon par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire

Transfert électrophorétique

- **Transfert** des protéines sur une membrane de nitrocellulose OU PVDF

Etape immunologique

- **Saturation** des sites non-spécifiques
- Dépôt d'un **Ac primaire** spécifique pour détecter la protéine d'intérêt

Etape enzymatique

- Dépôt **Ac secondaire** anti Fc (anti-isotype) – Enzyme

Etape de révélation

- Dépôt substrat chromogène

Remarque. La séparation de *protéines de petite taille* est effectuée sur des *gels de forte réticulation* (autour de 15 % d'acrylamide), alors que les *protéines de grande taille* sont séparées sur un *gel de faible réticulation* (7,5 %).

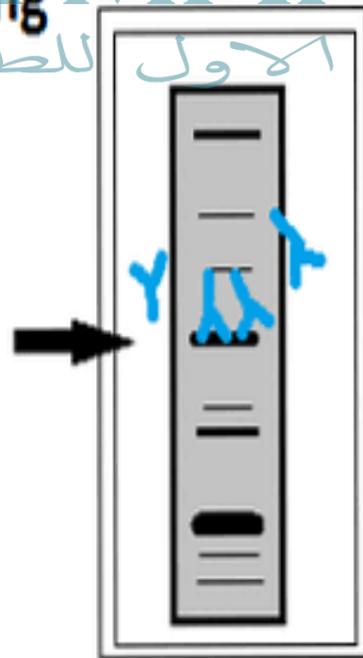
LES ETAPES DU WESTERN-BLOT

SAHLIA MAHLA
المصدر الاول للطالب الجزائري

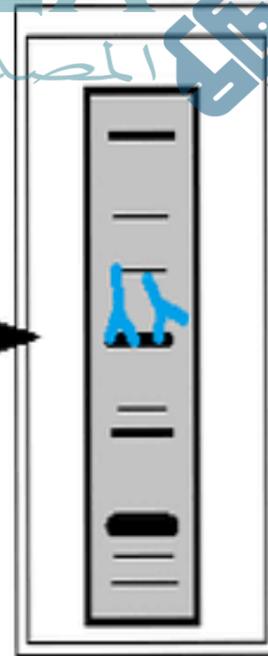
Western Blotting



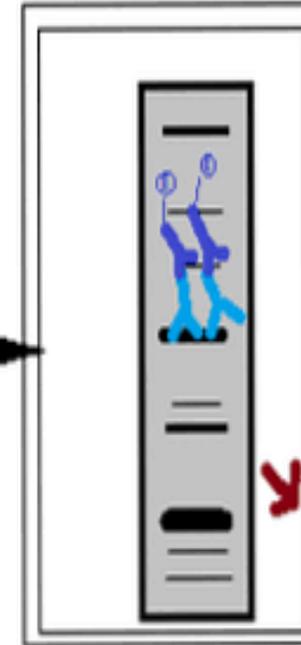
gel



Saturation
2. Antibody binds
to protein



3. Excess washed
away



4. second
antibody
added



5. Photographic film

Detection in Western Blots

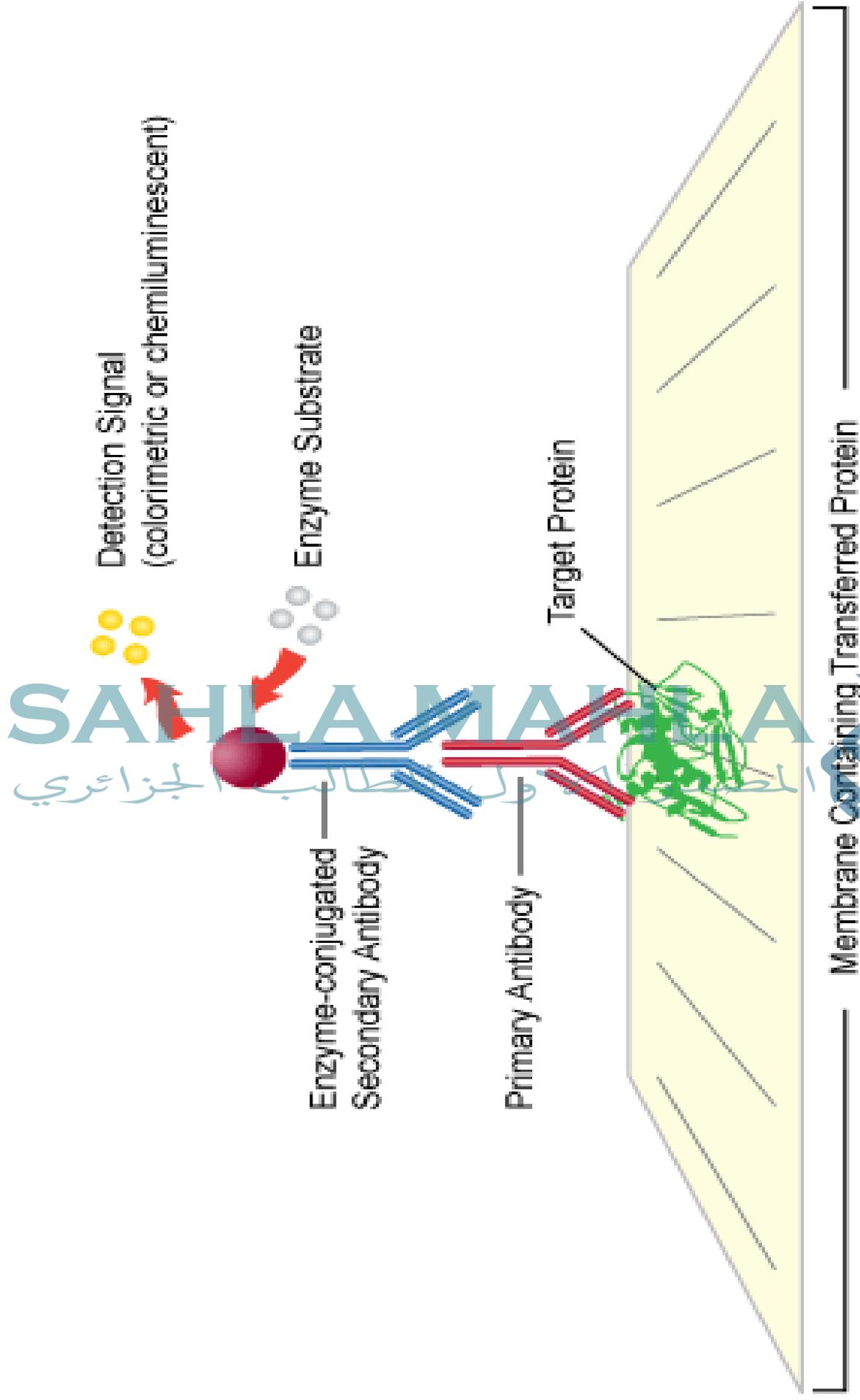


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.

COLORIMETRIE

1- Peroxydase

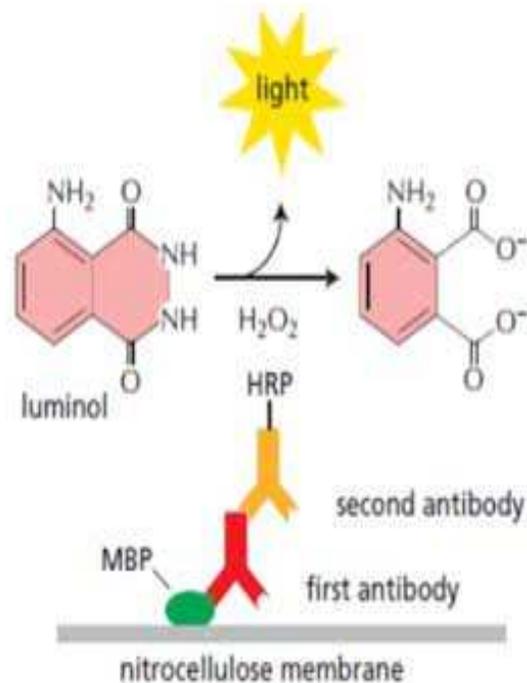
Chromogène
incolore

substrat

chromogène oxydé
coloré



CHEMILUMINESCENCE



(B) IMMUNOBLOT

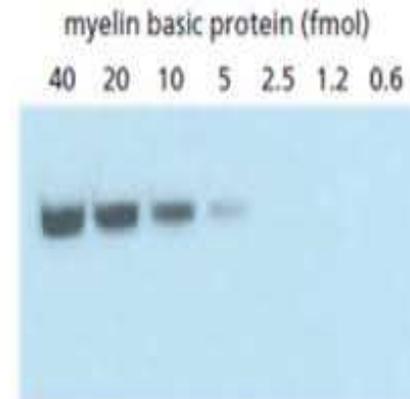


Figure 8-6 Sensitivity of detection of immunoblotting (Problem 8-41). (A) Schematic diagram of the experiment. MBP stands for myelin basic protein. In the presence of hydrogen peroxide, horseradish peroxidase (HRP) converts luminol to a chemiluminescent molecule that emits light, which is detected by exposure of an x-ray film. (B) Exposed film of an immunoblot. The number of femtomoles of myelin basic protein in each band is indicated.

Thermo Scientific

1-Step Ultra TMB-Blotting Solution

1 2 3 4 5 6 7



Thermo Scientific

Pierce ECL Substrate

1 2 3 4 5 6 7



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

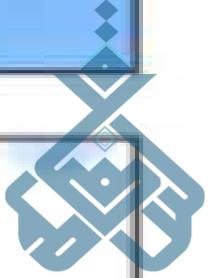




Fig. 1. Expression of rTc24 in *E. coli* and yeast.

(A) SDS-PAGE showing the dramatic increase of expression yield of rTc24 in *E. coli* BL21 (DE3) after being codon optimized (Tc24-E). All recombinant protein was expressed in soluble fractions. (B) Western blot with anti-Tc24 mouse sera showing the increased expression in yeast of the de-glycosylated form of Tc24 (Tc24-dg) compared with wild-type form (Tc24-wt). The *E. coli* expressed recombinant Tc24 [rTc24(E. coli)] was used as a control.

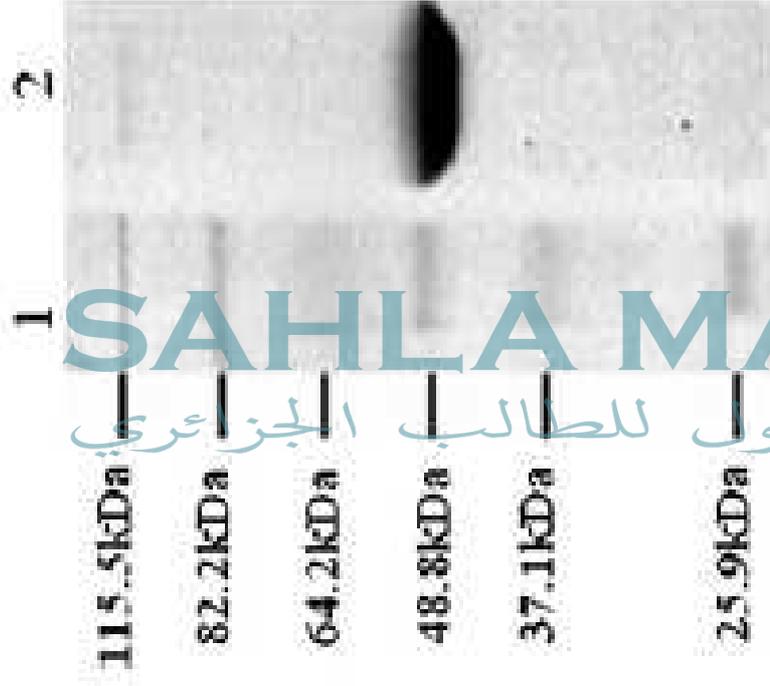


Fig. 5. Western blotting analysis of the renatured, purified recombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2. Ten micrograms of ScFv(CD11c)-TRP2 was applied into 10% SDS-PAGE and then electro-transferred to a PVDF membrane. Western blotting analysis was performed using mouse anti-His monoclonal antibody (Lane 2). The membrane was incubated with the second antibody: HRP-labeled goat anti-mouse IgG. Lane 1 contains pre-stained molecular weight protein markers. Lane 2, fusion protein ScFv(CD11c)-TRP2 of 46.5 kDa.

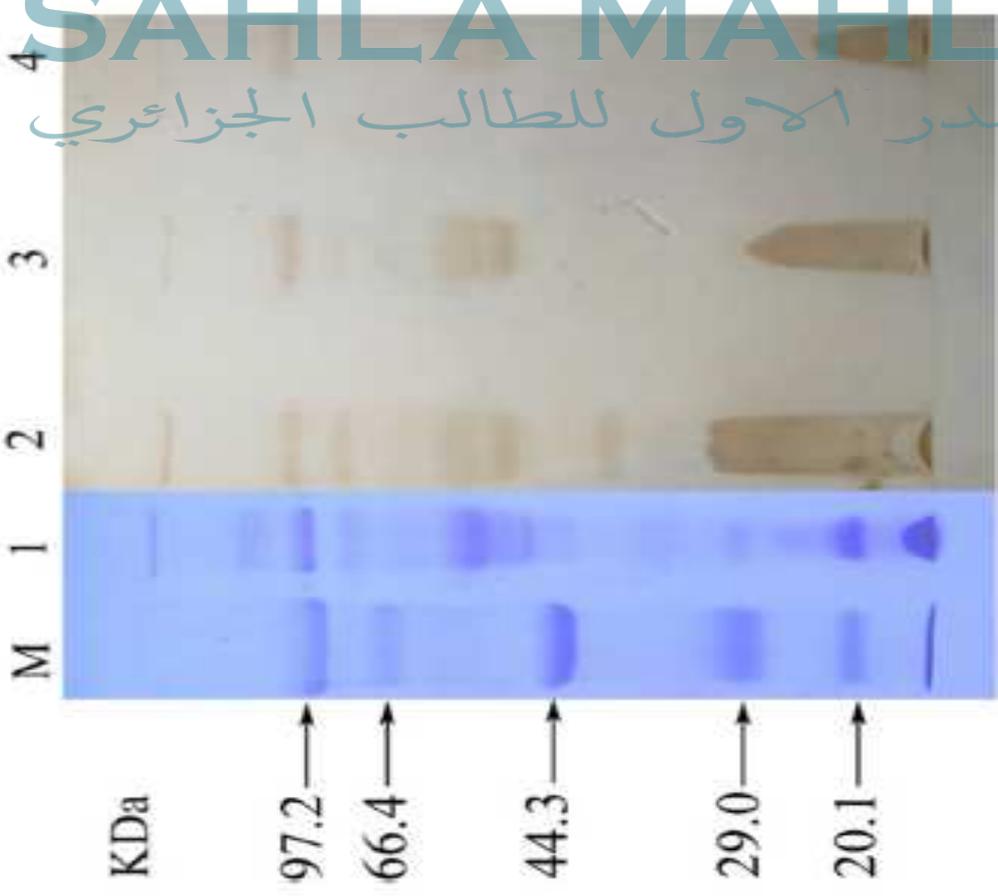


Fig. 4 Anti-*T. albobabris* venom IgY combined with venom proteins by Western blot analysis. Lane 1: 50 µg of venom on 10 % SDS-PAGE; lane 2: 50 µg of venom; lane 3: 25 µg of venom; and lane 4: 12.5 µg of venom combined with a fixed amount of anti-*T. albobabris* venom IgY (1:1000)

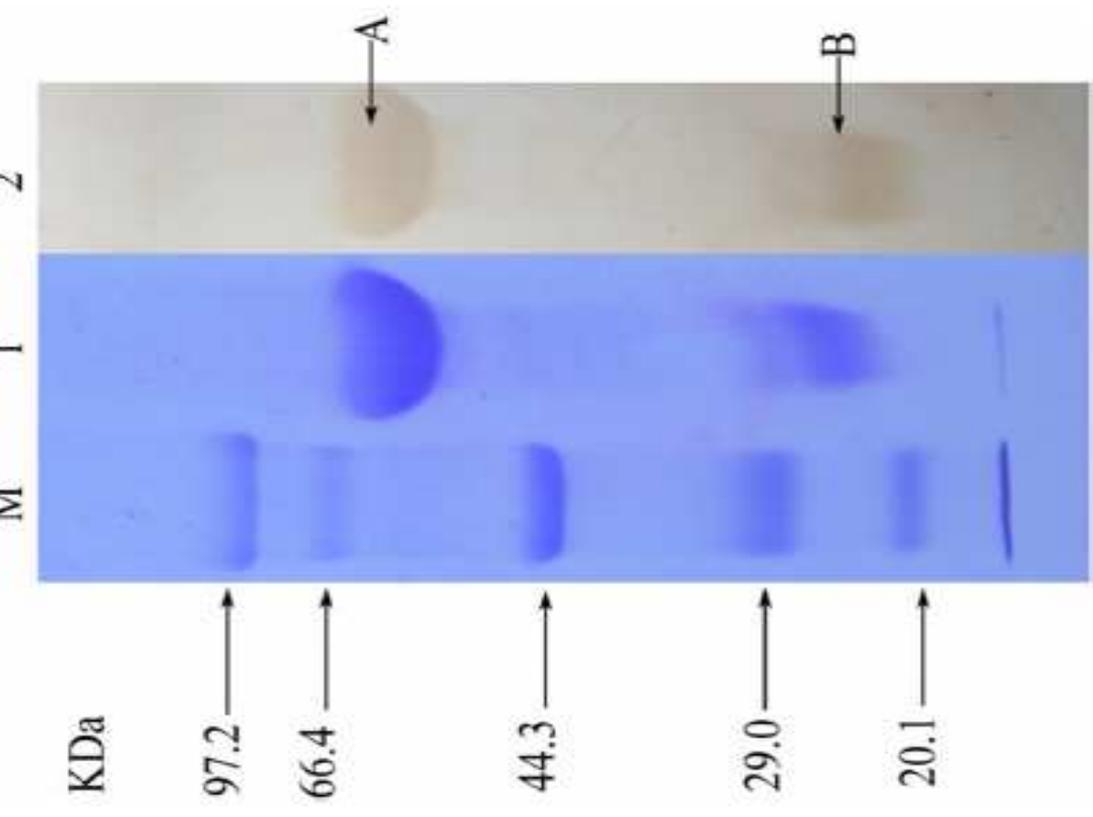


Fig. 3 Identification of anti-*T. albobabris* venom IgY. The reduced IgY (50 µg) was separated on 10 % SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue (lane M: molecular weight marker, lane 1: reduced IgY). Result of Western blot test using peroxidase conjugated rabbit anti-chicken IgY to detect the heavy chains (lane 2: A) and the light chains (lane 2: B)

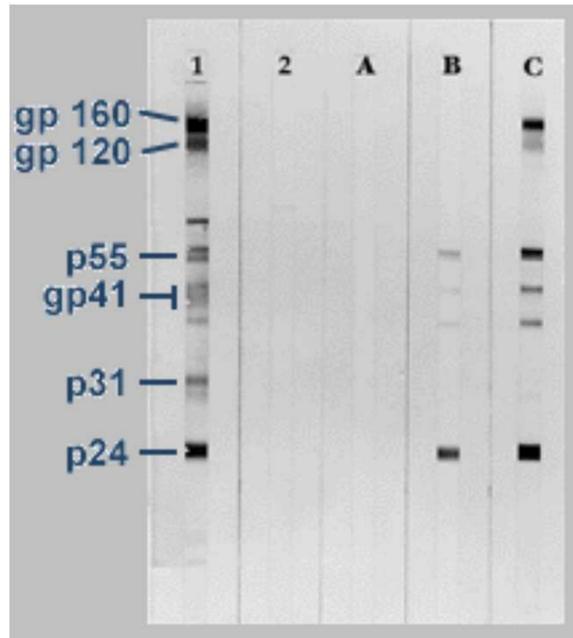
Westernblot

Exemple: détection des faux positifs HIV (détecté par Elisa)

Exemple: détection d'Ac anti-HIV

Résultat

Protéines HIV

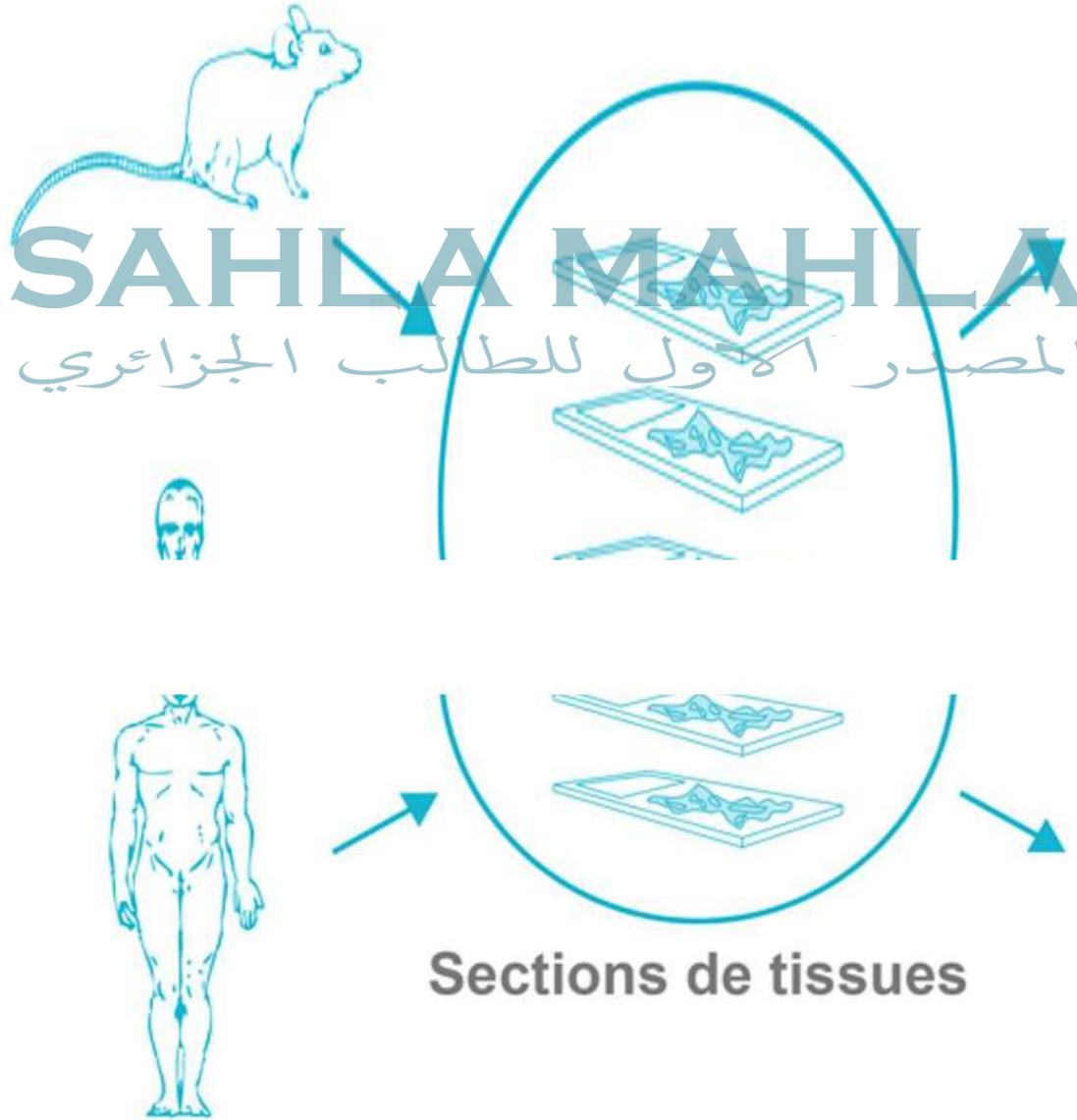


Patient A: négatif

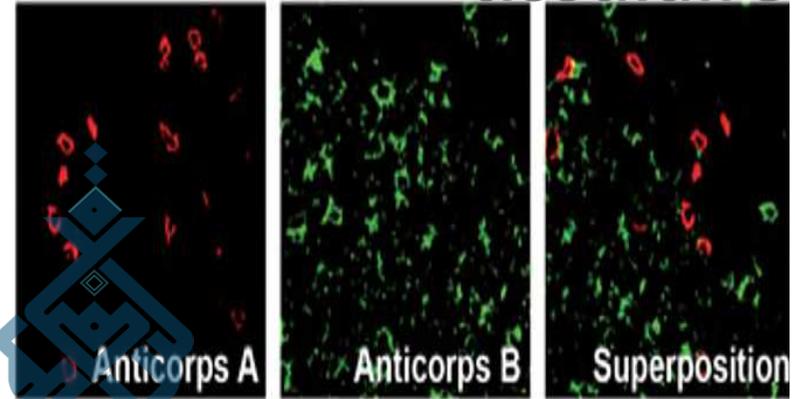
Patient B: indéterminé

Patient C: positif

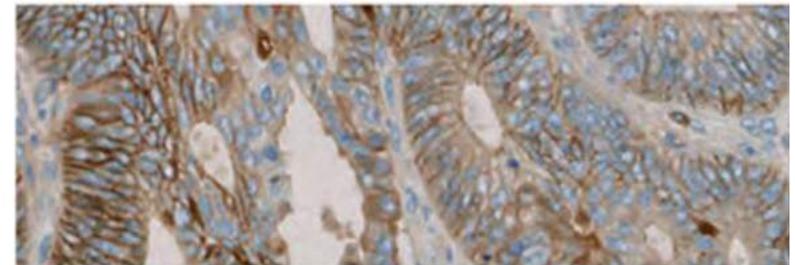
Pos
Neg patients



Immunofluorescence tissulaire



(immunocytochimie)



IMMUNOHISTOCHEMIE

SAHLA MAHLA

PRINCIPE

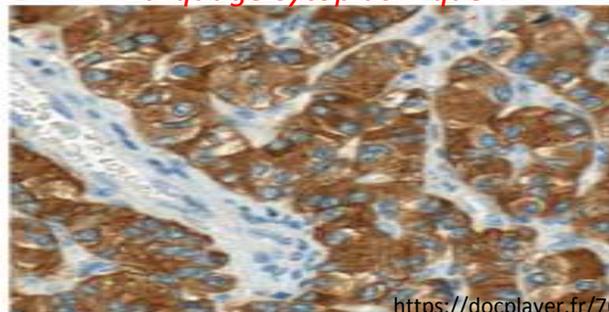
L'immunohistochimie c'est la combinaison de l'immunologie et de l'histochimie.

- Consiste à mettre en évidence divers **antigènes cellulaires ou extracellulaires** grâce à des **anticorps spécifiques** sur des préparations cytologiques (immunocytochimie) ou sur des **coupes de tissus congelés** ou fixés et inclus en paraffine.
- **Les antigènes recherchés:** Ag membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires ou des protéines de la matrice extracellulaire

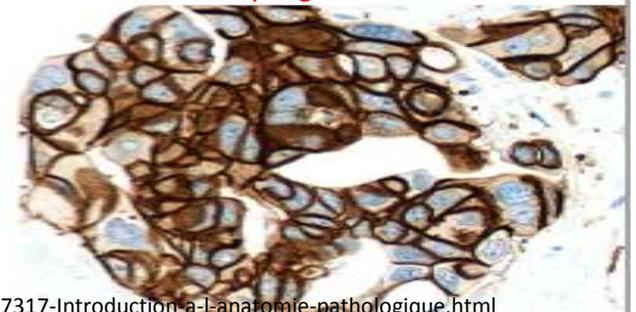
Marquage nucléaire



Marquage cytoplasmique

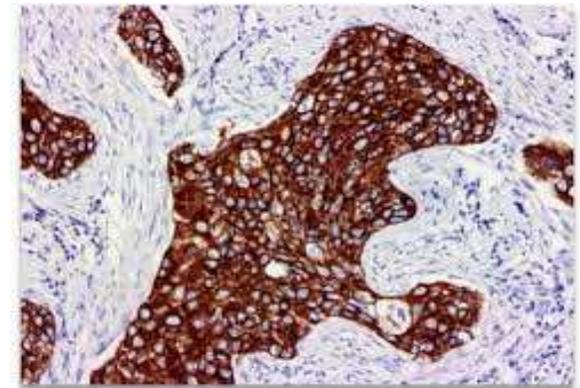
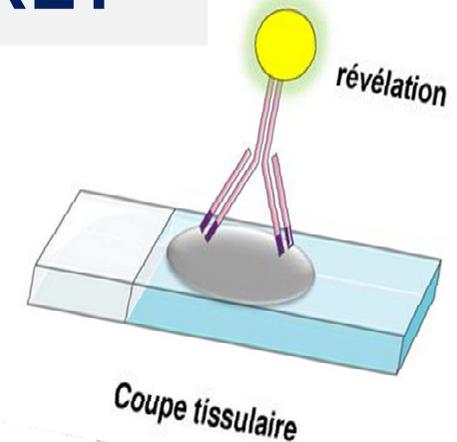


Marquage membranaire



IMMUNOHISTOCHEMIE: INTERET

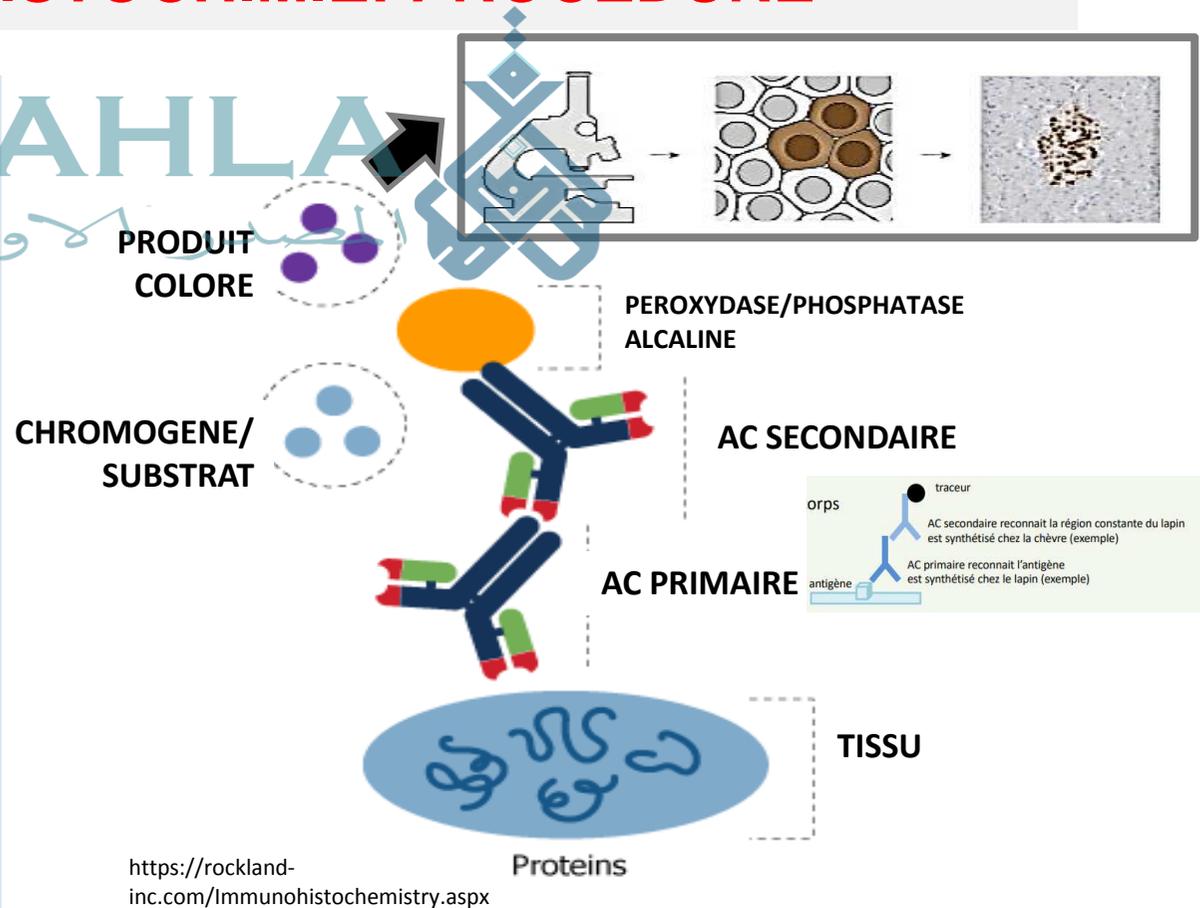
- Détection spécifique de protéines sur matériel cytologique ou sur coupe tissulaire
- Localisation d'une protéine dans une cellule ou un tissu
- Estimer le niveau d'expression de la protéine recherchée
- Permettre une identification et une confirmation rapides et précises de la maladie
- Rechercher les cibles des médicaments et de confirmer les propriétés pharmacocinétiques du médicament au cours du métabolisme du médicament



IMMUNOHISTOCHEMIE: PROCEDURE

L'immunoréaction est composée de trois éléments principaux:

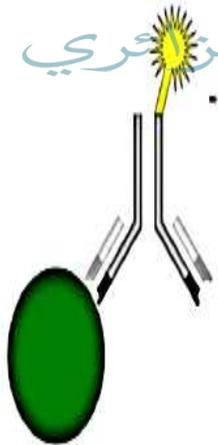
- Préparation tissulaire contenant l'antigène à étudier ou à rechercher
- Un anticorps spécifique dirigé contre l'antigène
- Le système révélateur qui permet de visualiser l'immuno-réaction



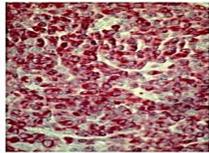
TYPES DE MARQUEURS

CARACTERISTIQUE D'UN BON ANTICORPS

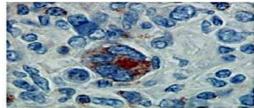
- Doit avoir une haute affinité/avidité pour son antigène (selon l'épitope, l'espèce, spécificité, spécificité)
- Le titre doit être élevé ce qui permet d'utiliser de grandes dilutions et d'améliorer la rapport signal/bruit.



Enzymes: catalyse de la formation d'un produit coloré



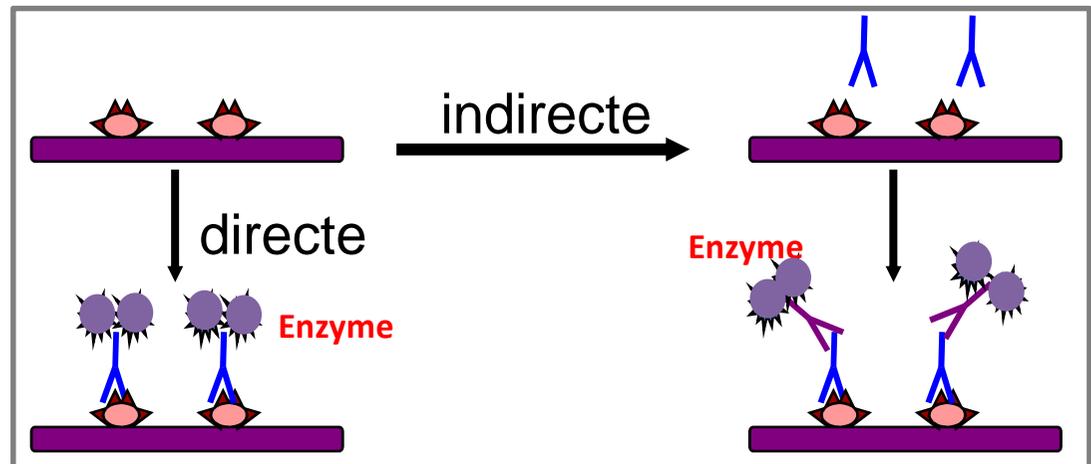
Phosphatase Alcaline



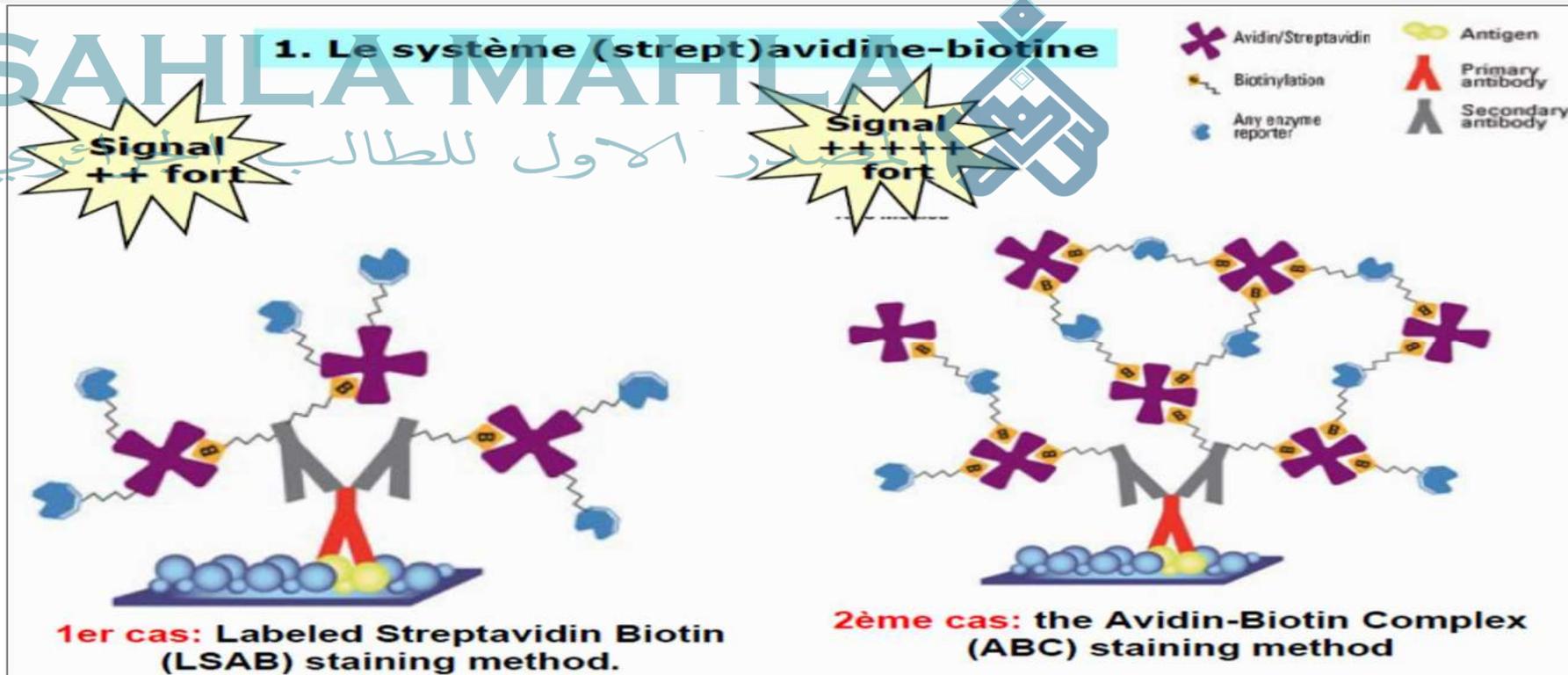
Peroxydase

Les différentes techniques utilisées en immunohistochimie :

- Technique directe
- Techniques indirectes sans amplification
- Techniques indirectes avec amplification



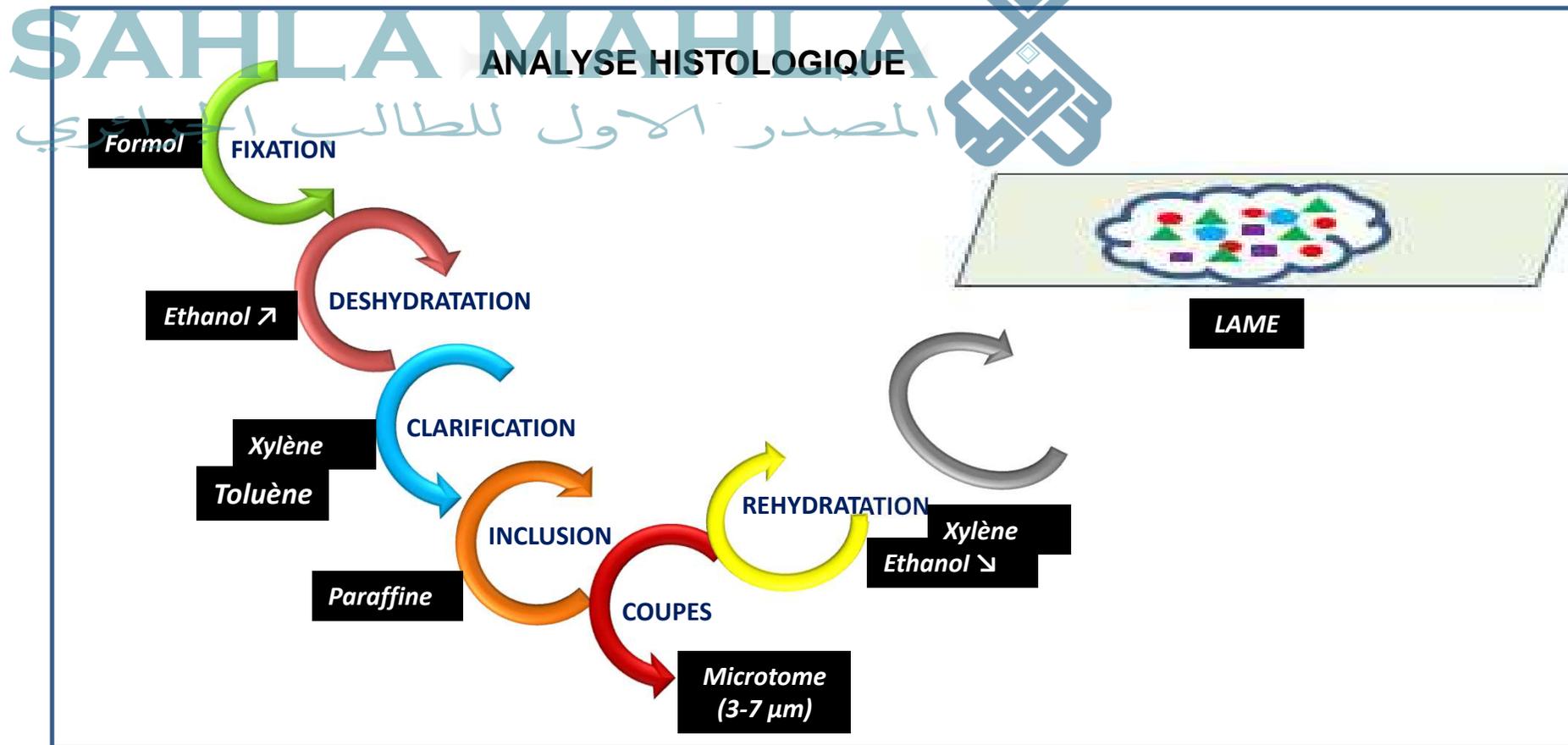
AMPLIFICATION DU SYSTÈME DE REVELATION



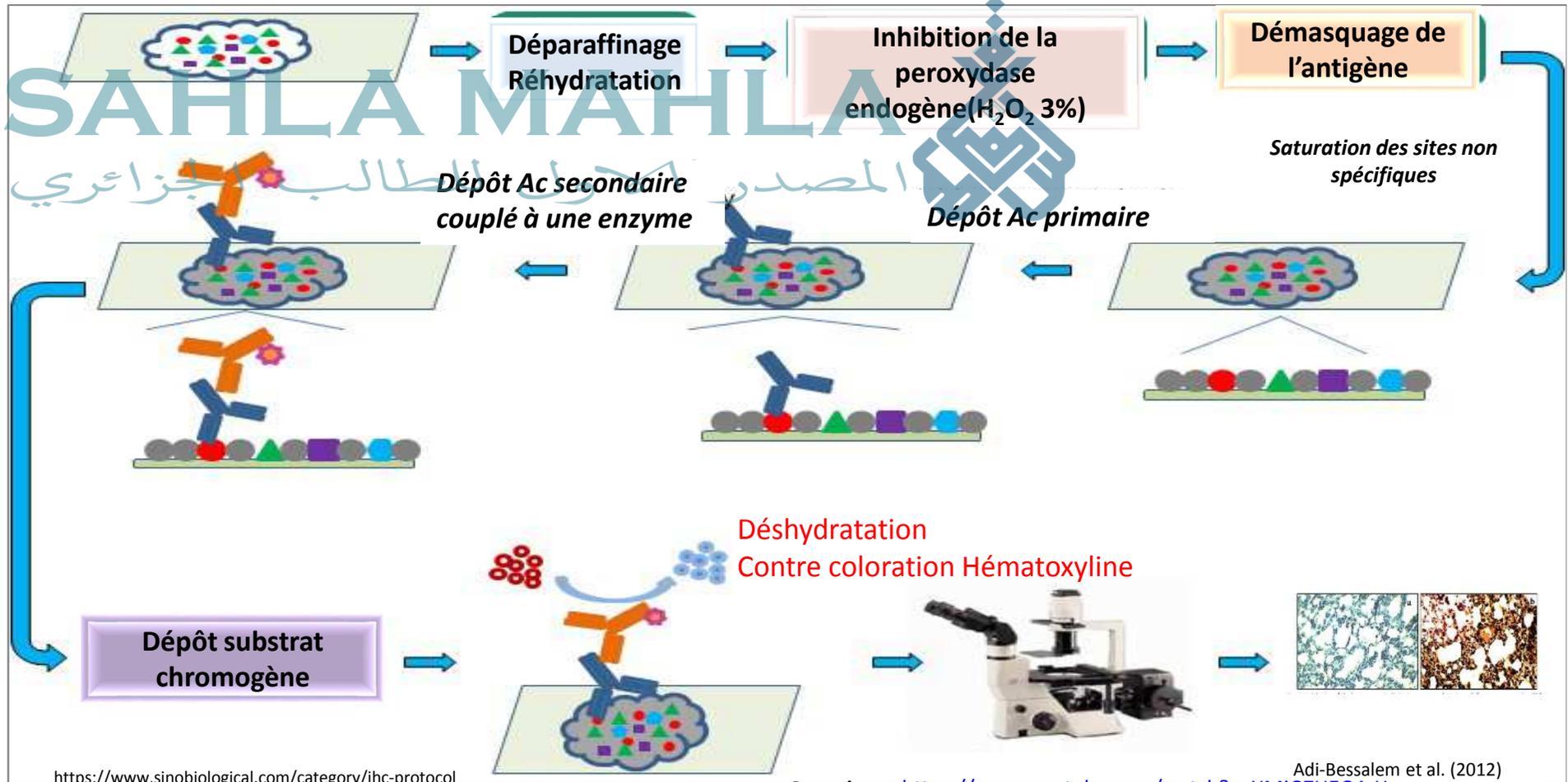
- Si la peroxydase du raifort (horseradish peroxydase ou HRP) ; $H_2O_2 + \text{chromogène (3,3' Diamino benzidine réduit)} \rightarrow H_2O + 1/2O_2 + \text{DAB oxydé (marron, oxydé)}$

DAB=brun, AEC (3 amino 9 ethyl carbazol) =orangé)

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR IMMUNOHISTOCHEMIE



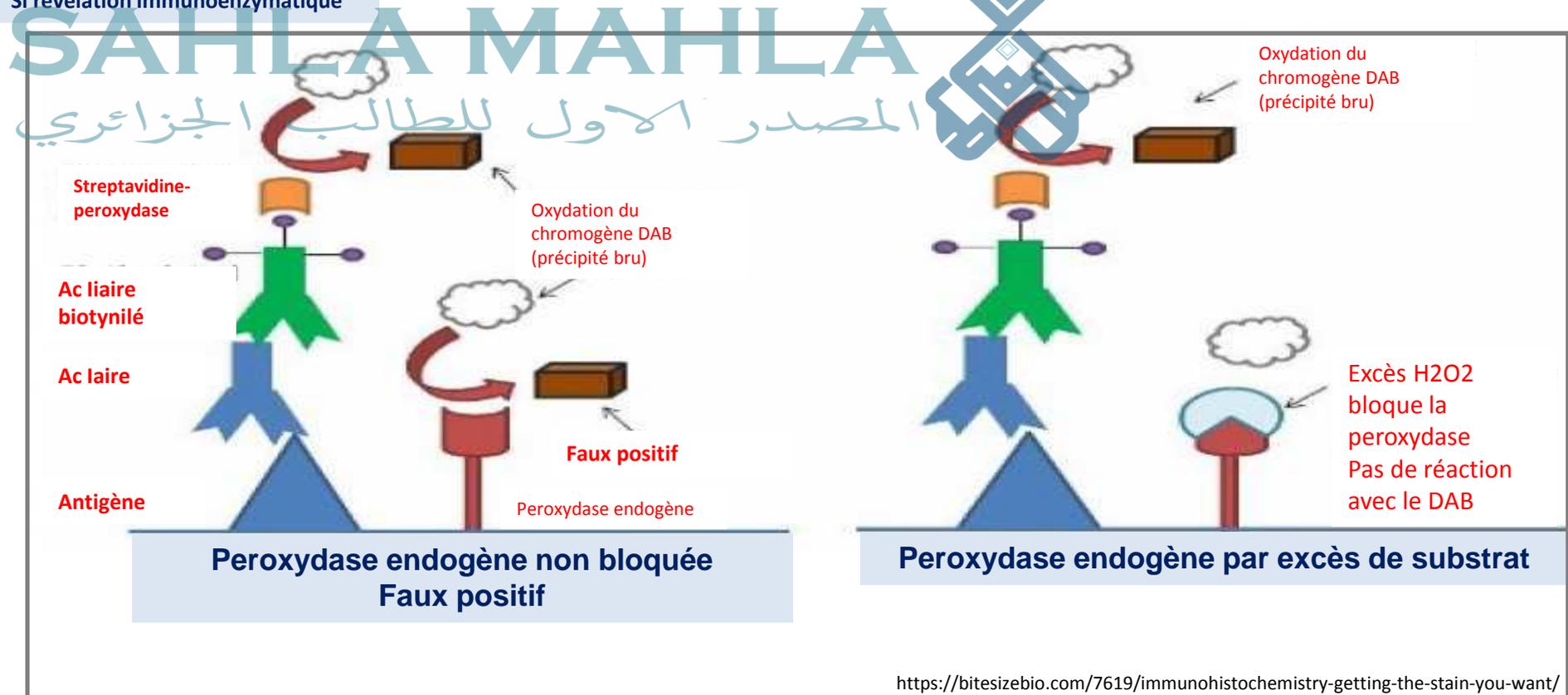
IMMUNOHISTOCHEMIE : ETAPES



INHIBITION DES COMPOSÉS ENDOGÈNES DES TISSUS

PRÉSENCE DE MOLÉCULES ENDOGÈNE

Si révélation immunoenzymatique



3) Composés endogènes

AI- Activités enzymatiques endogènes:

Nécessaire quand pour la révélation colorométrique ou chromogénique (avec enzyme)

1 Activités peroxydases endogènes:

Inhiber par un excès H₂O₂

2 Activités phosphatases endogènes:

Inhibée par le lévamisole ou 100°C

3- Activité estérase:

Inhibée par 100°C

SAH LA MAHILA

المصطفى الاول الطالب الاعزاعي



DEMASQUAGE DE L'ANTIGÈNE

Si fixation au formol



Perméabilisation des mb

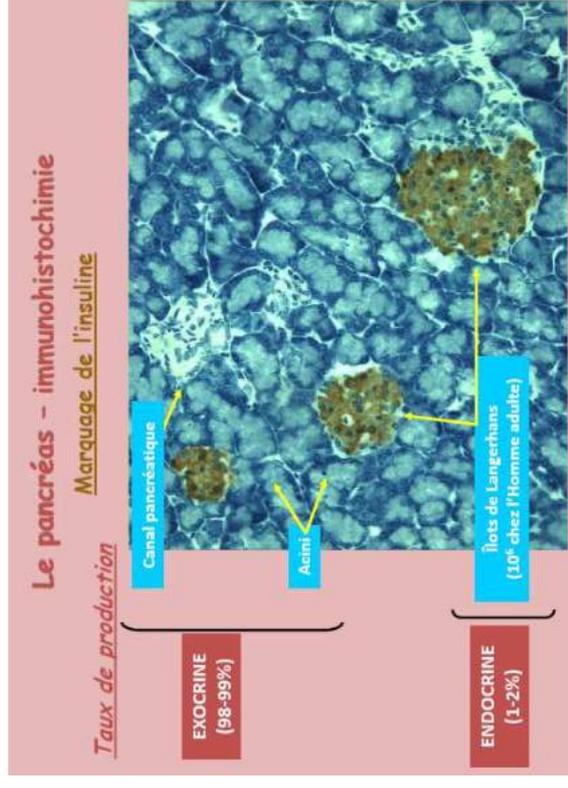
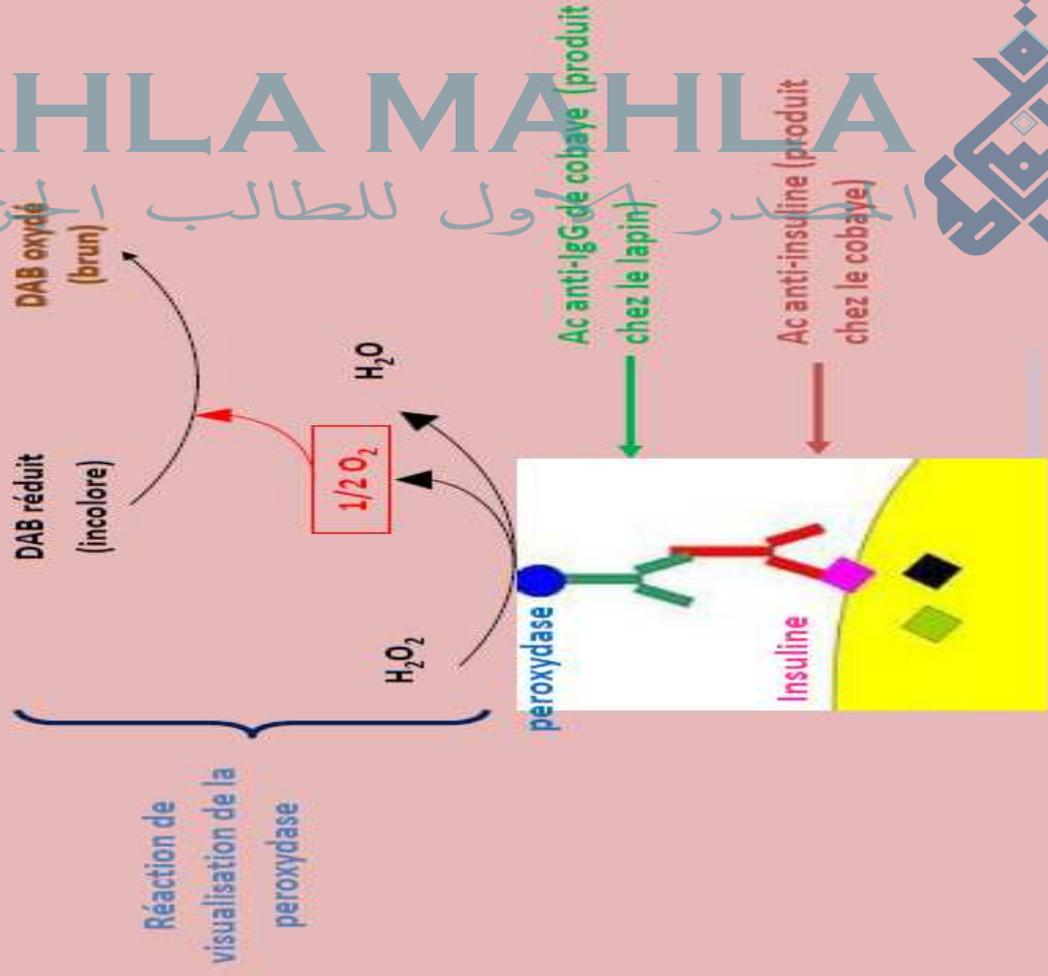
- Nécessaire pour les molécules intracellulaires (cytoplasmic, nuclear) ou molécules de la membrane dans l'épitope est du côté intracell
- **Detergents most popular**
 - Triton-X 100
 - Tween 80
- **Acetone/Methanol**
 - Précipite les protéines à l'extérieur de la membrane, donc plus accessible
- **Saponin**
 - Produit des ouvertures dans la membrane qui se ferme quand on enlève la saponin



Immunohistochimie:

Détecter l'insuline au niveau du pancréas

المنهج الأول للطلاب الجرائز



Controls

Positive control

Nécessaire seulement quand le résultat est négatif pour savoir si ce n'est pas un problème de manip

Il faut trouver un tissu qui donnerait sûr un R+ (controle positive de la technique)

Negative control

(1) Ne pas mettre le 1er Ac

(2) Ne pas mettre le conjugué

(3) Adsorption du 1er Ac et de l'Ag avant utilisation

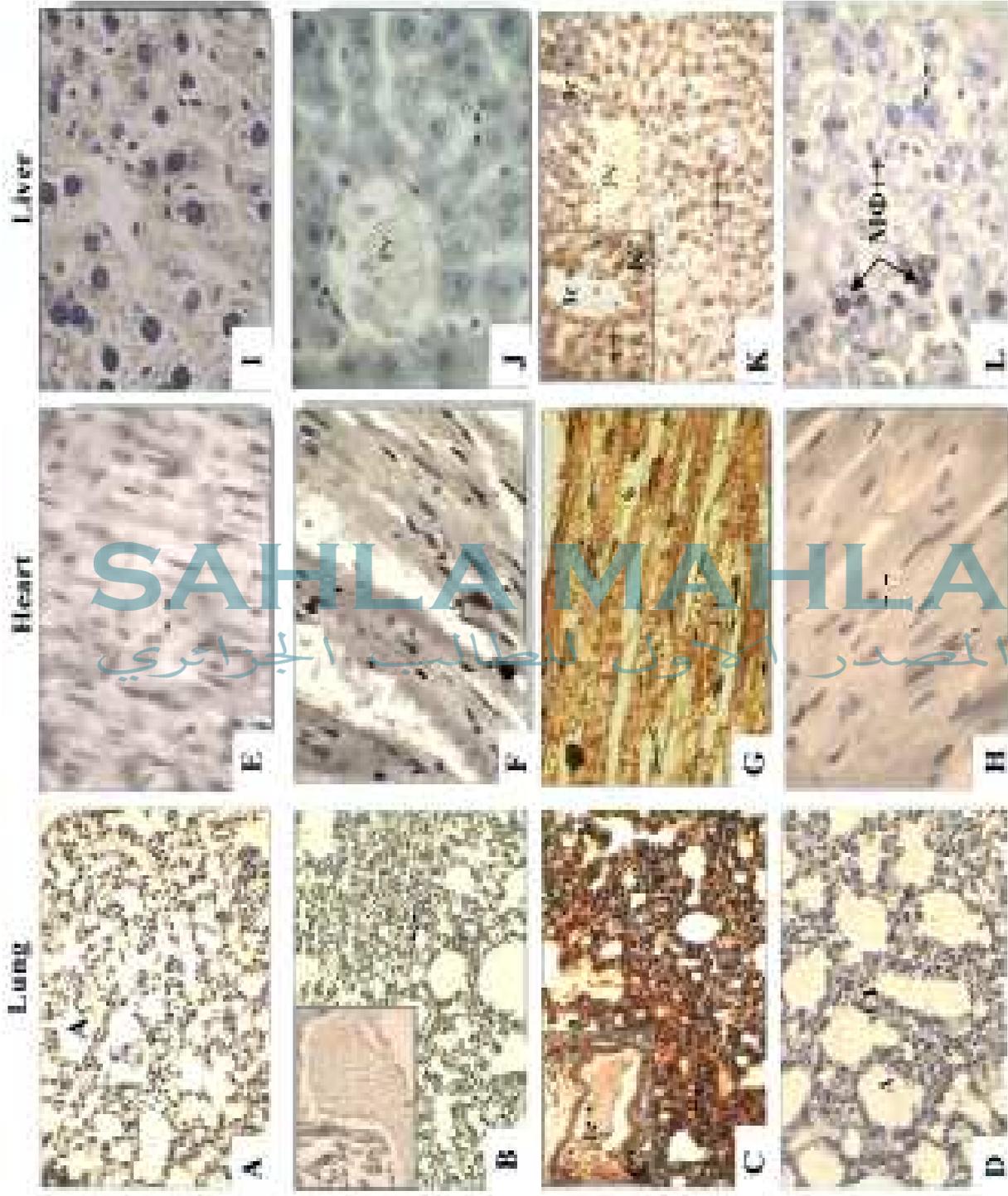
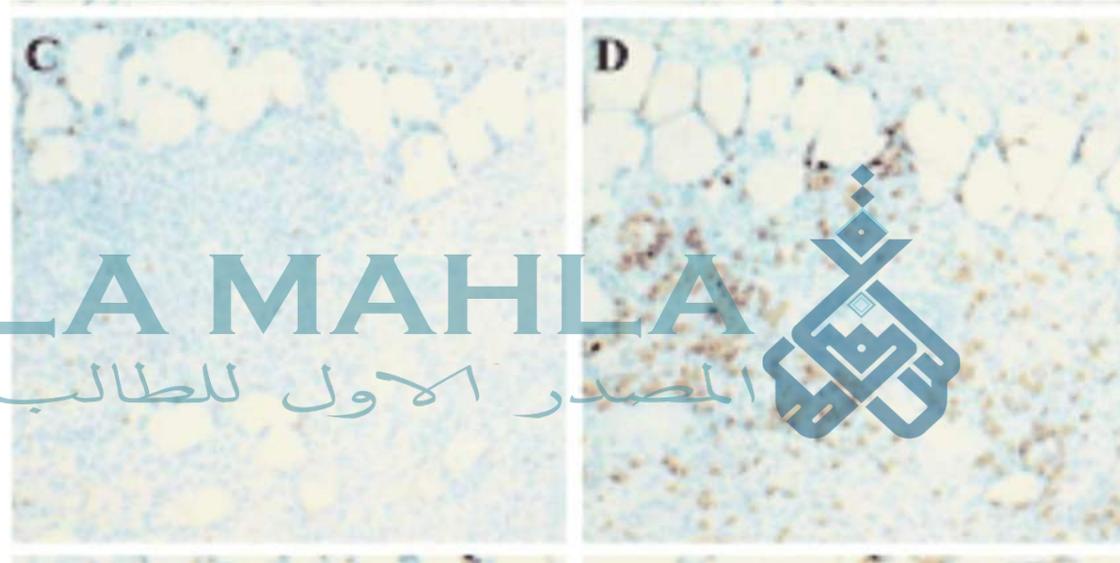


Fig. 4. Immunohistochemical analysis of *Neurospora asteroides* larvae (nuclei and cytoplasm) in the heart, lung and liver tissues of immunized mice. Panels A, E-I: controls. Panels B-F-J: negative controls. C-G-H: lung, myocardial and liver tissues of a mouse infected with a virus obtained with native vectors (10 µg/20 g body weight). Panels D-H-L: lung, myocardial and liver tissues of a mouse infected with irradiated viruses (100 µg/20 g body weight). Panels A-D: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels E-H: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels I-L: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels M: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels N: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels O: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels P: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels Q: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels R: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels S: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels T: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels U: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels V: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels W: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels X: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels Y: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Panels Z: Mayer's hematoxylin (Mh) staining for nuclei. Magnification is 417x and 1040x (Gomez).

Exemple: infiltration CD4 dans une tumeur



SAHLA MAHLA

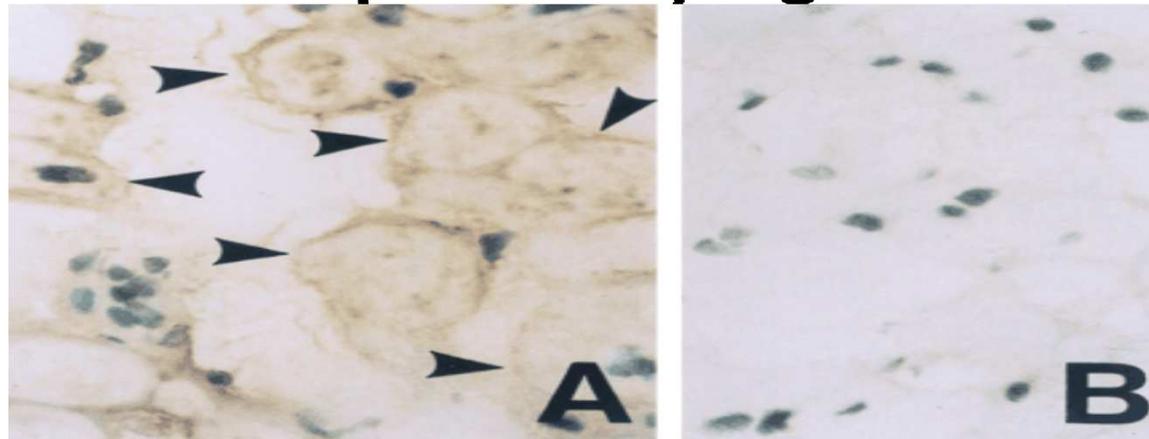
المصدر الاول للطالب الجزائري



Nég

Pos

Exemple: marquage Fas

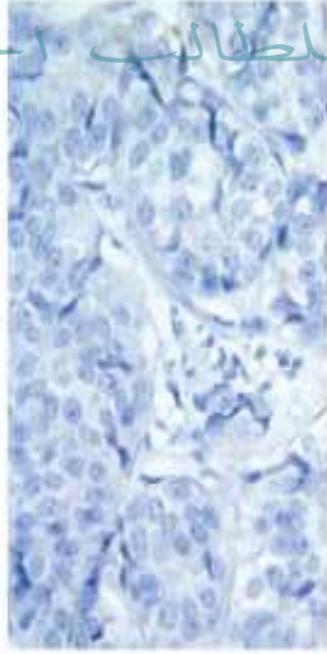


Pos

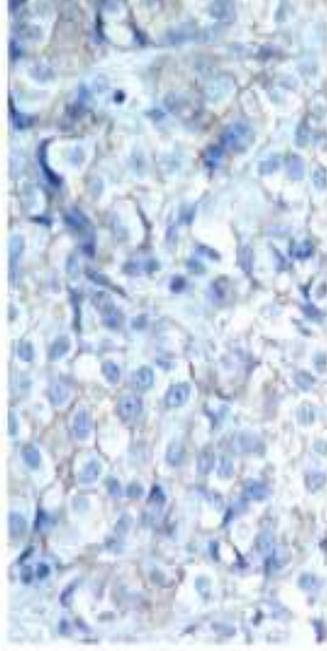
Nég

Détermination de la quantité et de la localisation de HER2 chez des patients atteintes de cancer du sein

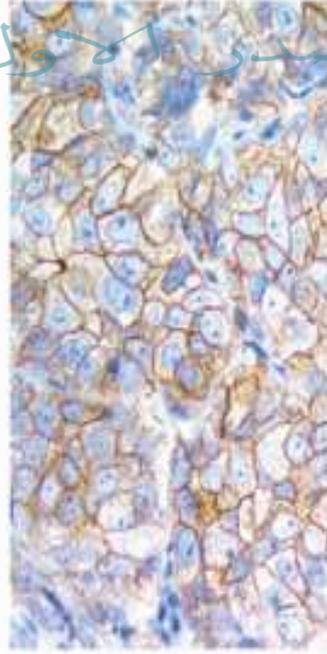
Utilisation d'anticorps polyclonaux primaires anti HER2 : marquage membranaire observé



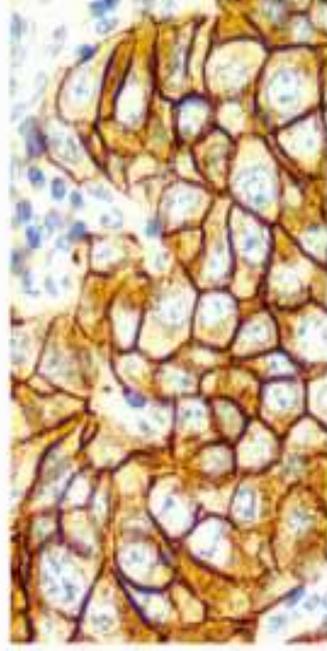
Score: 0 (40x)



Score: 1+ (40x)



Score: 2+ (40x)

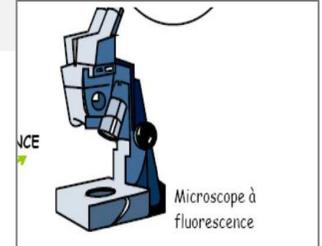


Score: 3+ (40x)

Technique d'immunohistochimie IHC



L'IMMUNOFLUORESCENCE

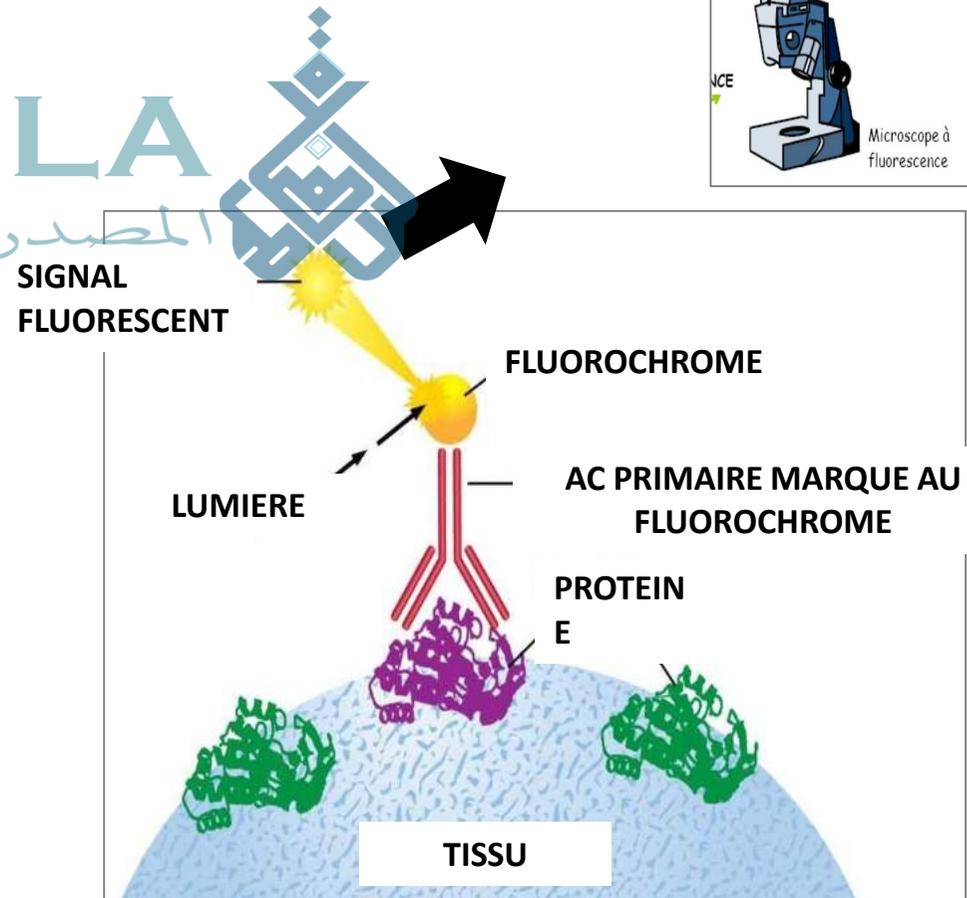


SAHLA MAHLA

L'immunofluorescence est une méthode qui permet de **détecter** et **localiser** une **protéine d'intérêt** à l'aide d'un **anticorps spécifique** (directement **couplé à un fluorochrome** ou **révélé par un anticorps secondaire fluorescent**), sur des cellules en suspension, des frottis cellulaires, des microorganismes ou des coupes de tissus

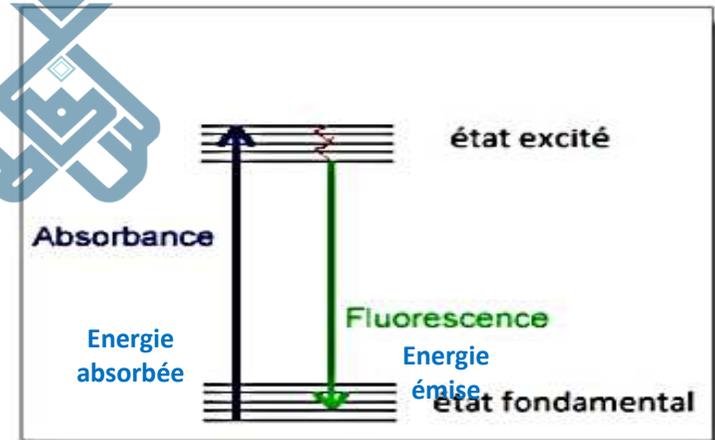
Couplée à un **logiciel de traitement de l'image** (ex : ImageJ), cette technique permet également de **générer des données d'intensité de fluorescence** pouvant faire l'objet d'une analyse quantitative.

Il est également possible de réaliser des **co-marquages** par cette technique.

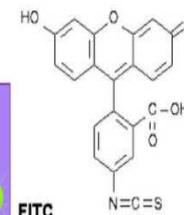
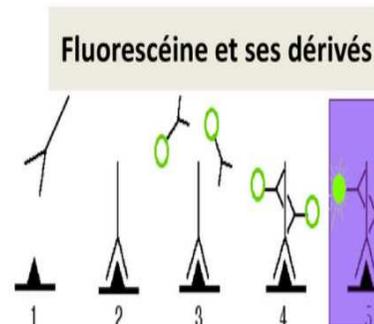


MÉTHODE IMMUNOFLUORESCENCE (IF) : FLUOCHROMES / FLUOROPHORE

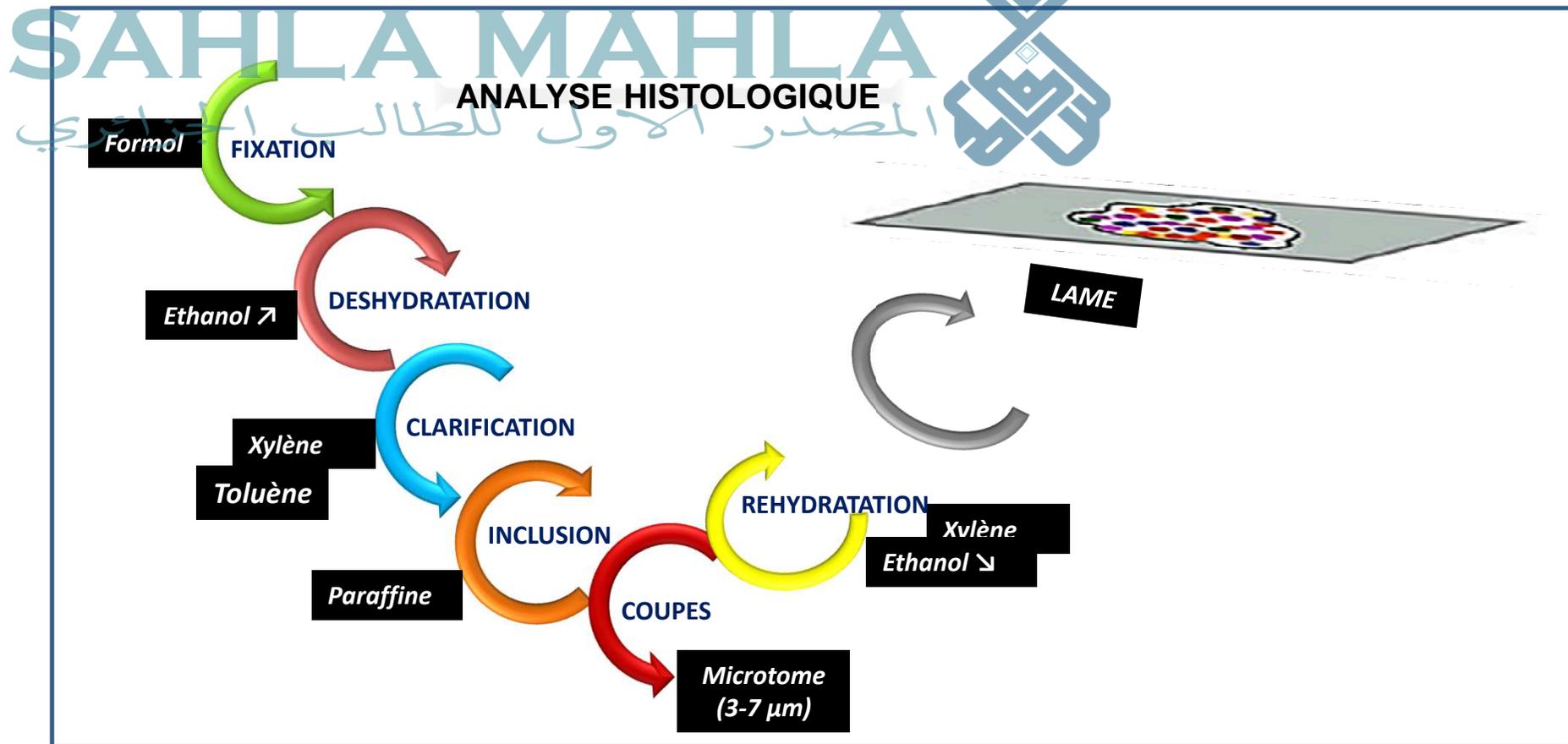
L'anticorps couplé à un fluochrome est excité par une lumière (UV) va émettre une lumière fluorescente (verte ou rouge....)



	Absorption	Emission
Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC)	495 nm	525 nm
Tetraméthyl Rhodamine IsoThioCyanate (TRITC)	545 nm	575 nm

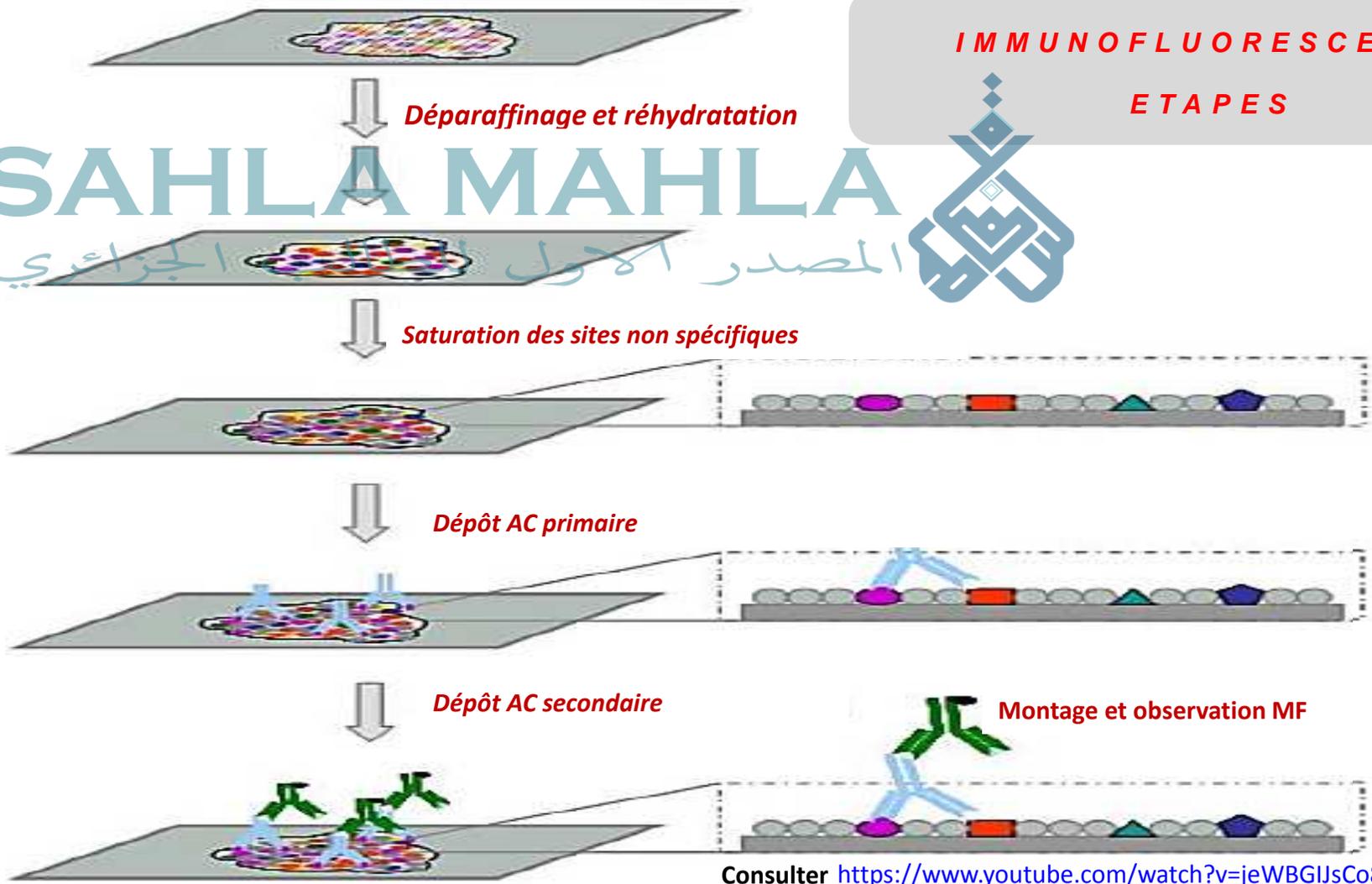


PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR L'IMMUNOFLUORESCENCE



IMMUNOFLUORESCENCE
ETAPES

SAHLA MAHLA
المصدر الأول الجزائري



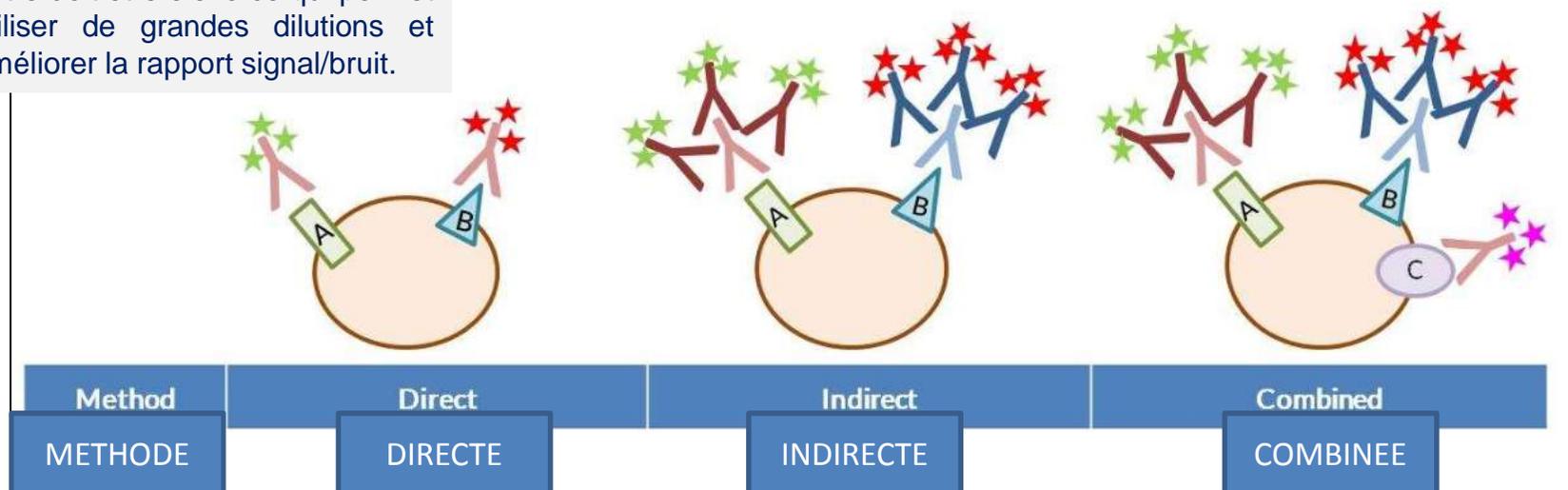
Consulter <https://www.youtube.com/watch?v=jeWBGIIjCo8>

DIFFERENTES METHODES D'IMMUNOFLUORESCENCE

CARACTERISTIQUE D'UN BON ANTICORPS

- Doit avoir une haute affinité/avidité pour son antigène (selon l'épitope, l'espèce, spécificité, spécificité)
- Le titre doit être élevé ce qui permet d'utiliser de grandes dilutions et d'améliorer la rapport signal/bruit.

المصدر الاول Comparison of Immunofluorescence Methods



IMMUNOFLUORESCENCE versus IMMUNOHISTOCHEMIE

IMMUNOFLUORESCENCE	IMMUNOHISTOCHEMIE
Faible coût et technique facile et rapide	
Grande sensibilité / Peu de bruit de fond	Plus faible sensibilité
Confocal	-
Co-localisations possibles	-
Montage aqueux : disparaît au cours du temps	Permet la conservation des lames
Extinction du signal sous UV microscope spécialement équipé, chambre noire	Microscope optique
Peu informative sur la morphologie Perte de la topographie et morphologie intérieure des tissus	Permet d'apprécier la morphologie des lésions

CYTOMETRIE EN FLUX

Analyse FACS*

* fluorescence activated cell sorting
en anglais (tri cellulaire induit par
fluorescence).

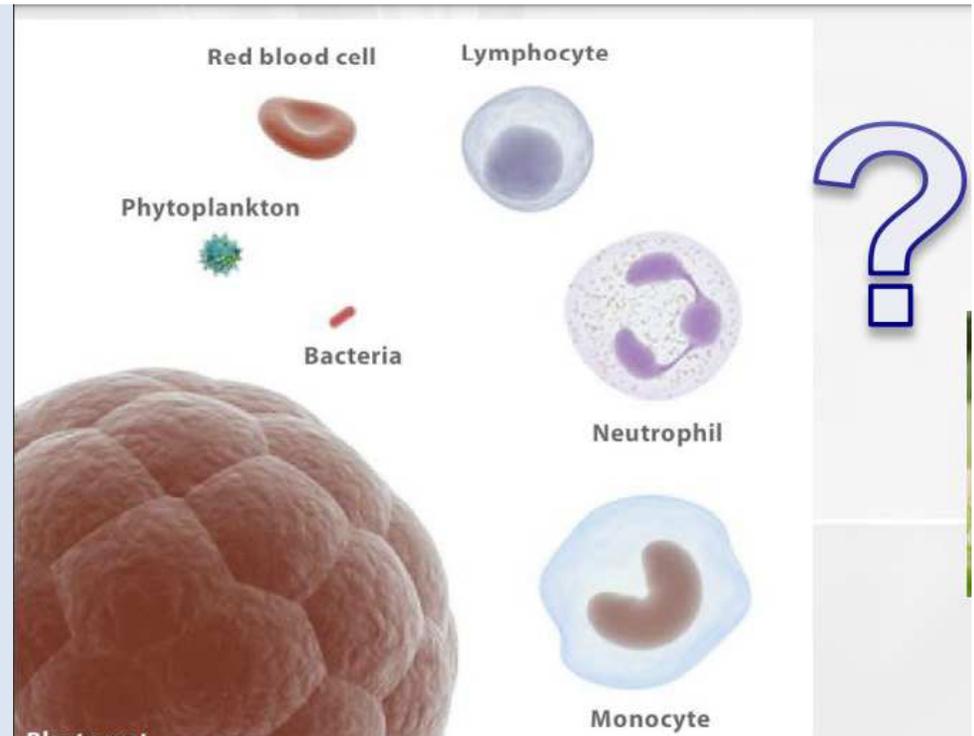
SAHLA MAHLA
الاول للطالب الجزائري
Cellules

Mesure



Flux

Mesure (-métrie) des
propriétés/caractéristiques
(physique et phénotypique)
des cellules (cyto)
transportées par un liquide
vecteur (flux) jusqu'à une
source d'excitation lumineuse
(un laser)





Monitoring de l'état immunitaire des patients dans différentes maladies:

SAHLA MAHILA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Ex. la numération des lymphocytes CD4+ pour le suivi des patients VIH+

- déficits immunitaires

- infections graves

- maladies inflammatoires chroniques MICI, SPA, PR ...

- auto-immunité DID, SEP ...

- au décours de traitement (immunostimulants, immunosupresseurs, vaccinations...)



Evaluation du pourcentage des différents types cellulaires que compte le système immunitaire

Applications.....

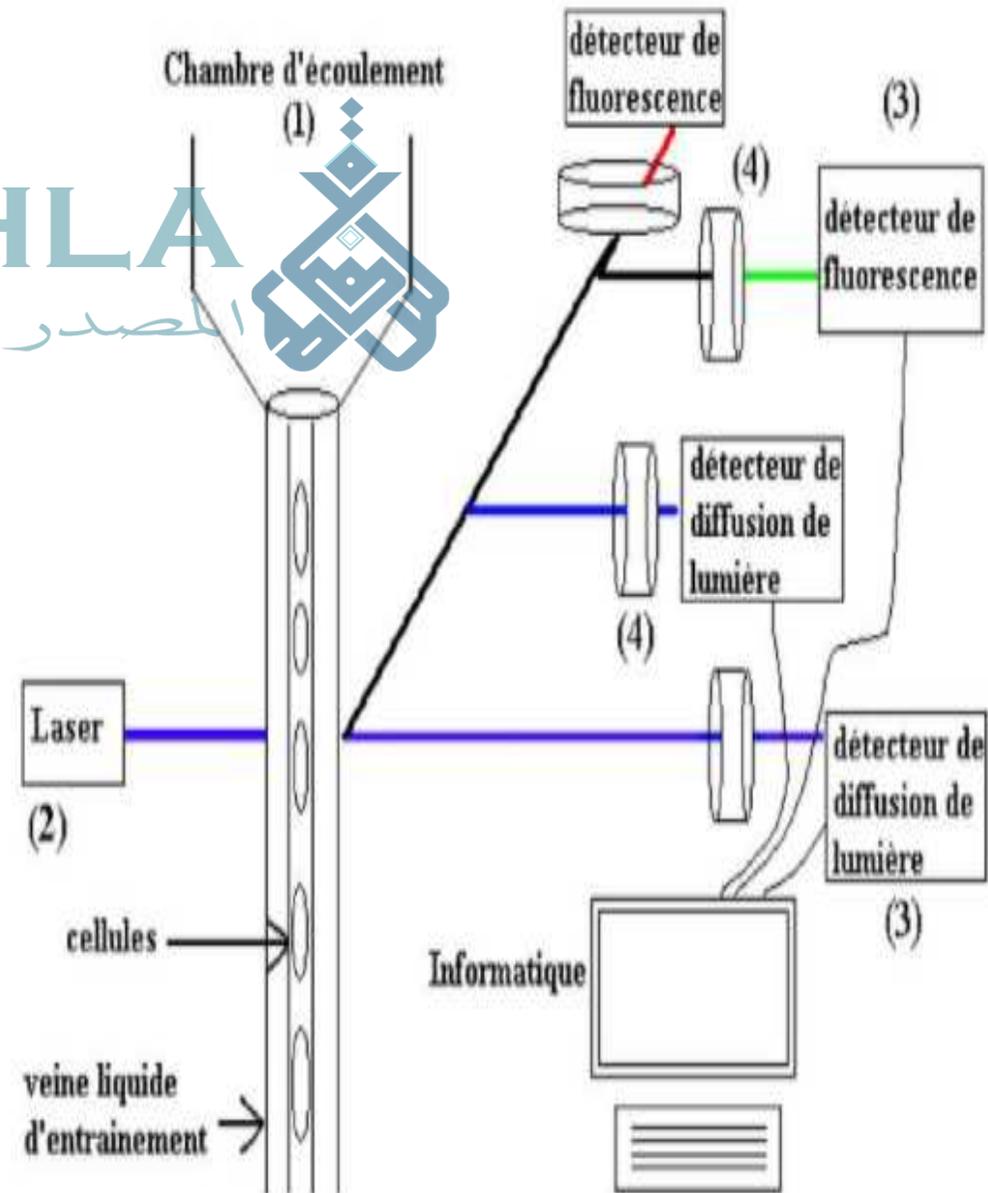
Les applications sont multiples. Avec la cytométrie, il est possible de :

المصدر الاول للطلاب الجزائري

- ▶ suivre une population de cellules par la taille et la granulosité du cytoplasme ;
- ▶ évaluer la présence de protéines membranaires sur des cellules vivantes ;
- ▶ trier des cellules vivantes selon l'expression de ces marqueurs ;
- ▶ évaluer la présence de protéines cytosoliques sur des cellules perméabilisées ;
- ▶ suivre un gène rapporteur fluorescent après transfection ;
- ▶ évaluer la viabilité d'une population de cellule, sa mortalité et le type de mort (apoptose ou nécrose).

PRINCIPE DE LA CMF

- Propulsion des cellules une à une à grande vitesse dans un flux hydrodynamique
- Passage devant une source lumineuse (laser)
- Récupération de la fluorescence issu d'un immunomarquage
- Ech: Sang, Lavage bronchoalvéolaire, ascite, épanchement pleural, cellules tissulaires après dissociation



Quelles sont les informations sur la cellule apportées par la cytométrie en flux (CMF)?

SAHLA MAHLA

Quelles informations sur la cellule ?



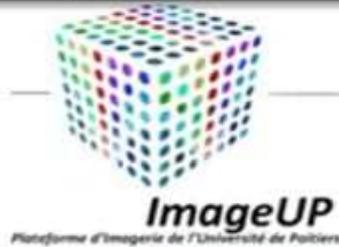
→ Sa taille (Forward scatter : FSC)

→ Sa granularité ou complexité interne (Side Scatter = SSC)

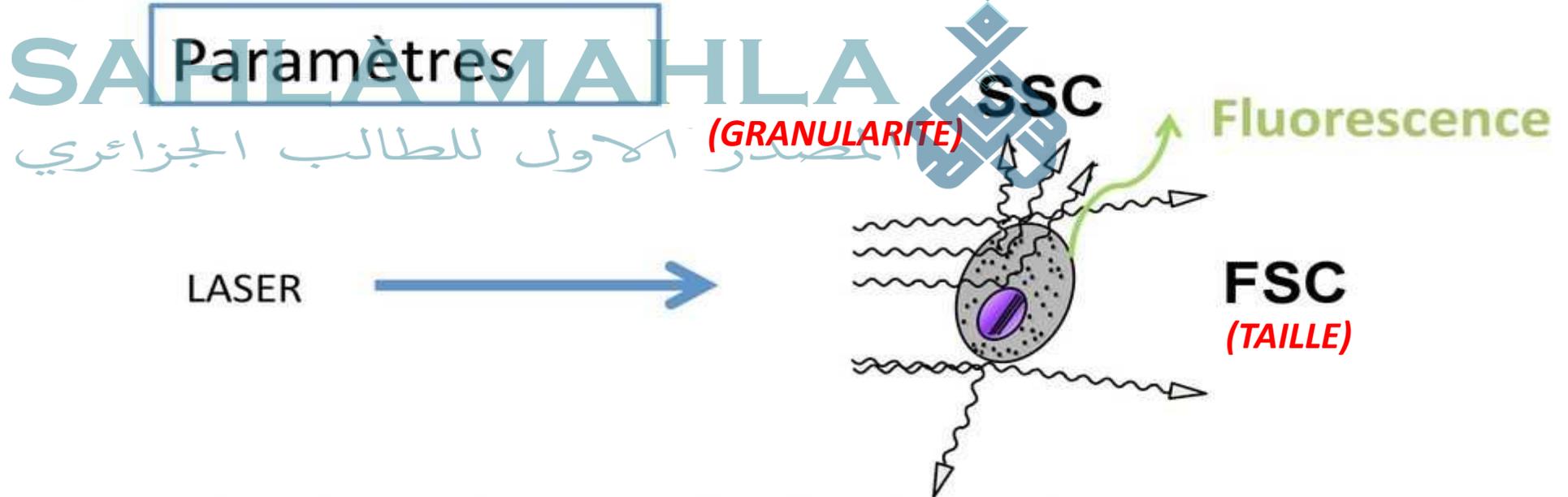
**DIFFUSION DE
LA LUMIERE**

→ Son intensité de fluorescence (en fonction des fluorochromes)

FLUORESCENCE

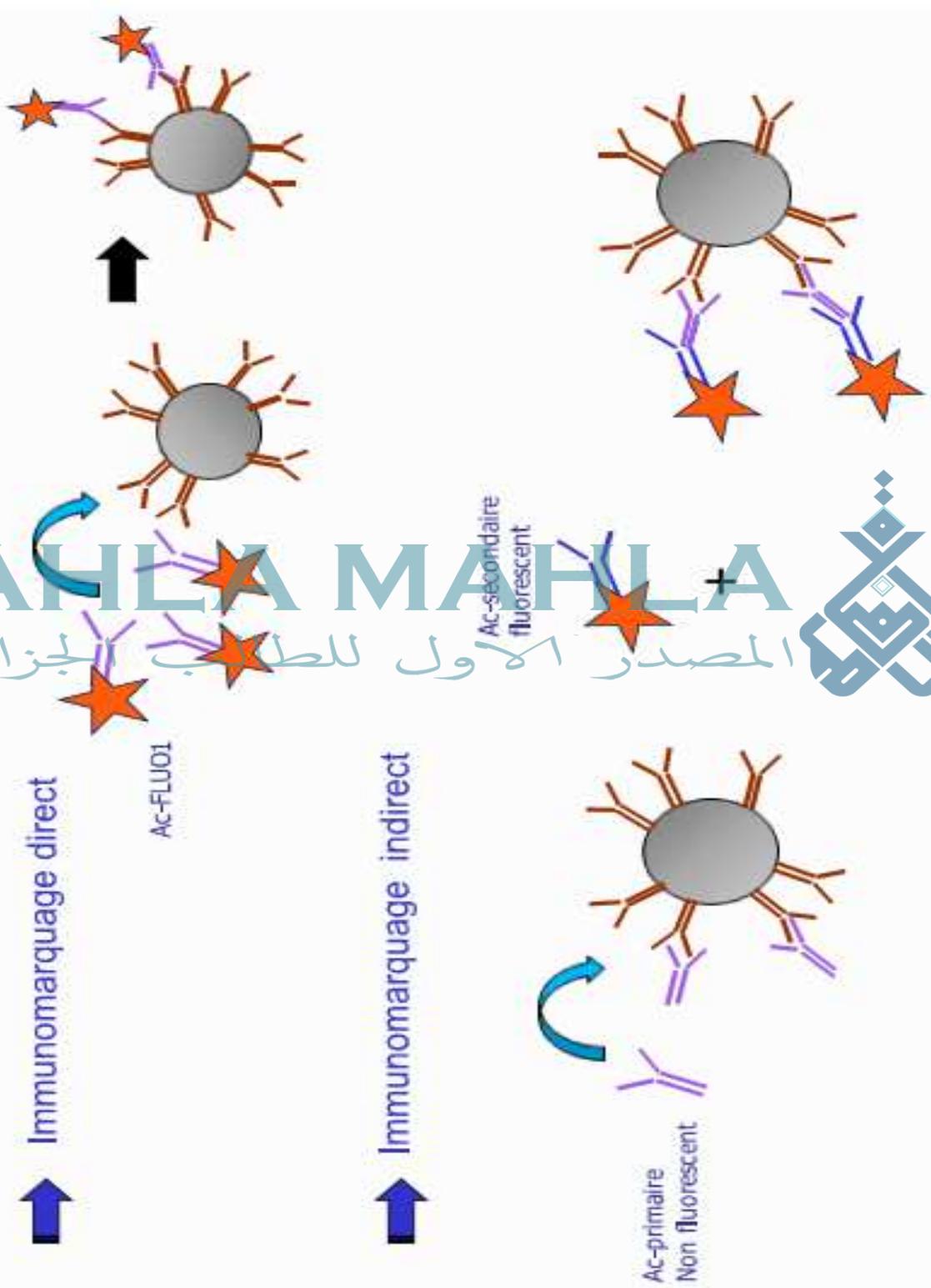


CYTOMETRIE EN FLUX: Analyses Multiparamétrique



- **FSC: Forward Scatter**—lumière diffractée
Dépend de la taille et de la surface cellulaire
- **SSC: Side Scatter**—lumière réfléchie et réfractée
Dépend de la granularité et de la complexité cellulaire
- **Fluorescence** **Intensité de la fluorescence**
(proportionnelle à l'intensité du marquage)

les immunomarquages



SAHILA MAHLA المصدر الأول للطالب الجزائري





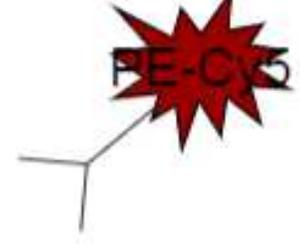
Immunophénotypage

ACM anti-CD3

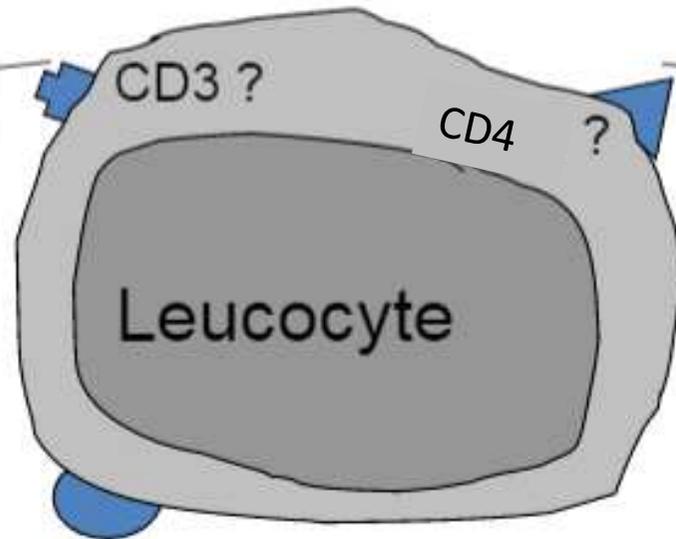
ACM anti-CD4

ACM anti-CD19

ACM anti-CD14



SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري



MARQUAGE MULTIPLE/ LIMITES
- De l'appareil : nombre de canaux de lecture du cytomètre
- Des réactifs : nombre de fluochromes ayant des spectres d'émission suffisamment distincts

➔ FITC⁺ PE⁺ APC⁻ PECy5⁻

CD4⁺ CD3⁺ CD19⁻ CD14⁻

iso-thiocyanate de fluorescéine (FITC)

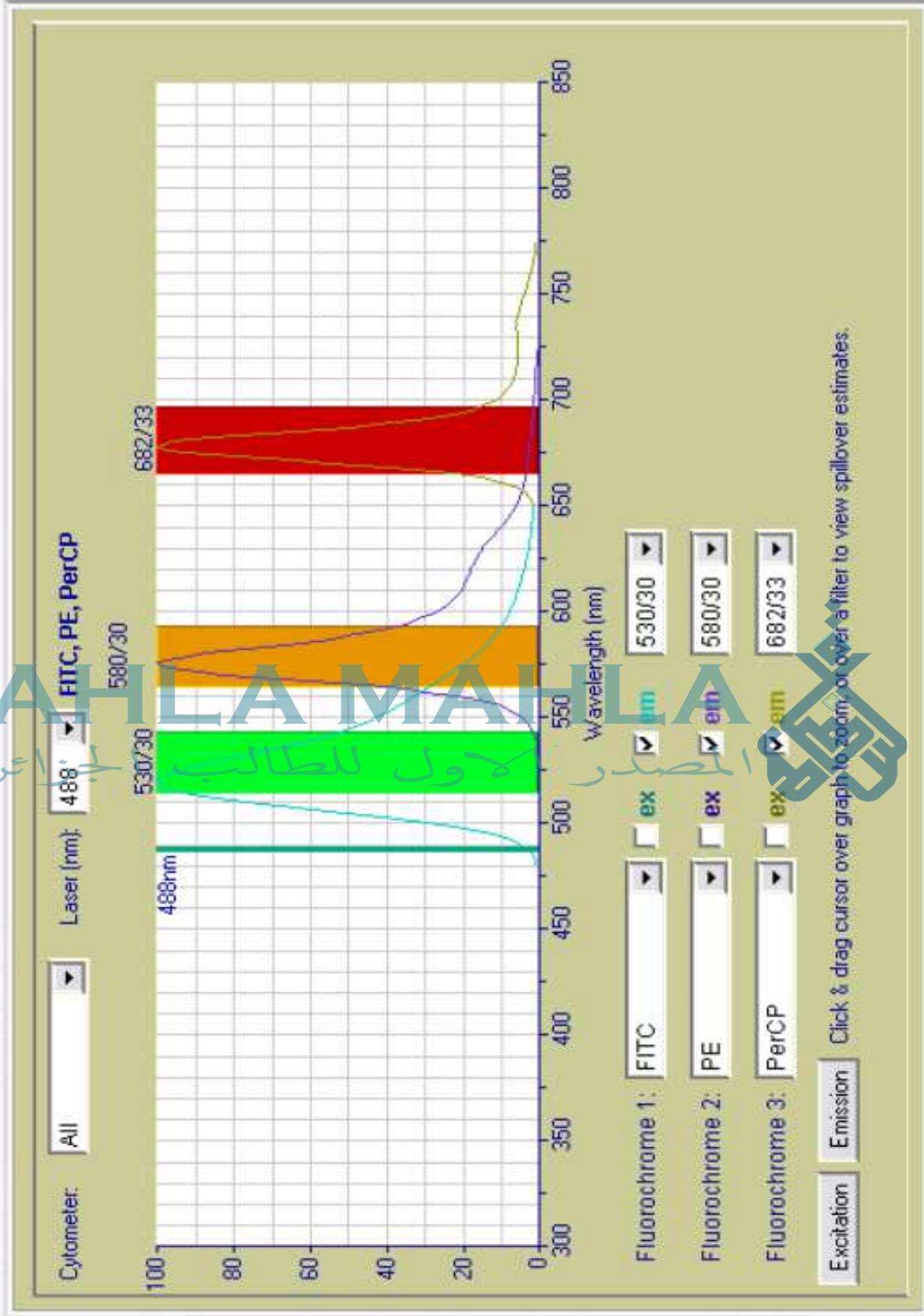
R-phycoerythrin PE

PE-Cyanin 5 tandem PE-CY5

Allophycocyanin APC

CD # : Cluster de différenciation

Pics d'émission de fluorescence de différents fluorochromes:



PRESENTATION DES RESULTATS

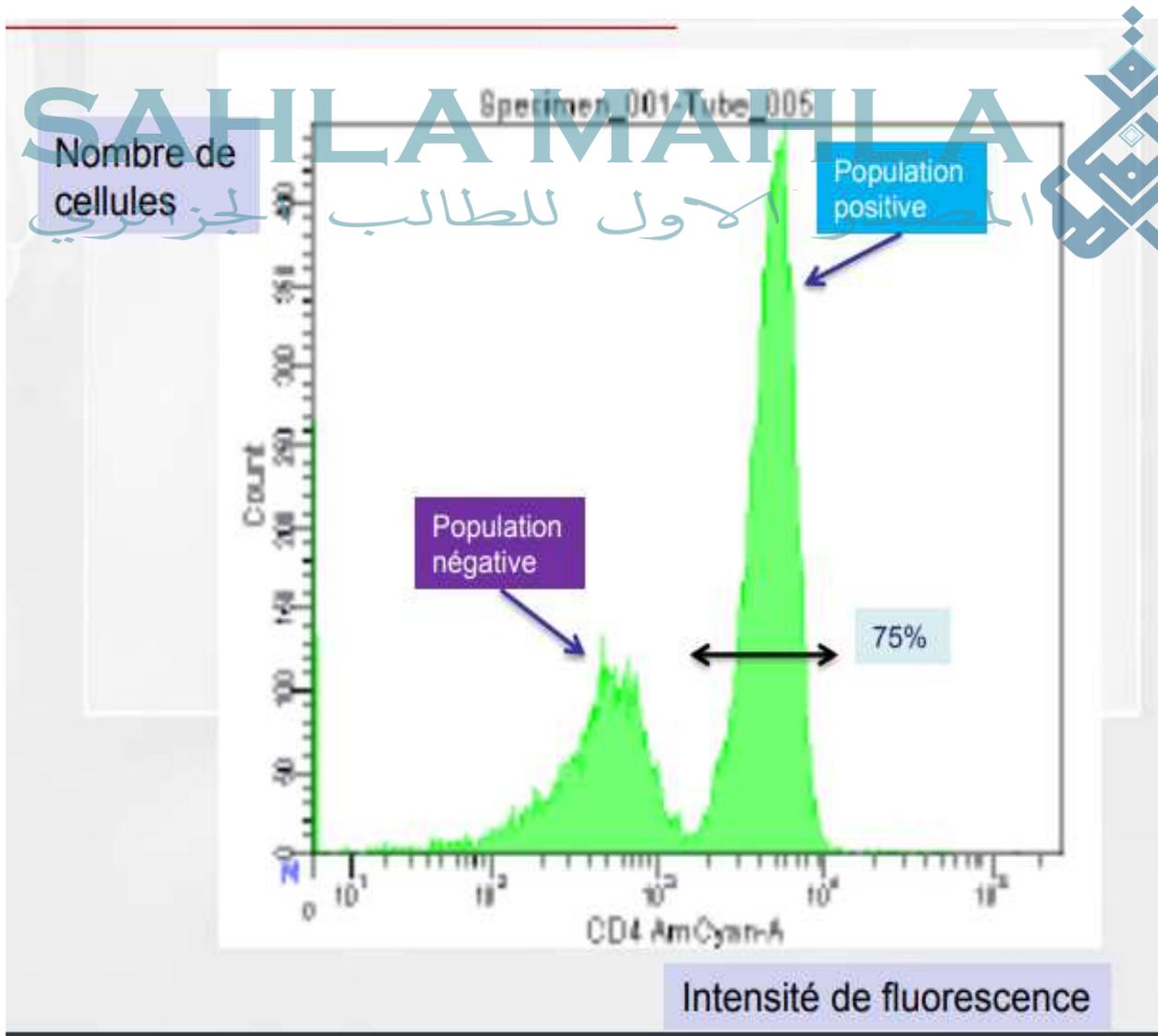
Les valeurs numériques issues des convertisseurs sont présentées sur les écrans des cytomètres sous deux formes :

- Des **histogrammes monoparamétriques** où l'axe des **abscisses** représente l'intensité du signal analysé et l'axe des **ordonnées** le nombre de cellules.
- Des **histogrammes biparamétriques** ou **cytogrammes** présentant deux signaux simultanément (DOT-plot, nuage de points)

HISTOGRAMME MONOPARAMETRIQUE

Dans la représentation monoparamétrique des données, on représente :

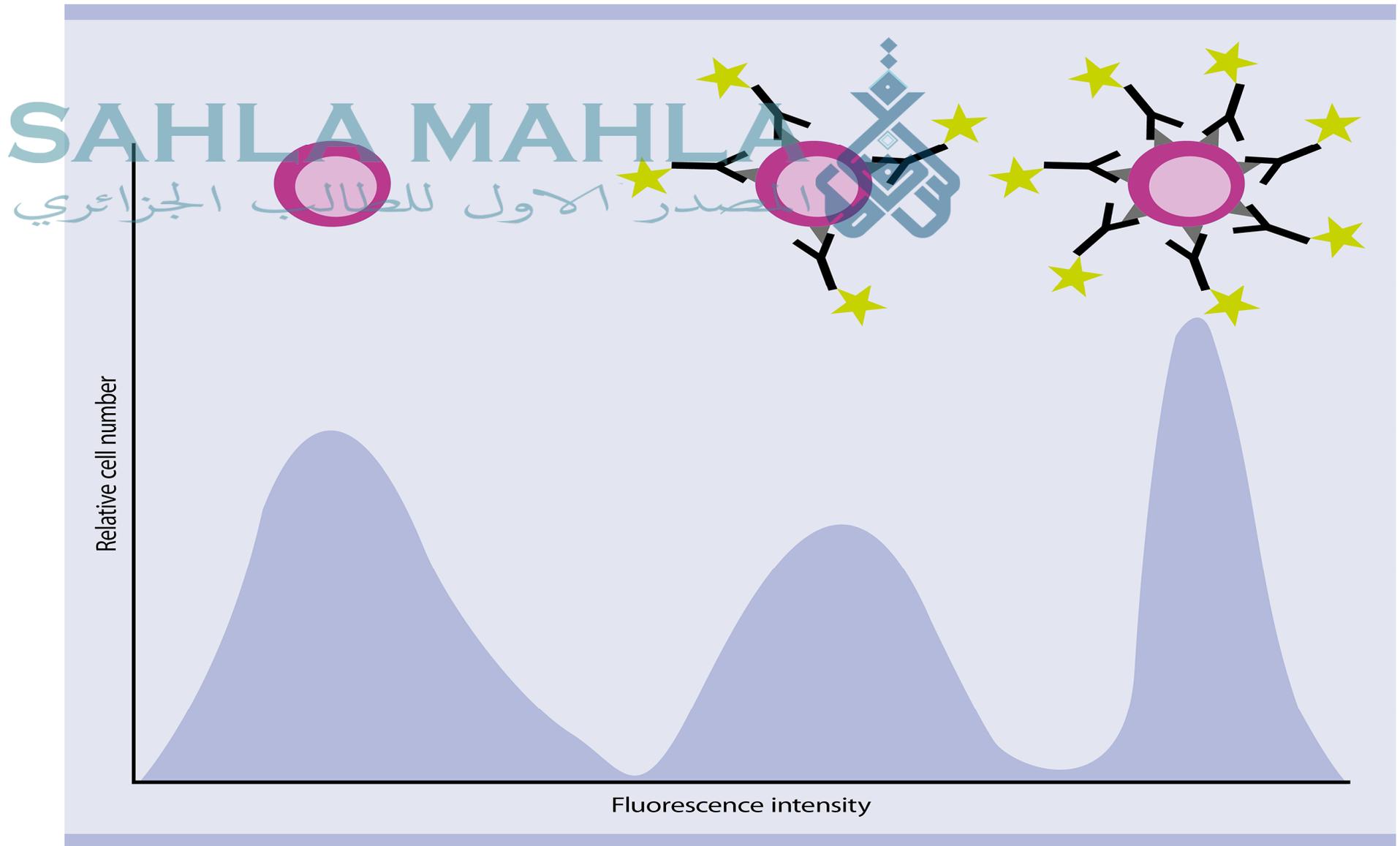
- **En ordonnée** : le nombre de cellules
- **En abscisse** : l'intensité de fluorescence



Le **1er pic** représente une fluorescence très faible/nulle. Les cellules n'ont PAS été marquées et sont donc non porteuses de l'Ag recherché.

La **2ème pic** représente une intensité majorée de fluorescence. Les cellules ont été marquées et sont donc porteuses de l'Ag recherché.

Histogramme de répartition des cellules suivant leur expression du marqueur : Univariate plots



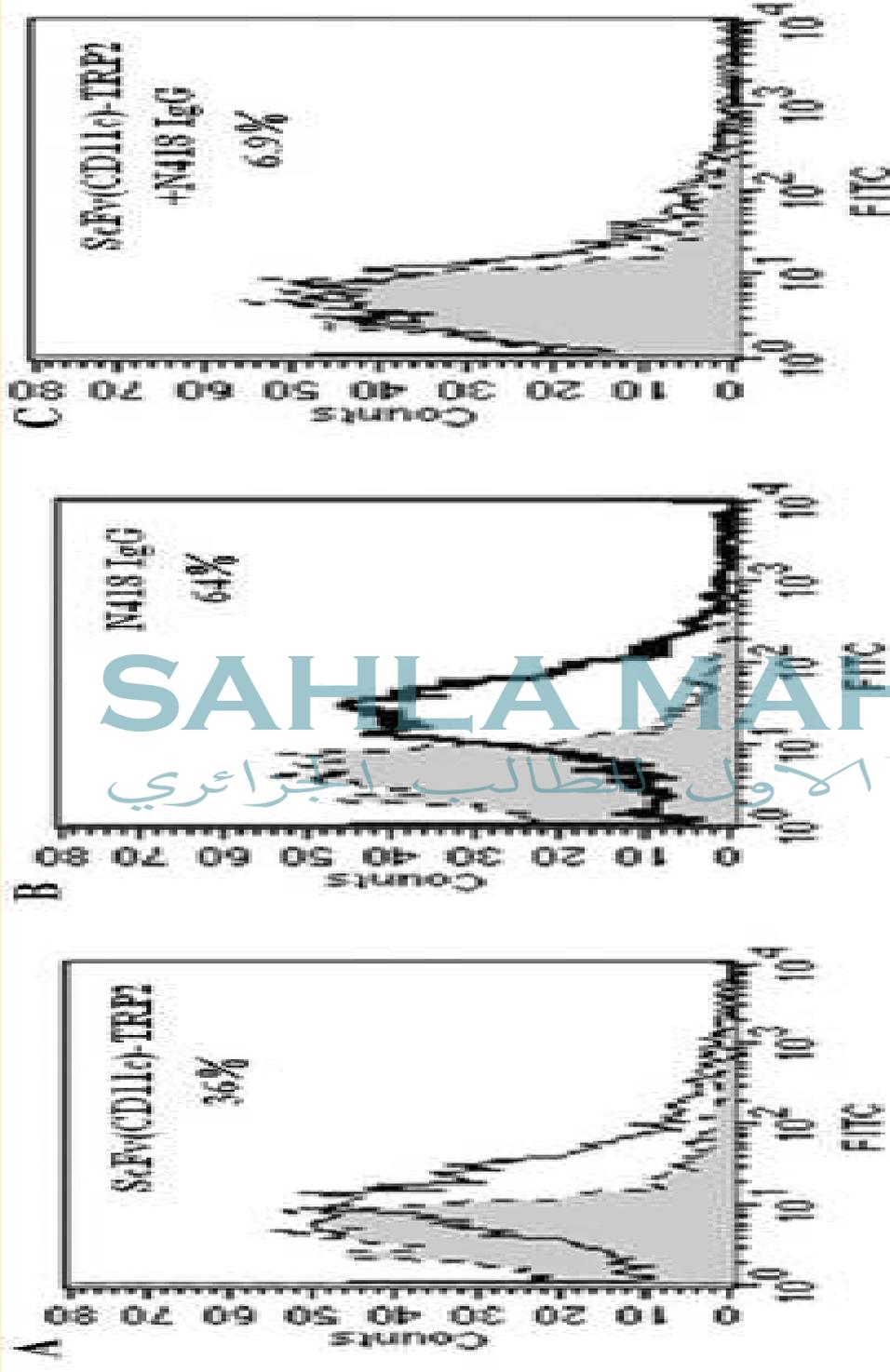


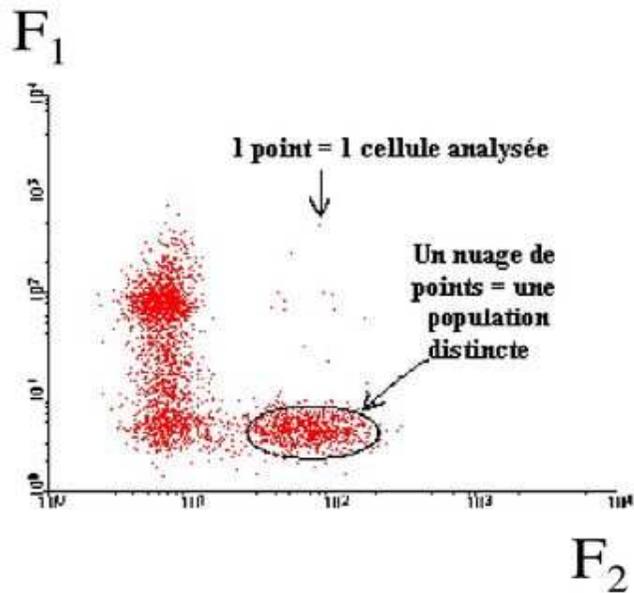
Fig. 6. The effect of ScFv(CD11c)-TRP2 binding to DCs was analyzed by flow cytometry. Unstained cells (negative control) are shown as shaded histograms; thin line, ScFv(CD11c)-TRP2-treated DC; thick line, N418 antibody-treated DC. (A) DCs were cultured with 200 μ g/ml purified ScFv(CD11c)-TRP2, secondary reagents were the FITC-labeled anti-His antibody. (B) DCs were cultured with a saturated concentration of N418 antibody, secondary antibody was the FITC-labeled anti-hamster antibody. (C) DCs were cultured with a saturated concentration of N418 antibody, followed by purified ScFv(CD11c)-TRP2 after washing and FITC-labeled anti-His antibody.

Représentation biparamétrique (Dot Plot)

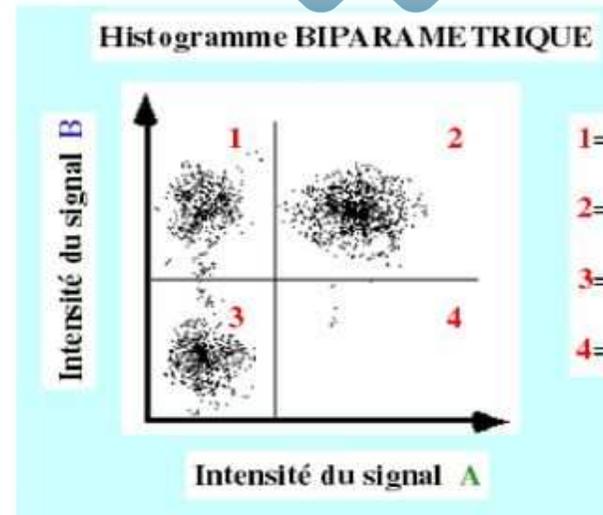
- ⇒ **Histogramme biparamétrique:** "dot-plot" = association de deux paramètres :
- deux diffusion de la lumière : **FS - SSC**
 - deux fluorescences, par exemple: **FL1-FL2**
 - une fluorescence et une diffusion de la lumière, par exemple : **SSC-FL1**.

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



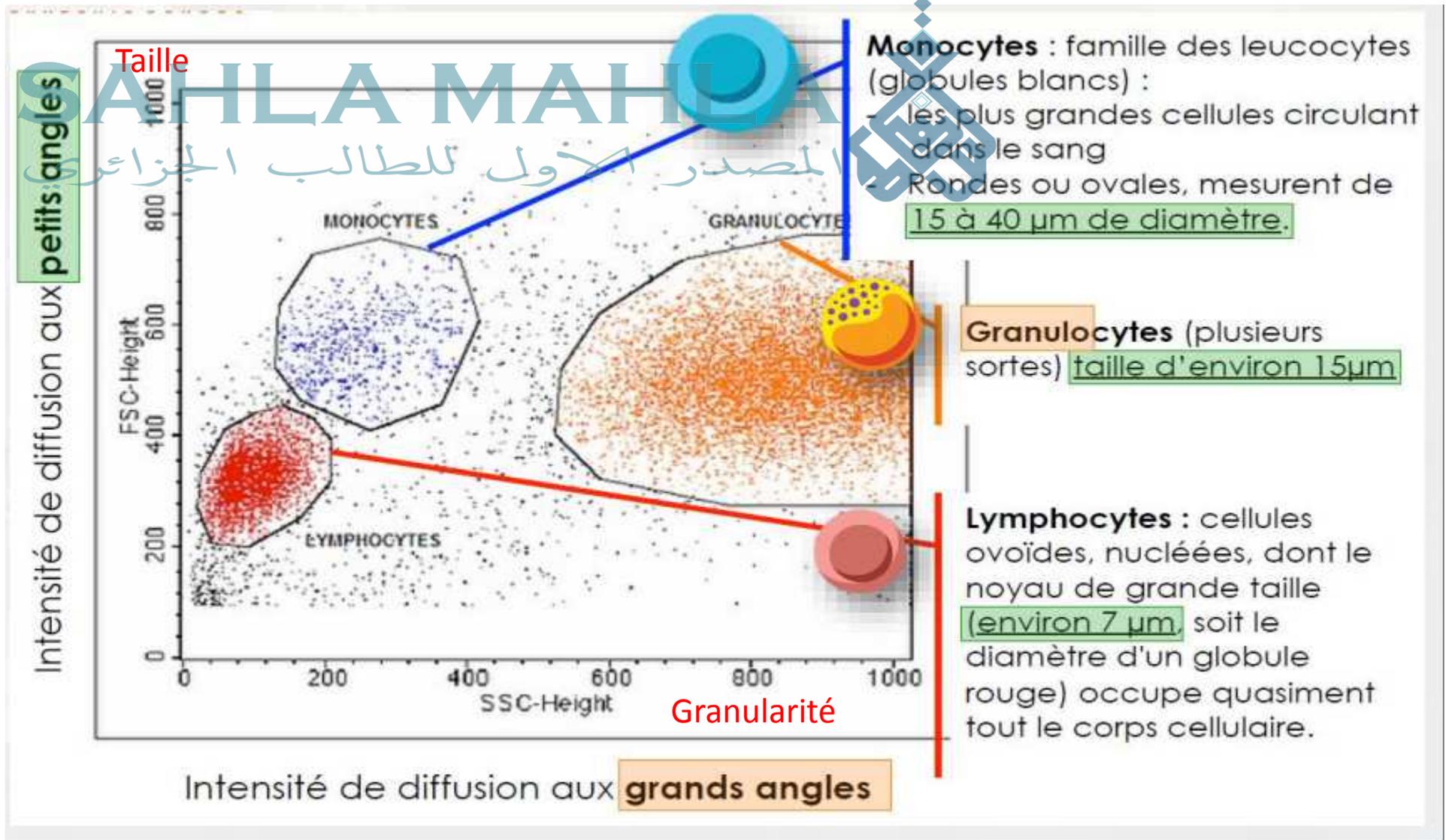
Quelle intensité de fluorescence de chaque population?



Quelle sont les caractéristiques des populations 1, 2, 3, et 4?

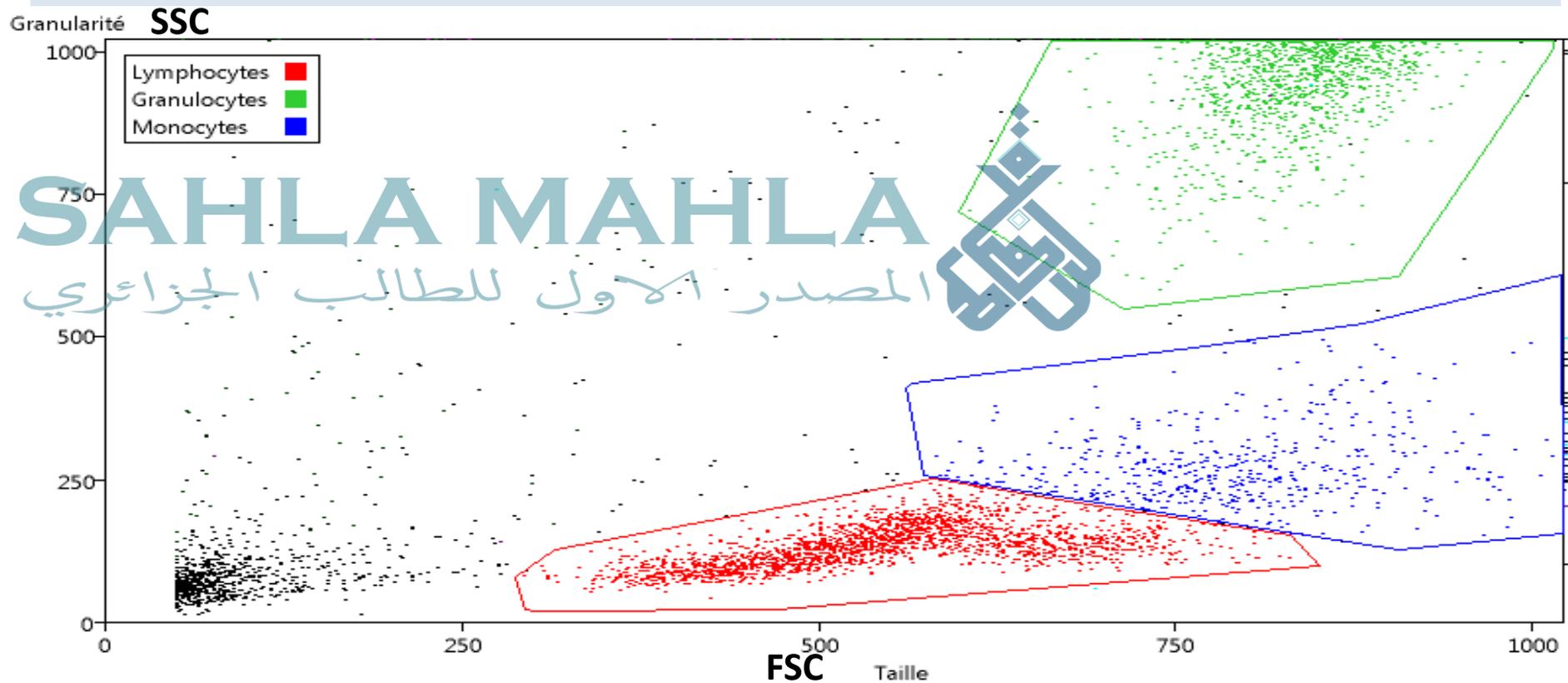
Représentation biparamétrique : DES DONNÉES MORPHOLOGIQUES

La représentation de la **taille** (FSC) et de la **granularité** (SSC) « Dot Plot »



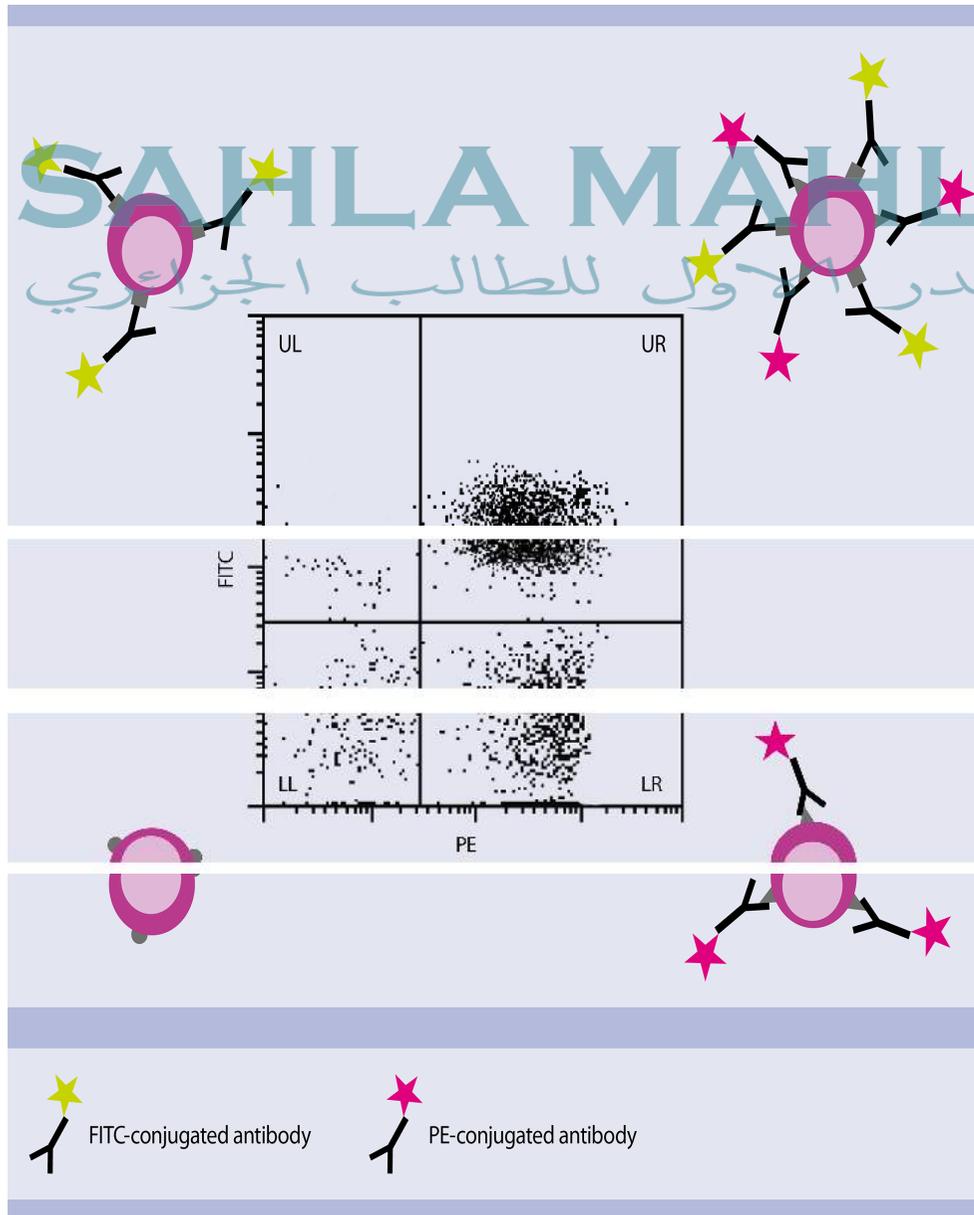
Représentation biparamétrique : DES DONNÉES MORPHOLOGIQUES

La représentation de la **taille** et de la **granulosité** « Dot Plot »



Signal FSC	Signal SSC	Type cellulaire
Faible → petit	Faible → réfringent	Lymphocytes
Moyen	Moyen	Monocytes
Fort → gros	Fort → granuleux	Granulocytes Macrophages

Représentation biparamétrique : Dot plot (DEUX SIGNAUX DE FLUORESCENCE)



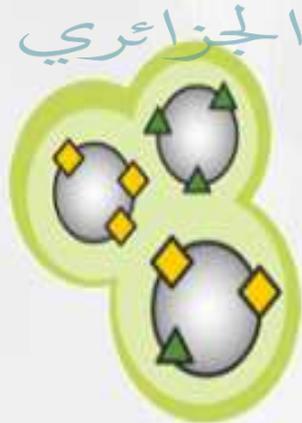
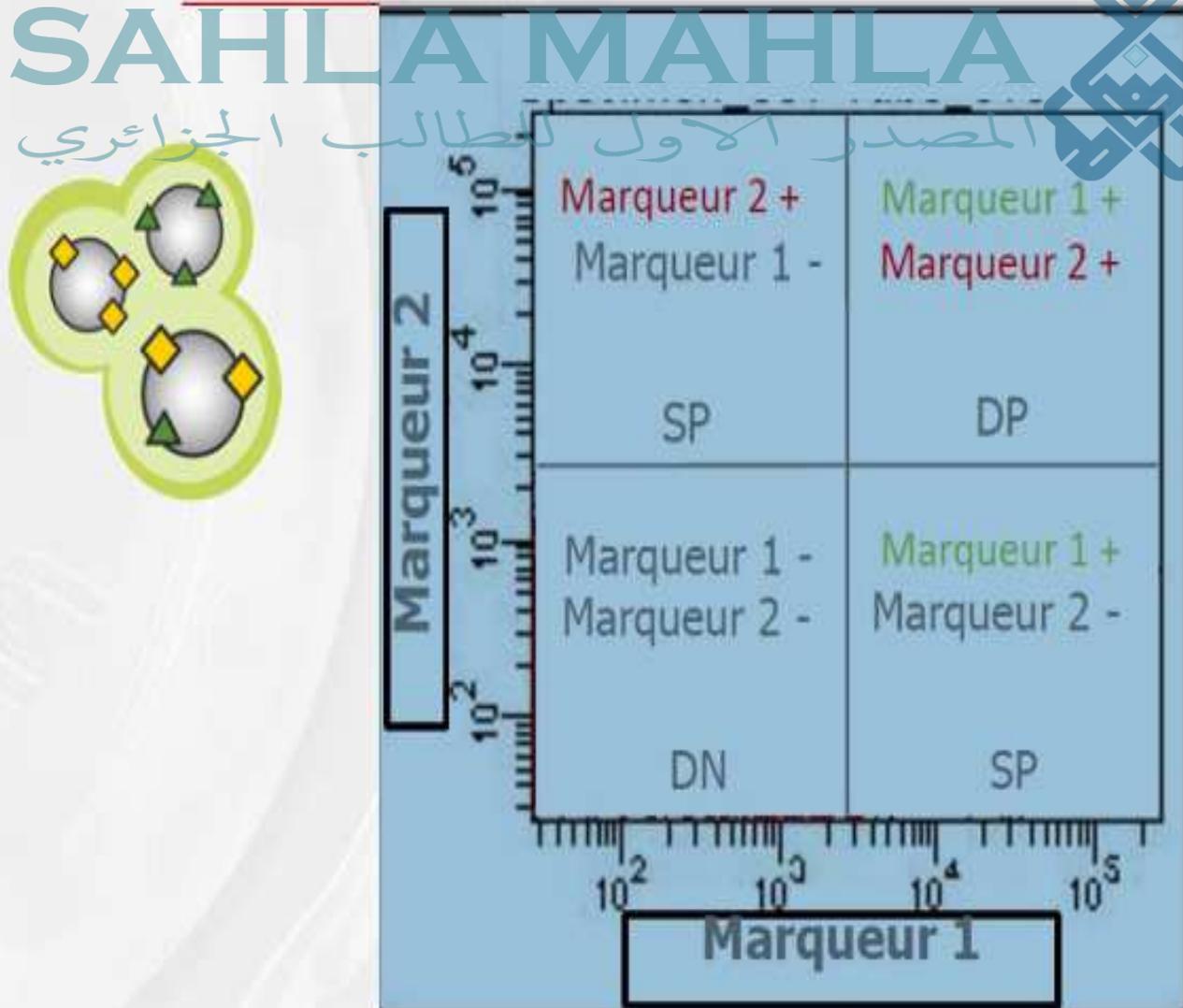
Dans la représentation biparamétrique, on représente **2 signaux de fluorescence** l'un par rapport à l'autre.

On obtient des **nuages de points** et chaque point représente une cellule. On pourra alors déterminer si les cellules sont :

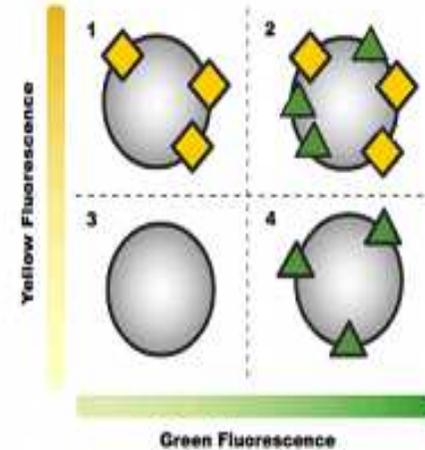
- **négatives** = non porteuses de l'Ag de surface recherché (double négative)
- **simples positives** = porteuses de l'un des deux Ag de surface recherché et lequel
- **doubles positives** = porteuses des deux Ag de surface recherchés

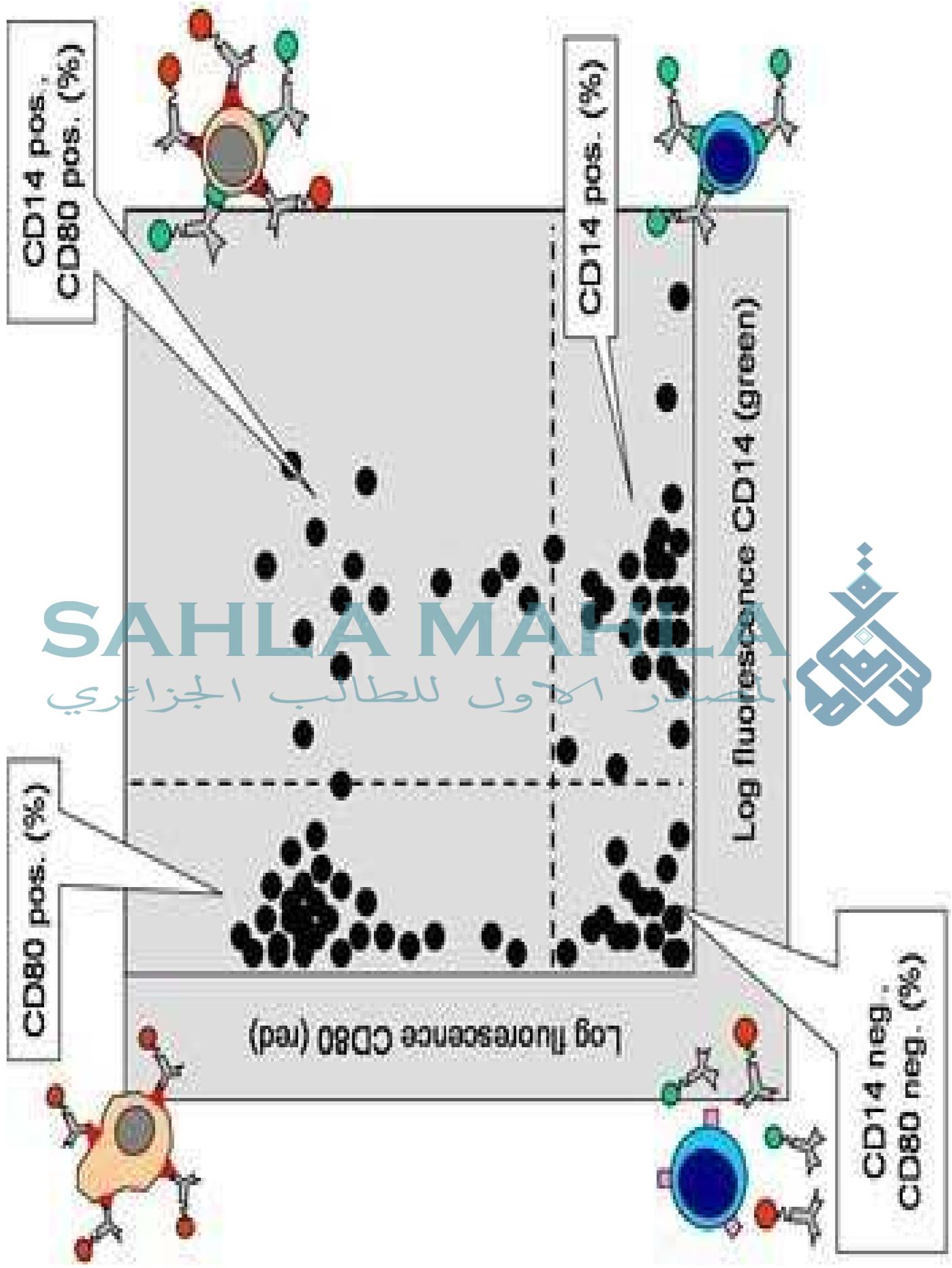
Représentation biparamétrique : Dot plot (DEUX SIGNAUX DE FLUORESCENCE)

Analyse à 2 paramètres Dot-plot



DN: double négatifs
SP : simple positifs
DP : double positifs





SAHLA MAHILA

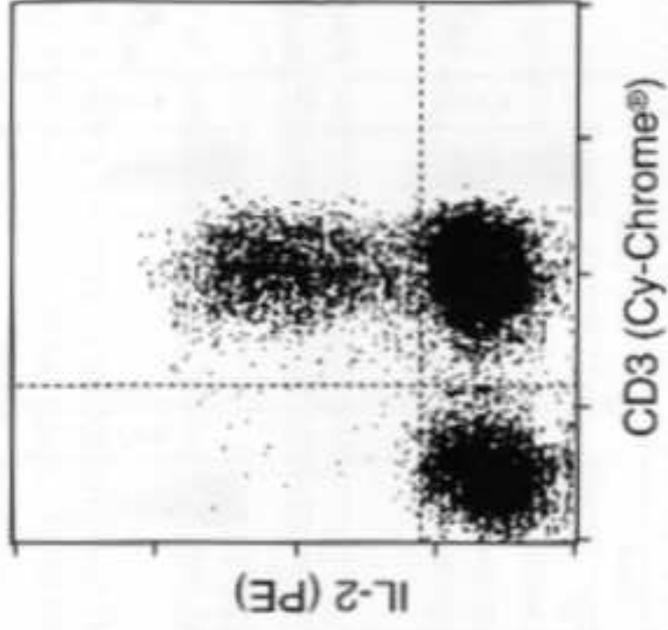
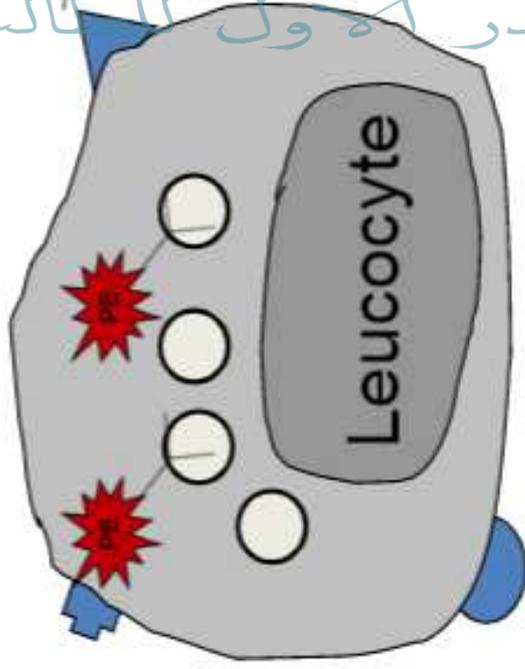
المسار الاول للطالب الجزائري





Marquage intracellulaire

Perméabilisation des cellules



- Sécrétion
- Signalisation ...

