

PRODUCTION ANTICORPS MONOCLONAUX

Hybridomes

Step 1: - Immunisation des souris

**ANTIGEN (cellule
membarne/ micro-
organismes) +
ADJUVANT**



Ac dans sérum



Prélèvement de la rate

(source de cellules)

Kolher and Milstein
Prix Nobel 1984

PRODUCTION ANTICORPS MONOCLONAUX

HYBRIDOMES

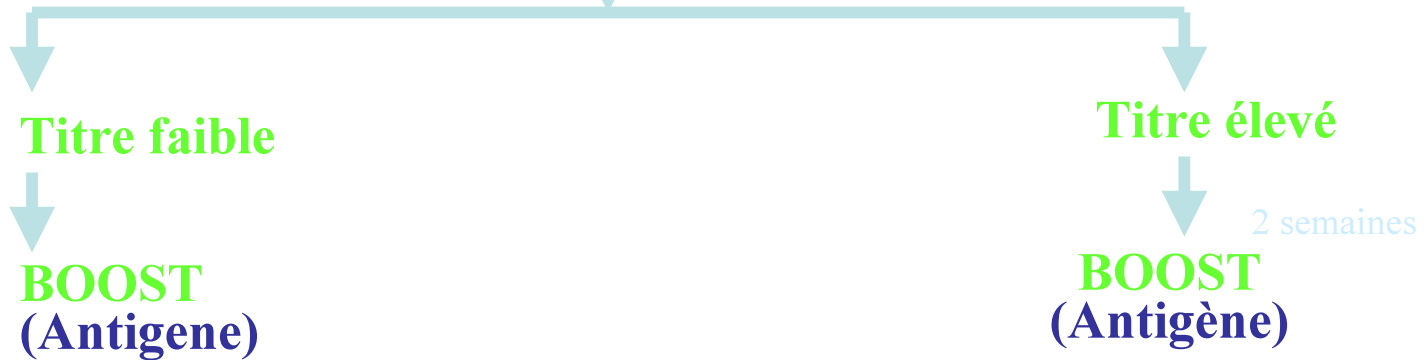
Step 2: - Dépistage Anticorps produit

Après qq
semaines



Détermination du titre de l'ac

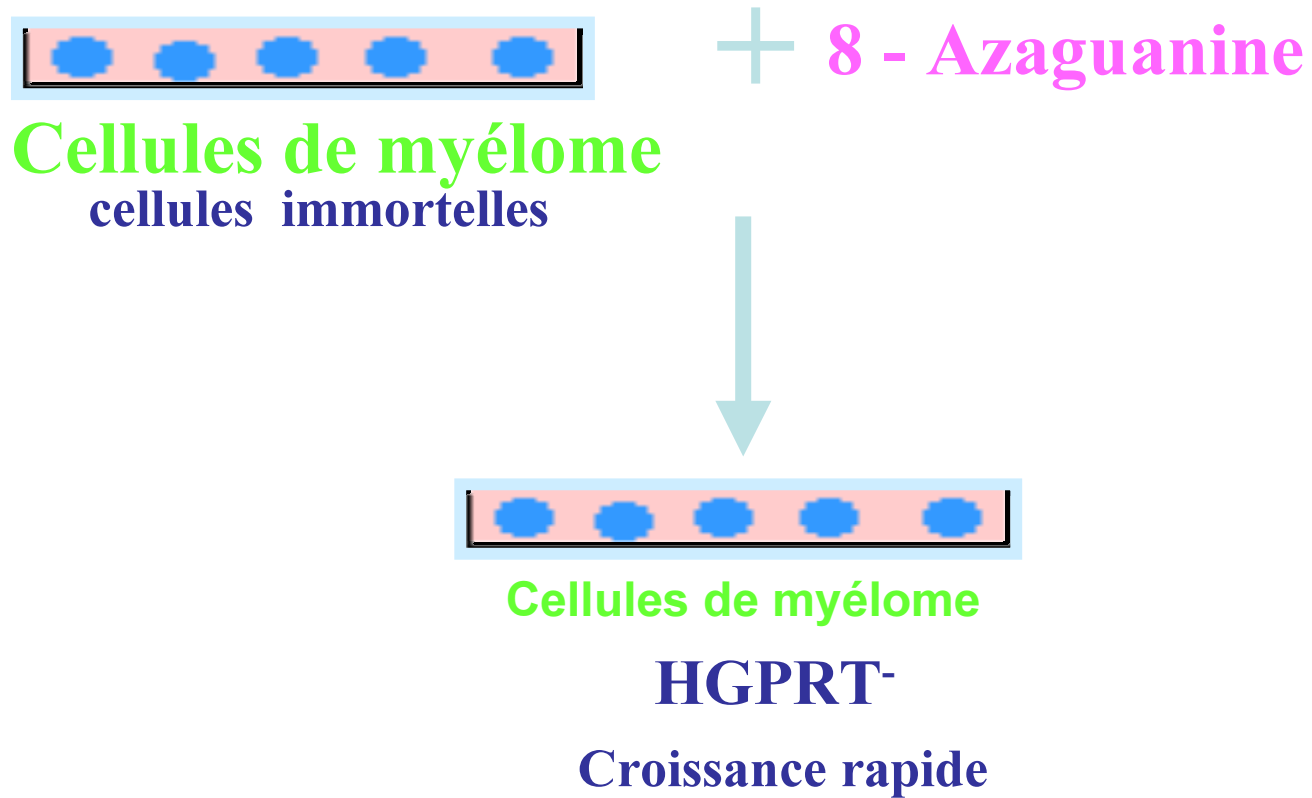
(Technique: - ELISA / cytométrie)



PRODUCTION ANTICORPS MONOCLONAUX

HYBRIDOMES

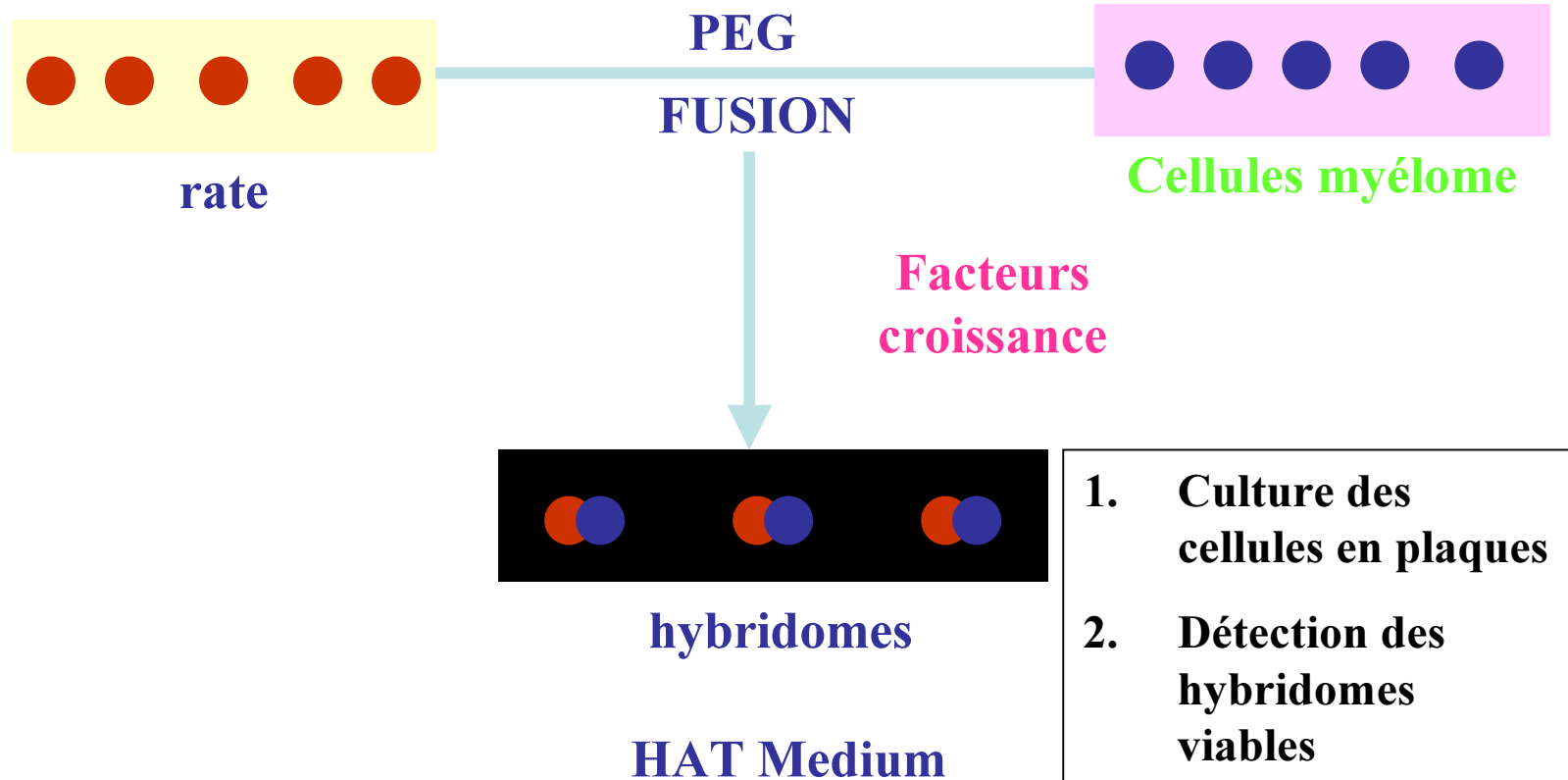
Step 3: - Preparation cellules Myelome



PRODUCTION ANTICORPS MONOCLONAUX

HYBRIDOMES

Step 4: - Fusion Myélome avec cellules de rate et Selection des hybridomes



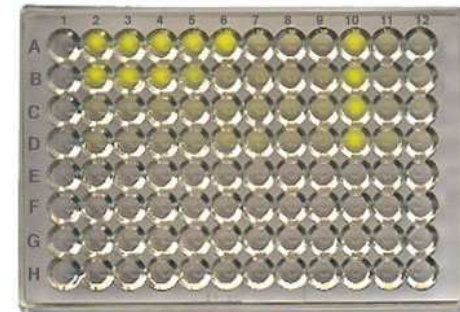
PRODUCTION ANTICORPS MONOCLONAUX

HYBRIDOMES

Step 4: - Clonage de l'hybridome en dilution limite

A. 1 cellule par puits

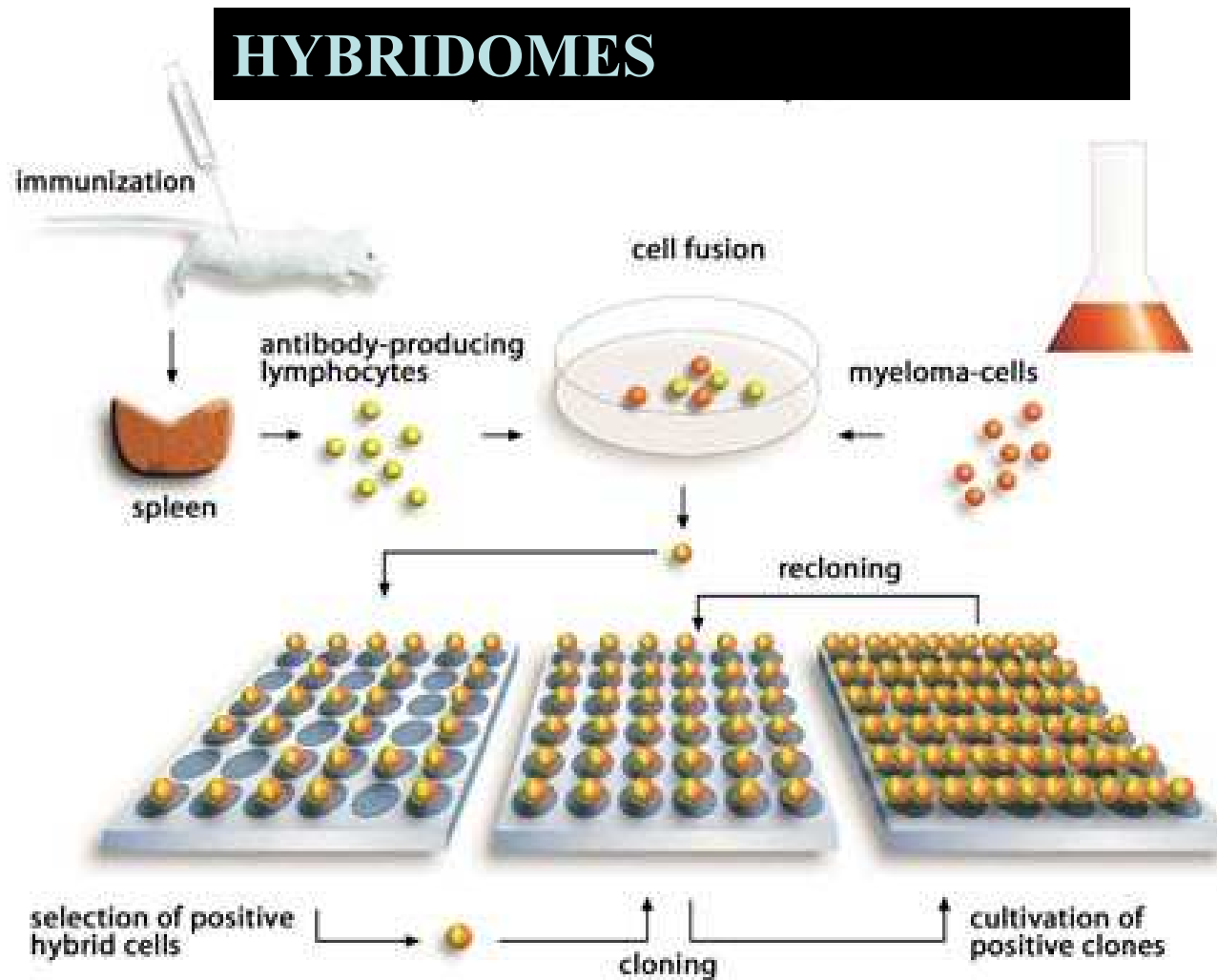
B. Test des surnageants



C. Expansion des clones intéressants



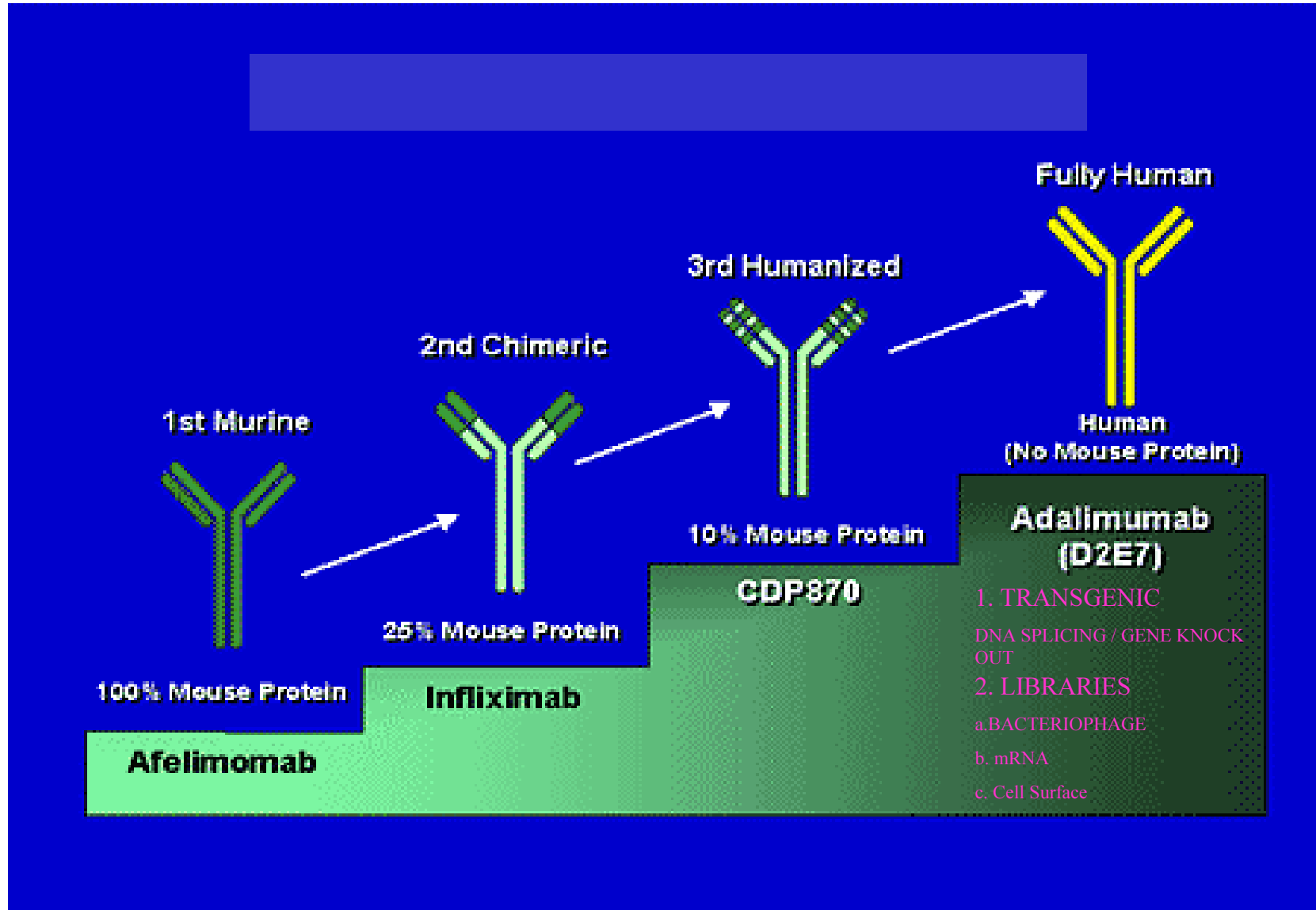
PRODUCTION ANTICORPS MONOCLONAUX



Utilisation des anticorps monocloonaux

- Diagnostic in vitro : immunologie, Anatomopathologie, bactériologie, virologie, dosages médicaments, antigènes tumoraux, tests grossesse.....
- In vivo : détection de tumeurs mais aussi à titre thérapeutique (Lymphome, arthrite rhumatoïde) après chimérisation ou humanisation

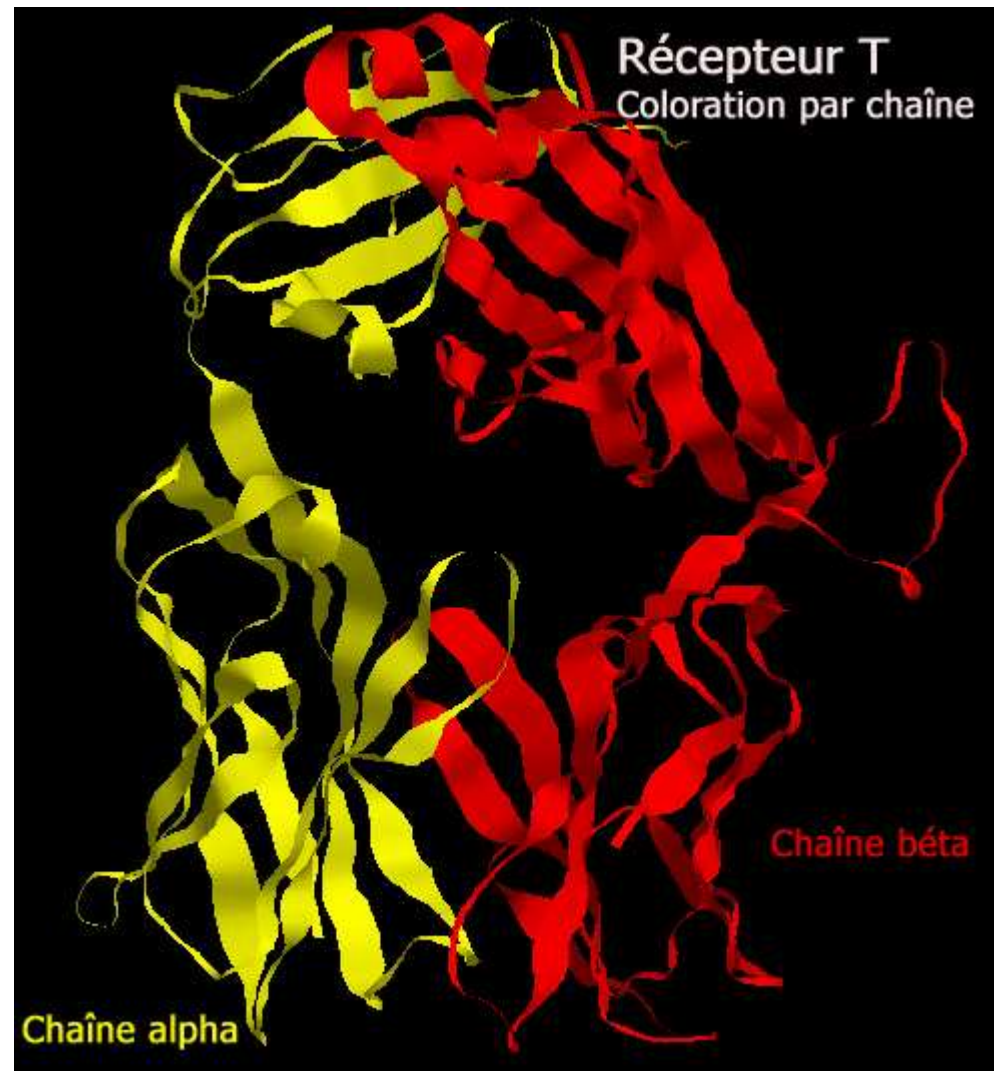
Traitements par anticorps monoclonaux

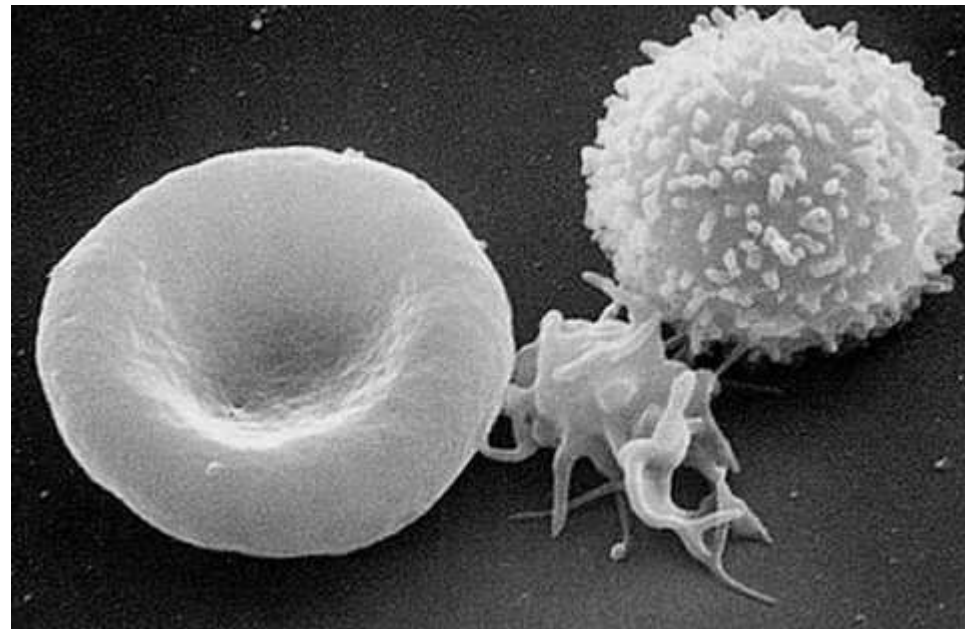




Company Name	Name of Product⁽¹⁾	Indications	Date of FDA Approval	Antibody Type⁽²⁾
Ortho Biotech	Orthoclone-OKT®	Organ Transplant Rejection	1986	M
J&J/Eli Lilly	ReoPro®	Acute Cardiac Conditions	1994	C
BiogenIdec/Genentech/Roche	Rituxan®	Non-Hodgkin's Lymphoma	1997	C
BiogenIdec	Zevalin™	Non-Hodgkin's Lymphoma	2002	M
PDLI	Zenapax®	Acute Transplant Rejection	1997	H
MedImmune/Abbott	Synagis®	Viral Respiratory Disease	1998	H
Genentech/Roche	Herceptin®	Breast Cancer	1998	H
	Avastin®	Colorectal Cancer	2004	H
J & J	Remicade®	Crohn's, Rheumatoid Arthritis	1998	C
Novartis	Simulect®	Acute Transplant Rejection	1998	C
Wyeth	Mylotarg™	Acute Myleoid Leukemia	2000	H
Schering /ILEX Oncology	Campath®	Chronic Lymphocytic Leukemia	2001	H
Abbott/CAT	Humira™	Rheumatoid Arthritis	2002	PD
Novartis/Genentech/Tanox	Xolair®	Asthma	2003	H
Genentech/Xoma	Raptiva™	Psoriasis	2003	H
Corixa/GlaxoSmithKline	Bexxar®	Non-Hodgkin's Lymphoma	2003	M
BMS/ImClone Systems	Erbix™	Colorectal Cancer	2004	C

Cellules T et Récepteur pour l'antigène





TCR et Récepteur B pour l'antigène

TCR

- Membranaire
- Pas de forme soluble
- Interaction Ag / récepteur est de faible affinité/ Ag Ac= nécessité de tests sensibles pour les mettre en évidence
- TCR spécifique Ag+CMH
- Codé par des gènes différents des Ig

structure

- Hétérodimère $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$
- Associé au complexe CD3 pour permettre la transmission du signal

TCR et cellules T

- Au début des années 70 développement de clones de Cellules T cytotoxiques CTL dans modèles murins
- Souris infectées par virus de la chorioméningite (LCM=leucocytic choriomeningitis) produisent des cellules capables de lyser des cellules infectées *in vitro*
- Cellules incapables de se fixer sur le virus libre

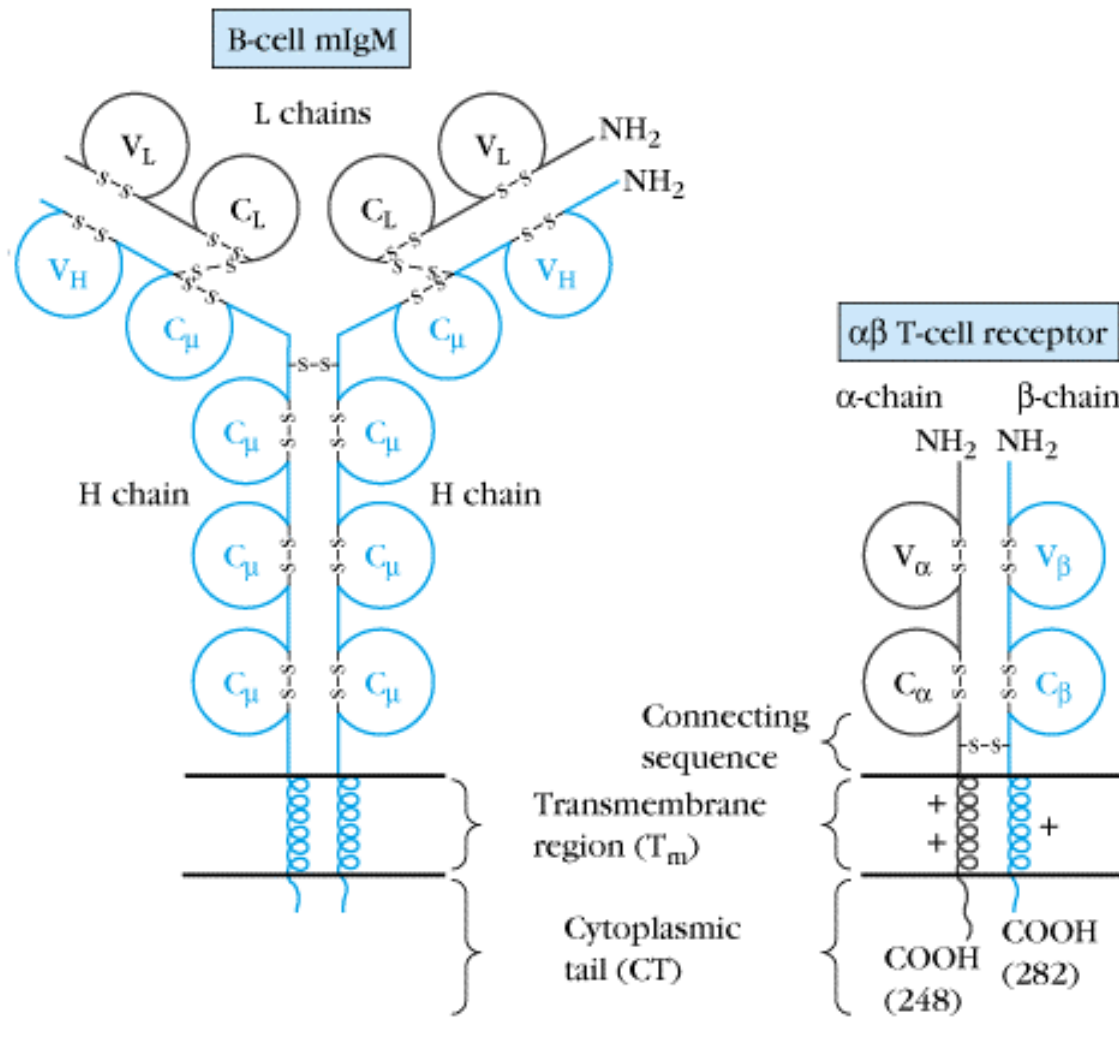
TCR et cellules T

- Processus de reconnaissance des Ag par cellules T différent de celui des Ac
- Expériences de Zinkernagel et Doherty 1974 définition de la restriction au soi

Prix Nobel 1996

- Modèle double récepteur ou soi modifié?
- **Un seul récepteur**

TCR



- Hétérodimères $\alpha\beta$ (le plus souvent) ou $\gamma\delta$ (plus rarement)

- α , β , γ , δ membres de la superfamille des immunoglobulines

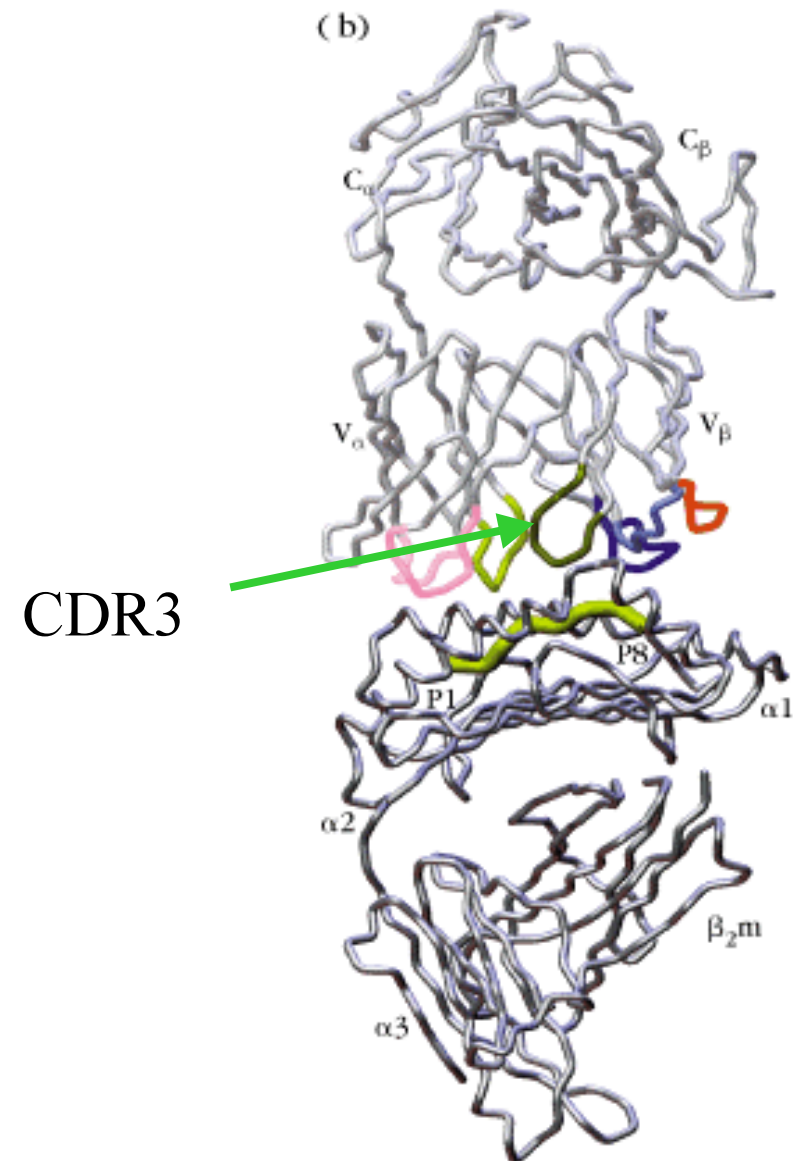
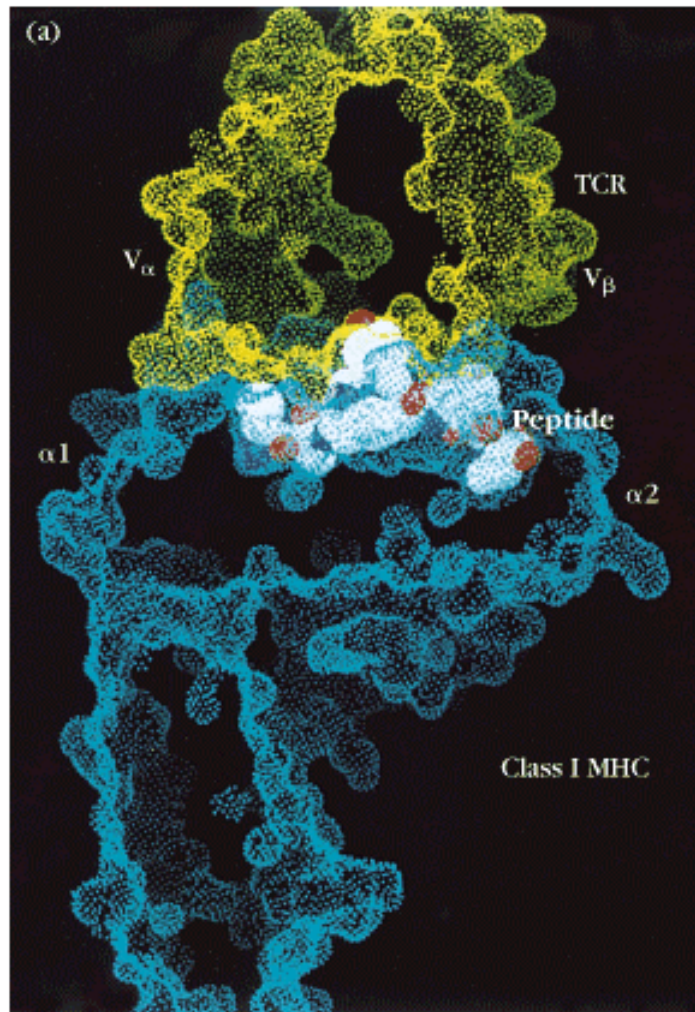
- Monovalent

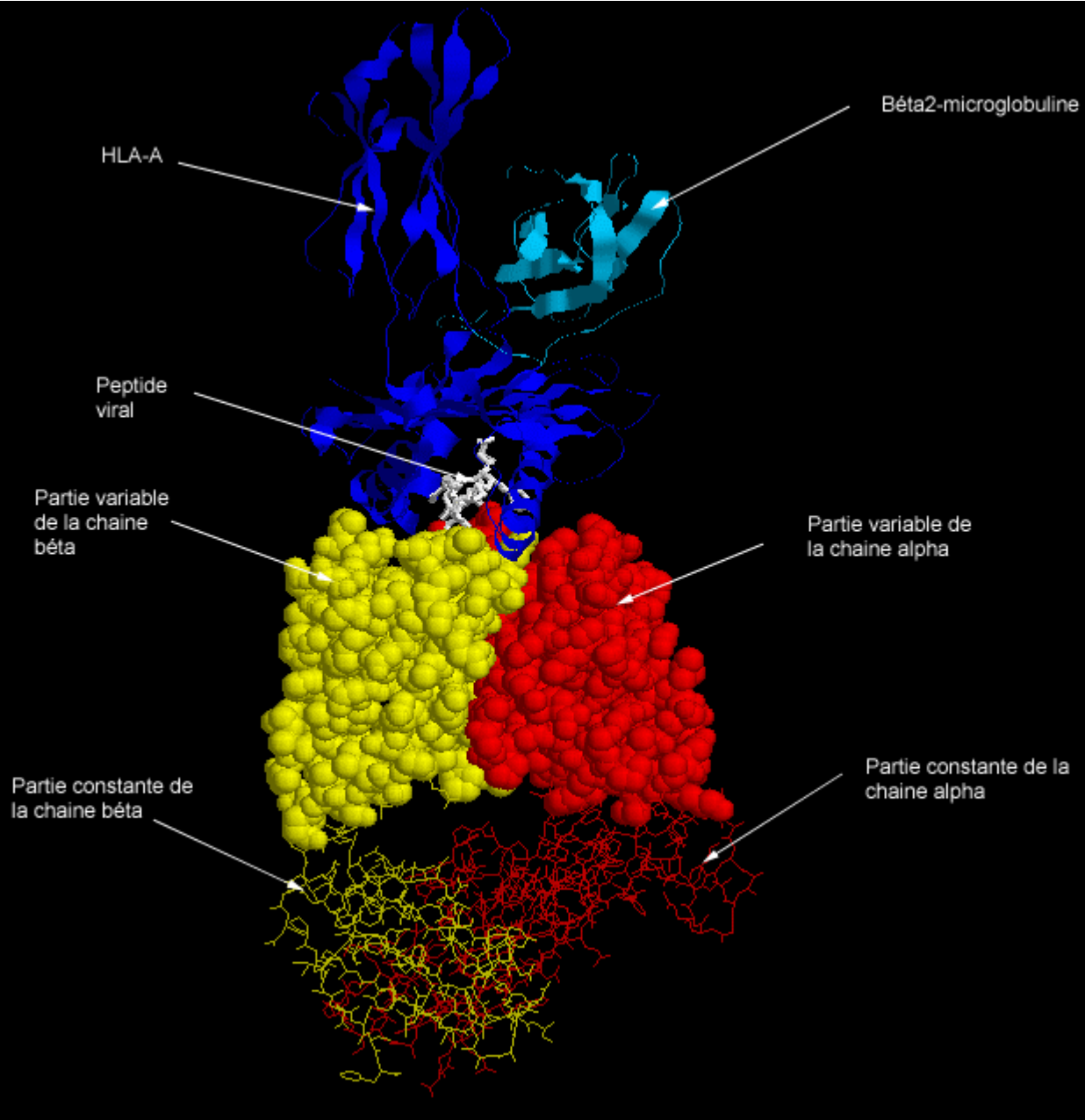
- Un domaine variable V sur chaque chaîne avec quatre régions hypervariables

TCR et cellules T

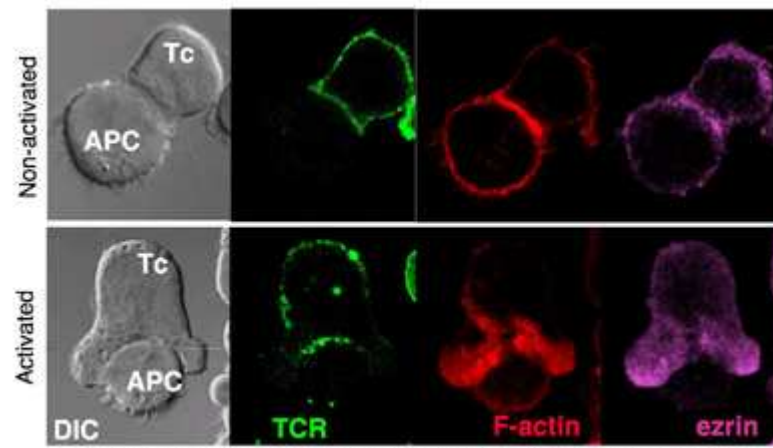
- Production d'un grand nombre d'anticorps monoclonaux dirigés contre divers clones de cellules T puis criblage pour trouver un anticorps spécifique d'un clone (anticorps clonotypique) = isolement du récepteur T pour l'antigène

Interaction du TCR avec le complexe peptide-CMH



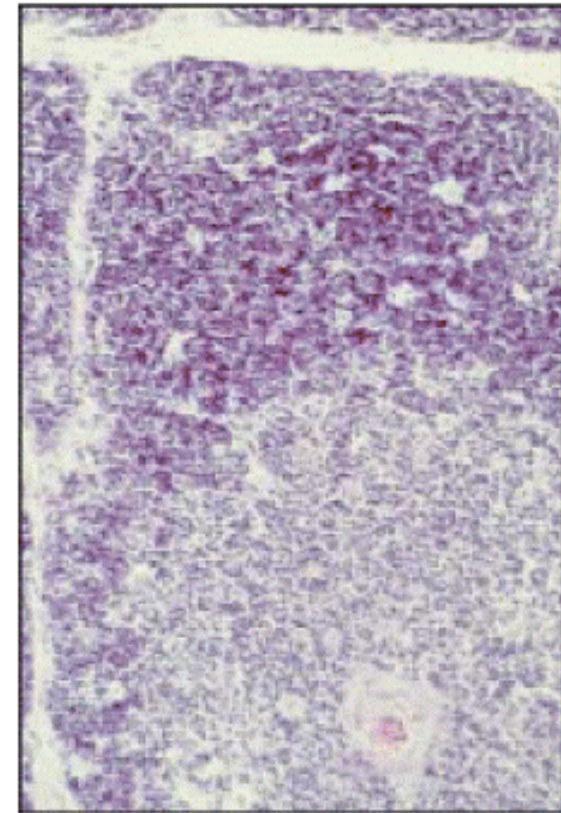
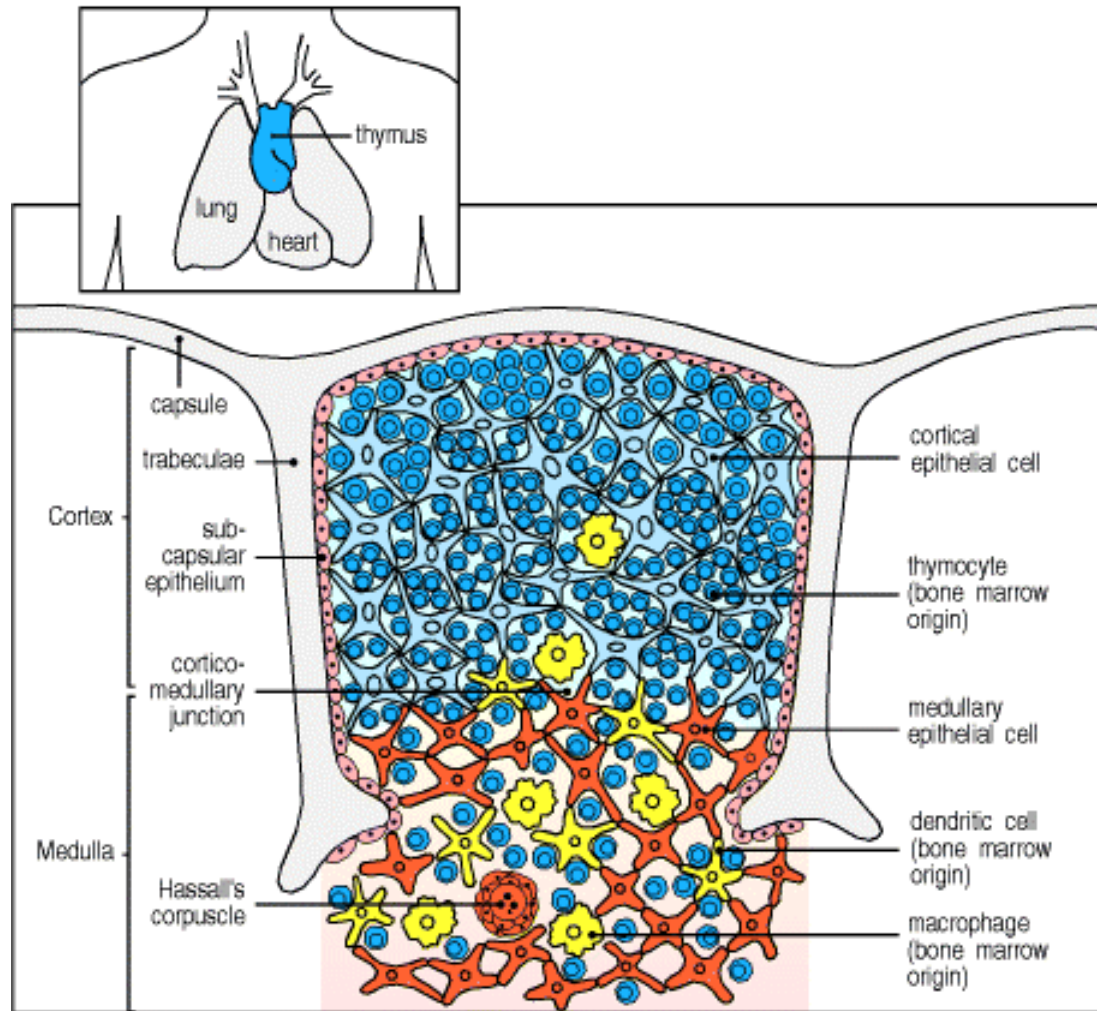


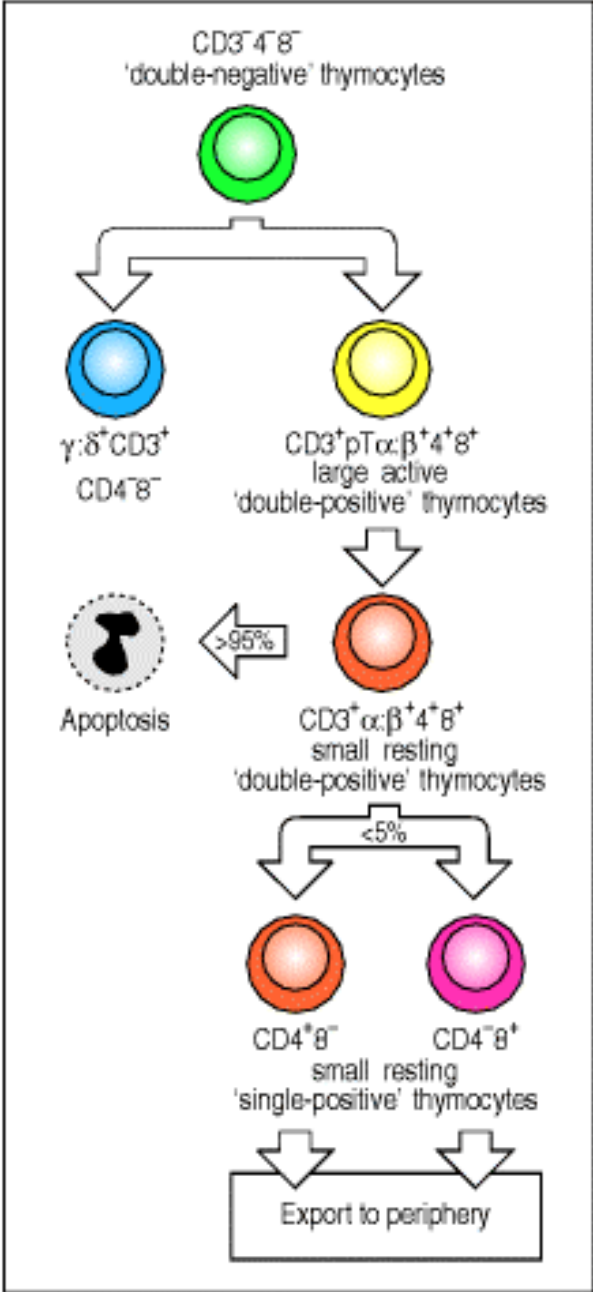
Interaction cellule T – Cellules présentant l'antigène



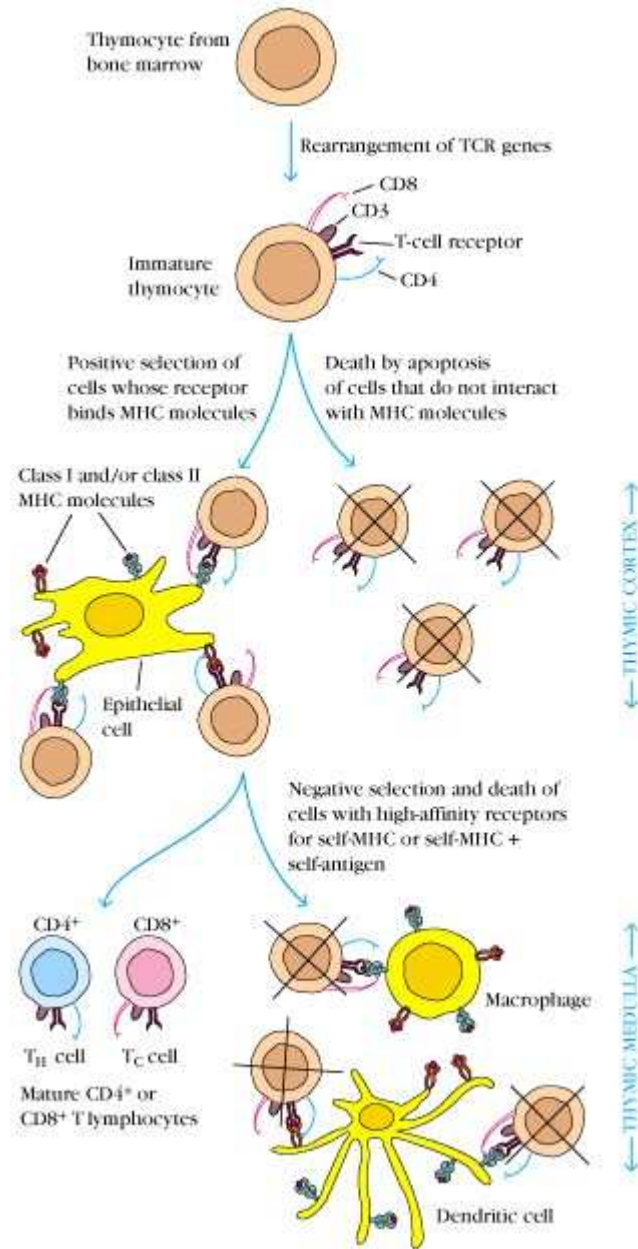
Roumier et al Immunity 2001 PMID: 11728334. doi:10.1016/S1074-7613(01)00225-4

Thymus





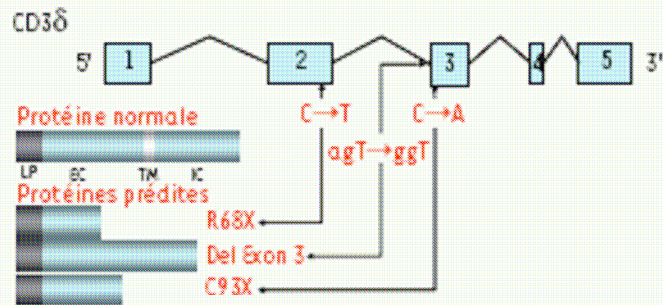
Thymus



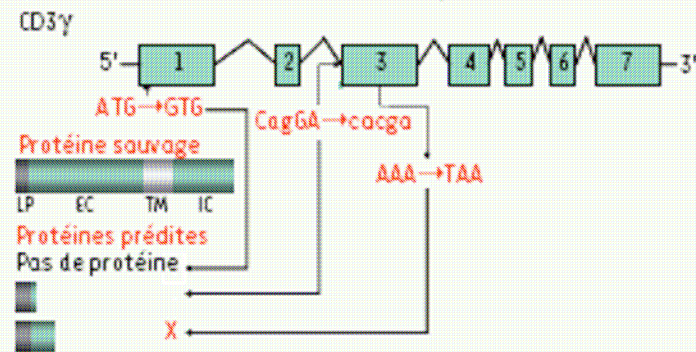
Le Thymus

- Lymphocytes T du thymus = thymocytes
- Différenciation précurseurs hématopoïétiques lymphoïdes en lymphocytes T matures CD4 ou CD8 (3 stades : CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺)
- Génération de la diversité (réarrangements des gènes de la chaîne b puis de la chaîne a)
- Double sélection
 - positive : TCR qui possèdent une affinité suffisante pour les molécules CMH du soi
 - négative : TCR qui possèdent trop d'affinité pour les complexes CMH-peptides du soi (ou CMH sans peptide)

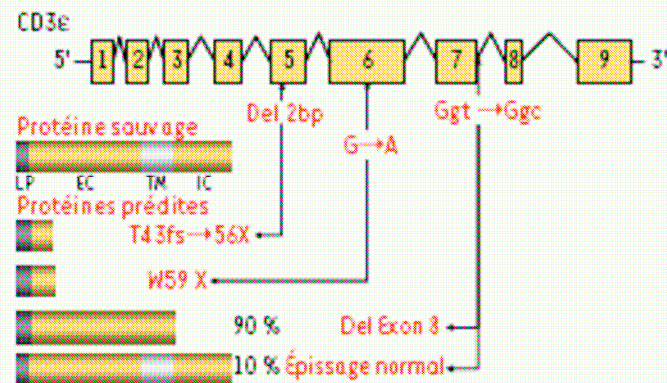
A Mutations de CD3D et protéines CD3δ



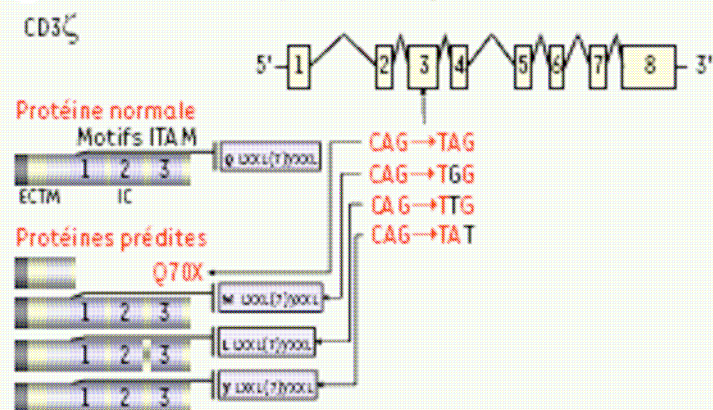
C Mutations de CD3G et protéines CD3γ



B Mutations de CD3E et protéines CD3ε



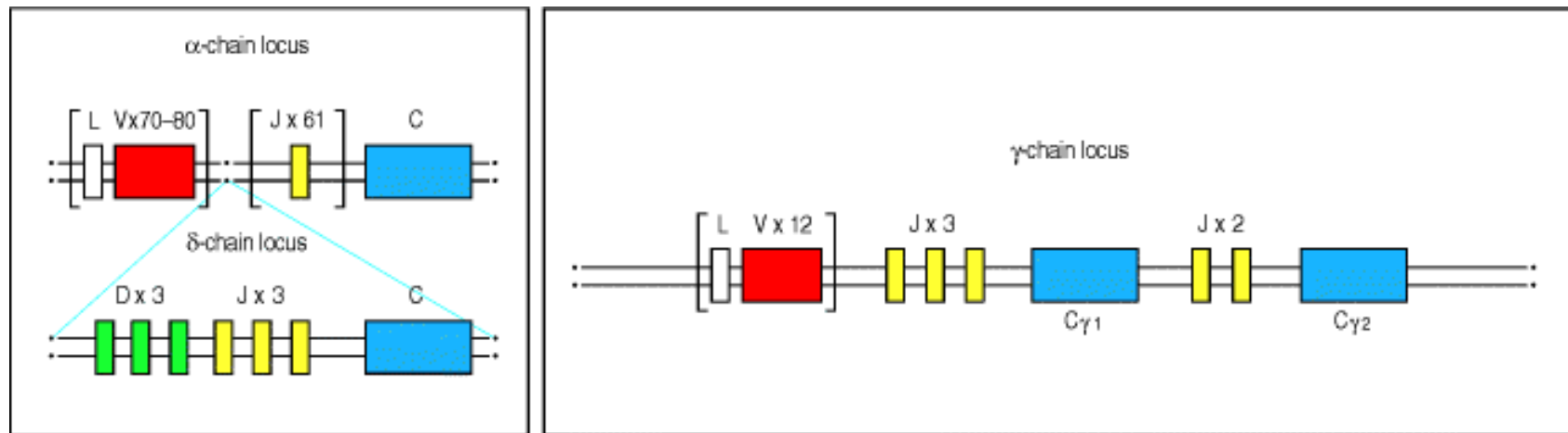
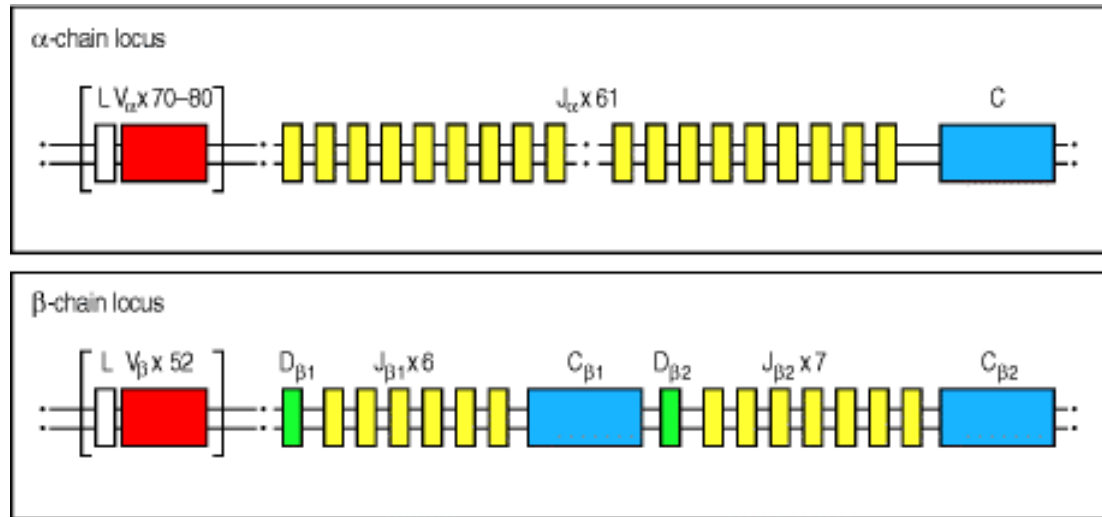
D Mutations du CD3Z et protéines CD3ζ



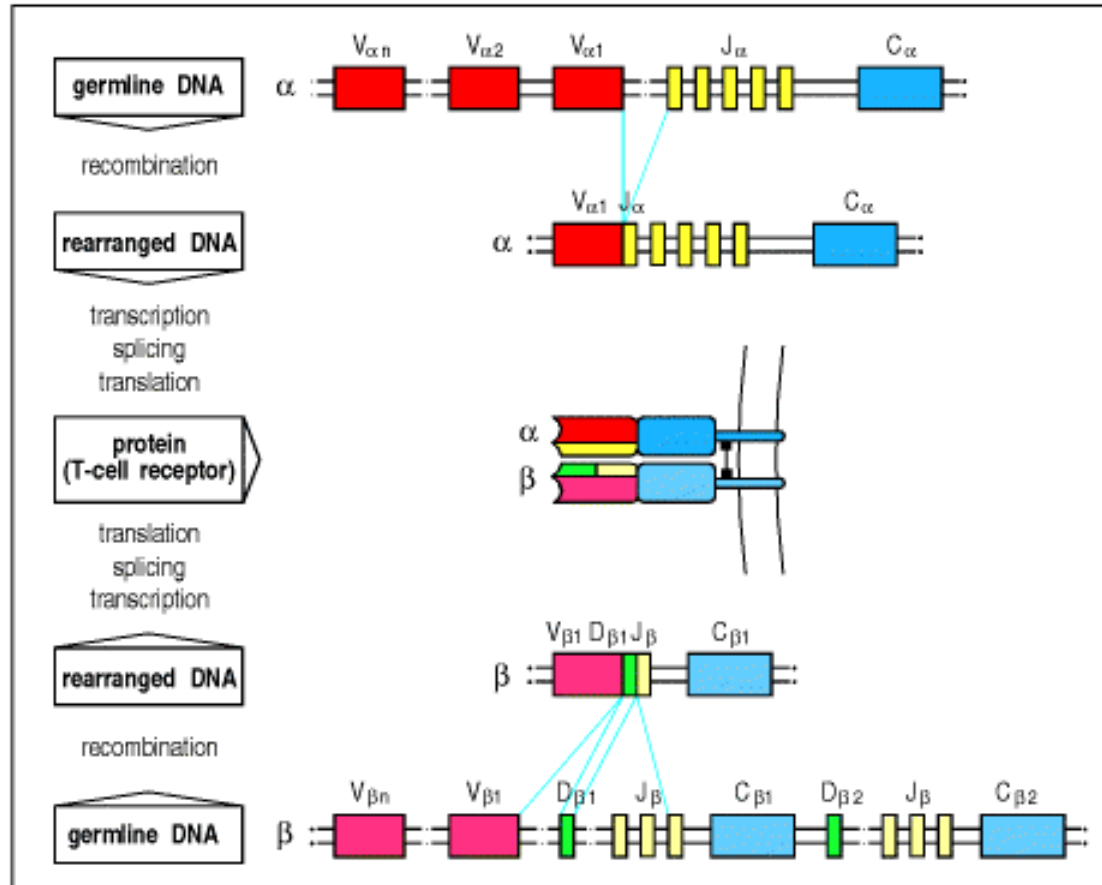
Famille de gènes récepteur T

Gène	chromosome	V	D	J	C
Chaîne α	14	50		61	1
Chaîne δ	14	3	3	3	1
Chaîne β	7	67	2	14	2
Chaîne δ	7	14		5	2

Réarrangement des gènes récepteur T



Réarrangement des gènes du TCR



Réarrangement des gènes du TCR

- rôle des enzymes RAG-1 et RAG-2 (Recombination Activators Genes comme pour le réarrangement des gènes d'immunoglobulines)
- mais pas de réarrangement des gènes d'immunoglobulines dans les lymphocytes T ni de réarrangement des gènes du TCR dans les lymphocytes B

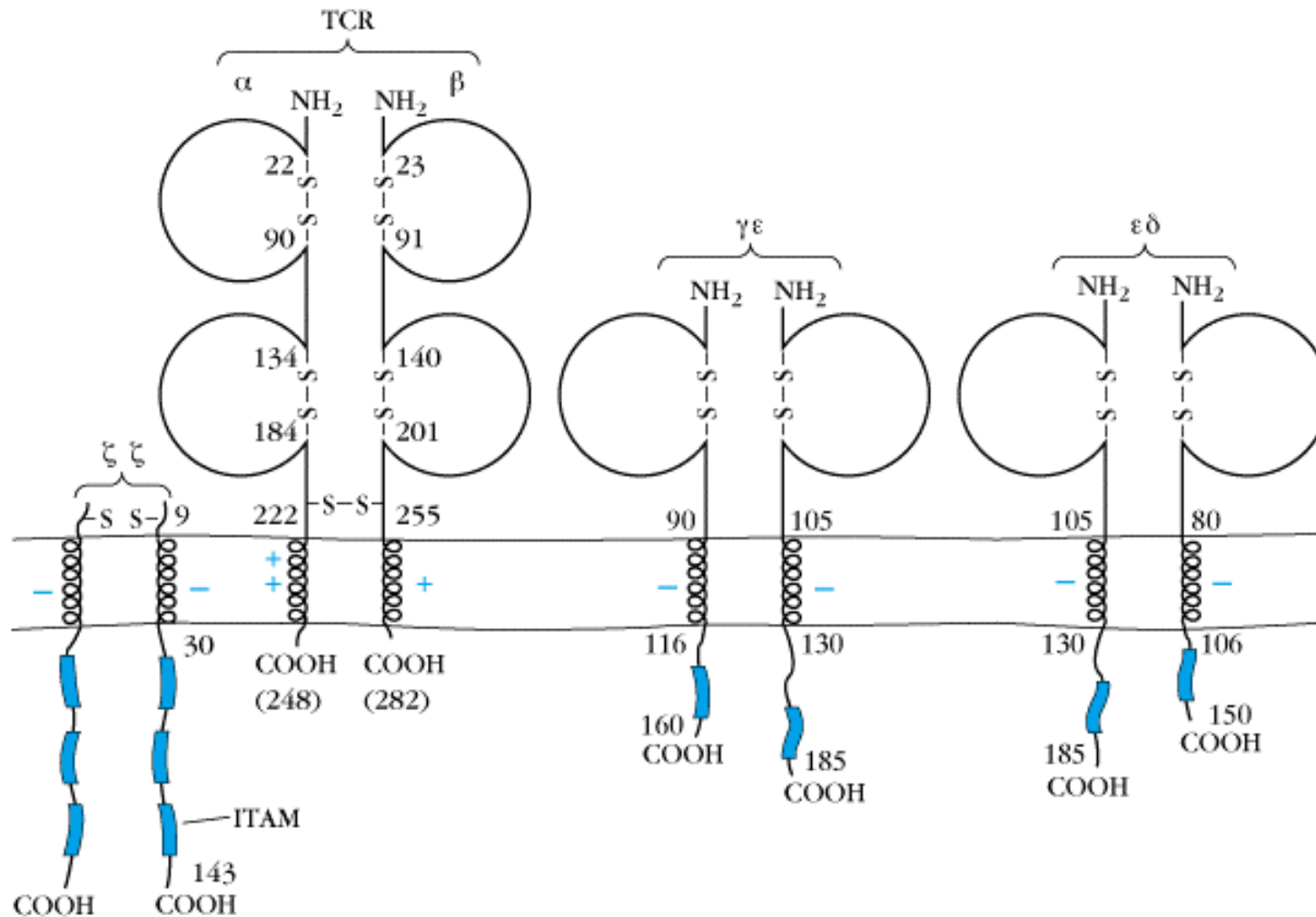
Réarrangement des gènes du TCR

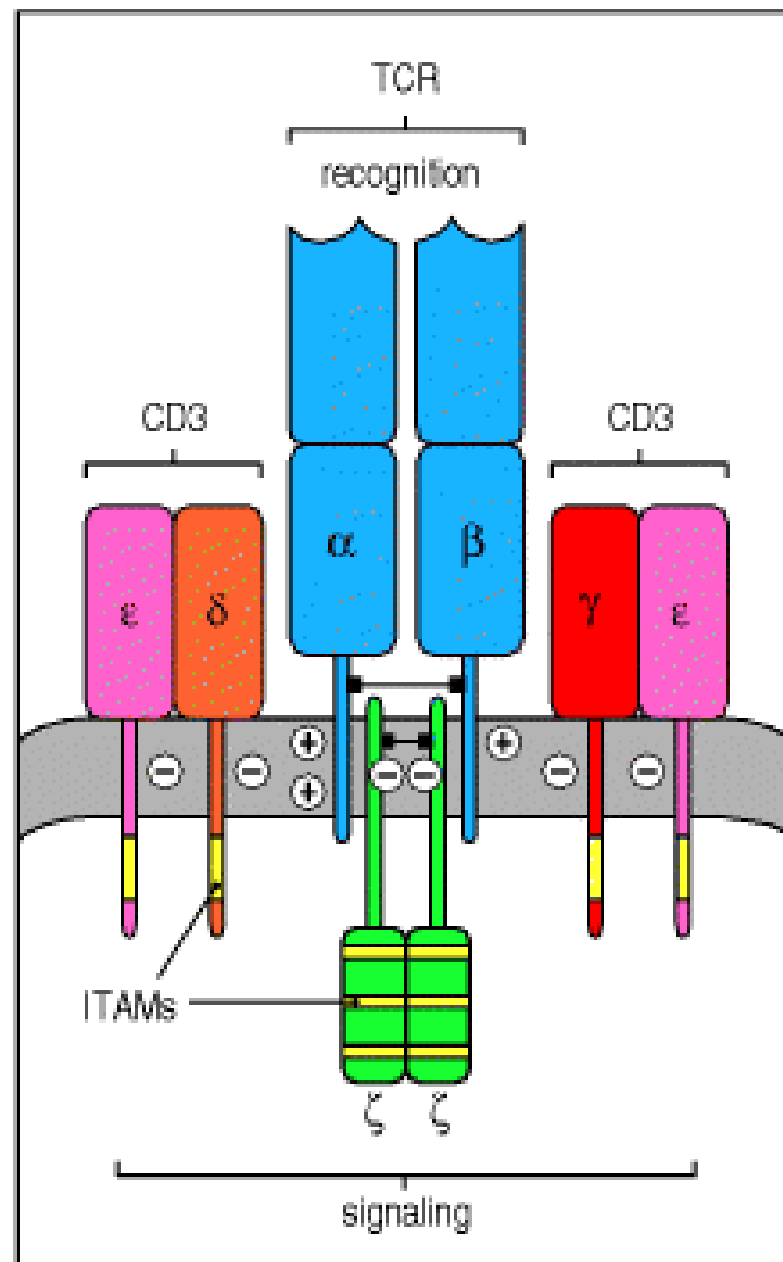
- Exclusion allélique (comme pour les Ig, bien qu'un peu moins stricte pour la chaîne α du TCR)
- Diversité résulte de trois mécanismes (comme pour les gènes d'Ig)
 - réarrangement proprement dit
 - flexibilité jonctionnelle
 - addition de nucléotides
 - PAS D'HYPERMUTATION SOMATIQUE!

Pas d'hypermutation somatique pour le TCR

- Pas d'hypervariabilité des CDR1 et CDR2 des TCR
- L'hypervariabilité (liée au réarrangement et à la diversité jonctionnelle) est limitée aux CDR3
- L'hypermutation somatique est l'apanage des lymphocytes B
 - Nécessaire pour produire des anticorps de haute affinité (neutralisants)
 - Inutile voire dangereux pour les lymphocytes T (autoréactivité, perte de la reconnaissance des CMH)

CD3 : le module de transduction de signal du TCR





CD3

- Ensemble de trois dimères qui n'interviennent pas dans la reconnaissance du peptide (ne pas confondre CD3 et CDR3) et qui participent à la transduction du signal
- Certains anticorps dirigés contre le CD3 court-circuitent le TCR et déclenchent l'activation cellulaire

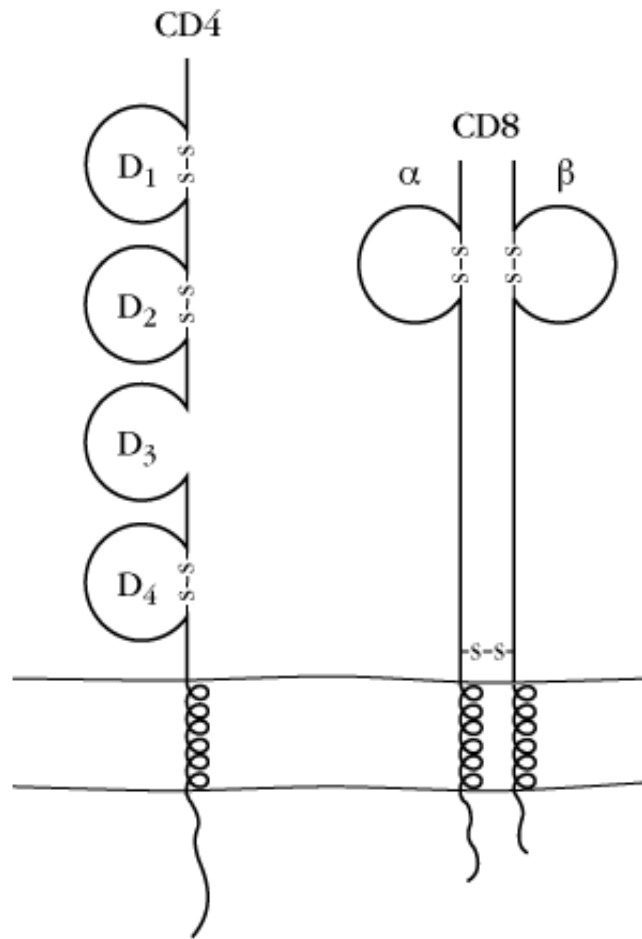
ITAM : point commun des
molécules des modules de
transduction des
immunorécepteurs
(immunoreceptor tyrosine-based
activation motif)

YXX[L/V]X₆₋₉YXX[L/V]...

Les corécepteurs

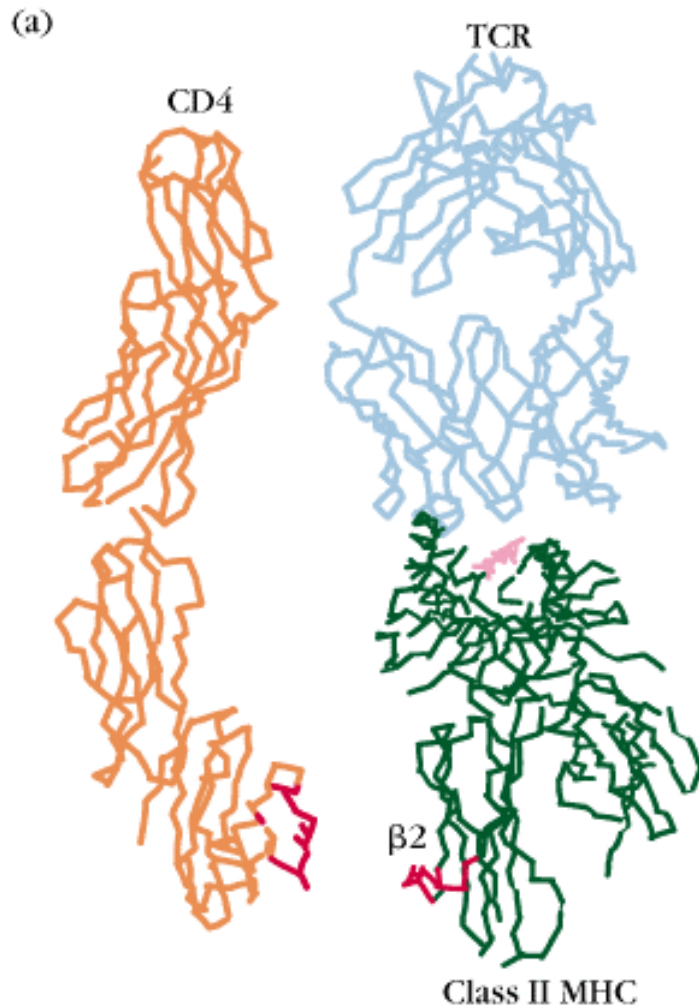
- L'affinité de l'interaction du TCR avec le complexe peptide-CMH est faible. *Des corécepteurs sont nécessaires*
- Interviennent dans l'activation cellulaire soit en augmentant l'avidité globale de l'interaction du TCR pour le complexe CMH-peptide et/ou en envoyant des signaux vers l'intérieur de la cellule

CD4 et CD8



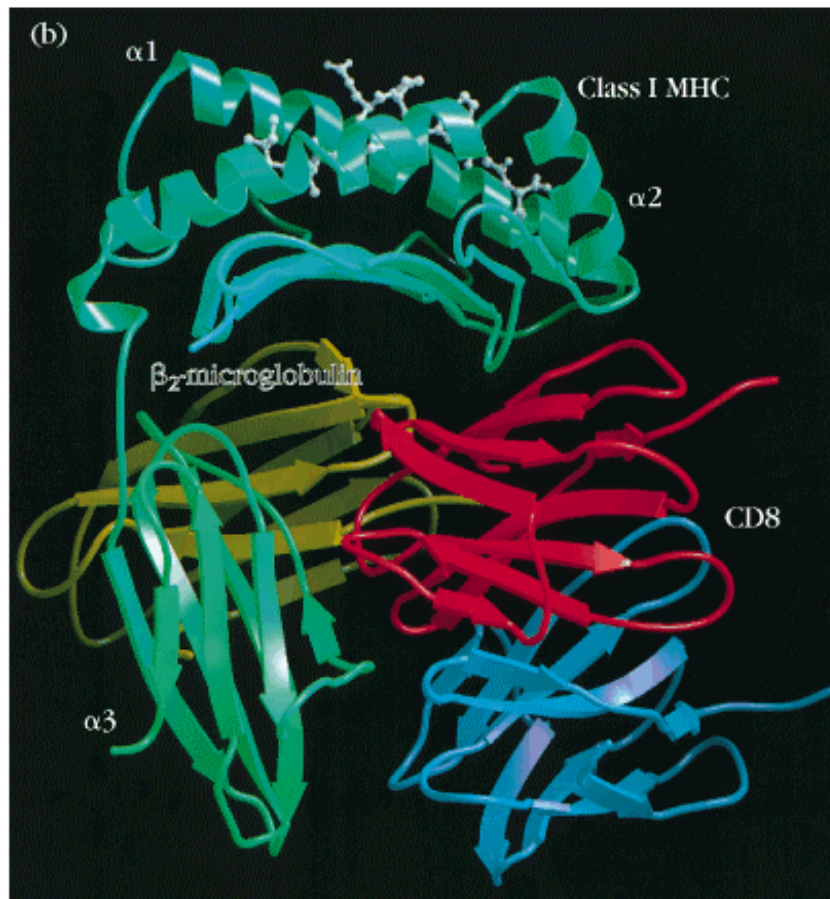
- Membres de la superfa-mille des Ig
- CD4 : monomère
- CD8 : homo- ou hétérodimère
- CD4 : lymphocytes T_h ; interaction avec CMH II
- CD8 : lymphocytes T_c ; interaction avec CMH I

CD4 et CMH II



Le CD4 se lie à une portion *non polymorphique* de la chaîne β du CMH II à distance du site d'interaction avec le TCR

CD8 et CMH I

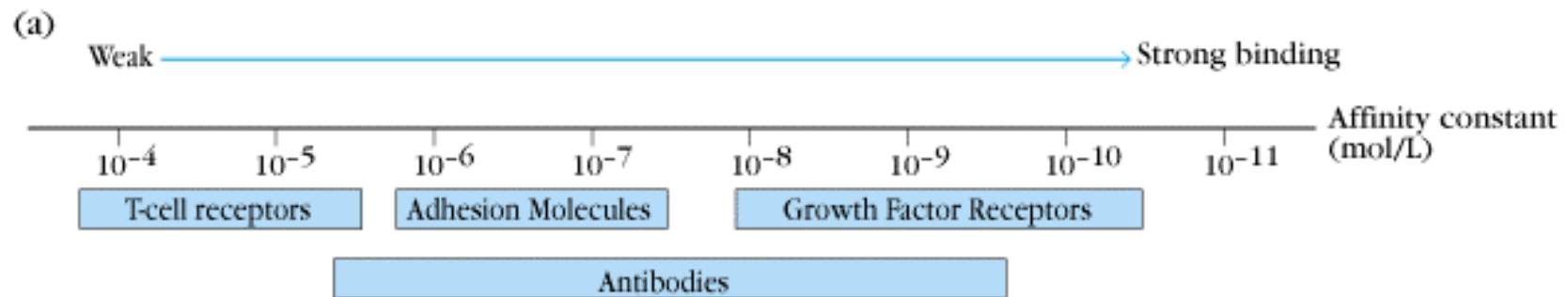


Le CD8 se lie à une portion *non polymorphique* de la chaîne α du CMH I à distance du site d'interaction avec le TCR

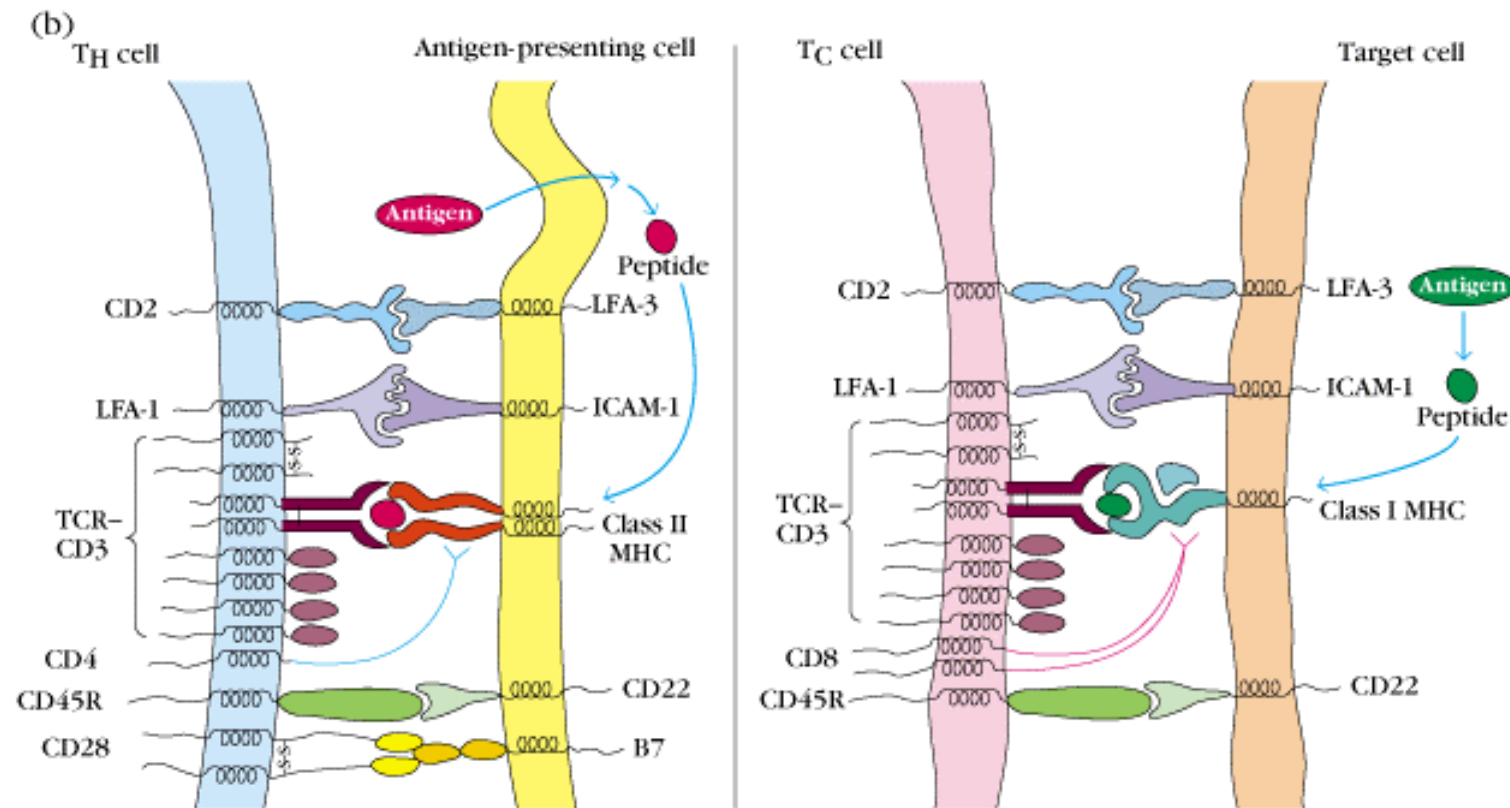
Double rôle de CD4 et CD8

- CD4 et CD8 augmentent jusqu'à 100 fois l'affinité globale de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH
- En outre, via leur domaine intracytoplasmique ils activent directement des systèmes de transduction de signal à l'intérieur de la cellule

Affinité des interactions récepteur/ligand dans le système immunitaire



Rôle des corécepteurs dans l'activation lymphocytaire



Alloréactivité

- Les molécules du CMH sont « conçues » pour avoir une bonne affinité pour les TCR (qui sont d'ailleurs sélectionnés positivement sur cette base).
- Pour ces raisons de structure et de sélection, il y a un risque majeur pour un TCR d'avoir une affinité trop grande pour le CMH « sans peptide » : les cellules qui portent ces TCR sont éliminées par apoptose

Alloréactivité

- La sélection négative des lymphocytes T dont le TCR présente trop d'affinité pour le CMH sans peptide implique la présence dans le thymus de ces molécules de CMH
- Par définition, ce sont les molécules CMH du soi
- Donc, il n'y a pas de sélection négative des lymphocytes T dont le TCR présenterait une trop forte affinité pour des molécules CMH n'appartenant pas au soi.

Sélection Thymique

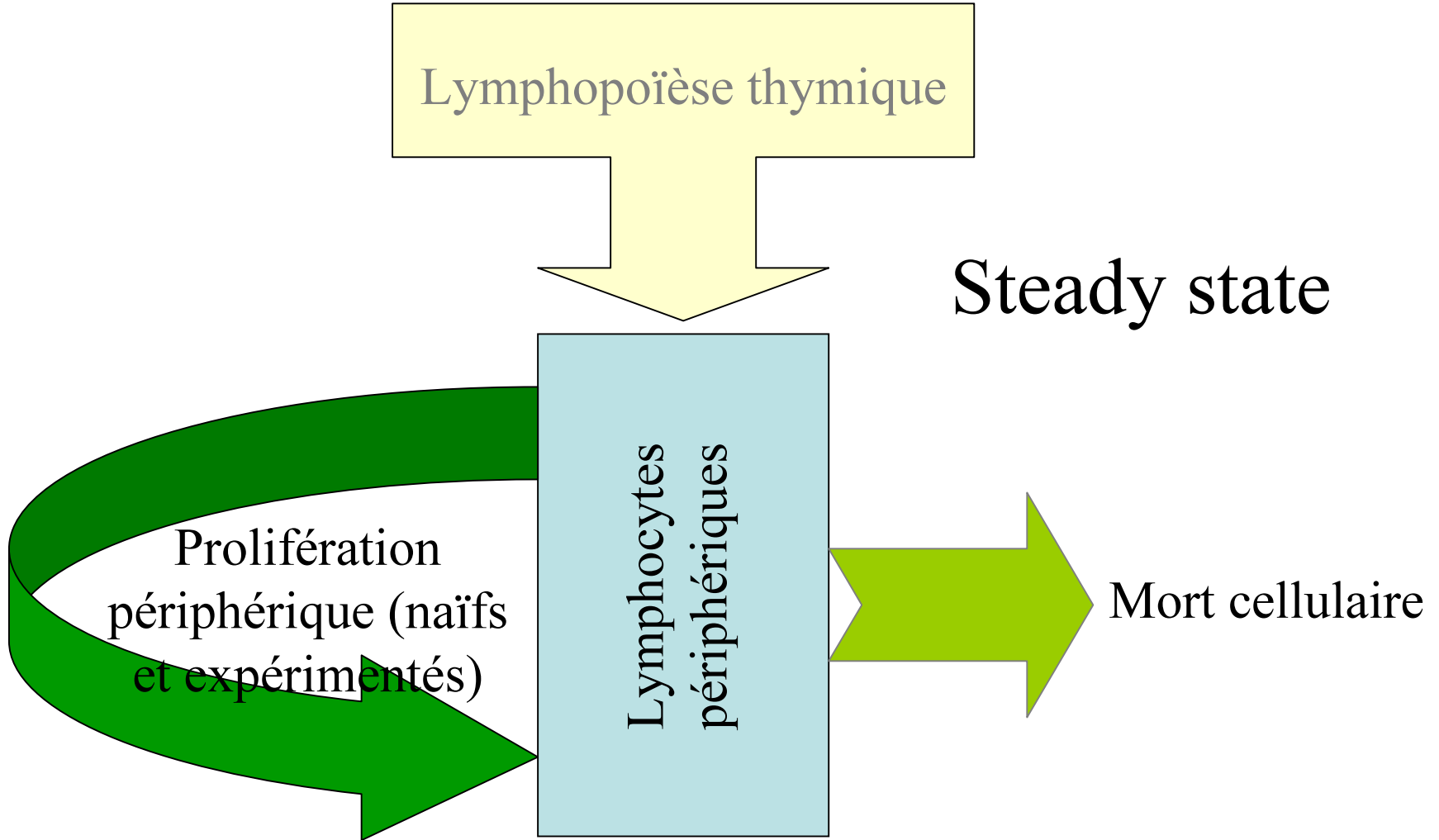
98% des thymocytes
échouent aux épreuves de
sélection positive ou négative
et meurent par apoptose dans
le thymus

Le thymus laisse passer certains lymphocytes T qui ont une affinité pour le soi

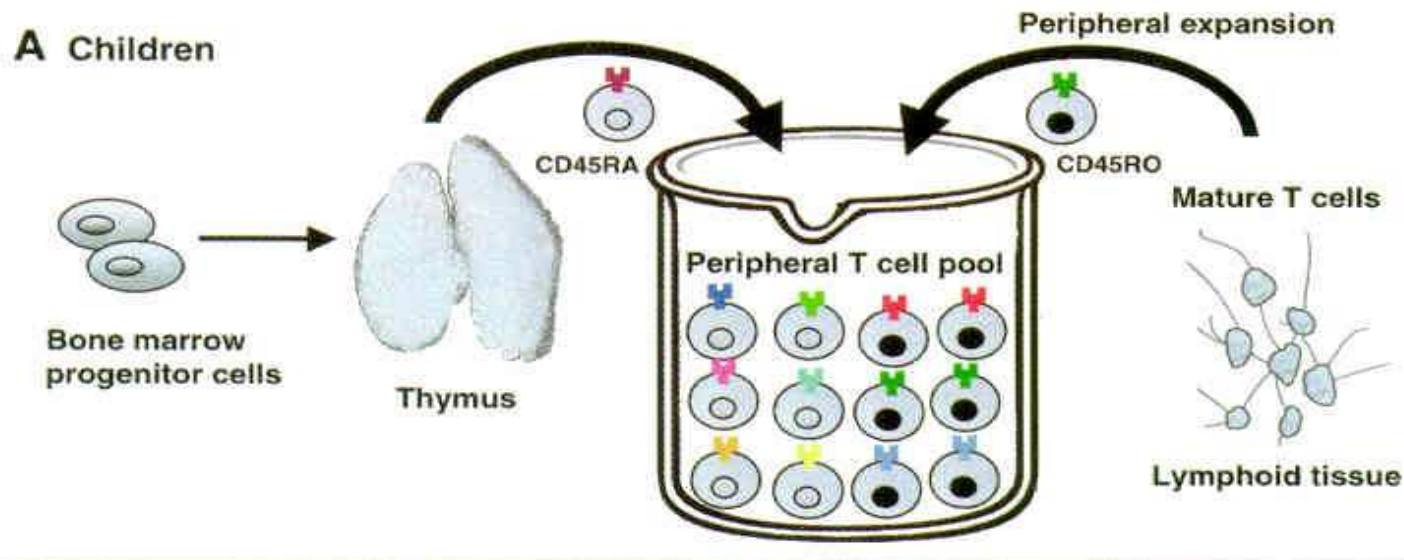
- Tolérance périphérique
- Réactivité croisée
- Mimétisme moléculaire
- Infections et rupture de tolérance

Trois étapes dans la vie d'un clone de lymphocytes T

- Thymocytes
- Lymphocytes T matures mais naïfs (n'ont pas encore rencontré l'antigène et l'attendent dans les organes lymphoïdes)
- Lymphocytes T matures et expérimentés (mémoires) : modifications phénotypiques irréversibles (il existe des « marqueurs » de l'état expérimenté d'un lymphocyte T)



CD45 RA : marqueur de cellules naïves
CD45 RO : marqueur de cellules mémoires



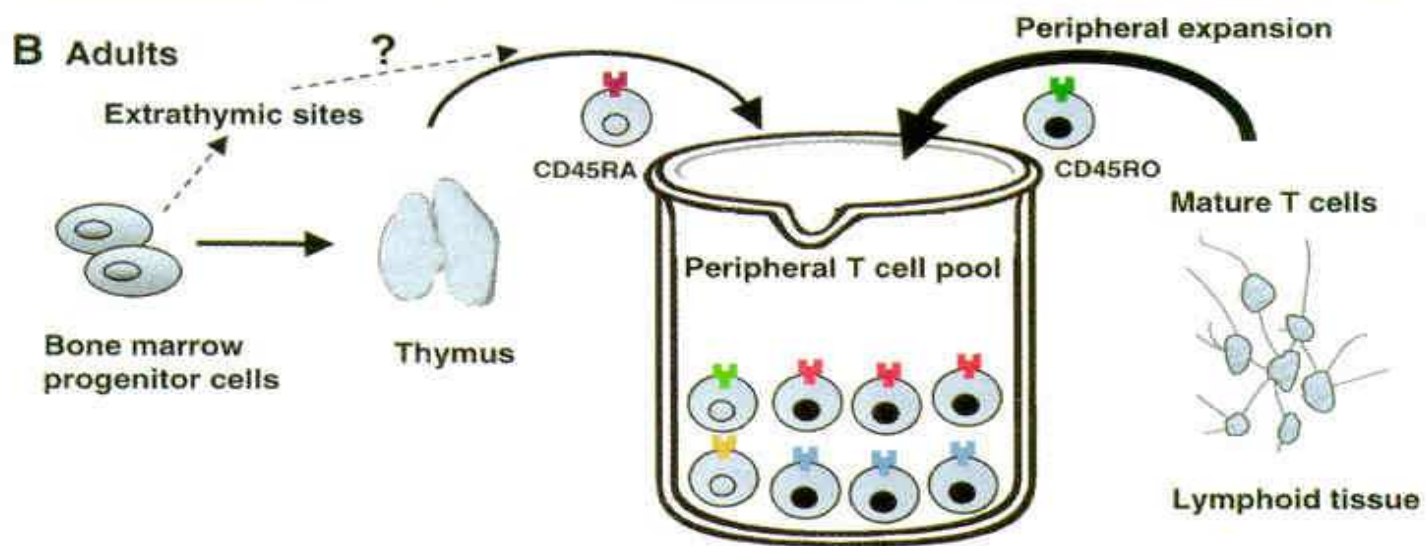
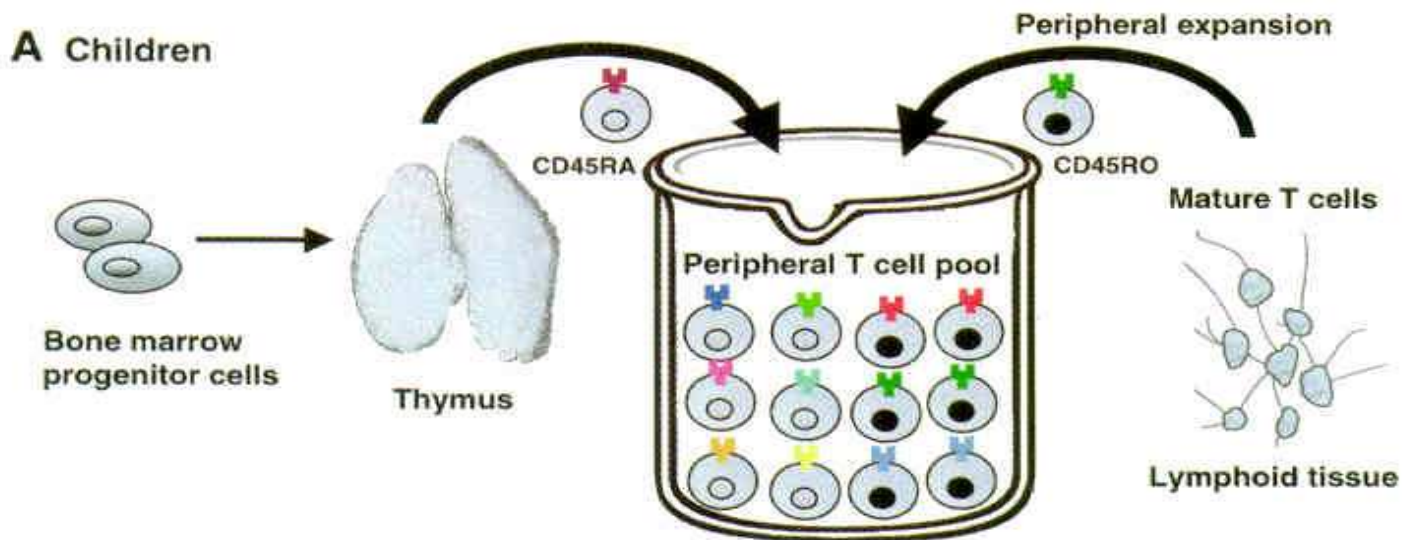
seul le pool des cellules mémoires est autoentretenu

Thymectomie

- Une fois le pool de lymphocytes T matures établis en périphérie, la thymectomie n'a plus d'effet sur le nombre de lymphocytes T dans le sang ou dans les organes lymphoïdes
- La thymectomie chez l'adulte ou le grand enfant ne provoque pas d'immunodéficience grave sauf si l'individu subit par la suite une déplétion lymphocytaire sévère (chimiothérapie, radiothérapie, infection virale) qui ne pourra plus être compensée par un apport de nouvelles cellules

Lymphopoïèse thymique

- Bien que non essentielle au maintien d'un nombre normal de lymphocytes T, la lymphopoïèse thymique joue un rôle dans le renouvellement du répertoire et le maintien de la diversité
- La lymphopoïèse thymique diminue fortement avec l'âge mais ne se tarit jamais



Involution thymique

- Le thymus involue avec l'âge
 - la thymectomie chez l'adulte voire chez le grand enfant ne provoque pas de lymphopénie T (abaissement du nombre de lymphocytes T) car les lymphocytes T mémoires se divisent continuellement et maintiennent un nombre cellulaire constant
 - la lymphopoïèse thymique n'est toutefois jamais abolie, même chez des sujets âgés

Réponses lymphocytaires T

- Deux types de réponses après interaction avec l'antigène en périphérie
 - différenciation auxiliaire (lymphocytes CD4⁺)
 - sécrétion de cytokines et expression membranaire de ligands favorisant l'activation d'autres types cellulaires
 - lymphocytes B, lymphocytes T cytotoxiques, macrophages, cellules NK, etc.
 - différenciation cytotoxique (lymphocytes CD8⁺)

Réponses « helper »

- Après activation par l'antigène, le lymphocyte auxiliaire CD4⁺ subit une « superspécialisation » selon le type de cellule qu'il va « aider »
 - aide aux lymphocytes B et à la production d'anticorps : lymphocytes auxiliaires Th2
 - aide aux lymphocytes T cytotoxiques, aux NK et aux macrophages : lymphocytes auxiliaires Th1

Lymphocytes CD4⁺ Th1 et Th2

- Ils se distinguent fondamentalement par le type de cytokines qu'ils sécrètent

Cytokines Th1 et Th2

Cytokine/function	T _H 1	T _H 2
Cytokine secretion		
IL-2	+	-
IFN- γ	++	-
TNF- β	++	-
GM-CSF	++	+
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-10	-	++
IL-13	-	++
Functions		
Help for total antibody production	+	++
Help for IgE production	-	++
Help for IgG2a production	++	+
Eosinophil and mast-cell production	-	++
Macrophage activation	++	-
Delayed-type hypersensitivity	++	-
T _C -cell activation	++	-

SOURCE: Adapted from F Powrie and RL Coffman, 1993, *Immunol. Today* 14:270.

Polarisation de certaines réponses immunitaires

- Dans certains cas, la réponse immunitaire est polarisée, c'est-à-dire qu'elle va se caractériser surtout par une production d'anticorps avec peu d'activation de cellules cytotoxiques et de macrophages ou vice-versa
- C'est le type de lymphocyte T auxiliaire qui va déterminer la polarisation de la réponse

Contrôle réciproque des réponses Th1 et Th2

- Les cytokines de type Th1 (IFN- γ) inhibent le développement de réponses de type Th2 et les réponses humorales elles-mêmes et les cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) inhibent le développement des réponses de type Th1 et les cellules cytotoxiques elles-mêmes

Polarisation Th1 ou Th2?

- Le « climat » cytokinique au moment de la première interaction avec l'antigène
- Le type de cellule présentatrice d'antigène responsable de la première activation
 - cellule dendritique : svt Th1
 - lymphocyte B : svt Th2

la fonction Helper des lymphocytes T CD4 et expression de ligands membranaires

- CD40 est une protéine de surface des lymphocytes B, des macrophages et des cellules dendritiques
- La stimulation de CD40 est essentielle à l'activation de ces cellules
- Le ligand de CD40 est exprimé à la surface des lymphocytes T auxiliaires (Th1 ou Th2)

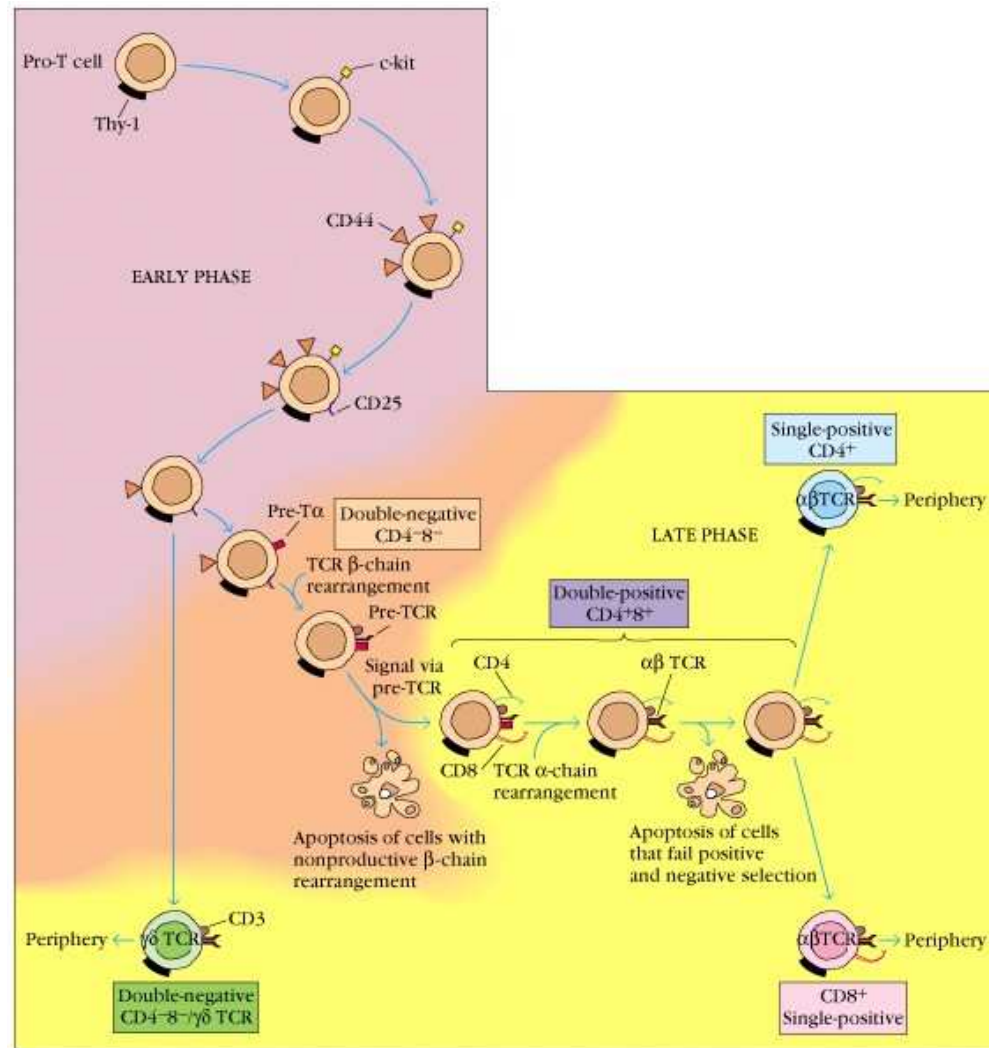
CD40L

- L'expression du ligand de CD40 est essentielle aux fonctions auxiliaires
 - exemple : le déficit génétique du ligand de CD40 provoque une incapacité à faire une commutation isotypique, c'est le syndrome d'hyperIgM

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ et les lymphocytes T $\gamma\delta$ correspondent en fait à des lignées cellulaires *différentes* et possèdent des propriétés *différentes*.

Les données classiquement admises au sujet du lymphocyte T concernent essentiellement le lymphocyte T $\alpha\beta$

Lymphocytes T $\gamma\delta$



Echappent aux
phénomènes de
sélection

Lymphocytes T $\gamma\delta$

- Peu nombreux dans le sang et les organes lymphoïdes
- Majoritaires au niveau des épithélias
- Peu de diversité, reconnaissance directe des antigènes sans intervention du CMH
- Sont souvent CD4⁻CD8⁻
- Fonction inconnue
 - reconnaissance des *heat shock proteins*?

Element	Immunoglobulin		$\alpha:\beta$ receptors	
	H	$\kappa+\lambda$	β	α
Variable segments (V)	65	70	52	~70
Diversity segments (D)	27	0	2	0
D segments read in 3 frames	rarely	–	often	–
Joining segments (J)	6	5(κ) 4(λ)	13	61
Joints with N- and P-nucleotides	2	50% of joints	2	1
Number of V gene pairs	3.4 x 10 ⁶		5.8 x 10 ⁶	
Junctional diversity	~3 x 10 ⁷		~2 x 10 ¹¹	
Total diversity	~10 ¹⁴		~10 ¹⁸	