



LES ANTICORPS POLYCLONAUX

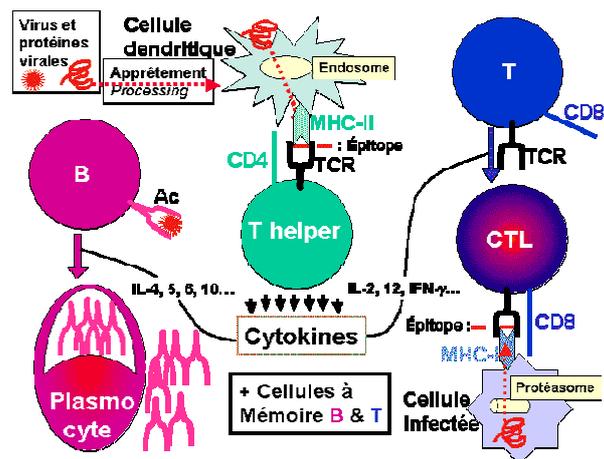
TD Immuno S5 2014-2015

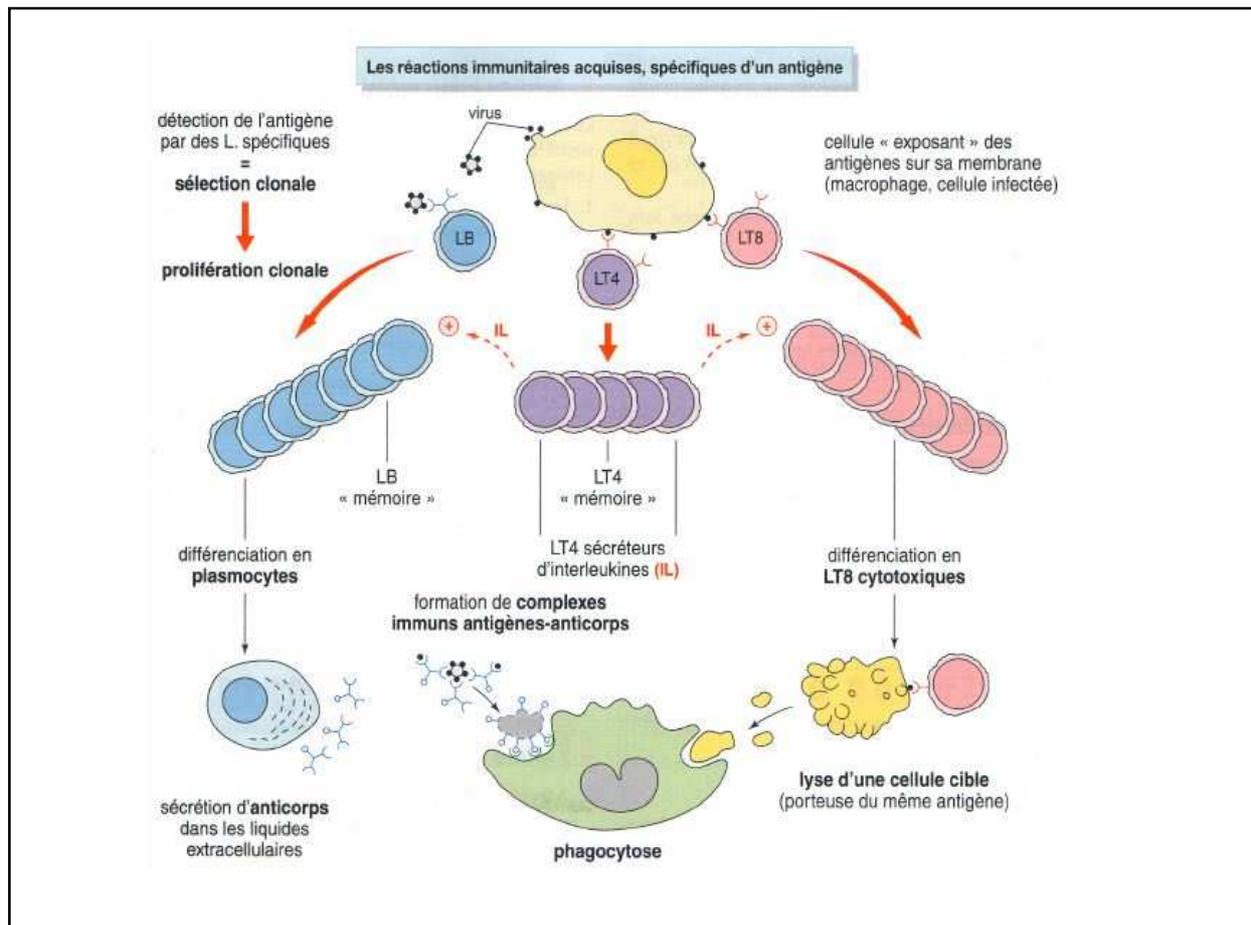
Pr : Nadia . Dakka

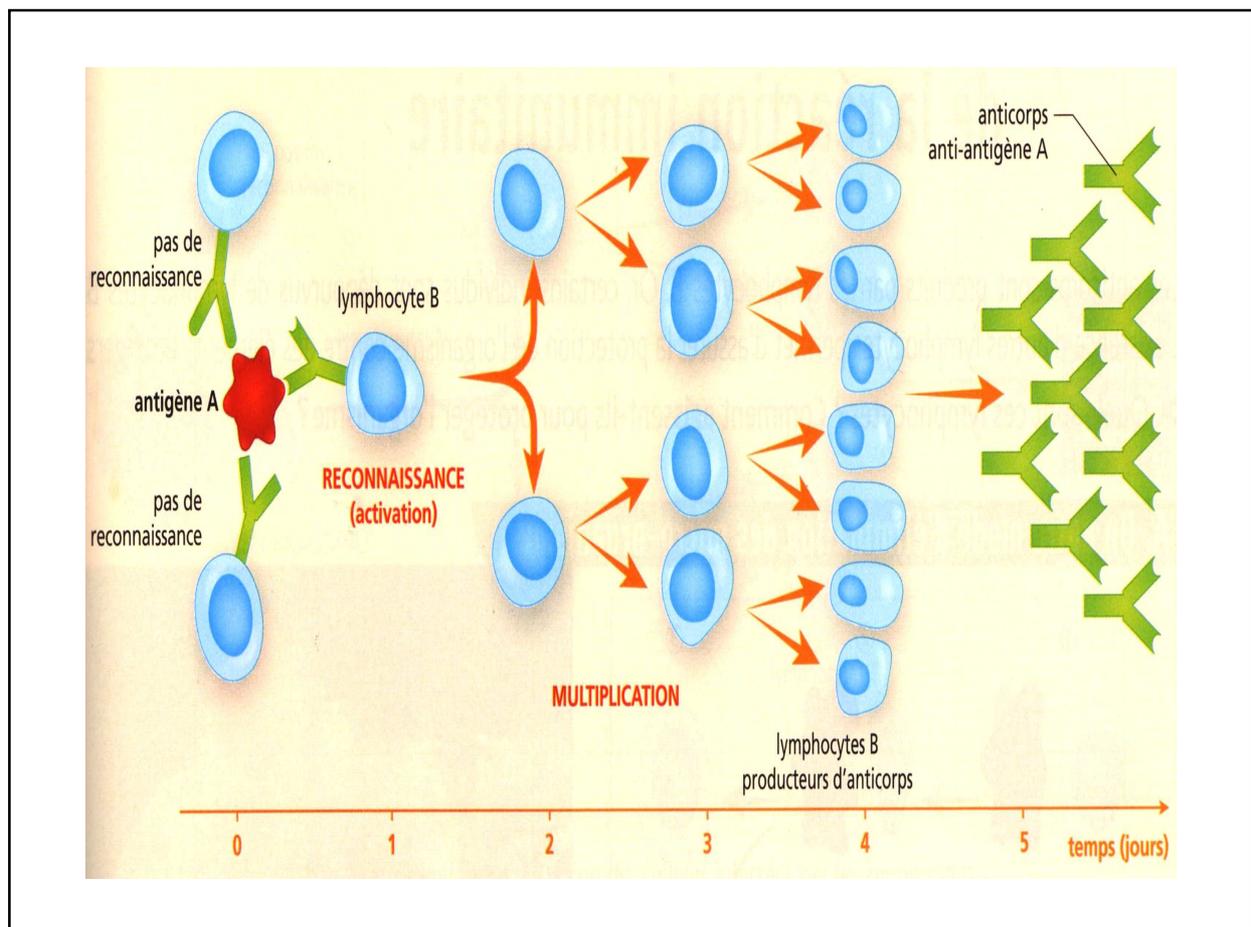
RÉACTION IMMUNITAIRE ACQUISE

Réponse cellulaire adaptative

- **Lymphocytes T** qui contribuent à l'immunité à médiation cellulaire ou cytotoxique.
- **Lymphocytes B** qui sont responsables de l'immunité à médiation humorale.

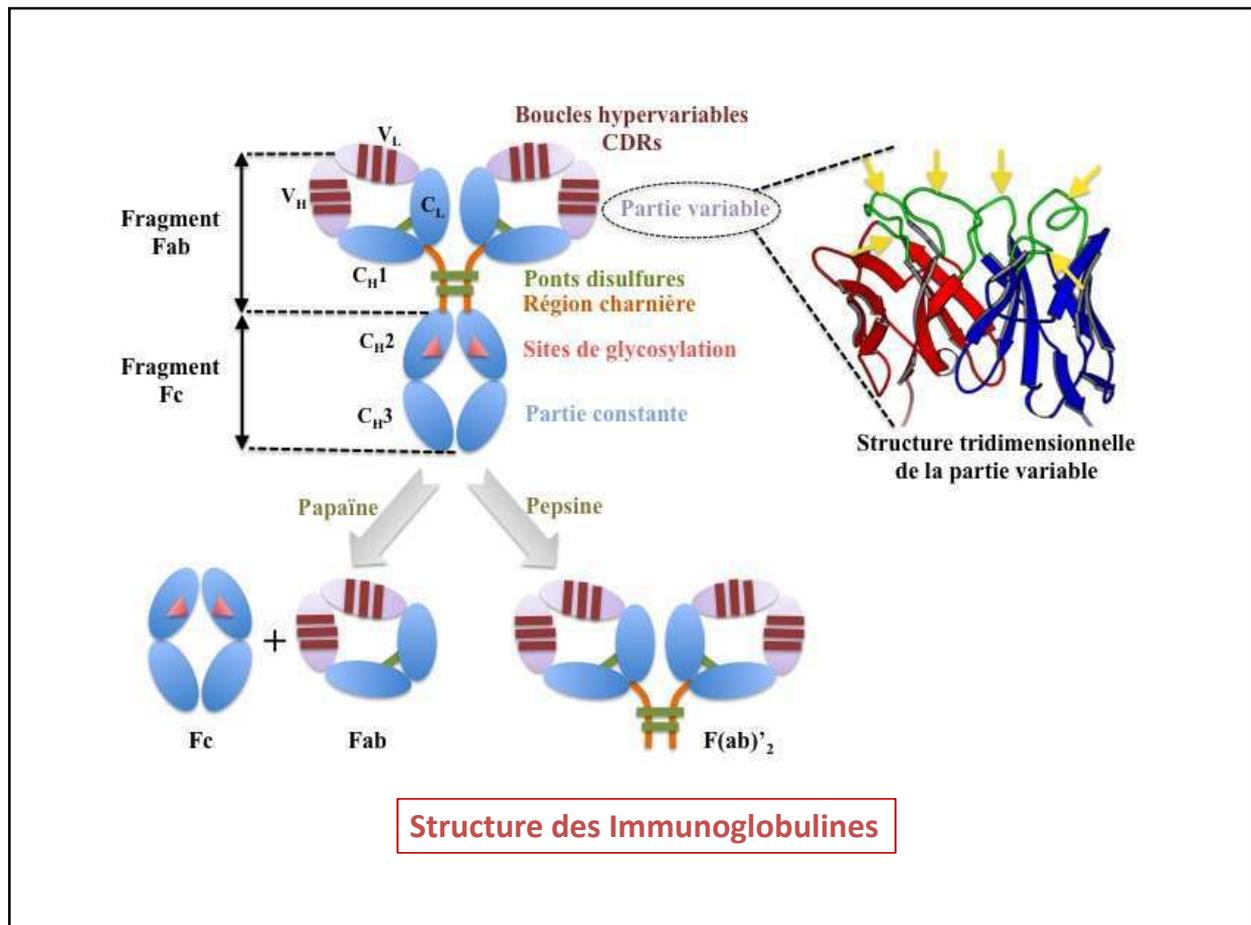






- ★ **Anticorps** (immunoglobulines) sont des **glycoprotéines membranaires** ou **solubles** produites par des **plasmocytes**.
- ★ **Plasmocytes** : lymphocytes B différenciés, après activation par un immunogène (antigène) ou corps étranger (agents pathogènes, protéines, polysaccharides et parfois des lipides ou des acides nucléiques).
- ★ **Anticorps** sont présents en permanence dans le corps et circulent dans les principaux liquides de l'organisme: le sang et la lymphe. Les anticorps peuvent être membranaires ou circulants.
- ★ **Anticorps** en se fixant sur des molécules du **non soi**, permettent leur prise en charge par le système immunitaire afin de les neutraliser et/ou de les éliminer.

STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES



**CLASSES ET SOUS
CLASSES
D'IMMUNOGLOBULINES**

★ Anticorps humains sont répartis en **cinq classes** ou cinq **isotypes** :
IgG, IgM, IgA, IgD et IgE.

Chaque catégorie d'anticorps est caractérisée par sa chaîne lourde :

IgG : gamma, IgM : mu, IgA : alpha, IgD : delta et IgE : epsilon

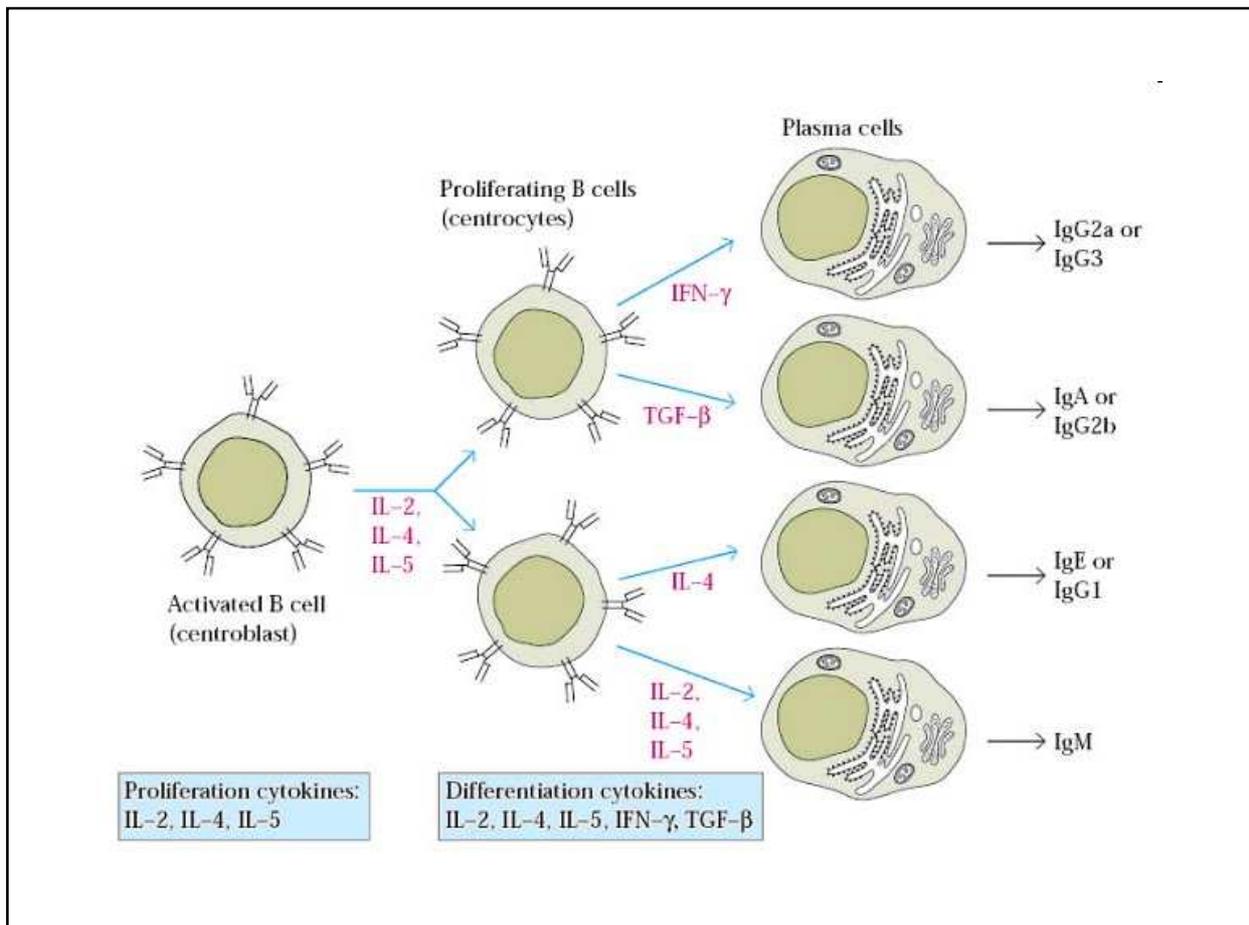
Chaque chaîne lourde est associée à une chaîne légère de sous classe **kappa** ou **lambda**.

- **IgG** : 4 sous-classes (IgG1 à 4)

- **IgA** : 2 sous-classes (IgA1, IgA2), dues à un polymorphisme dans

les régions conservées de la chaîne lourde.

★ La classe et la sous-classe conditionnent la structure et la fonction de l'anticorps dans la réponse immunitaire.



RÉPARTITION ET FONCTION
DES IMMUNOGLOBULINES

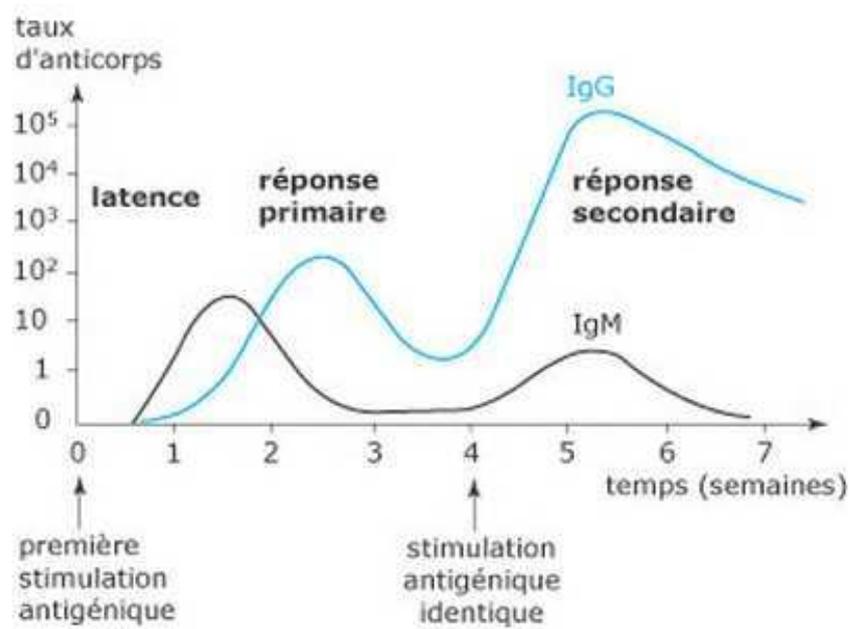
★ **IgMs** se retrouvent en faible quantité dans le sang. Ce sont les premières Igs produites suite à l'entrée d'un « non-soi » dans l'organisme.

Elles sont responsables de la réponse **immunitaire primaire**. Elles sont exprimées à la surface des lymphocytes B, sous forme de **BCR** (B Cell Receptor) ou peuvent être circulantes. Elles sont **pentamériques**.

★ **IgGs** de forme **monomérique**, interviennent principalement dans les réponses **immunitaires secondaires** succédant à la réponse primaire .

Elles induisent la neutralisation et la destruction des « non-soi » pénétrant l'organisme.

A cause de leur affinité, de leur spécificité et surtout de leur durée de vie, ce sont les Igs les plus utilisés en tant qu'anticorps à visée thérapeutique .



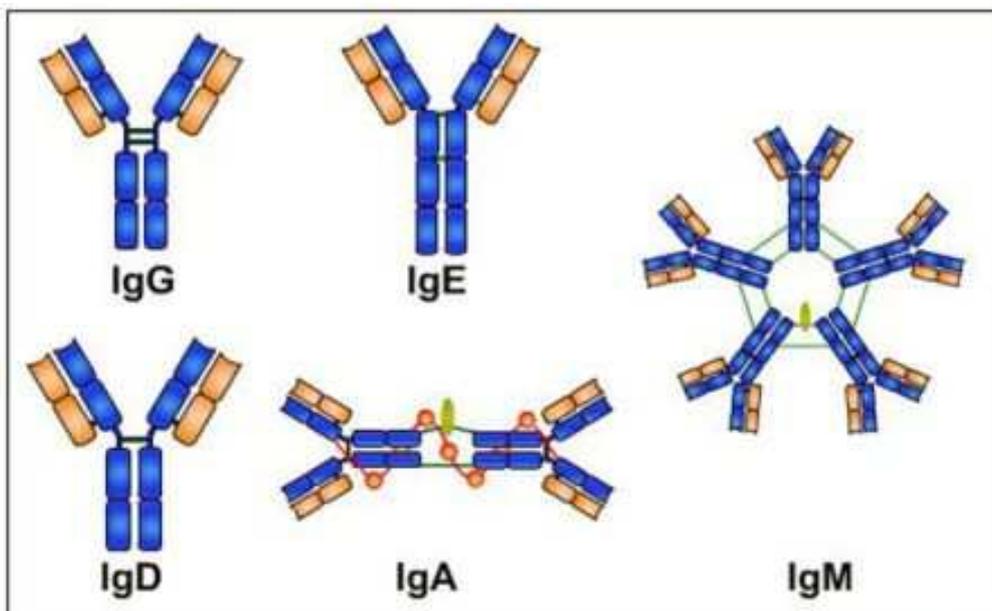
Réponses anticorps primaire et secondaire

★ **IgA** : se retrouvent majoritairement dans les fluides corporels (salive, lait, larmes, sécrétions nasales, génitales, mucus bronchique, digestif).

Les **IgA** sont **multimériques** et assurent la **protection au niveau des points d'entrée de l'organisme**.

★ **IgD** sont exprimées essentiellement à la membrane des lymphocytes B matures. Les **IgD** ont la fonction de **récepteur à l'antigène** (BCR).

★ **IgE** sont impliquées dans les **phénomènes allergiques** et dans l'immunité antiparasitaire. Elles se retrouvent sous forme **monomérique**.



IgM: Ac naturel produit dès la naissance (G sanguin);
IgG: principaux Ac sécrétés après les IgM;
IgE: Ac des allergies; IgA : Ac des muqueuses

★ **Immunoglobulines** sont des **glycoprotéines** (résidus glucidiques) associés au niveau du **fragment Fc (CH2)**.

★ **Glycosylations** au niveau du **Fc** jouent un rôle dans **la stabilité et la fonction de l'anticorps**.

★ Nombre et la localisation des glycosylations varient en fonction de l'isotype de l'anticorps.

Les IgGs présentent deux N-glycosylations des domaines CH2, sur l'Asn297: jouent un rôle dans l'orientation du CH2 et dans l'interaction du Fc avec les récepteurs des cellules effectrices. Cette glycosylation intervient également dans la stabilité des IgGs.

Le type de glycosylation joue un rôle sur **les fonctions effectrices *in vivo* de l'anticorps en modulant l'affinité du Fc pour son récepteur**.

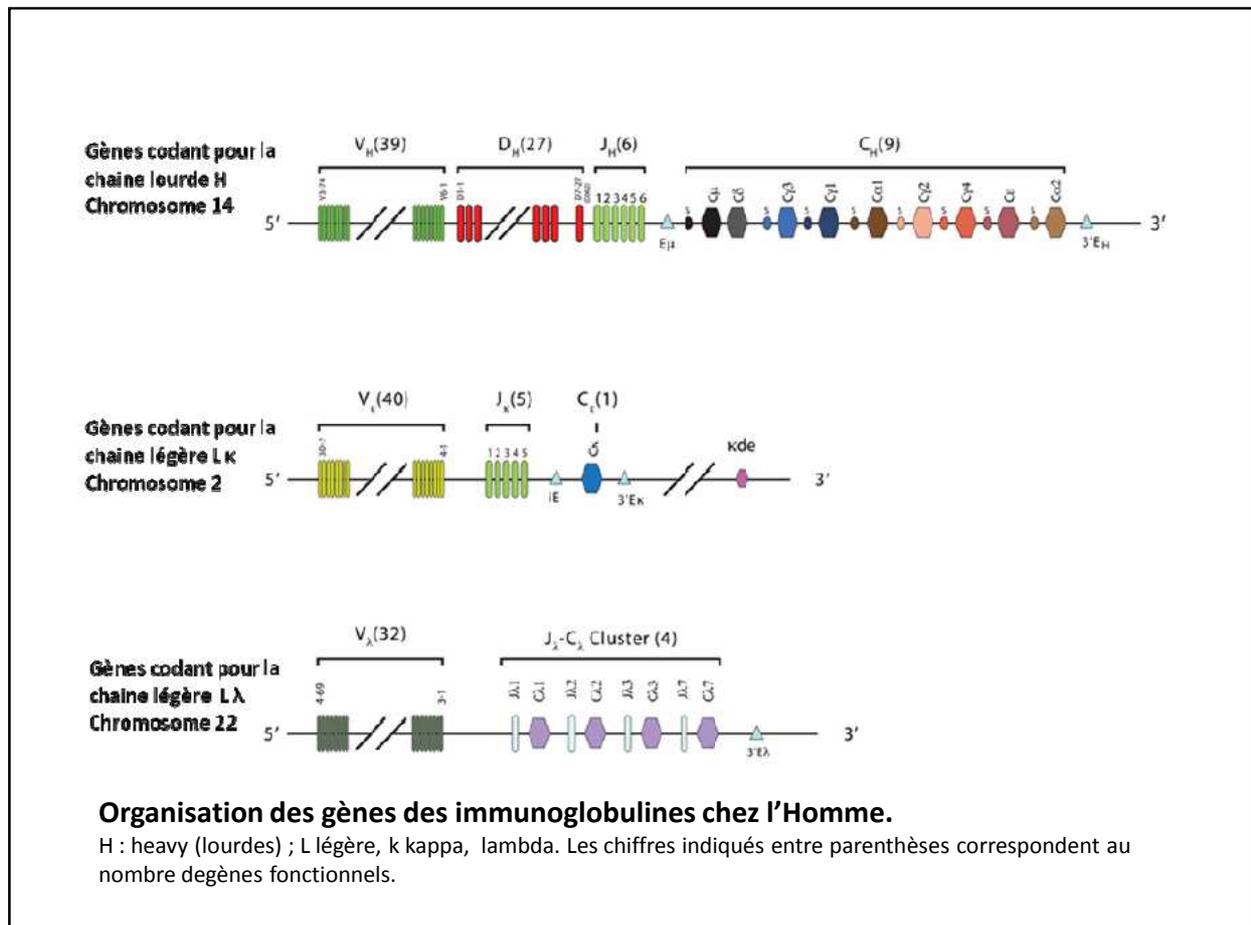
La demi-vie des anticorps est variable selon **l'isotype** de **l'anticorps**.

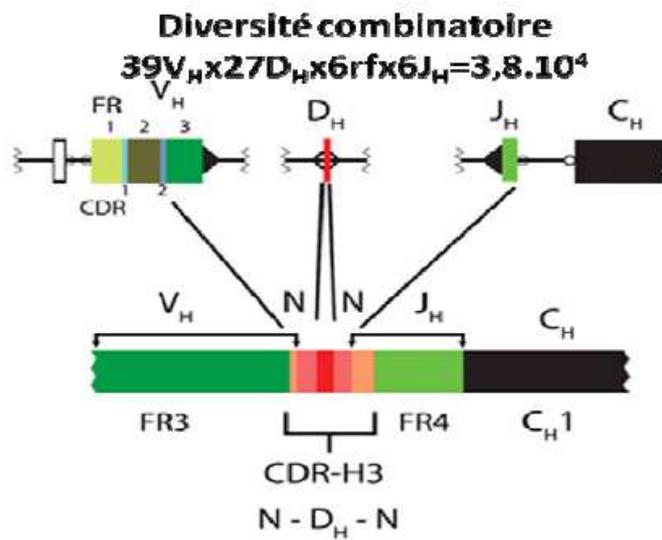
Les **IgM, IgD, IgA et IgE** possèdent un temps de demi-vie court de **3 à 5 jours**.

Les **IgGs** présentent quant à eux le temps de **demi-vie** le plus long. La demi-vie des IgGs est d'environ **21 jours** dans le plasma.

Les **IgGs** de par leur demi-vie sont **l'isotype** le plus utilisé par les laboratoires pharmaceutiques pour développer des anticorps thérapeutiques.

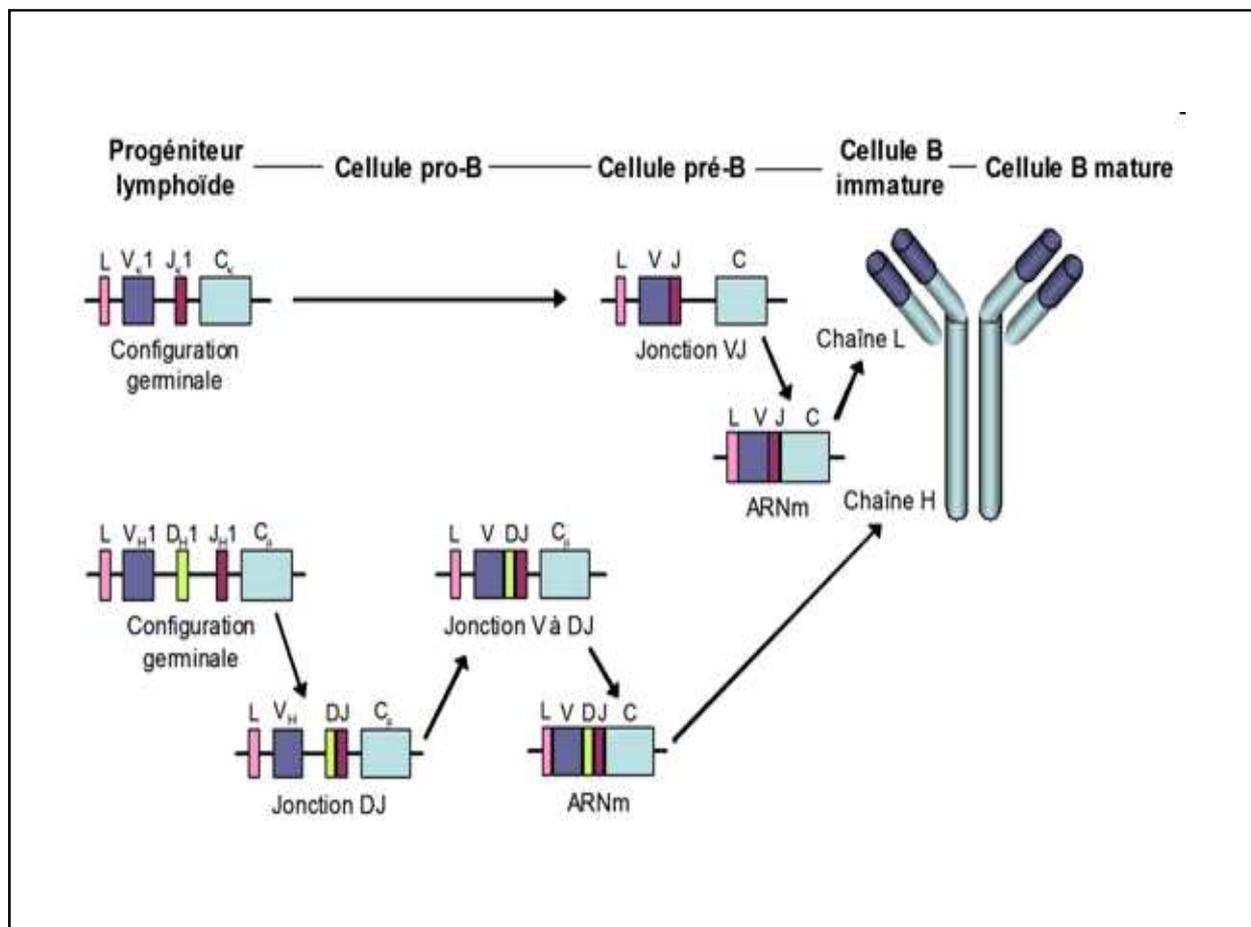
QUELLE EST L'ORIGINE
DE LA DIVERSITÉ DES ANTICORPS?





Diversité combinatoire des gènes d'immunoglobulines.

VDJ=gènes codant pour la partie variable des chaînes lourdes, VJ=gènes codant pour la partie variable des chaînes légères, C=gènes codant pour la région constante.

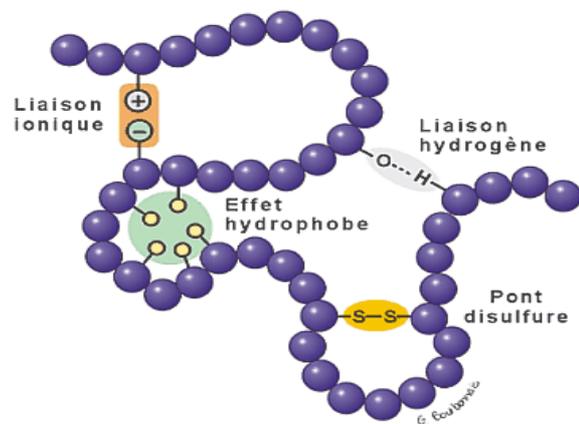
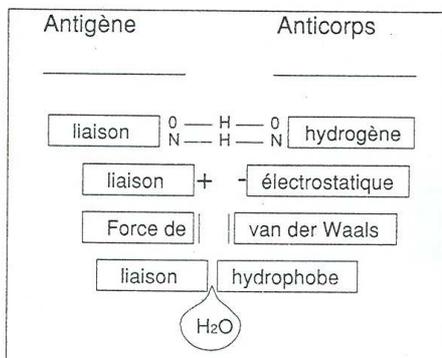


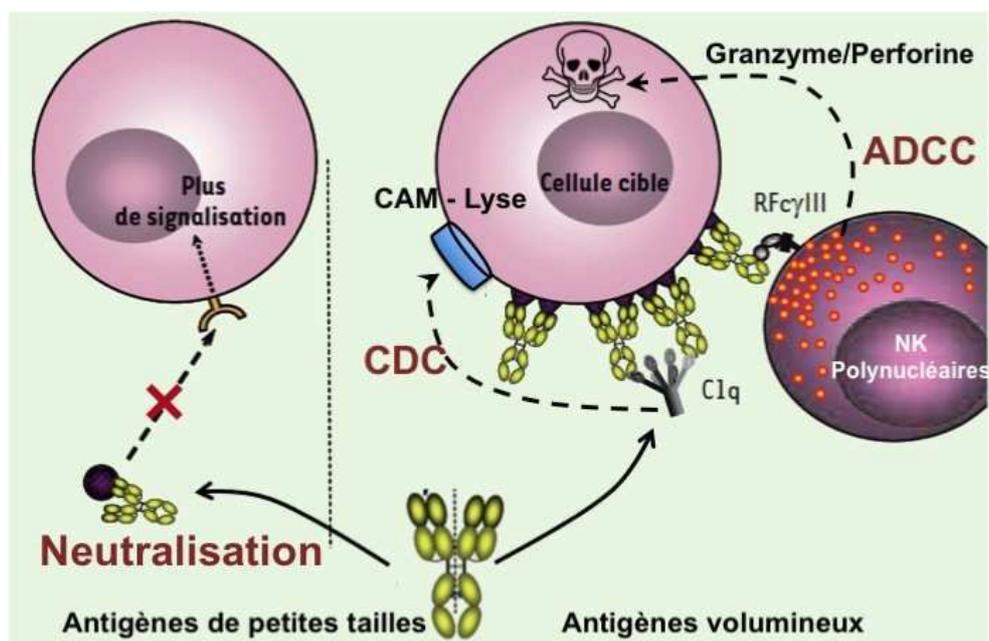
FONCTION BIOLOGIQUE
DES ANTICORPS

La réaction Ag/Ac est due à l'interaction entre **l'épitope** et **le paratope**. Cette interaction **paratope/épitope**, implique **6 à 20 acides aminés**, c'est une **réaction réversible**.

Le complexe (immun) Ag/Ac fait intervenir des liaisons faibles qui sont donc dépendantes de la complémentarité entre les sites Ac et Ag.

Forces non-covalentes assurant la liaison antigène-anticorps





Mécanismes principaux d'action des anticorps.

Les **antigènes de petites tailles** (toxines, xénobiotiques, allergènes) sont neutralisés puis détruits par les phagocytes. Les **antigènes plus gros** (pathogènes) sont reconnus par les anticorps puis éradiqués par l'intermédiaire d'effecteurs **cellulaires** (cellules cytotoxiques, phagocytes) **ADCC** : Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity ou **moléculaires** (le **système du complément**).; **CDC** : Complement Dependent Cytotoxicity ; **CAM** : Complexe d'Attaque Membranaire.



LA PRODUCTION DES
ANTICORPS POLYCLONAUX

La **fonction biologique** des **anticorps** est de participer à la réponse immunitaire en neutralisant et/ou en éliminant les agents étrangers à l'organisme. Les anticorps représentent la **réponse humorale** de l'organisme contre les antigènes et peuvent activer la **réponse cellulaire** ou **cytotoxique**. Les antigènes présentent généralement de nombreux épitopes et sont donc reconnus par un large nombre d'anticorps présents sur les lymphocytes B. Une fois activés et différenciés, ces lymphocytes B déclenchent une réponse de **type polyclonale**. Plusieurs anticorps dirigés contre plusieurs épitopes d'un même antigène seront sécrétés en même temps.

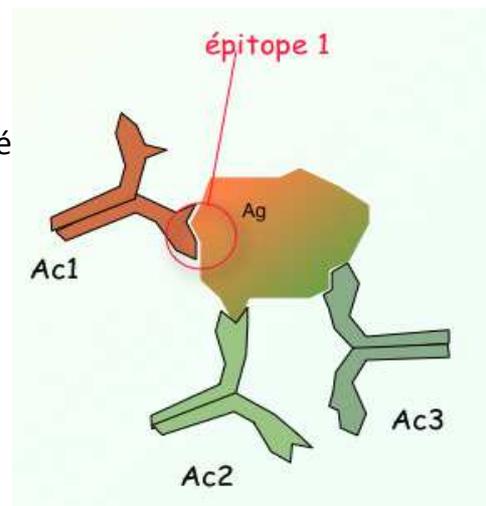
ANTICORPS POLYCLONAUX (ANTISÉRUMS)

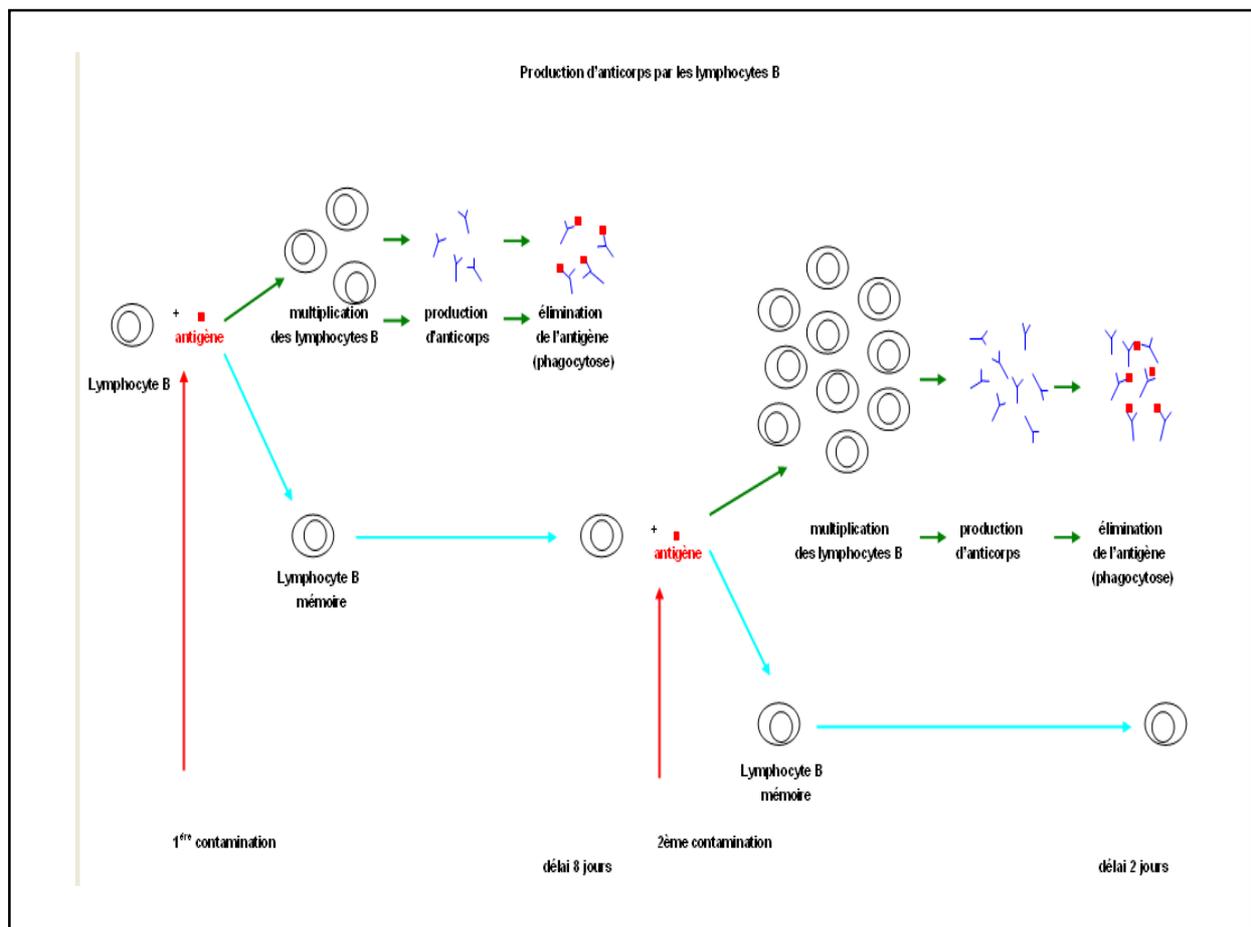
Les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné.

Spécificité: dirigé contre un antigène donné
(plusieurs épitopes reconnus)

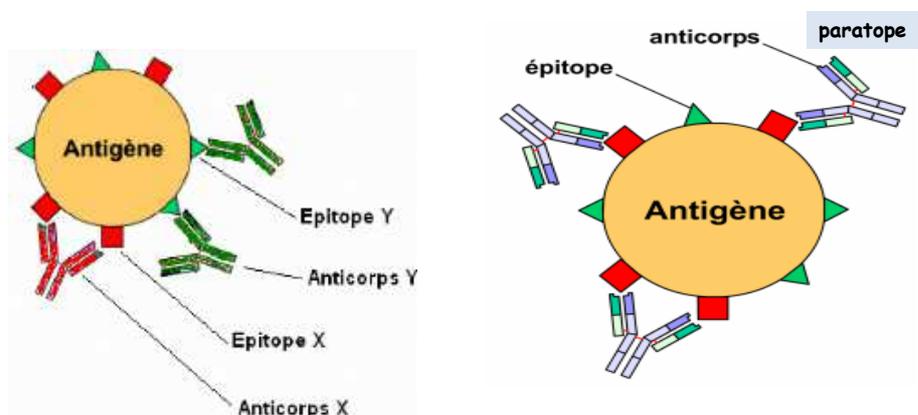
Nature: mélange d'anticorps

Affinité: généralement élevée





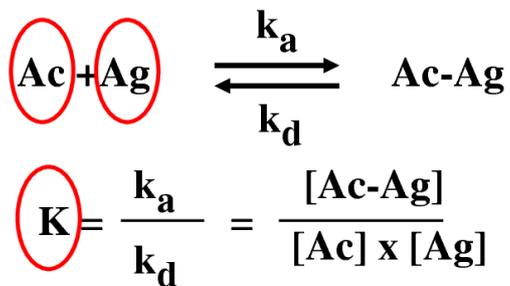
La production des **anticorps polyclonaux** est moins exigeante en temps (un à deux mois), en efforts et en équipements. Ils sont doués:
d'une **forte avidité** résultant de la reconnaissance d'épitopes différents d'un même antigène ou des aspects variés d'un même épitope.



L'affinité d'un Ac correspond à la résultante entre les forces attractives et répulsives entre le paratope et l'épitope.

L'affinité est l'attraction spécifique entre un anticorps et un antigène. L'affinité est variable selon les couples anticorps/antigène, et les conditions du milieu (pH, force ionique, température).

Elle est caractérisée par la constante d'affinité:



VALENCE DE L'ANTIGÈNE



Valence d'un Ag : nombre de déterminants antigéniques (répétitifs ou distincts), nombre d'épitopes de l'Ag.

L'avidité : la force avec laquelle un Ac multivalent se lie à un Ag multivalent.

La **qualité d'un anticorps** repose sur deux facteurs principaux:
La spécificité et l'avidité (ou affinité).

- L'anticorps ne doit réagir que contre la protéine d'intérêt pour éviter les réactions croisées avec d'autres protéines susceptibles de la contaminer, c'est **la spécificité**.

- L'anticorps doit réagir fortement avec cette protéine et avoir une grande affinité pour elle, c'est **l'avidité**.

PRÉPARATION DE L'IMMUNOGÈNE

Les **immunogènes** utilisés sont souvent des **protéines** ou des **peptides**.

Les **polysaccharides**, les **acides nucléiques**, les **petites molécules organiques** (haptènes < 3 kDa) sont conjuguées à des protéines porteuses appropriées (haut PM (porteur) ex : BSA, thyroglobuline).

Les **isomères optiques** peuvent générer des Ac distincts.

Les **cellules**, les **extraits de cellules** ou de **tissus** peuvent aussi être utilisés.

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

LES CRITÈRES DE QUALITÉ ET DE PURETÉ DE L'AG

La qualité de la préparation de l'immunogène revêt une importance capitale. **L'immunogène doit être stérile**, exempt de toxines, de pyrogènes et de tout autre contaminant.

Plus la préparation antigénique contient de **contaminants** plus l'antisérum produit contiendra des anticorps dirigés contre ces contaminants; ce qui se répercute négativement sur le rendement de l'immunisation et sur la spécificité de l'antisérums.

L'IMMUNISATION

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.

CHOIX DES ANIMAUX

L'immunisation se fait principalement sur **lapins New-Zelandais**.

Pour chaque Ag, on immunise 2 lapins car la réponse immunitaire varie d'un animal à l'autre.

On peut immuniser d'autres espèces animales :

cobaye, rat, souris, chèvre, mouton selon la quantité d'immunsérum que l'on veut récupérer.



NATURE ET QUALITÉ DE L'IMMUNOGÈNE

La préparation d'antisérums nécessite la purification préalable de **l'immunogène** en quantité suffisante (quelques milligrammes).

Il faut tenir compte aussi de la taille, l'état et la conformation de l'antigène au moment de l'élaboration de la préparation immunogénique.

Des anticorps produits contre une protéine dénaturée peuvent ne pas réagir contre la protéine native.

CHOIX DE L'ADJUVANT

La préparation antigénique est associée à une émulsion appelée **adjuvant d'immunisation**.

L'adjuvant augmente:

- l'immunogénicité** de l'antigène,
- ralentit sa libération** dans la circulation sanguine et par conséquent sa dégradation et son élimination,
- favorise** sa présentation au système immunitaire et entretient la stimulation.

- 3 composantes principales dans un **adjuvant**
 - **huile minérale/eau** : protection de l'antigène, transport de l'antigène
 - **particules** : agrégation de l'antigène, dépôt antigénique
 - **parois de bactéries** : réaction inflammatoire

Plusieurs types **d'adjuvant** peuvent être utilisés à base de substances minérales (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium, phosphate de calcium, etc.), les liposomes, etc.

L'adjuvant de Freund est le plus utilisé. C'est une émulsion d'eau, d'huile minérale et d'agent émulsifiant à laquelle on incorpore (**adjuvant complet**) ou non (**adjuvant incomplet**) une suspension de bacille inactivé de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*).

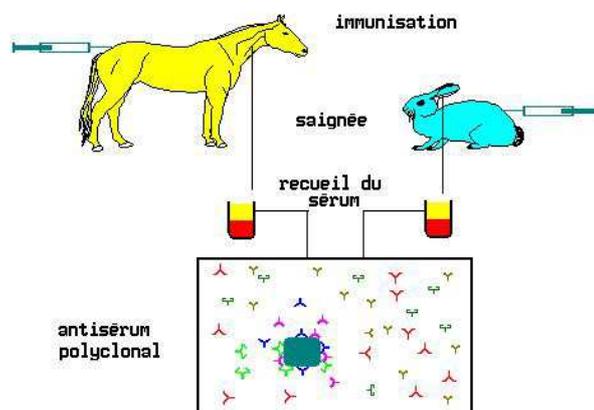
L'adjuvant complet de Freund est un adjuvant puissant qui permet l'initiation et l'amplification de la réponse immunitaire (humorale et à médiation cellulaire).

PROTOCOLES

Selon **l'immunogénicité** de l'antigène et le temps prévu, 3 protocoles standards :

- Protocole court de **53 jours** : **3 injections** - 1 prélèvement test.
- Protocole intermédiaire de **67 jours** : **4 injections** - 2 prélèvements test.
- Protocole long de **88 jours** : **4 injections** - 2 prélèvements test.

L'immunisation de l'animal avec des préparations antigéniques, combinées à un **adjuvant** qui accroît la réponse immunitaire. 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 (immunsérum)**; à partir duquel on peut purifier les anticorps.





1 mg/0.5 ml PBS/Freund's
Incomplet; IM et SC

0.5 mg/0,5ml PBS)
IntraVeineuse

J0 J15 J30 J45 J60

Injection sous-cutanée (SC)
Le long de l'échine (1mg dans 0,5ml)
(PBS/ Adjuvant complet de Freund's)

0.5 mg/0,5ml PBS)
IntraMusculaire

Saignée dans
8-10 J

Voies d'administration : sous-cutanée, intradermique, intramusculaire
et intraveineuse

PRÉPARATION DE L'ANTISÉRUM

Après la saignée on récupère **le sang** dans un flacon.

Laisser **3h à température** ambiante pour la formation d'un caillot.

Au bout de 3h, on décolle le caillot des parois du flacon et on

laisse une nuit à 4°C.

Filtrer sur gaze stérile

Centrifuger **15mn à 15000rpm** dans des tubes eppendorfs .

Récupérer le surnageant qui contient **les Ac polyclonaux.**

Les **Anticorps polyclonaux** obtenus sont (sérum polyclonal, immunosérum)

Un **immunosérum** renferme des Acp de **classes et de sous-classes différentes, d'affinités** diverses et reconnaissent plusieurs déterminants antigéniques.

Les Anticorps polyclonaux sont utilisés et sont utiles dans les tests ELISA, les Immunotransferts, les Tests immunohistochimiques et d'immunoprécipitation.