

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED SEDDIK BENYAHIA JIJEL

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin D'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

*Production des anticorps monoclonaux et
polyclonaux et leurs applications*

Membres du Jury

Président : Melle. REZZAGUI Abir

Examinatrice : Dr. KEBSA Wided

Encadreur : Dr. BENGUEDOUAR Lamia et Dr. HIRECHE Saliha

Présenté Par :

Melle : BEKHIEKH Imane

Melle : BOUFELGHA Khawla

Melle : BOUFENZIOUA Hayem

Année universitaire : 2022/20223

N°d'ordre :/2023

Remerciements

*Nous remercions tout d'abord **ALLAH**, le tout puissant pour nous avoir illuminé et ouvert les voies du savoir, et pour nous avoir accordé la volonté et le courage afin d'élaborer ce travail.*

*Nous remercions sincèrement l'encadreure **Dr. BENGUEDOUER Lamia** pour son soutien, son suivi et ses conseils tout au long de la réalisation de notre mémoire.*

*Nous adressons aussi nos remerciements **Dr. HIRACHE S***

Nous remercions également tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

*Particulièrement **Dr. KEBSA W** enseignante au département de Biologie à l'Université de Jijel de nous avoir accordé l'honneur d'examiner et juger notre travail.*

*Et **Melle. REZZAGUI A** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury. Nous lui sommes reconnaissantes d'avoir accepté ce rôle et de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail.*

Enfin, que tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de notre gratitude en particulier les enseignants et les étudiants du département de biologie.

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrasses, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A ma très chère mère « Yamina »

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mes chers Amis

En souvenir de nos éclats de rire et des bons moments, en souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble, j'espère de tout mon coeur que notre amitié durera éternellement.

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Khawla

Dédicaces

*A la mémoire de mon père «**Massoude**» qui a été toujours dans mon esprit que Dieu ait son âme, je te dédie aujourd'hui ma réussite, et je sais que si tu étais présent parmi nous, tu seras si fière de moi. Je t'aime papa. Qu'Allah t'accueille dans son éternel paradis.*

*A ma chère maman «**Rokia**» ma source de confort, de réussite et de bonheur qui m'a donnée la vie, le symbole de tendresse qui a été mon ombre durant toutes les années des études qui à me donner l'aide et me protéger. Que Dieu la garde pour nous.*

*A mes chère sœurs : **Nadira, Fouzia, Sara, Ahlem, Sonia.***

*A mes chère frères : **Bilal, Fouzi, farouke, Mohamed yacine, Aissame, Samir.***

A mes collègues, A mes amies et tous ceux et toutes celles que j'ai involontairement omis de citer et qui n'en demeurent pas moins chers.

Hayem

Dédicace

Louange à Dieu qui nous a aidés, embellis avec la patience, honorés avec la piété et embellis avec la santé. Je dédie humblement mon travail à ceux que Dieu a couronnés de majesté et de dignité.

À Mon cher papa «Ali»

Permettez-moi de vous exprimer mon grand amour, Mon attachement et ma plus haute considération pour Votre personne. Je suis très fière d'être votre fille veuillez trouver, dans ce modeste travail, le fruit de Vos sacrifices Que Dieu vous protège et vous garde.

À ma chère mère «Rebiha»

Si Dieu a mis le paradis sous les pieds des mères, ce n'est pas pour rien. Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. je te dois ce que je suis aujourd'hui e ce que je serais demain, ma réussite est la tienne.

À ma chère sœur Youssra : source de joie et de bonheur

À mes chers frères : Sami et Ahmed pour leur appui et leur encouragement.

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Imane

Sommaires

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Généralités sur les Immunoglobulines

I.1. Définition 3

I.2. Classification des Immunoglobulines 4

I.2.1. Immunoglobulines G 4

I.2.1.1. Définition 4

I.2.1.2. Structure des Immunoglobulines 4

I.2.1.3. Rôle des Immunoglobulines G 5

I.2.2. Immunoglobulins M 6

I.2.2.1. Définition 6

I.2.2.2. Structure des Immunoglobuline M 6

I.2.2.3. Rôle des immunoglobulines M 7

I.2.3. Les immunoglobulines A 8

I.2.3.1. Définition 8

I.2.3.2. Structure des Immunoglobulines A 8

I.2.3.3. Rôle des Immunoglobulines A 9

I.2.4. Immunoglobulines E 9

I.2.4.1. Définition 9

I.2.4.2. Structure des Immunoglobulines E 9

I.2.4.3. Rôle des immunoglobuline E 10

I.2.5. Immunoglobulines D 10

| | |
|---|----|
| I.2.5.1. Définition | 10 |
| I.2.5.2. Structure des Immunoglobulines D | 11 |
| I.2.5.3. Rôle des immunoglobulines D..... | 11 |
| I.3. Anticorps monoclonaux et polyclonaux..... | 12 |
| I.3.1. Anticorps monoclonaux | 12 |
| I.3.2. Anticorps Polyclonaux | 13 |
| I.3.3. Comparaison entre les AC polyclonaux et AC monoclonaux | 14 |

Chapitre II : Production et purification des anticorps monoclonaux et polyclonaux

| | |
|--|----|
| II.1. Immunisation des animaux | 15 |
| II.1.1. Choix de l'animal | 15 |
| II.1.2. Préparation de la solution d'antigène pour immunisation..... | 15 |
| II.1.3. Choix de l'adjuvant | 16 |
| II.1.4. Voies d'administration | 16 |
| II.1.5. Production d'immunosérum | 17 |
| II.1.5.1. Production d'anticorps polyclonaux..... | 17 |
| II.1.5.2. Production d'anticorps monoclonaux..... | 20 |
| II. 2. Méthodes de purification des anticorps polyclonaux et monoclonaux | 23 |
| II.2.1. Méthodes conventionnelles | 23 |
| II.2.1.1. Fractionnement physico-chimique | 23 |
| II.2.1.1.1. Précipitation | 23 |
| II.2.1.2. Filtration membranaire | 24 |
| II.2.1.3. Chromatographie d'affinité | 26 |
| II. 2.2. Technologies récentes de purification basées sur la chromatographie | 27 |
| II.2.2.1. Chromatographie à base de protéine A/ G | 27 |
| II.2.2.2. Chromatographie basée sur l'immunoaffinité (IAC) | 29 |

| | |
|---|----|
| II.2.2.3. Chromatographie monolithique | 30 |
| II.2.2.4. Chromatographie basé sur la membrane | 31 |
| II.2.2.5. Chromatographie échangeuse cations | 31 |
| II.2.2.6. Chromatographie échangeuse d'anions | 32 |
| II.2.3. Avancées dans les méthodes non chromatographiques | 33 |
| II.2.3.1. Séparation diphasique aqueuse | 33 |
| II.2.3.2. Cristallisation | 34 |
| II.2. 3.3. Flocculation et filtration en profondeur | 35 |
| Chapitre III: Domaines d'applications des anticorps monoclonaux et polyclonaux | |
| III.1. Domaine de Diagnostique | 37 |
| III.1.1. Dosage des substances biologiques | 37 |
| III.1.2. Détermination des groupes sanguins ABO (hémagglutination)..... | 39 |
| III.1.3. Utilisation dans le test de grossesse | 39 |
| III.1.4. Anticorps monoclonaux comme outil de diagnostic de l'infection au COVID19 | 40 |
| III.2. Domaine thérapeutique | 41 |
| III.2.1. Anticorps monoclonaux | 41 |
| III.2.1.1. Types d'anticorps monoclonaux | 41 |
| III.2.1.2. Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux | 43 |
| III.2.2. Anticorps polyclonaux | 48 |
| III.2.2.1. Thérapeutique polyclonale commercialisée d'origine animale | 48 |
| III.2.2.2. Thérapeutique polyclonale commercialisée d'origine humaine..... | 50 |
| Conclusion..... | 52 |
| Perspective future | 53 |
| Références bibliographique | 54 |
| Résumé | |

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| Ac :Anticorps | CH : constant heavy |
| ACF : Adjuvant complet de Freund | CL : constant light |
| Acm : Anticorps monoclonaux | CRP : C reactive protein |
| Acp : Anticorps polyclonaux | Cys : Cysteine |
| AD : Antigen Detection | CK : Domaine constant de la chaine légère |
| ADCC : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity | CY : Domaine constant de la chaine légère |
| ADCP : Antibody dependent cellular phagocytosis | Cμ : Domaine constant de la chaine lourde d'immunoglobuline M |
| ADN : Acide Désoxyribonucléique | IFN-γ : Interferon gamma |
| AEC : Anion-exchange chromatography | DVB : Divinylbenzene |
| Ag : Antigène | EDMA : Ethylene dimethacrylate |
| AIF : Adjuvant incomplet de Freund | ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| AMC : Affinity monolith chromatography | Fab : Fragment Antibody Binding |
| ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament | Fc : Fragment Cristallisable |
| ARN : Acide Ribonucleique | FcRn : neonatal Fc receptor |
| AS : Ammonium sulfate | FcαRI : High-affinity IgA receptor |
| ATG : Antithymocyte globulin | FcγR : Récepteurs Fc Gamma |
| ATPS : Aqueous Two Phase System | FCER1 : High-affinity IgE receptor |
| Bay Tet® : Tetanus immune globulin | FDA : Food and Drug Administration |
| BSA : Bovine Sérique Albumine | GMA : Glycidyl methacrylate |
| CD : Clusters de différenciation | GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| CDC : Complement dependent cytotoxicity | GMM : Glycerol monomethacrylate |
| CDR : Complementarity-determining region | GPP : Psoriasis Pustuleux Généralisé |
| CEC : Cation-exchange chromatography | HAT : Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine |

| | |
|--|--|
| HCG: Humain chorionic gonadotropin | KLH: Keyhole limpet hemocyanin |
| HER2: Human epidermal growth factor receptor 2 | LDLC: Low-density lipoprotein cholesterol |
| HGPRT: Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase | LNII: Lymphome non hodgkinien |
| HIC: hydrophobic interaction chromatography | Mab: Monoclonal antibody |
| HIV: Human Immunodeficiency Virus | MCV: Maladies cardiovasculaires |
| HPLC: High performance liquid chromatography | MF: Microfiltration |
| hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein | MPAA: modified Polyallylamine |
| IAC: immunoaffinity Chromatography | Nabi-HB®: Hepatitis B Immune Globulin (Human) |
| ID: Intradermiques | OVA: Ovalbumine |
| IF: Immunofluorescence | Pab: polyclonal antibody |
| IFI: Immunofluorescence indirect | PDADMAC: Poly diallyldimethylammonium chloride |
| IFN-γ: Interferon gamma | PEG: polyethylene glycol |
| IgA: Immunoglobuline A | PEI: Polyethylenimine |
| IgDm: Immunoglobuline D membranaire | P-K: Prausnitz-kustner |
| IgDsec: Immunoglobuline D sécrétée | PPG: Psoriasis pustuleux généralisé |
| IgE : Immunoglobuline E | PVA: Poly-vinyl alcohol |
| IgG : Immunoglobuline G | RAD: Rapid antigen detection |
| IgIV: Ig intraveineuses | r-ATG: Rabbit antithymocyte globulin |
| IgM: Immunoglobuline M | RIA: Radioimmunologique |
| IL: Interleukine | RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction |
| IM: Intramusculaire | SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 |
| IP: Intrapéritonéales | SC: Sous-cutanée |
| IV: Intraveineuses | Th: T helper |

THY: Thyroglobuline

TNF α : Tumor necrosis factor a

TRIM: Triméthylolpropane triméthacrylate

UF: Ultrafiltration

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VH: variable heavy

VL: variable light

VRS: virus respiratoire syncytial

VK : Domaine variable de la chaîne légère

V2: Domaine variable de la chaîne légère

V μ : Domaine variable de la chaîne lourde d'immunoglobuline M

Liste des figures

| Figures | Titres | ages |
|------------------|---|-------------|
| Figure 1 | Structure de sous-unité d'une molécule d'anticorps | 3 |
| Figure 2 | Disposition schématique des sous-classes d'IgG | 4 |
| Figure 3 | Structure schématique d'une molécule d'IgG | 5 |
| Figure 4 | Structure schématique de l'IgM hexamérique et d'une monomère IgM | 6 |
| Figure 5 | Mécanismes possibles qui soutiendraient le maintien à long terme des IgM | 7 |
| Figure 6 | Structures schématique d'IgA - IgA monomérique, dimérique et sécrétoire | 8 |
| Figure 7 | Structure schématique d'une molécule d'immunoglobuline E | 10 |
| Figure 8 | Structure schématique d'une molécule d'IgD humaine | 11 |
| Figure 9 | Anticorps monoclonal, liaison à un épitope spécifique | 12 |
| Figure 10 | Anticorps Polyclonaux : plusieurs épitopes sont reconnus par plusieurs types d'anticorps spécifiques | 13 |
| Figure 11 | Cinétique des échantillons d'anticorps IgM et IgG de mammifères après immunisation initiale et rappel | 17 |
| Figure 12 | Mesure du titre d'un anticorps | 18 |
| Figure 13 | Types de technique ELISA | 19 |
| Figure 14 | Technique immuno-enzymatique ELISA | 19 |
| Figure 15 | Principe du test ELISA indirect | 20 |
| Figure 16 | Production AcM selon la technique des hybridomes de G. Kohler et C. Milstein | 21 |
| Figure 17 | Principaux procédés à base de membranes capables d'éliminer diverses tailles des contaminants | 25 |
| Figure 18 | Filtration à flux tangentiel | 26 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figure 19 | Chromatographie d'affinité pour isoler des molécules en fonction des capacités de liaison au ligand | 27 |
| Figure 20 | Interaction d'un anticorps monoclonal de type immunoglobuline G | 28 |
| Figure 21 | Chromatographie d'affinité basée sur la protéine A/G | 28 |
| Figure 22 | Chromatographie d'immuno-affinité pour la purification des protéines | 29 |
| Figure 23 | Chromatographie basé sur membrane de filtration | 31 |
| Figure 24 | Chromatographie échangeuse d'anions sépare les molécules en fonction des charges positives et négatives | 33 |
| Figure 25 | Aperçu schématique du processus de floculation | 36 |
| Figure 26 | Immunofluorescence indirect. | 38 |
| Figure 27 | Schématisation d'une réaction d'agglutination | 39 |
| Figure 28 | Effet de l'ajout en alternance d'anticorps polyclonaux utilisées dans le test de grossesse dirigés contre l'hCG | 40 |
| Figure 29 | Résultat RT-qPCR sur le gène E du SARS-CoV-2. A, test positif (Ct=20) ; B, test négatif (absence de fluorescence) | 41 |
| Figure 30 | Évolution des anticorps monoclonaux et potentiel d'immunogénicité | 42 |
| Figure 31 | Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique en oncologie | 43 |

Liste des tableaux

| Tableaux | Titre | Page |
|------------------|---|-------------|
| Tableau 1 | Comparaison des principales caractéristiques des Ac polyclonaux et Ac monoclonaux | 14 |
| Tableau 2 | Types de supports utilisés en AMC | 30 |
| Tableau 3 | Anticorps monoclonaux humanisés utilisés en clinique. | 47 |
| Tableau 4 | Exemples de thérapeutiques polyclonales actuellement disponibles | 51 |

Introduction

Notre sang a la capacité de neutraliser et d'éliminer des germes. Cette caractéristique biologique été pour la première fois mise en évidence dans les années 1890 par Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato. Durant un siècle, les recherches se sont poursuivies et ont permis de caractériser les substances dotées de cette capacité de neutralisation : les anticorps (Ac) appelés aussi immunoglobulines (Ig) (Goubet et al., 2018) sont des glycoprotéines sécrétées par des lymphocytes B spécialisés appelés plasmocytes qui se distribuent dans le plasma, les liquides extravasculaires et les sécrétions (Lipman et al., 2005). Ils sont formés de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures (Kolopp, 2009).

Les anticorps sont les molécules effectrices cardinales du système immunitaire et sont exploités avec un énorme succès en tant que médicaments biothérapeutiques. Un élément clé de la réponse immunitaire adaptative est la production d'un mélange d'anticorps polyclonaux diversifiés en épitopes, capable de neutraliser les agents pathogènes envahisseurs ou les molécules pathogènes par l'interférence de liaison et par la médiation des fonctions effectrices humorales et cellulaires (Oostindie et al., 2022).

La production d'anticorps polyclonaux (Acp) restera une activité de recherche essentielle et les lapins continueront d'être l'une des principales espèces utilisées dans la production d'anticorps polyclonaux. Les calendriers et les méthodologies utilisées pour immuniser les lapins et produire des anticorps polyclonaux continueront de varier en fonction de l'immunogène, l'adjuvant et le but final de l'anticorps (Stills, 2012).

Grâce à la mise au point de la technologie des hybridomes en 1975. Georges Köhler, et César Milstein ont fabriqué pour la première fois des anticorps (Ac) monoclonaux, ce qui leur a valu le prix Nobel Médecine et de Physiologie en 1984 (Scheen et Moutschen, 2009). Durant les années qui suivirent leur découverte, les Ac monoclonaux sont devenus des outils révolutionnaires largement exploités en laboratoire, jusqu'à devenir omniprésents dans le domaine de la recherche et du diagnostic médical (Mistretta et al., 2009). Les anticorps monoclonaux sont largement préférés aux anticorps polyclonaux en raison de leur spécificité et de leur traitement ciblé. Cela les rend incroyablement utiles car ils peuvent être utilisés pour traiter toute maladie cellulaire ou liée à un agent pathogène, y compris le cancer. Des anticorps monoclonaux peuvent être fabriqués pour aider l'organisme à reconnaître, marquer ou bloquer les récepteurs des cellules cancéreuses sans les effets secondaires d'autres immunothérapies telles que la chimiothérapie et la radiothérapie. Il existe actuellement de

nombreux médicaments mAb sur le marché contre le cancer, qui sont soit murins, chimériques, humanisés ou humains (Srirapu, 2023).

Les thérapies à base d'anticorps utilisant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux apparaissent comme une approche thérapeutique importante pour le traitement d'un certain nombre de maladies. Avec l'accent mis sur les nouvelles technologies associées à l'expression et à la purification des anticorps monoclonaux, le besoin clinique des thérapies polyclonales pour le traitement d'une variété de maladies et d'infections spécifiques est souvent négligé. Bien qu'ils aient été largement abandonnés au début du XXe siècle en raison du développement des antibiotiques, les anticorps thérapeutiques polyclonaux sont aujourd'hui largement utilisés en médecine pour la neutralisation des virus et toxines et pour la thérapie de remplacement chez les patients présentant des déficits en immunoglobulines. Au cours des 20 dernières années, les immunoglobulines intraveineuses ont montré des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires bénéfiques dans de nombreuses maladies. Les préparations d'anticorps hyperimmuns ont été utilisées au cours du siècle dernier pour le traitement d'une variété d'agents infectieux et d'urgences médicales, y compris la toxicité de la digoxine, l'envenimation des serpents et les morsures d'araignées (Newcombe et Newcombe, 2007).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de démontrer la méthode de production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux et d'identifier leurs applications les plus importantes dans le traitement et le diagnostic médical.

Dans un premier temps notre premier chapitre comportera des définitions des immunoglobulines leur classification, leur structure générale, et leur rôle. Ainsi qu'une exploration des anticorps monoclonaux et polyclonaux mettant en exergue la différence de production.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons les techniques de production des anticorps monoclonaux et polyclonaux et les méthodes de purification des anticorps.

Enfin un troisième chapitre est dédié aux cibles et modes d'action des AcM et AcP ainsi que des différents domaines d'application en diagnostique et en thérapie : en oncologie, maladies inflammatoires, maladie respiratoires et allergiques...etc.

***Chapitre I : Généralités sur
les Immunoglobulines***

I.1. Définition des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines sécrétées par des lymphocytes B spécialisés appelés plasmocytes qui se distribuent dans le plasma, les liquides extravasculaires et les sécrétions. Aussi appelés immunoglobulines (Ig), parce qu'ils contiennent un domaine structural commun présent dans de nombreuses protéines. Le terme immunoglobuline est général et s'applique à une famille de protéines de haut poids moléculaire qui partagent des caractéristiques physico-chimiques et des déterminants antigéniques communs. Ces protéines comprennent toutes les molécules ayant une activité d'anticorps (Ayyar et al., 2012). Ils sont des protéines hétérodimères composées de 2 chaînes lourdes (~55 kD) et 2 chaînes légères (~25 kD) maintenues ensemble par des liaisons disulfures et non covalentes, et la molécule résultante est souvent représentée par une molécule schématique en forme de Y d'environ 150 kD (Figure 1) (Lipman et al., 2005).

Les Immunoglobulines peuvent être séparées fonctionnellement en domaines variables qui se lient aux antigènes et en domaines constants qui spécifient les fonctions effectrices. Elles peuvent ensuite être soumises à une hypermutation somatique après exposition à l'antigène pour permettre la maturation d'affinité. Chaque domaine variable peut être divisé en 3 régions de variabilité de séquence appelées « Régions Déterminant la Complémentarité » (CDR) et 4 régions de séquence relativement constante appelées régions de charpente. Les 3 CDR de la chaîne lourde sont appariées avec les 3 CDR de la chaîne légère pour former le site de liaison à l'antigène, tel que défini classiquement. Les domaines constants de la chaîne lourde peuvent être commutés pour permettre une fonction effectrice altérée tout en maintenant la spécificité antigénique (Schroeder et al., 2010).

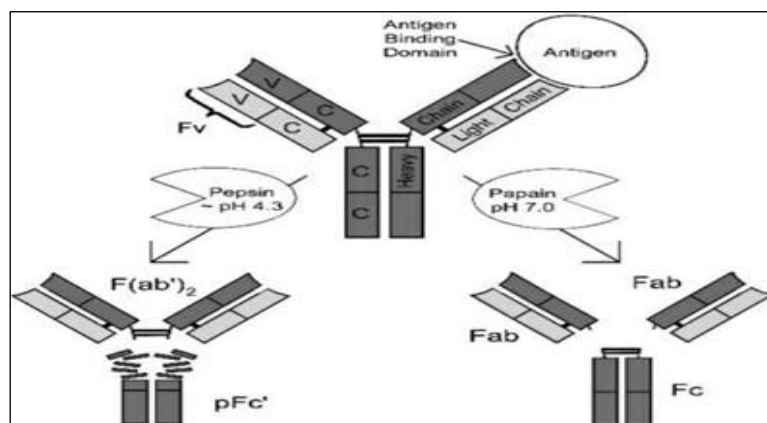


Figure 1 : Structure de sous-unité d'une molécule d'anticorps (Lipman et al., 2005).

I.2. Classification des Immunoglobulines

Il existe cinq classes d'immunoglobulines qui sont classées sur la base de la région constante de la chaîne lourde; ce sont les IgA, les IgD, les IgE, les IgG et les IgM. La région lourde constante des IgA, IgD et IgG a trois domaines Ig et une région charnière pour offrir une flexibilité, tandis que les régions constantes d'IgE et d'IgM ont quatre domaines Ig. Les classes IgG et IgA sont ensuite classées en six isotypes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 et IgA2). Malgré le vaste choix de types d'immunoglobulines à sélectionner pour le développement d'un anticorps thérapeutique, la plupart des ingénieurs en anticorps se sont concentrés sur la classe IgG, bien que la classe IgG3 ne soit pas utilisée comme candidat thérapeutique car elle a une demi-vie plus courte, une longue région charnière facilement accessible à la protéolyse et un polymorphisme allotypique (Correia, 2010).

I.2.1. Immunoglobulines G

I.2.1.1. Définition

L'immunoglobuline G (IgG) est l'une des protéines les plus abondantes dans le sérum humain, représentant environ 10 à 20% des protéines plasmatiques. C'est la classe principale des cinq classes d'immunoglobulines chez les êtres humains, IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. Ces glycoprotéines étroitement apparentées, composées de 82 à 96% de protéines et de 4 à 18% de glucides, diffèrent par leur structure de chaîne lourde et ont des fonctions effectrices différentes. Les IgG peuvent être divisés en quatre sous-classes, nommées, par ordre décroissant d'abondance IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 Comme les autres isotypes (Figure 2) (Vidarsson et al., 2014). L'IgG est l'isotype prédominant trouvé dans l'organisme. Il a la demi-vie sérique la plus longue de tous les isotypes d'immunoglobulines (Schroeder et al., 2010).

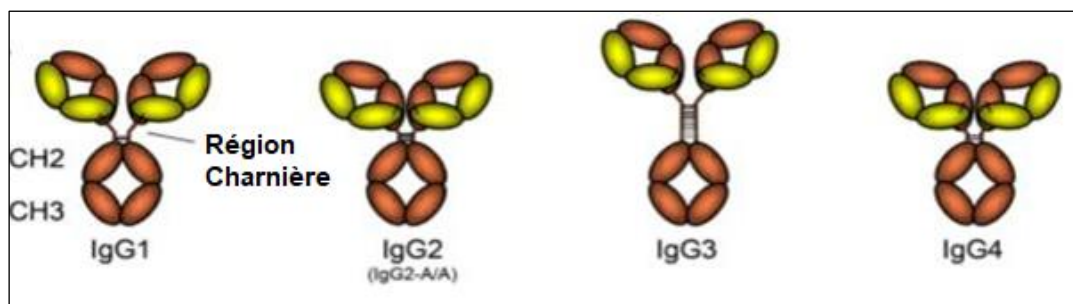


Figure 2 : Disposition schématique des sous-classes d'IgG (Vidarsson et al., 2014).

I.2.1.2. Structure des Immunoglobulines G

La molécule d'immunoglobuline G (IgG) est constituée de quatre chaînes polypeptidiques, composées de deux chaînes identiques de 50 kDa γ lourdes (H) et de deux chaînes légères (L) identiques de 25 kDa κ ou λ , liées entre elles par des liaisons disulfure

inter-chaînes. Chaque chaîne lourde est constituée d'un domaine variable N-terminal (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2, CH3), avec une « région charnière » supplémentaire entre CH1 et CH2. De même, les chaînes légères sont constituées d'un domaine variable N-terminal (VL) et d'un domaine constant (CL). La chaîne légère s'associe aux domaines VH et CH1 pour former un bras Fab (« Fab » = liaison à l'antigène fragmentaire) (Figure 3) (Vidarsson et al., 2014).

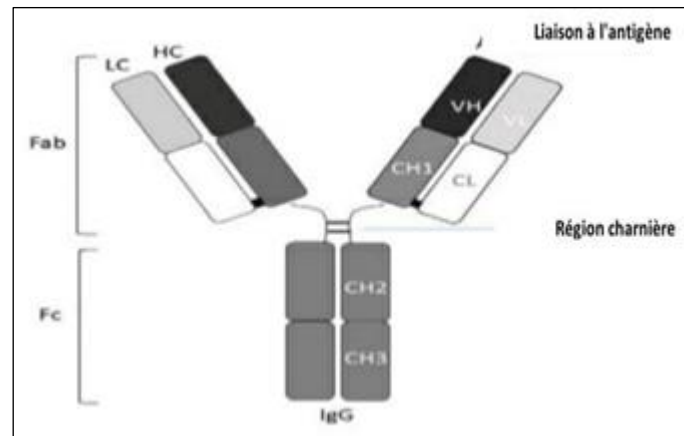


Figure 3 : Structure schématique d'une molécule d'IgG (Maibom-Thomsen et al., 2019).

I.2.1.3. Rôle des Immunoglobulines G

Les anticorps IgG sont reconnus depuis longtemps comme médiateurs pro-inflammatoires de la réponse immunitaire humorale. Les anticorps se lient et neutralisent les antigènes pour favoriser la cytotoxicité dépendante des anticorps, l'opsonisation des antigènes et l'initiation de la phagocytose. Alors que la spécificité antigénique des anticorps est déterminée par la partie Fab de liaison à l'antigène, les fonctions effectrices initiées par les anticorps sont déclenchées par le domaine Fc (crystallisable) (Subedi et Barb, 2015). Le domaine Fab d'une molécule d'IgG se lie aux épitopes viraux et peut neutraliser le virus en bloquant l'entrée, la fusion ou la maturation, l'engagement du domaine FC d'IgG avec les membres de la famille FcγR est responsable du déclenchement des réponses des cellules effectrices critiques pour la protection de l'hôte contre l'infection (Bournazos et al., 2020).

L'IgG est la seule classe d'anticorps qui traverse de manière significative le placenta humain. Ce croisement est médié par le récepteur Fc néonatal (FcRn) exprimé sur les cellules syncytiotrophoblastes. Le transfert placentaire des anticorps IgG maternels au fœtus est un mécanisme important qui protège le nourrisson (Palmeira et al., 2012). Les IgG étaient utilisées pour traiter de nombreuses maladies infectieuses. Aujourd'hui, les IgG polyclonales regroupées provenant du sérum de milliers de donneurs, administrées par voie intraveineuse, appelées immunoglobulines intraveineuses, ou IgIV, sont utilisées comme thérapie de

remplacement pour les patients dépourvus d'immunoglobulines. A fortes doses, les IgIV peuvent agir comme agent anti-inflammatoire et immunomodulateur pour le traitement de plusieurs maladies auto-immunes (Lünemann et al., 2015).

I.2.2. Immunoglobulines M

I.2.2.1. Définition

Les anticorps IgM constituent le composant majeur des anticorps naturels et sont également la première classe d'anticorps produits lors d'une réponse anticorps primaire. Les anticorps de type IgM diffèrent des autres classes d'anticorps en ce qu'ils sont majoritairement produits par les cellules B1, en l'absence de stimulation apparente par des antigènes spécifiques. En outre les anticorps IgM sont principalement codés par des segments de gène germinal V et ont de faibles affinités mais de larges spécificités pour les structures étrangères et auto (Boes, 2000).

I.2.2.2. Structure des Immunoglobuline M

Les anticorps de l'isotype IgM sont généralement de format pentamérique ou hexamère, où chaque monomère est d'environ 190 kDa, composé d'une chaîne μ lourde avec cinq domaines ($V\mu$, $C\mu1$, $C\mu2$, $C\mu3$ et $C\mu4$) et une chaîne légère avec deux domaines ($V\kappa-C\kappa$ ou $V\lambda-C\lambda$). Les chaînes lourdes de chaque monomère sont liées de manière covalente par une liaison disulfure à Cys 337. Chaque chaîne légère est liée par un pont disulfure à la chaîne lourde en utilisant des résidus de cystéine en position 136 dans la chaîne lourde. Les monomères IgM sont liés de manière covalente par des liaisons disulfure entre l'avant-dernière cystéine de ces peptides de l'embout. De plus, les liaisons disulfure intermonomères entre les résidus de Cys 414 dans $C\mu3$ maintiennent le centre de l'IgM dans une structure en anneau bien définie. En plus de la chaîne lourde et des chaînes légères, les IgM possèdent également une troisième chaîne, un polypeptide de 137 acides aminés, connu sous le nom de chaîne de jonction (J), qui est une caractéristique clé des anticorps IgA polymères et IgM pentamères (Keyt et al., 2020).

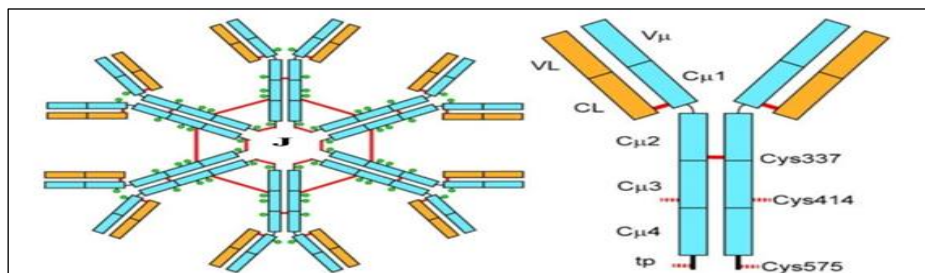


Figure 4 : Structure schématique de l'IgM hexamérique et d'un monomère IgM (Müller et al., 2013).

I.2.2.3. Rôle des immunoglobulines M

La fonction des IgM polymériques peut être observée à trois niveaux différents : les processus d'agglutination, d'activation du complément et d'interaction avec les récepteurs poly-Ig. L'agglutination assure la phagocytose et l'élimination du pathogène, tandis que l'activation du complément contribue à l'opsonisation du pathogène et relie les branches innées et adaptatives du système immunitaire. L'interaction avec les récepteurs poly-Ig fournit le rôle des IgM dans l'immunité muqueuse (Petrušić et al., 2011).

L'IgM joue un rôle plus important dans les infections microbiennes que ce qui a été généralement apprécié. Les propriétés uniques de l'IgM permettent à cette immunoglobuline d'être très efficace dans la prévention et l'élimination de divers types d'infections microbiennes. Ainsi, il existe un potentiel pour mieux utiliser l'IgM pour la prévention et le traitement des infections, par l'immunisation et/ou l'administration passive d'anticorps. Il est maintenant clair qu'une source majeure d'IgM naturelles et immunitaires provient de sous-ensembles spécialisés de cellules B-1 (Figure 5) (Racine et Winslow, 2009).

L'IgM a été utilisée depuis longtemps comme un outil de diagnostic important pour identifier les individus qui ont été exposés à des agents pathogènes viraux, et bien que des IgM neutralisantes soient générées contre la plupart des virus. Un rôle protecteur important des IgM a également été démontré dans plusieurs infections bactériennes extracellulaires, notamment celles causées par *Borrelia* et *Streptococcus*, ainsi elles peuvent fournir une immunité contre la bactérie intracellulaire facultative comme *Nocardia brasiliensis* (Racine et Winslow, 2009).

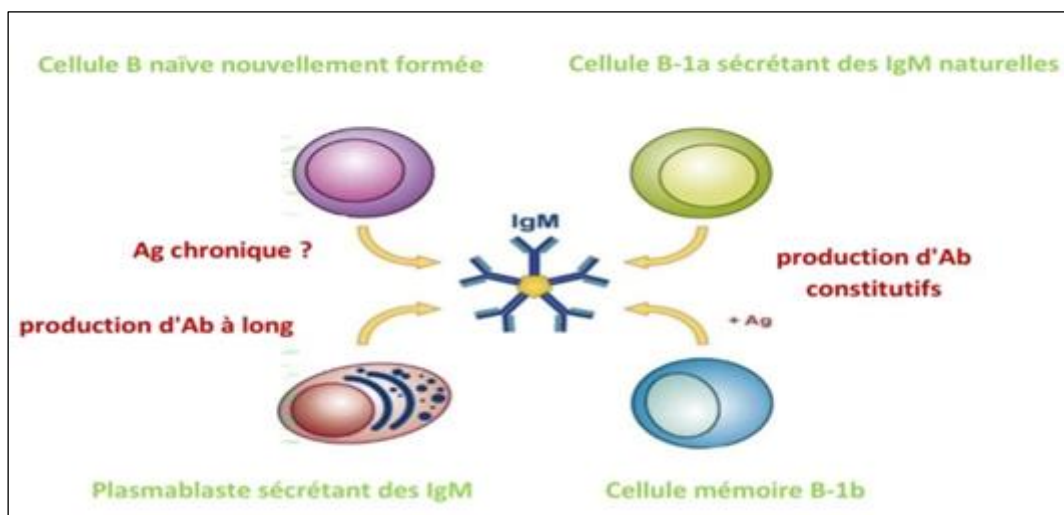


Figure 5 : Mécanismes possibles qui soutiendraient le maintien à long terme des IgM (Racine et Winslow 2009).

I.2.3. Immunoglobulines A

I.2.3.1. Définition

L'IgA est l'isotype d'anticorps le plus abondant produit chez l'homme, principalement présent dans les zones muqueuses. Le processus de biosynthèse des IgA, l'interaction avec les récepteurs et la clairance peuvent être perturbés dans certaines pathologies, comme la néphropathie à IgA, qui est la forme la plus courante de glomérulonéphrite dans le monde (Perše et Večerić-Haler, 2019).

I.2.3.2. Structure des Immunoglobulines A

Dans chaque molécule d'IgA, il existe une chaîne α , qui permet de distinguer une partie variable située dans le segment N-terminal et une partie fixe comprenant le segment C-terminal organisée en domaines : CH1, CH2, CH3 ainsi que la région charnière, et le peptide de 18 acides aminés, appelé section de la queue. Cette section est capable de se lier de manière covalente à la chaîne J et de former des polymères. L'immunoglobuline A est sécrétée sous deux formes : monomère et dimère. Dans le sérum, les IgA existent principalement sous forme monomère. Il existe deux sous-classes : IgA1 et IgA2, qui diffèrent par leur structure et leur distribution, et se produisent dans des proportions différentes dans les tissus et les organes du corps humain. La différence entre les sous-classes d'IgA ne s'applique qu'à 22 acides aminés dans la région charnière. Dans la molécule IgA2, il y a une délétion de 13 acides aminés dans cette région, mais la région charnière de la molécule IgA1 contient de trois à cinq domaines oligosaccharidiques liés, qui ne se trouvent pas dans les IgA2. (Trochimiak et Hübner-Woźniak, 2014).

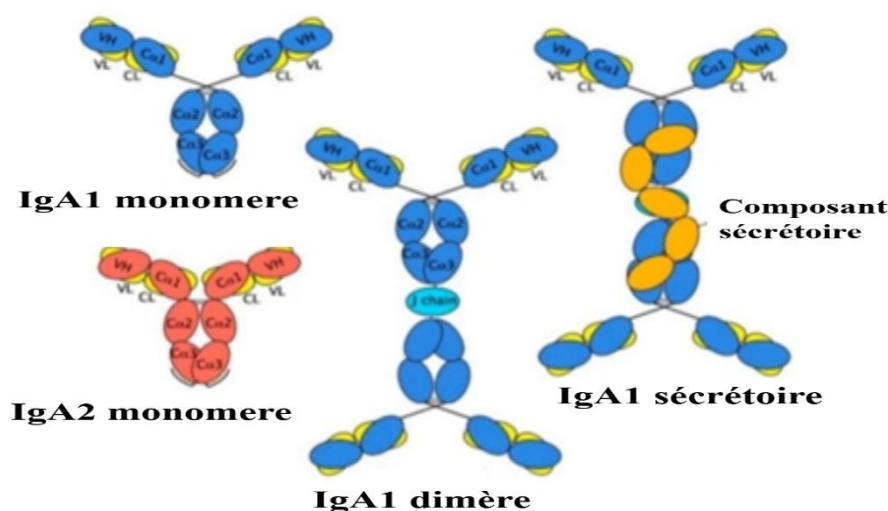


Figure 6 : structures schématique d'IgA - IgA monomérique, dimérique et sécrétoire

(Sousa-Pereira et Woof, 2019).

I.2.3.3. Rôle des Immunoglobulines A

Les mécanismes par lesquels d'IgA est transportée et régulée sont différents de ceux de l'immunité systémique. Les anticorps muqueux inhibent l'adhérence des micro-organismes, protègent l'hôte contre l'absorption des antigènes des surfaces muqueuses et le maintien de l'homéostasie intestinale. L'IgA joue également un rôle dans l'inhibition des effets inflammatoires, qui se manifestent au cours de certains mécanismes effecteurs immunitaires (Herich, 2017).

Les IgA sériques, qui sont principalement monomères, et les formes sécrétoires d'IgA sont capables de neutraliser et d'éliminer les agents pathogènes par une gamme de mécanismes, y compris le déclenchement du récepteur IgA Fc connu sous le nom de High-affinity IgA receptor (Fc α RI) ou CD89 sur les phagocytes. L'efficacité de ces processus d'élimination est mise en évidence par le fait que divers agents pathogènes ont développé des mécanismes pour contrecarrer une telle clairance médiée par les IgA (Sousa-Pereira et Woof, 2019).

I.2.4. Immunoglobulines E

I.2.4.1. Définition

L'IgE est le moindre composant de la famille des immunoglobulines chez l'homme et les animaux de laboratoire. La concentration de l'immunoglobuline dans le sérum humain normal est de l'ordre de 100 à 200 ng/ml. Cependant, les anticorps IgE ont des activités biologiques uniques. Les anticorps sensibilisent les mastocytes et les basophiles d'espèces homologues, et les réactions de l'antigène aux anticorps IgE liés aux cellules induisent la libération d'une variété de médiateurs (par exemple, l'histamine) qui provoquent des symptômes allergiques. La sensibilisation de la peau humaine avec un anticorps IgE suivie d'une provocation des sites cutanés avec un allergène induit des réactions d'érythème-papule qui sont connues sous le nom de réactions ,prausnitz-kustner (P-K) (Ishizaka,1985).

I.2.4.2. Structure des Immunoglobulines E

Fab contient la chaîne légère et une partie de la chaîne lourde reliées par un pont disulfure, elles sont chacune composées de deux domaines globulaires, et elles composent toutes deux la région variable où l'anticorps se lie à l'antigène qu'il reconnaît. La région Fc est composée de l'autre moitié des deux chaînes lourdes, où elles sont liées par un pont disulfure. La région Fe contient les domaines constants C ϵ 2, C ϵ 3 et C ϵ 4. Le C ϵ 3 est le domaine constant et le site où l'IgE se lie au récepteur High-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) (Ra et al., 1989).

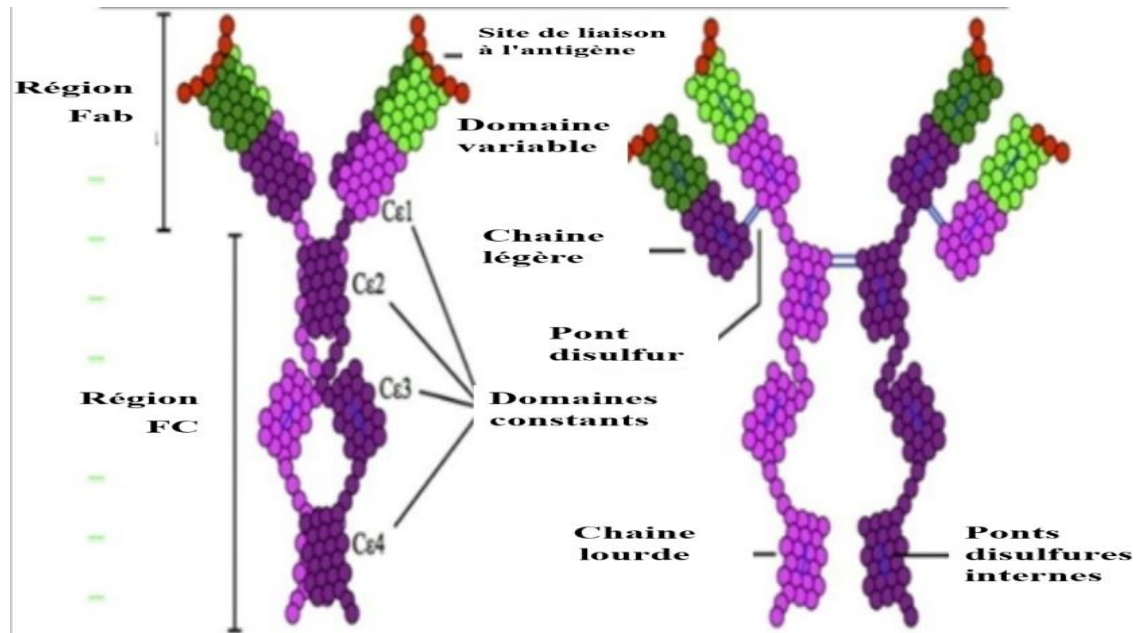


Figure 7 : Structure schématique d'une molécule d'immunoglobuline E (Ra et al., 1989).

I.2.4.3. Rôle des immunoglobuline E

Les anticorps immunoglobulines E (IgE) jouent un rôle central dans la réponse allergique l'interaction avec le FcεRI sur les mastocytes et les basophiles entraîne des réactions d'hypersensibilité immédiates lors d'une provocation allergénique, tandis que l'interaction avec le CD23/FcεRII, exprimé sur une variété de cellules, régule la synthèse d'IgE parmi d'autres activités. La région IgE-Fc de liaison au récepteur s'est récemment avérée présenter une flexibilité remarquable, allant de conformations très courbées à étendues, avec une communication allostérique entre les sites de liaison FcεRI et CD23 distants (Chen et al., 2018).

I.2.5. Immunoglobulines D

I.2.5.1. Définition

L'IgD est le principal isotype du récepteur antigénique à la surface de la plupart des cellules B périphériques, où il est coexprimé avec l'IgM. Peu de plasmocytes contenant uniquement des IgD ont pu être trouvés dans les tissus lymphoïdes, les végétations adénoïdes avaient un plus grand nombre de plasmocytes contenant des IgD que la rate humaine, les ganglions lymphatiques ou le tissu lymphoïde intestinal. Il existe une synthèse et une sécrétion spontanées d'IgD à partir des lymphocytes des amygdales en culture. L'immunoglobuline D est une immunoglobuline unique dont la concentration sérique est bien inférieure à celle des IgG, IgA et IgM mais bien supérieure à celle des IgE (Vladutiu, 2000).

I.2.5.2. Structure des Immunoglobulines D

Comme les autres immunoglobulines, l'IgD humaine est constituée de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) organisées en domaines variables et constants (figure 8). L'IgD existe sous deux formes, membranaire (IgDm) et sécrétée (IgDsec). Ces formes diffèrent par la partie carboxy-terminale de leur chaîne lourde δ , une queue hydrophile pour l'IgDsec et une région membranaire hydrophobe et cytoplasmique pour l'IgDm. Les chaînes légères sont le plus souvent de type κ pour la forme membranaire, et de type λ pour la forme sécrétée. Chez l'homme, les chaînes lourdes des IgD sont composées de trois domaines C, d'une région charnière et d'un domaine variable. La structure des domaines C δ 1 et C δ 2 est semblable à celles des domaines C des autres classes d'Ig (Levan-Petit et al., 1999).

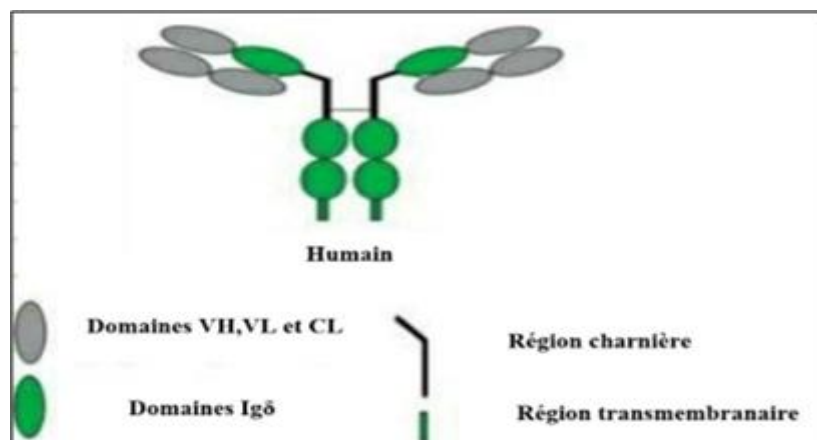


Figure 8 : Structure schématique d'une molécule d'IgD humaine (Surova et Jumaa, 2014).

I.2.5.3. Rôle des immunoglobulines D

L'IgD est présente sous forme de traces dans le sérum mais fait fonction de récepteur à la surface des cellules B, où elle est coexprimée avec l'IgM. L'IgD apparaît sur les cellules B qui se différencient à la suite de leur activation, mais est absente des cellules mûres productrices d'anticorps. Les mécanismes qui régulent l'expression et la perte des récepteurs IgD sont au cœur de l'adaptabilité du système immunitaire dans sa réponse aux agents pathogènes envahisseurs. Deux rôles connexes peuvent être envisagés pour les récepteurs IgD à cet égard. Premièrement, ils étendent la limite inférieure de la plage d'affinité des populations de cellules mémoires précoces induites par un stimulus antigénique donné et élargissent donc la diversité des réponses pouvant être obtenues à partir de ces populations. Deuxièmement, ils soutiennent la persistance de populations de mémoire de faible affinité dans des conditions où l'antigène devient limitant et finit par disparaître (Nguyen, 2022).

L'IgD sécrétée semble améliorer l'homéostasie muqueuse et la surveillance immunitaire en "armant" les cellules effectrices myéloïdes telles que les basophiles et les

mastocytes avec des anticorps IgD réactifs contre les antigènes muqueux, y compris les microbes commensaux et pathogènes (Gutzeit et al., 2018).

I.3. Anticorps monoclonaux et polyclonaux

I.3.1. Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (Acm) sont des anticorps produits par un seul clone de lymphocyte B. Ils ont été reconnus pour la première fois dans les sérums de patients atteints de myélome multiple dans lesquels l'expansion clonale des plasmocytes malins produit des niveaux élevés d'un anticorps identique entraînant une gammopathie monoclonale. Au milieu des années 1970, Köhler et Milstein ont mis au point la technique de génération d'anticorps monoclonaux d'une spécificité souhaitée, pour laquelle ils ont reçu le prix Nobel. Ils ont fusionné des cellules B spléniques avec des cellules de myélome, résultants les hybridomes immortels, chacun produisant un Acm unique. Les Acm ont un avantage sur les autres types de traitement de l'infection car ils sont créés pour cibler spécifiquement une partie essentielle du processus infectieux (Lipman et al., 2005).

Les Acm présentent plusieurs caractéristiques qui les distinguent des petites molécules, notamment une sélectivité très élevée, une demi-vie relativement longue qui permet généralement une ou deux doses mensuelles et un potentiel considérablement réduit d'interactions médicamenteuses ou d'autres toxicités non liées à la cible (Silberstein et al., 2015). Les Acm aussi présentent des propriétés de liaison précises et reproductibles d'un lot à l'autre (figure 9), il faut beaucoup de temps, d'argent et d'expertise pour produire, cribler et stocker, en particulier par rapport à la facilité relative et au faible coût de production des anticorps polyclonaux (Acp) (Ascoli et Aggeler, 2018).

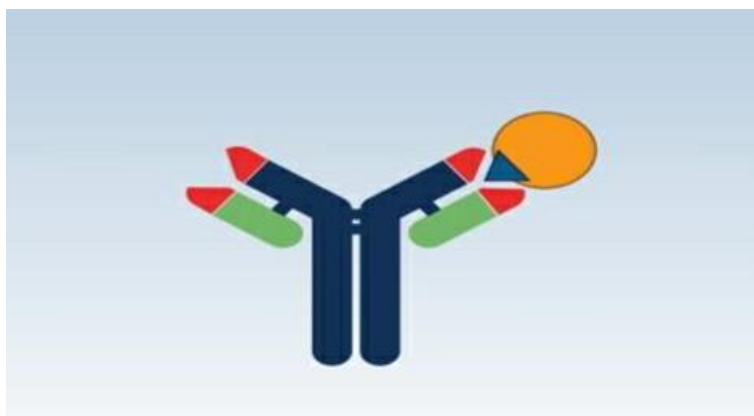


Figure 9 : Anticorps monoclonal lié à un épitope spécifique (Ascoli et Aggeler, 2018).

I.3.2. Les Anticorps Polyclonaux

Le terme « anticorps polyclonal » est défini comme la population totale d'anticorps présents dans le sérum animal. Cette population complexe contient différentes sous-classes d'anticorps, notamment les IgG, IgM, IgE, IgA et IgD (Dunbar et al., 1990). Les Ac polyclonaux sont des Ac produits par plusieurs familles de lymphocytes B. Les antisérums contenant ces Acp sont généralement produits par injection, à un animal, de l'immunogène cible (antigène), souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. Cette dernière peut, par la suite, être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant (Mistretta et al., 2009).

Les principaux avantages des Acp sont centrés sur deux propriétés inhérentes : la diversité clonale et biophysique (figure 10). La « poly » clonalité des Acp permet la liaison de multiples déterminants antigéniques de la cible. Cela permet aux Acp d'être plus sensibles dans certains dosages contre une variété de protéines cibles, de cellules ou d'organismes. La diversité biophysique des Acp permet une plus grande stabilité lorsque les défis environnementaux peuvent entraîner l'inactivation, la labilité ou la précipitation d'autres formes d'anticorps. Ces deux propriétés sont à la base des nombreux avantages offerts par les Acp par rapport à leurs homologues Acm et Acr. les Acp considérés comme des outils de recherche inestimables qui continuent de jouer un rôle approprié dans la recherche, en particulier si : (1) ils sont développés, validés et finalement fabriqués avec les spécifications correctes ; (2) les contrôles positifs et négatifs sont utilisés de manière appropriée pendant la production et la libération ; et (3) ils sont finalement utilisés dans un contexte spécifique à l'essai approprié, selon les conditions d'utilisation établies par le fabricant (Ascoli et Aggeler, 2018).

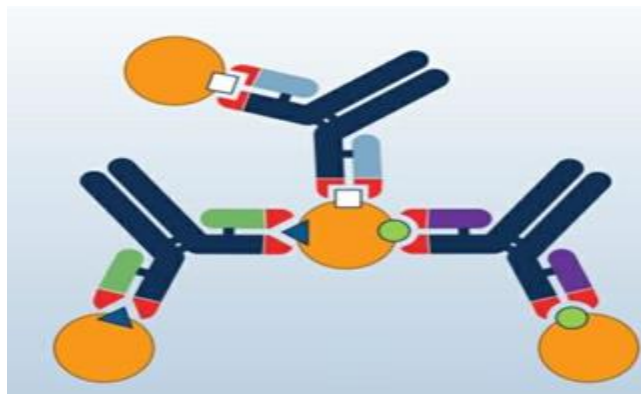


Figure 10 : Anticorps Polyclonaux : plusieurs épitopes sont reconnus par plusieurs types d'anticorps spécifiques (Ascoli et Aggeler, 2018).

I.3.3. Comparaison entre les AC polyclonaux et AC monoclonaux

Le tableau 1 montre quelques points exprimant des différences entre les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux.

Tableaux 1 : Comparaison des principales caractéristiques des AC polyclonaux et AC monoclonaux (Mistretta et al., 2009).

| | AC polyclonaux | AC monoclonaux |
|---|--|---|
| Temps et coût de fabrication | Rapide et moins cher | Lente et plus cher |
| Compétence technique requises | Moindre | Supérieure |
| la production | Plusieurs lignées différentes de lymphocyte B 6 semaines <i>in vivo</i> | Une seul lignée de lymphocyte B 6 mois <i>in vitro</i> |
| Spécificité | A plusieurs épitopes | A un seul épitope |
| Affinité | Variable | Constante |
| Concentration et degré de pureté | Faible | Elevé |
| La source | Animaux immunisé | Les hybridomes |
| Nombre d'animaux utilisés | Supérieur | Inferieur |
| Disponibilité | Limité | Illimitée |

***Chapitre II : Production et
purification des anticorps
monoclonaux et polyclonaux***

II.1. Immunisation des animaux

Outre l'immunogénicité de l'antigène, un grand nombre de paramètres influencent le résultat de chaque immunisation (le site d'introduction de l'antigène, la dose d'antigène, la programmation des vaccinations dans le temps, le type d'adjuvant appliqué et la constitution génétique du receveur) (Leenaars et al., 1997).

II.1.1. Le choix de l'animal

Le choix des espèces est pertinent, en particulier lors de la production de Acp, car la quantité d'anticorps récoltés dépend de la taille de l'animal. Les lapins, les moutons et les chèvres sont les mammifères les plus couramment utilisés en raison de leur taille, de la facilité d'accès vasculaire et de la nature et de la robustesse de leur réponse immunitaire. Parmi ces mammifères, les lapins sont le plus souvent utilisés pour générer des anticorps pour la recherche car ils sont plus faciles et moins coûteux (Lipman et al., 2005).

Alors que les souris sont les espèces prédominantes utilisées pour générer des Acm car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et faciles à élever, ont une durée de vie courte et se reproduisent facilement, elles sont moins fréquemment utilisées pour générer des Acp en raison de leur petite taille et du volume sanguin associé (Delahaut, 2017).

II.1.2. Préparation de la solution d'antigène pour immunisation

Les antigènes (Ag) aqueux pour l'immunisation sont préparés de manière à prévenir la contamination, à éliminer les contaminants ou les deux, en particulier les bactéries étrangères ou les produits bactériens qui peuvent provoquer une septicémie ou une réaction inflammatoire étendue. La plupart des protéines Ag peuvent être stérilisées par filtration à travers un filtre microporeux (Hanly et al., 1995). Les petites molécules de faible poids moléculaire (moins de 8–12 kDa) ce que l'on appelle les haptènes nécessitent d'être couplés par une liaison covalente à une grande protéine porteuse (albumine sérique bovine (BSA), ovalbumine (OVA) et thyroglobuline (THY)...etc) (Delahaut, 2017). En termes généraux, des quantités d'antigène protéique de l'ordre du microgramme au milligramme sont nécessaires en conjonction avec un adjuvant pour provoquer des réponses sériques à titre élevé chez les animaux de laboratoire. Comme Hanly et ses collaborateurs (1995) l'ont rapporté, la dose habituelle d'une protéine soluble administrée avec l'adjuvant de Freund pour les lapins est de l'ordre de 50 à 1000 µg, pour les souris de 10 à 200 µg, pour les chèvres et les moutons 250 à 5000 µg (Leenaars et Hendriksen, 2005).

II.1.3. Choix de l'adjuvant

Le choix du meilleur adjuvant peut nécessiter la réalisation d'une étude préliminaire comparant différents adjuvants en association avec l'antigène d'intérêt (Simonin et al., 1979). Les adjuvants sont des substances injectées avec un antigène qui sont destinés à renforcer la réponse immunitaire humorale et ou à médiation cellulaire à l'antigène. Les adjuvants peuvent être divisés arbitrairement en ceux utilisés à des fins prophylactiques, principalement pour créer des vaccins thérapeutiques, et ceux utilisés à des fins expérimentales pour produire des anticorps pour une étude ultérieure (Stils, 2005).

Il existe différentes classes d'adjuvants mais les plus utilisés pour la production d'AC tels que les adjuvants d'origine bactérienne contenant en plus des mycobactéries inactivées par la chaleur (*Mycobacterium tuberculosis*) comme l'adjuvant complet de Freund (ACF) ces adjuvants agissent par effet dépôt pour générer des titres d'anticorps élevés prolongés et soutenus et sont le plus employés pour la première injection. Des huiles minérales ou émulsions eau dans l'huile comme l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) sont utilisés pour les injections ultérieures, cette émulsion d'eau dans de l'huile permet à l'antigène de se déposer dans les tissus. (Vermout et al., 2003).

II.1.4. Voies d'administration

Le choix de la voie d'administration en fonction de la nature de l'antigène, de la nature de l'adjuvant, de l'espèce animale et de l'évolution de la séquence d'immunisation (primaire ou rappel) (Delahaut, 2017). Les voies d'injection les plus fréquemment utilisées pour la production des anticorps sont sous-cutanées (SC), intradermiques (ID), intramusculaires (IM), intrapéritonéales (IP) et intraveineuses (IV) (Hanly et al., 1995).

Les principales voies d'immunisation chez le lapin sont les voies sous-cutanées, intradermique, et intramusculaire. Les injections intramusculaires et sous-cutanées sont toutes deux techniquement assez faciles à réaliser chez le lapin et permettent l'injection de plus grands volumes d'immunogène/adjuvant par site que la voie intradermique. La voie intraveineuse pourrait être la voie de choix pour les petits immunogènes, est pratique pour les injections secondaires et les rappels, mais les préparations antigéniques avec adjuvant ne doivent pas être injectées par voie intraveineuse cette voie la plus souvent utilisée pour l'immunisation des souris. Les immunisations intrapéritonéales, largement utilisées chez les rongeurs et les souris, ont été associées à la douleur et à la détresse chez les souris lorsque l'ACF est utilisé et sont rarement utilisées chez les lapins (Stills, 2012).

II.1.5. Production d'immunosérum

II.1.5.1. Production d'anticorps polyclonaux

a. Protocole d'Immunsation

Beaucoup de ces protocoles rapportés partagent des caractéristiques communes : une immunisation primaire, une période de repos appropriée pour permettre à la réponse immunitaire primaire de se calmer et aux cellules mémoires de se former, une ou plusieurs injections de rappel, et prélèvement de sérum 10 à 14 jours après le dernier rappel. Pour la génération d'anticorps, un protocole d'immunisation relativement bref peut être utilisé :

- Jour 0 : première injection (25 à 300 µg d'antigène), adjuvant complet de Freund (ACF)
- Jour 21 : Injection de rappel (25 à 300 µg d'antigène), adjuvant incomplet de Freund (AIF)
- Jour 42 : Injection de rappel (25 à 300 µg d'antigène), AIF
- Jour 56 : Prélèvement de sérum

Ce protocole générique peut être utilisé pour la plupart des espèces hôtes et permettra la génération d'une réponse immunitaire efficace à une grande variété d'antigènes. La réponse immunitaire primaire est caractérisée par des niveaux relativement élevés d'anticorps IgM, qui ont une demi-vie de 8 à 10 jours et à de faibles niveaux d'anticorps pour lesquels une commutation de classe est requise (IgG, IgA, IgE). La classe d'anticorps IgG constitue la majeure partie de la réponse secondaire, et cette classe a une demi-vie de 25 à 35 jours. La (figure 11) montre la contribution relative des IgG et des IgM aux réponses d'anticorps primaires et secondaires (Bean, 2000).

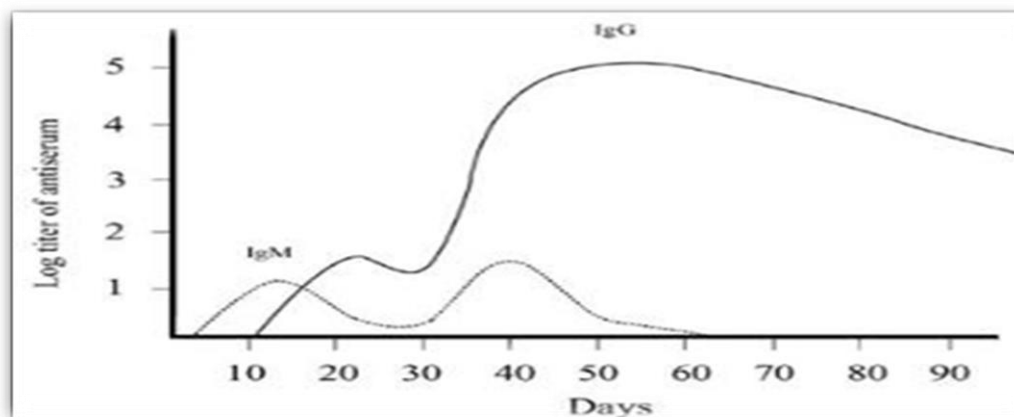


Figure 11 : Cinétique des échantillons d'anticorps IgM et IgG de mammifères après immunisation initiale et rappel (Bean, 2000).

b. Mesure du titre d'un Anticorps :

La présence d'un anticorps spécifique dans le sérum de patients peut être mesurée par plusieurs méthodes différentes. La quantité d'anticorps présente dans le sérum est déterminée par titrage de celui-ci en dilution limitée. Le titre d'un sérum correspond à l'inverse de la dernière dilution positive (Figure 12) . Certains auteurs définissent le titre d'un sérum comme la dilution donnant 50% de la réaction maximale observée. L'antisérum a pu être utilisé à une dilution supérieure à 1:100 000 dans un test immuno-enzymatique compétitif indirect (ELISA) et a permis de détecter des concentrations d'anticorps dans l'échantillon (Thirumala et al., 2000).

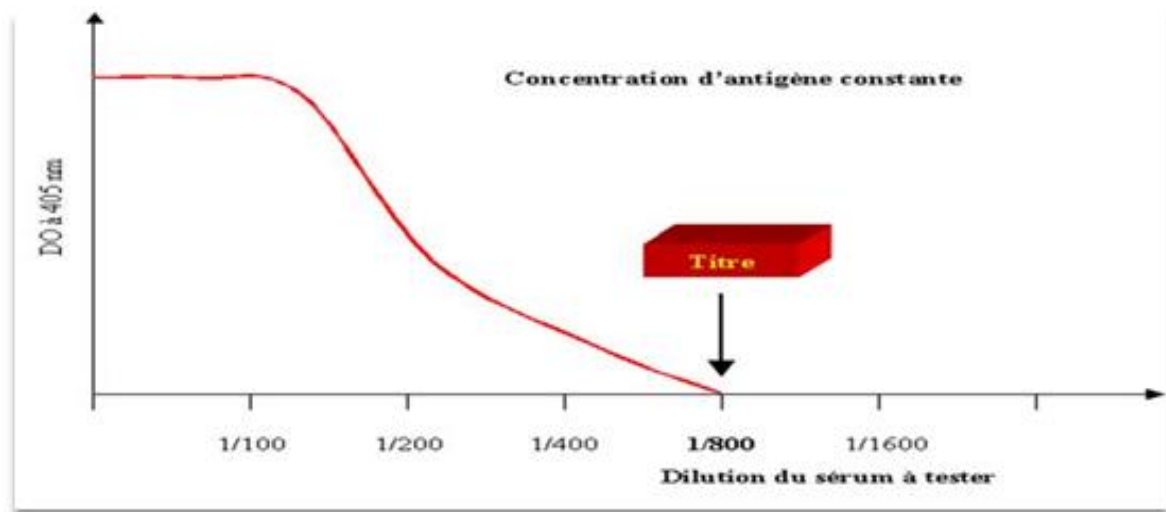


Figure 12 : Mesure du titre d'un anticorps (Thirumala et al., 2000).

c. Méthodes de dosage des anticorps Polyclonaux

- ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay)

Le dosage immuno-enzymatique (ELISA) est une technique simple et rapide de détection et de quantification des anticorps ou des antigènes fixés à une surface solide. Étant l'un des essais immuns les plus sensibles, l'ELISA offre une valeur commerciale dans la recherche en laboratoire, le diagnostic des biomarqueurs de la maladie et le contrôle de la qualité dans diverses industries. Cette technique utilise un anticorps lié à une enzyme se liant à un antigène fixé à la surface. Par la suite, un substrat est ajouté pour produire soit un changement de couleur, soit un signal lumineux corrélé à la quantité d'antigène présente dans l'échantillon original (Lin, 2015), il existe quatre formats dans la configuration ELISA (Figure 13).

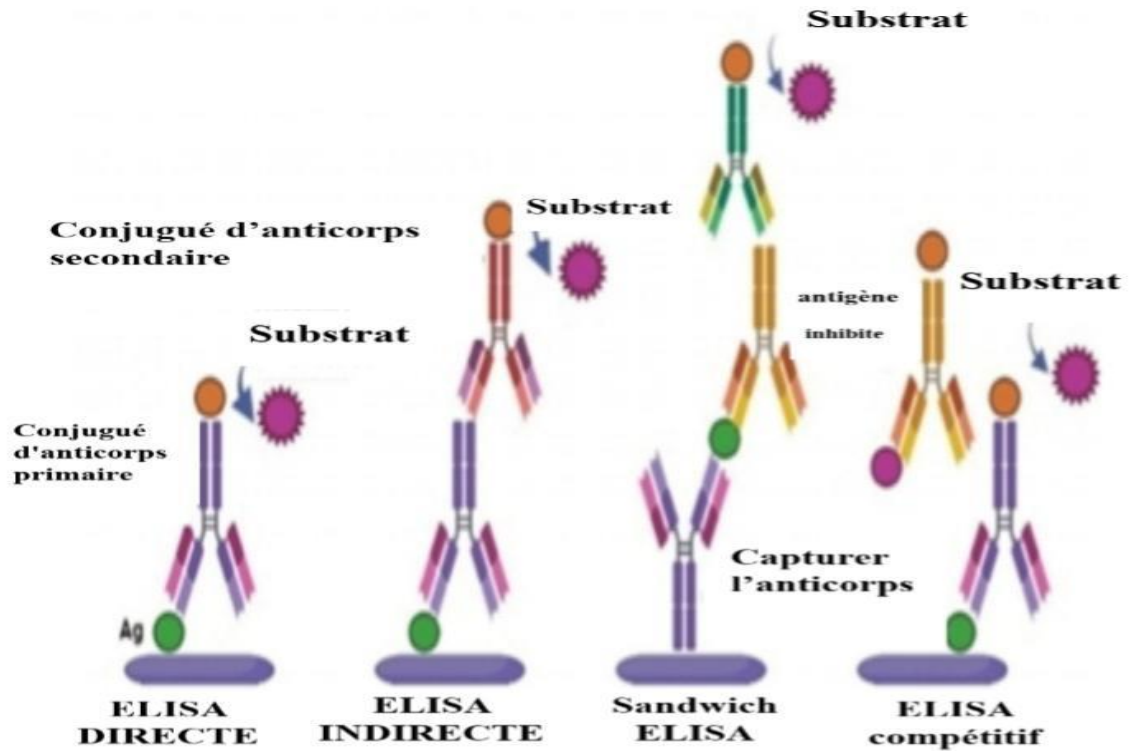


Figure 13 : Types de technique ELISA (Khan et al., 2023).

Le principe de base d'un ELISA est d'utiliser une enzyme pour déterminer la liaison Ag-Ac. Le substrat incolore est transformé à l'aide d'une enzyme en un produit coloré, suggérant que la liaison Ag:Ac est présente selon la façon dont le test ou le type d'ELISA est construit, un ELISA peut détecter la présence d'Ags ou d'Acs dans un échantillon dans les dosages immuno-enzymatiques (ELISA) (Figure 14), les Acp détectent plusieurs variants d'antigène ou épitopes présents dans l'analyte, ce qui est particulièrement important lors de l'observation de variances naturelles dans des échantillons de donneurs humains (Plested et al., 2003) (Ma et Shieh, 2006).

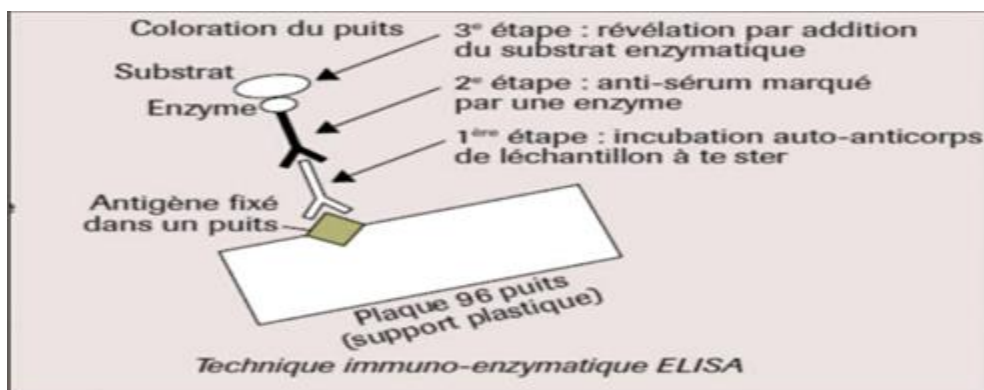


Figure 14 : Technique immuno-enzymatique ELISA (Terrier et Mouthon., 2006)

❖ **ELISA indirect :**

Dans ce procédé, les Ac à doser réagissent dans un premier temps avec l'Ag immobilisé. Dans un deuxième temps, la quantité d'Ac fixé sur l'Ag en excès est mesurée à l'aide d'un deuxième Ac (anti-immunoglobuline) conjugué à une enzyme (Figure 15). L'activité enzymatique est élevée quand il y a beaucoup d'Ac marqué fixés, donc beaucoup d'Ac ayant réagi dans le premier temps. L'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité d'Ac à doser (Khan et al., 2023).

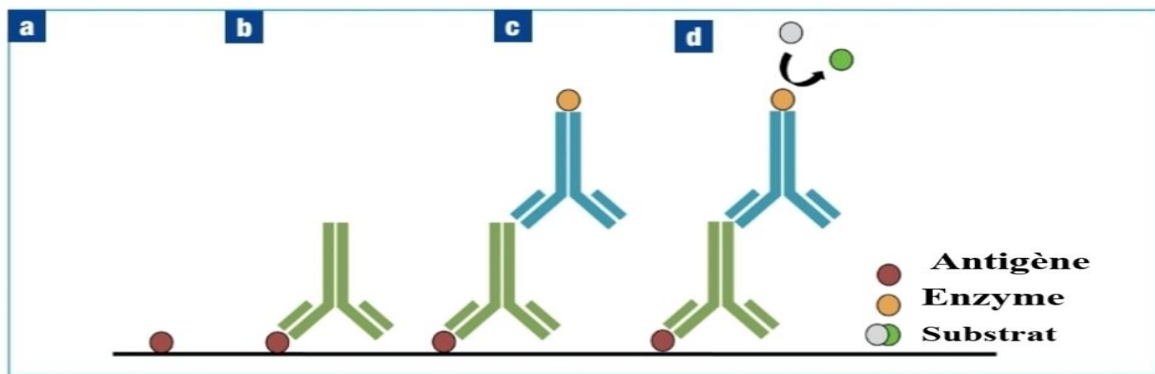


Figure 15: Principe du test ELISA indirect (Shah et Maghsoudlou, 2016).

II.1.5.2. Production d'anticorps monoclonaux

Dans la technique de base la production des Ac monoclonaux se déroule en deux étapes principales à savoir la production *in vivo* (immunisation) de cellules lymphoïdes sécrétant des Ac leur hybridation et la sélection *in vitro* d'un hybridome producteur d'Ac puis la multiplication de clones de l'hybridome soit *in vitro* soit *in vivo*, afin d'obtenir de grandes quantités d'Ac (figure16) (Mistretta et al., 2009).

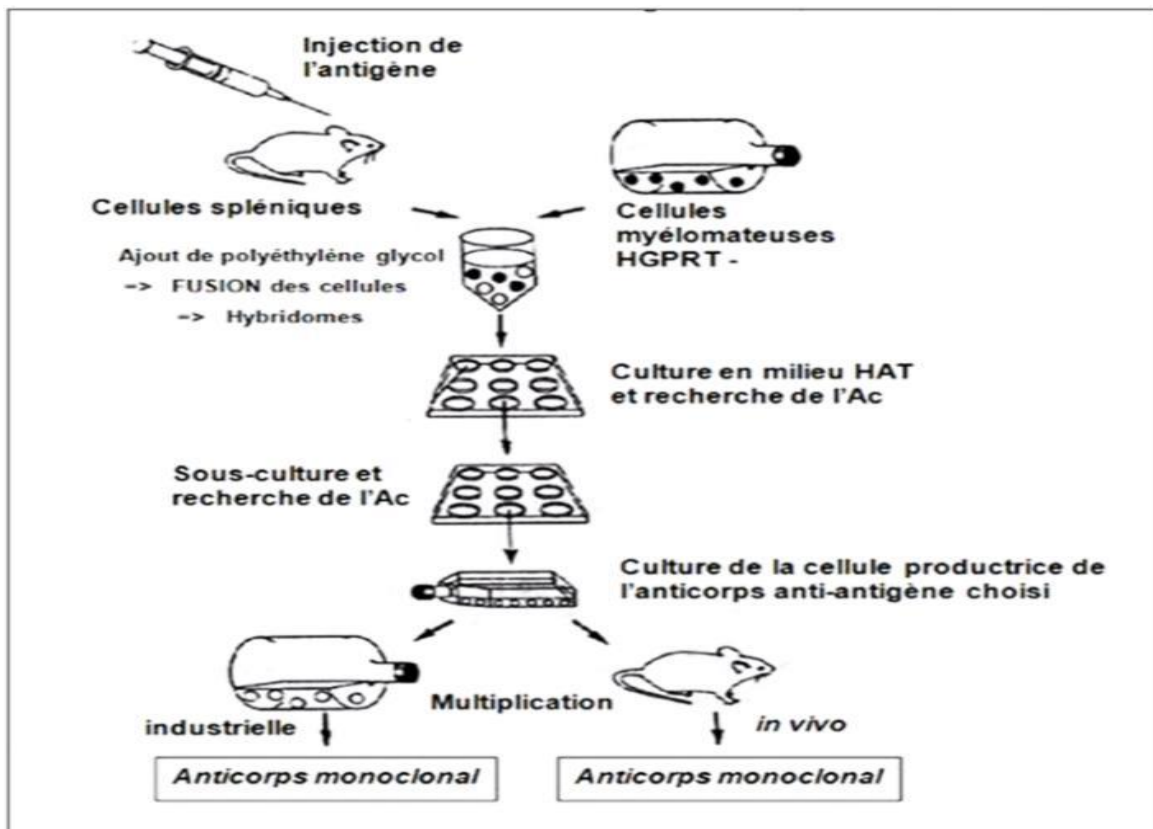


Figure 16 : Production Acm selon la technique des hybridomes de G. Kohler et C. Milstein (Mistretta et al., 2009).

a. Immunisation

Les substances qui induisent une réponse immunitaire sont généralement étrangères à l'individu et sont appelées immunogènes. Le plus souvent, un immunogène sera délivré en conjonction avec un adjuvant, qui est considéré comme un activateur immunitaire non spécifique (Nelson et al., 2000), est injecté par voie intrapéritonéale dans des souris BALB/c qui sont généralement utilisées car de nombreuses cellules de myélome disponibles pour la fusion ont une origine BALB/ c (Leenaars et al., 1997). On doit effectuer les saignements de la queue après le dernier rappel et ELISA pour déterminer la souris à titre le plus élevé à utiliser pour la fusion cellulaire (Pandey, 2010). L'injection de rappel est administrée 10 à 14 jours après la primovaccination. Trois jours après l'injection de rappel, les rates des animaux sont prêtes pour la fusion cellulaire (Yokoyama et al., 2013).

b. Fusion cellulaire et sélection d'hybridomes

Le processus d'hybridation est centré sur la fusion de cellules B spléniques avec des cellules de myélome (Nelson et al., 2000). Les cellules de myélome utilisées sont déficientes en activité enzymatique de type hypoxanthine-guanine phospho-ribosyl-transférase (HGPRT-) (Al Saati et Brousset, 2010). La fusion cellulaire est réalisée à 37°C en présence de polyéthylène glycol (PEG) et permet ainsi d'obtenir les hybridomes. Une fois que ces cellules hybrides sont formées et cultivées dans des puits de culture tissulaire, la priorité passe à l'élimination des cellules de myélome non fusionnées (Nelson et al., 2000). Cette situation est résolue par incubation avec un milieu hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (HAT) et alimentation pendant 2 semaines, les hybridomes sont prêts pour le criblage (Yokoyama et al., 2013).

c. Criblage des surnageants primaire d'hybridomes

Le but du criblage est de découvrir quels puits (<1 % à 5 %) contiennent des hybridomes qui sécrètent l'anticorps de spécificité souhaitée. La sélection des hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux spécifiques se fait par des tests d'activité anticorps dans le surnageant de la culture, la méthode utilisée est la révélation immunoenzymatique (ELISA) ou radioimmunologique (RIA). Le criblage doit être effectué lorsque la plupart des puits en croissance démontrent 10 % à 25 % de confluence lorsqu'ils sont observés au microscope inversé ou lorsque certains des puits les plus denses commencent à jaunir dans les 2 jours suivant l'alimentation (Yokoyama et al., 2013).

d. Clonage des hybridomes

Le clonage se produit après identification des cellules d'hybridome primaires positives dans le but de multiplier et produire de grandes quantités d'anticorps désirés. Cloner par dilution limitée. Le principe de la méthode est de diluer le mélange de telle manière que, lors de la distribution de la suspension cellulaire dans des plaques multipuits, on puisse s'attendre statistiquement à une seule cellule par puits (Pandey, 2010). Les clones positifs (producteurs d'Ac d'intérêt) sont multipliés soit en continuant de les cultiver *in vitro*, soit en utilisant l'animal immunisé pour une production *in vivo* (souris BALB/ c). Lorsqu'un hybridome est cultivé dans des flacons de culture de tissu, l'Ac est sécrété dans le milieu, à de très faibles concentrations (1-20 µg/mL). Un hybridome sont administrées par voie IP d'une souris compatible s'y développe et sécrète l'Acm dans le liquide d'ascite à des concentrations beaucoup plus élevées (1-10 mg/mL) (Mistretta et al., 2009).

II. 2. Méthodes de purification des anticorps polyclonaux et monoclonaux

II.2.1. Méthodes conventionnelles

La purification sélective d'anticorps est couramment effectuée en utilisant une chromatographie d'affinité ou une chromatographie basée sur des marqueurs d'affinité. Il atteint une sélectivité et une pureté élevées; cependant, il devient coûteux lorsqu'il est utilisé à grande échelle. Afin de réduire les coûts, des méthodes de séparation physico-chimiques sont employées avant la chromatographie d'affinité pour éliminer les plus gros contaminants et empêcher le colmatage ou l'encrassement de la colonne (Murphy et al., 2016). Un aperçu des deux méthodes est donné dans les sections suivantes.

II.2.1.1. Fractionnement physico-chimique

a. Précipitation

La précipitation est une méthode efficace pour l'extraction initiale de protéines brutes impliquant l'isolement ou l'élimination d'un ou plusieurs composants solubles d'un mélange homogène en formant une phase solide appelée le précipité. Il est largement utilisé pour enrichir les anticorps du matériel de départ (surnageant de culture cellulaire, ascite ou sérum) (Arora et al., 2014). Alors que de nombreuses méthodes de précipitation différentes ont été utilisées au cours des cent dernières années, le sulfate d'ammonium (AS) est resté le plus largement utilisé (Burgess et Deutscher, 2009).

- **Précipitation au sulfate d'ammonium**

La précipitation au sulfate d'ammonium (AS) est la méthode la plus couramment utilisée pour l'enrichissement des protéines en solution. Les anticorps peuvent être précipités en utilisant de faibles concentrations de sulfate d'ammonium. Ce processus est appelé "relargage". Il est basé sur le principe de l'ajout de sel lyotrope dans la solution, à une concentration où les anticorps sont incapables de former des liaisons hydrogène avec le solvant par l'intermédiaire de leurs groupes de chaîne latérale chargés ou polaires. Il en résulte une compétition des ions pour le solvant, provoquant l'interaction des anticorps entre eux à l'aide de groupes hydrophobes, entraînant ainsi la formation d'agrégats qui sont précipités hors de la solution. Le rendement de la protéine obtenue dépend de plusieurs facteurs, tels que le temps, la température, le pH et le taux d'ajout de sel (Arora et al., 2014).

- **Précipitation au polyéthylène glycol (PEG)**

La précipitation au PEG fonctionne bien pour les IgM, mais est moins efficace pour les IgG les méthodes de précipitation au sel sont généralement recommandées pour les IgG. La précipitation au PEG peut être préférée dans les purifications en plusieurs étapes qui

utilisent des colonnes échangeuses d'ions, car la force ionique de l'Ig n'est pas altérée. De plus, il s'agit d'une procédure très douce qui entraîne généralement une faible dénaturation de l'anticorps. Cette procédure est applicable à la fois aux antisérums polyclonaux et à la plupart des fluides contenant des Acm (Bürki et Al., 2023).

- **Précipitation à l'acide caprylique**

L'acide caprylique peut être utilisé pour purifier les immunoglobulines de mammifères à partir d'un mélange par précipitation de composants protéiques non immunoglobulines. C'est une méthode simple qui peut être utilisée seule, cependant, cette méthode, en conjugaison avec d'autres procédures d'extraction telles que la précipitation au sulfate d'ammonium, offre un moyen efficace d'obtenir une préparation d'anticorps relativement pure. La concentration d'acide caprylique nécessaire à la purification des immunoglobulines varie selon les espèces. Avant de procéder à une extraction à grande échelle, il est nécessaire de déterminer la quantité d'acide caprylique nécessaire pour obtenir la pureté souhaitée du produit (Arora et al., 2014). Une étude de réduction virale a montré l'élimination complète d'un rétrovirus modèle lors de la précipitation à l'acide caprylique de l'anticorps purifié de la protéine A (Brodsky et al., 2012).

II.2.1.2. Filtration membranaire

Les technologies membranaires à pression, telles que la microfiltration (MF) et l'ultrafiltration (UF), ont été mises en œuvre avec succès pour récupérer différents types de biomolécules et de composés à haute valeur ajoutée à partir de divers flux. Un aperçu des deux méthodes est donné dans les sections suivantes (Castro-Muñoz et al., 2022).

a. Microfiltration

- **Définition**

La microfiltration est un autre moyen de récolter le produit d'anticorps à partir de cultures de cellules de mammifères. Il peut fournir un flux de récolte sans particules qui nécessite une filtration supplémentaire minimale, La microfiltration n'est généralement pas une technique de récolte et de clarification préférée pour la purification de Acm à l'échelle du processus (Han et al., 2011).

- **Principe**

La microfiltration (MF) est l'une des premières membranes à pression pratiquées commercialement, La taille des pores de la membrane variait de quelques microns à 0,1 μm (Hubadillah et al., 2022). La MF est capable d'éliminer les matières de taille micrométrique, telles que les particules en suspension, les principaux agents pathogènes, les grosses bactéries,

les protéines et les cellules de levure selon le principe de la séparation physique.(figure 17) montre l'efficacité d'élimination des principaux processus de séparation à base de membranes, notamment l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (RO) par rapport à la MF pour divers contaminants (Anis et al., 2019).

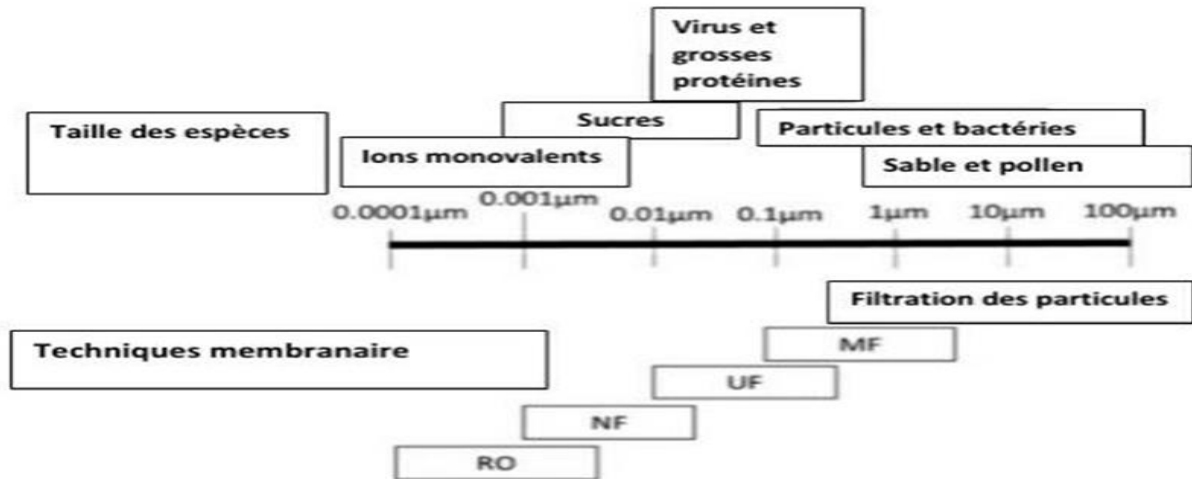


Figure 17 : Principaux procédés à base de membranes capables d'éliminer diverses tailles des contaminants (Anis et al., 2019).

b. Ultrafiltration

• Définition

Les membranes UF répondent aux exigences de séparation de bioproduits spécifiques dans les processus en aval, par exemple les Acm (Murphy et al., 2016).

L'ultrafiltration (aussi communément appelée UF/ DF pour ultrafiltration/ diafiltration) utilise des membranes polymères pour retenir un produit biologique tout en permettant aux solutés de faible poids moléculaire et à l'eau de passer à travers la membrane. L'ultrafiltration est largement utilisée pour concentrer (ou déshydrater) le produit et éliminer les impuretés de faible poids moléculaire ou les composants du tampon tout en les remplaçant par un tampon frais (Shukla et al., 2006).

• Principe

L'ultrafiltration est généralement opérée en mode filtration tangentielle comme le montre la (figure 18). La filtration tangentielle implique le passage d'un fluide perméat à travers la membrane (avec une composante de vitesse perpendiculaire ou normale à la membrane) et le passage du fluide à travers la surface de la membrane (avec une composante de vitesse tangente à la membrane) (Shukla et al., 2006).

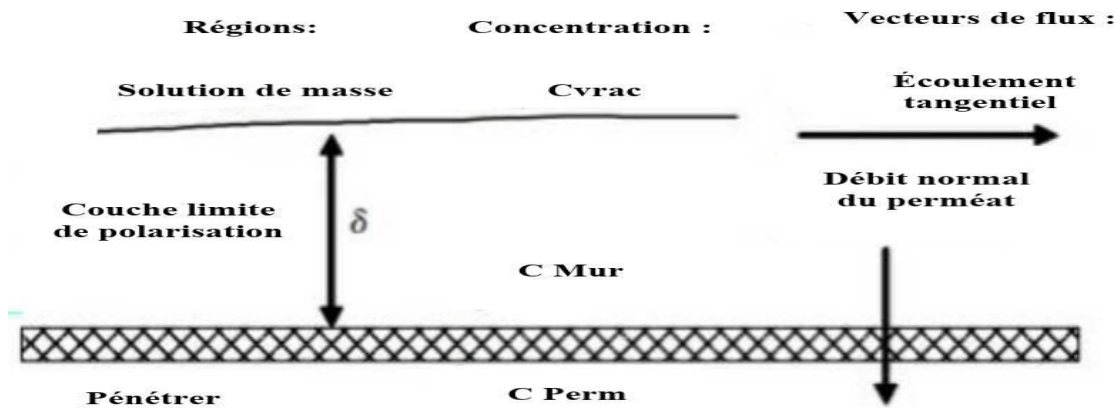


Figure 18 : Filtration à flux tangentiel (Shukla et al., 2006)

II.2.1.3 Chromatographie d'affinité

a. Définition

La chromatographie d'affinité est un type de chromatographie liquide qui utilise des interactions de type biologique pour la séparation et l'analyse spécifique des composants de l'échantillon. Certaines applications traditionnelles de cette approche comprennent l'utilisation du boronate, de la lectine, de la protéine A ou de la protéine G, et des supports d'immunoaffinité pour la quantification directe des solutés (Hage , 1999), les méthodes de purification des immunoglobulines ont une longue histoire de tentatives hautement qualifiées pour les obtenir de manière active et pure. Jusqu'à présent, la chromatographie à protéines A est la méthode de purification de choix pour une grande échelle d'anticorps, mais les conditions difficiles nécessaires pour éluer ces protéines parfois sensibles ont conduit au développement de procédés de purification alternatifs. L'un des développements les plus fascinants de ces dernières années sont les ligands mimétiques protéiques, mais aussi thiophiles (Huse et al., 2002).

b. Principe

La séparation par affinité sépare les protéines sur la base d'une interaction réversible ou formation de complexes avec de petites molécules spécifiques, ou ligands (Liu et al., 2010). Cette petite molécule peut être immobilisée par liaison covalente à la résine dans une colonne (Figure19). Lorsque l'échantillon traverse la colonne, la protéine d'intérêt, en présentant une affinité pour son ligand se lie et s'immobilise. La protéine d'intérêt est ainsi éliminée du mélange d'échantillon. Enfin, la protéine est dissociée ou éluee de la résine par addition de fortes concentrations de ligand libre en solution. Parce que cette méthode repose

sur la spécificité biologique de la protéine d'intérêt, c'est une procédure très efficace (Shen, 2019).

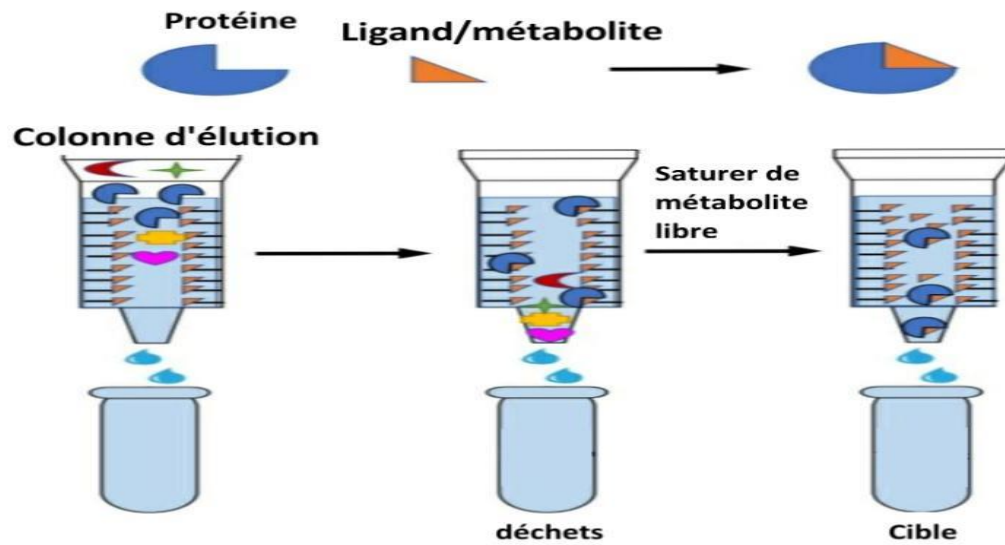


Figure 19 : Chromatographie d'affinité pour isoler des molécules en fonction des capacités de liaison au ligand (Shen, 2019).

II.2.2. Technologies récentes de purification basées sur la chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent impliquer l'adsorption d'une molécule cible sur un support solide. Ils sont souvent la méthode de choix pour le traitement des anticorps et plus spécifiquement, les méthodes basées sur l'affinité sont couramment utilisées dans l'industrie biopharmaceutique en raison de la sélectivité et de la pureté élevées qui peuvent être atteintes pour répondre aux normes réglementaires et de contrôle de la qualité (Murphy et al., 2016).

II.2.2.1. La chromatographie à base de protéine A/ G

a. Définition

La protéine A et la protéine G sont des protéines de liaison aux immunoglobulines exprimées dans *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus* respectivement, qui ont été adaptés pour être utilisés dans la purification de grandes quantités d'IgG (Figure 19) (Arora et al., 2014). La chromatographie d'affinité basée sur la protéine A présente de nombreux avantages, notamment la capacité de capturer l'anticorps de manière hautement spécifique. La protéine A est spécifique d'un sous-type d'anticorps et tous les anticorps ne peuvent pas être isolés à l'aide de ce ligand. L'éluion de la molécule cible de la colonne de protéine A nécessite généralement des conditions drastiques, un gradient par étapes jusqu'à 0,1 M de glycine- HCl

(pH <3,0) est typique. L'élution à faible pH contribue à l'inactivation du virus, mais menace le rendement en anticorps biologiquement actifs (Schubert et Freitag, 2007). Les nouvelles avancées de la chromatographie d'affinité sur la protéine A, telles que l'utilisation de résines améliorées comme Amsphere et MabSelect (Murphy et al., 2016).

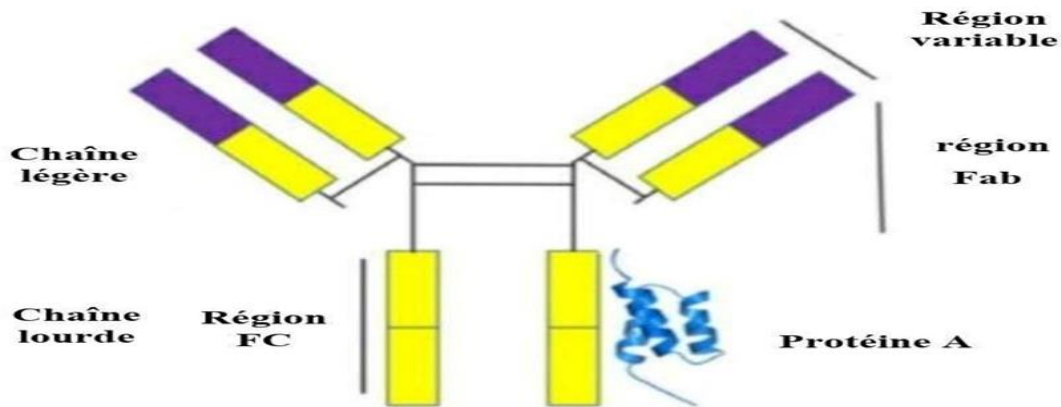


Figure 20 : Interaction d'un anticorps monoclonal de type immunoglobuline G et de la protéine A (Ramos-de-la-Peña et al., 2019).

b. Principe

Les protéines A et G Ils sont attachés de manière covalente à des résines d'affinité telles que l'agarose réticulé à 4 %, ce qui les rend adaptés à l'isolement d'anticorps à basse pression (figure 21). La protéine A et la protéine G contiennent des sites de liaison pour la partie Fc de l'IgG de mammifère. La protéine G naturelle possède également un site de liaison supplémentaire pour l'albumine qui est absent de la protéine G recombinante (Figure 19) (Fishman et Berg, 2019)

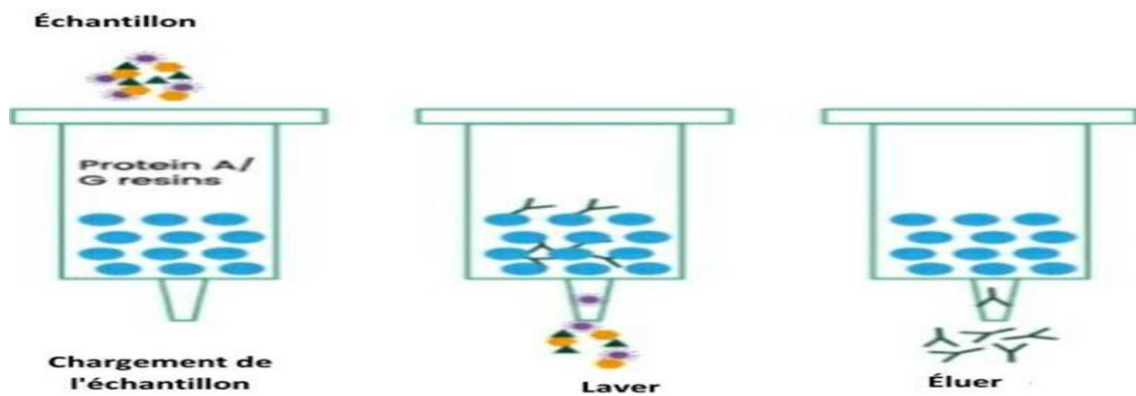


Figure 21 : Chromatographie d'affinité basée sur la protéine A/G (Hober et al., 2007)

II.2.2.2. Chromatographie basée sur l'immunoaffinité (IAC)

a. Définition

La chromatographie d'immunoaffinité est une technique puissante qui peut isoler sélectivement un composé donné à partir d'échantillons complexes (Moser et Hage, 2010).

L'IAC est un processus dans lequel l'affinité de liaison d'un antigène (Ag) à un anticorps parent (Ac) est utilisée comme base de séparation. L'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt est immobilisé sur un support solide rigide pour donner un immunosorbant actif. Un mélange complexe de protéines est ensuite passé sur l'immunosorbant, l'anticorps capturant la protéine d'intérêt et les autres protéines non produites étant lavées dans la colonne à travers. L'interaction réversible entre l'antigène et l'anticorps peut être interrompue pour donner un produit hautement purifié dans l'éluat de la colonne. Cela pourrait être réalisé par des changements de pH ou l'utilisation de chaotropes tels que les thiocyanates/urées de sodium ou de potassium comme éluants. En raison de l'avidité et de la spécificité personnalisées, les anticorps monoclonaux (Acm) sont devenus indispensables à la fois pour la caractérisation et la purification des protéines (Subramanian, 2002).

b. Principe

La chromatographie d'immuno-affinité combine l'utilisation de la chromatographie liquide avec la restriction spécifique d'anticorps ou d'autres agents spécialisés (Gulhane et al., 2022). La chromatographie d'immunoaffinité consiste en un anticorps (immunoglobuline) immobilisé sur un support pour purifier la protéine contre laquelle l'anticorps a été développé. Des anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt sont produits par le système immunitaire lorsque la protéine exogène est inoculée à l'animal après, des anticorps polyclonaux sont extraits du sérum sanguin de l'animal, isolés et immobilisés pour constituer une matrice de purification de la protéine d'intérêt (Figure 22) (Gulhane et al., 2022).

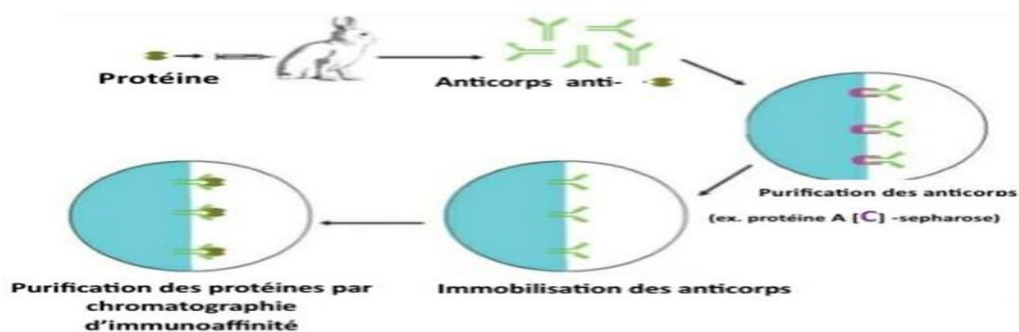


Figure 22 : Chromatographie d'immuno-affinité pour la purification des protéines (Gulhane et al., 2022).

II.2.2.3. Chromatographie monolithique

a. Définition

Les monolithes chromatographiques est une méthode de séparer les protéines des particules en utilisant un "bloc continu de gel poreux". En termes chromatographiques, un monolithe est défini comme un matériau poreux à une seule unité incorporé dans un appareil chromatographique (Murphy et al., 2016). Les monolithes commerciaux les plus courants pour la chromatographie liquide ont des pores traversants d'un diamètre de 1,5 à 1,7 μm et des pores de diffusion d'un diamètre inférieur à 100 nm. (Poddar et al., 2021).

L'application de supports chromatographiques monolithiques dans divers domaines de la chromatographie, en particulier pour la séparation et la purification de grandes biomolécules, a augmenté ces dernières années (Prasanna et Vijayalakshmi, 2010). Différents types de monolithes ont été utilisés en AMC (Tableau 02). Ces monolithes vont de supports à base de polymères organiques ou de silice à des supports à base d'agarose ou de cryogels. Ces supports peuvent être adaptés pour être utilisés avec un certain nombre de méthodes d'immobilisation et peuvent être réalisés sous plusieurs formes notamment des colonnes, des disques, des capillaires et des micropuces (Li et al., 2017).

b. Principe

La chromatographie monolithique d'affinité (AMC) est un type de chromatographie liquide qui utilise un support monolithique et un agent de liaison biologiquement apparenté comme phase stationnaire pour isoler, enrichir ou détecter un analyte cible dans une matrice complexe (Pfaunmiller et al., 2013). L'interaction spécifique à la cible présentée par les agents de liaison rend AMC attractif pour la séparation ou la détection d'une large gamme de composés (Poddar et al., 2021).

Tableau 02 : Types de supports utilisés en AMC (Li et al., 2017).

| Type général de soutien | Exemple de supports |
|--------------------------------|---|
| Monolithe organique | GMA/EDM, GMM/EDMA, GMA/DVB ,GMA/TRIM, DVB |
| Monolithes de silice | Silice convertie en une forme époxy oy diol , silice aminopropyle |
| Monolithes à basze de glucides | Agarose, composites agarose-chitosan, hybrides agarose/chitosan-PVA |
| Monolithes cryogel | Agarose, HEMA |

II.2.2.4. Chromatographie basée sur la membrane de filtration

a. Définition

La chromatographie sur membrane combine les avantages de la filtration sur membrane et de la chromatographie liquide en une seule opération. Elle offre de nombreux avantages par rapport à la chromatographie sur colonne à garnissage traditionnelle, notamment une meilleure accessibilité aux grandes biomolécules, une résistance réduite au transfert de masse conduisant à un comportement de liaison rapide à des débits élevés, une utilisation réduite du tampon, des pertes de charge plus faibles, un coût inférieur et une facilité d'élimination (Rathore et al., 2018).

b. Principe

Le principe de séparation de la chromatographie sur membrane d'affinité consiste en l'adsorption de la biomolécule cible sur le ligand, qui est immobilisé sur la surface de la membrane, y compris ses pores. Initialement, la solution contenant la biomolécule cible imprègne la membrane en raison d'un gradient de pression. Les grosses molécules et particules qui ne traversent pas les pores sont exclues tandis que les petites molécules, y compris celle cible, traversent les pores où le ligand est immobilisé (Figure 23).

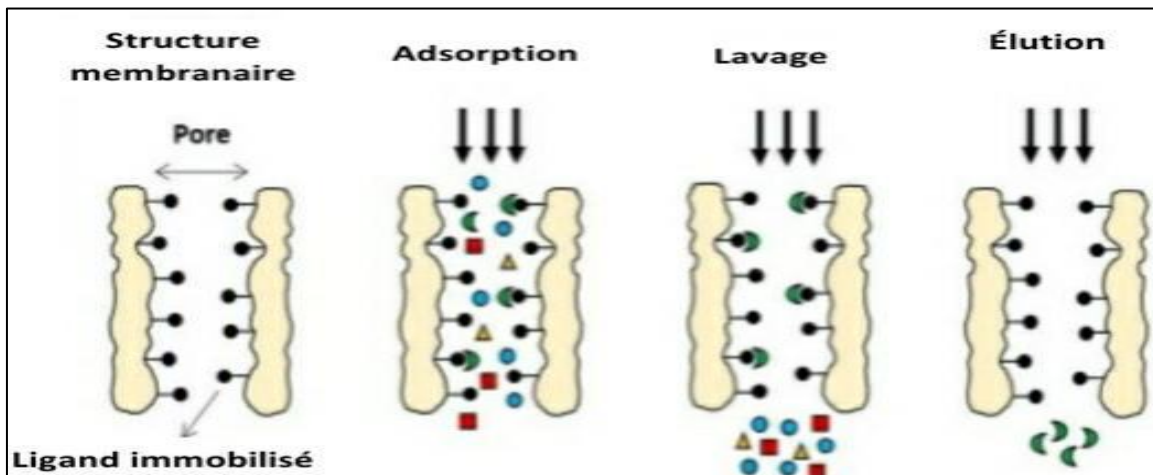


Figure 23 : Chromatographie basé sur membrane de filtration (Bresolin et al., 2022).

II.2.2.5. Chromatographie échangeuse de cations

a. Définition

La chromatographie par échange cationique (CEC) est une opération unitaire bien établie dans le traitement en aval des anticorps monoclonaux et largement utilisée pour la séparation à grande échelle des agrégats d'anticorps monoclonaux (Acm) (Madadkar et al., 2017). Dans de nombreux procédés, ce type de chromatographie fait partie d'une séquence en

plusieurs étapes qui commence par une étape d'affinité pour la capture, puis ajoute d'autres étapes de chromatographie (le plus souvent chromatographie par échange cationique, chromatographie par échange d'anions (AEC) ou chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC)) dans différentes combinaisons (Stein et Kiesewetter, 2007).

b. Principe

La chromatographie par échange cationique utilise une résine modifiée avec des groupes fonctionnels chargés négativement. Ils peuvent être des ligands acides forts tels que les groupes sulfopropyle, et ou des ligands acides faibles. La chromatographie par échange cationique a été appliquée aux procédés de purification de nombreux Acm avec des valeurs de pI allant de neutre à basique. La plupart des sous-classes humées d'IgG1 et d'IgG2 sont des candidats parfaits pour la chromatographie par échange cationique, dans laquelle l'anticorps est lié à la résine pendant l'étape de chargement et élué par augmentation de la conductivité ou de l'augmentation du pH dans le tampon d'élution. Les impuretés liées au processus les plus chargées négativement telles que l'ADN, certaines protéines de la cellule hôte, la protéine A lixiviée et l'endotoxine sont éliminées dans la fraction de charge et de lavage. La chromatographie par échange cationique peut également fournir un pouvoir de séparation pour réduire les variantes d'anticorps du produit d'anticorps cible telles que les produits désamidés (Liu et al., 2010).

II.2.2.6. Chromatographie échangeuse d'anions

a. Définition

La Chromatographie par échange d'ions est l'un des modes chromatographiques les plus fréquemment utilisés pour la purification des produits biologiques, car elle permet de séparer différentes espèces moléculaires qui ne présentent que des différences de charge mineures les unes des autres. la chromatographie par échange d'ions pouvait être utilisée pour remplacer complètement une résine coûteuse de protéine A pour la purification des Acm (Murphy et al., 2016).

b. Principe

La chromatographie d'échange de ion utilise une résine pour séparer les protéines en fonction de leurs charges de surface. Ce type de colonne contient une résine portant des groupements chimiques chargés soit positivement, soit négativement. Les résines contenant des groupes chargés positivement attirent les solutés chargés négativement et sont appelées résines échangeuses d'anions (Figure 24). Les résines avec des groupes chargés négativement sont des échangeurs de cations. Dans les solutions à faible teneur en sel, les protéines avec

une charge de surface négative se lieront plus fortement aux colonnes échangeuses d'anions chargées positivement. De même, les protéines avec une charge de surface positive se lieront aux colonnes d'échange de cations chargées négativement. Plus tard, un tampon à concentration de sel plus élevée est appliqué à la colonne afin qu'il puisse entrer en compétition avec la résine pour les protéines liées, et les protéines liées peuvent ensuite être éluées à travers le tampon à haute teneur en sel (Shen, 2019).

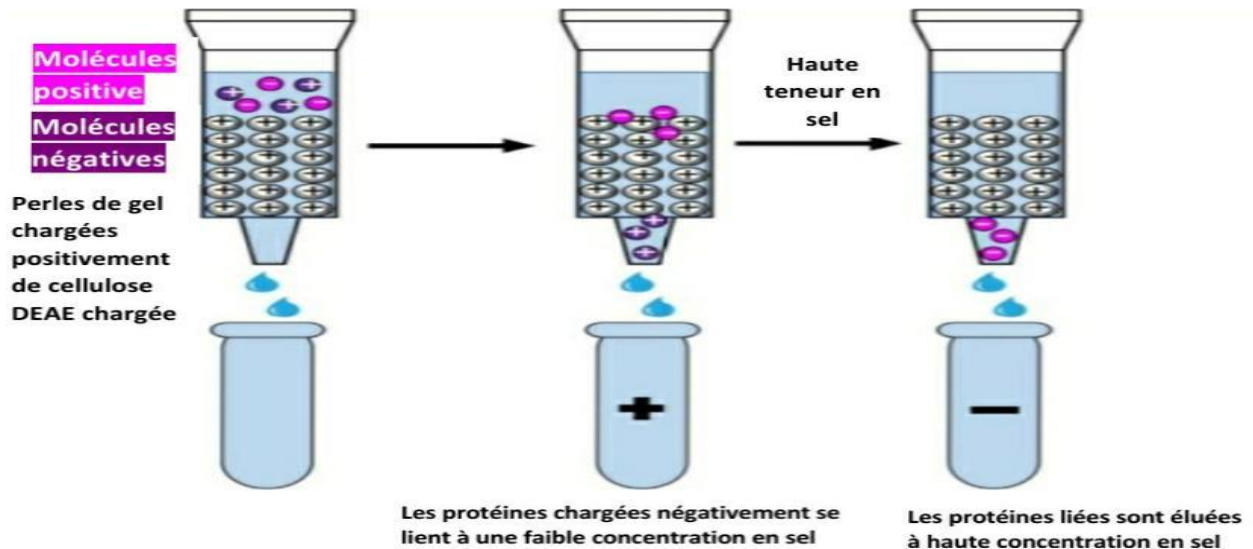


Figure 24 : Chromatographie échangeuse d'anions sépare les molécules en fonction des charges positives et négatives (Shen, 2019).

II.2.3. Avancées dans les méthodes non chromatographiques

II.2.3.1. Séparation diphasique aqueuse

a. Définition

La séparation en systèmes aqueux à deux phases (ATPS) s'est révélée être un outil précieux pour séparer et purifier des mélanges de biomolécules par extraction. De plus, les ATPS sont une technologie idéale où la clarification, la concentration et la purification partielle peuvent être intégrées en une seule étape ont été utilisés avec succès pour isoler des anticorps à partir de surnageants de cellules d'hybridome et pour l'analyse des anticorps, notamment pour la purification partielle des Acm (Rosa, 2007)

Les chercheurs ont montré les larges perspectives d'application à grande échelle de l'ATPS en tant que première étape de purification des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Ils ont optimisé la méthode de séparation des IgG de l'ovaire de hamster chinois (CHO) en utilisant le système PEG 6000/ phosphate par la méthodologie de surface de réponse. Un

ATPS composé de 12 % de PEG, 10 % de phosphate, 15 % de NaCl à pH 6 a donné une récupération de 88 % dans la phase supérieure et un facteur de purification de 4,3 (Azevedo, 2007).

b. Principe

En général, il existe deux principaux types d'ATPS disponibles, à savoir le système polymère/ polymère (par exemple, le polyéthylène glycol/ dextrane) et le système polymère/ sel (par exemple, le polyéthylène glycol/ phosphate). Il est formé en mélangeant deux polymères hydrosolubles différents ou un polymère hydrosoluble et un sel dans l'eau. Lorsque les concentrations limites sont dépassées, deux phases aqueuses non miscibles se forment. Les concentrations limites dépendent du type de composants formant la phase et du pH, de la force ionique et de la température de la solution (Raja et al., 2011).

Pour le Système PEG- dextrane : La « phase supérieure » est formée par le polyéthylène glycol (PEG) plus hydrophobe, qui est de densité inférieure à la « phase inférieure », constituée de la solution de dextrane plus hydrophile et plus dense. Bien que le PEG soit intrinsèquement plus dense que l'eau, il occupe la couche supérieure. Le degré de polymérisation du PEG affecte également la séparation des phases et le partage des molécules lors de l'extraction (Mayolo-Deloisa et al., 2017).

II.2.3.2. Cristallisation

a. Définition

La cristallisation est une autre technique de purification qui peut être utilisée pour concentrer et dessaler les protéines de la même manière que la précipitation. La cristallisation des protéines est une technologie de séparation puissante car elle concentre, purifie et stabilise simultanément le produit. La cristallisation a été démontrée à l'échelle industrielle pour la purification de produits allant des enzymes industrielles comme la glucose isomérase aux produits pharmaceutiques approuvés comme l'insuline. C'est une technique puissante de purification à faible coût. Le défi reste de développer à la fois le théorie et techniques de criblage pour pouvoir établir une zone robuste de cristallisation à haut rendement sans expérimentation empirique excessive (Przybycien et al., 2004).

b. Principe

La cristallisation est une précipitation contrôlée à partir d'une solution aqueuse avec quatre variables principales qui contrôlent la morphologie et la récupération des cristaux : la concentration en protéines, la concentration en précipitants, le pH et la température. Elle est similaire à la précipitation en ce que des particules solides sont formées à partir d'une solution

cependant, les précipités ont une morphologie mal définie et sont caractérisés par une petite taille de particules, alors que les cristaux sont très ordonnés avec des tailles de particules généralement plus grandes (Burgess et Deutscher, 2009). La cristallisation macromoléculaire utilise trois principes. La première consiste à perturber la relation entre les macromolécules et les composants de la solution (molécules d'eau et ions) , la seconde consiste à modifier la structure du solvant de manière à ce que les macromolécules soient moins bien accueillies, favorisant ainsi la séparation des phases et le troisième consiste à augmenter le nombre et la force des interactions favorables entre les macromolécules individuelles (McPherson et al., 1995).

II.2.3.3. Floculation et filtration en profondeur

a. Définition

La floculation est une méthode économique qui est utilisée pour améliorer l'efficacité de la clarification en provoquant l'agglutination des particules dispersées, permettant leur élimination par sédimentation, centrifugation ou filtration (Buyel et Fischer , 2014).

La floculation combinée à une filtration en profondeur jetable permet la clarification du bouillon de culture cellulaire via des processus jetables entièrement intégrés. Lors de la production d'anticorps dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), le produit est exprimé dans le surnageant et l'induction de la formation de floccage permet une élimination plus facile des cellules sans compromettre le rendement du produit (Burgstaller et al., 2017). La filtration en profondeur apparaît comme une méthode très appropriée pour la purification des protéines cibles après la floculation, en raison de la disponibilité de cassettes jetables, éliminant ainsi le besoin de nettoyage et évitant la contamination croisée (Murphy et al., 2016).

b. Principe

La floculation consiste à ajouter un flocculant dans le but d'augmenter la taille des particules pour améliorer les propriétés de sédimentation ou de filtration. Étant donné que les surfaces des cellules de mammifères sont chargées négativement, la floculation est généralement effectuée à l'aide de polymères cationiques pour ponter les particules (Burgstaller et al., 2017). Ils se lient à des particules chargées de manière opposée, mais la longueur du polymère doit s'étendre au-delà de la longueur de la particule afin de relier plus de particules. Le processus se poursuit avec la liaison du polymère suivant et jusqu'à ce que toutes les particules se soient agglutinées (Figure 25) (Murphy et al., 2016).

Les polymères couramment utilisés pour la floculation cellulaire comprennent la polyéthylèneimine (PEI), chlorure de polydiallyldiméthylammonium (pDADMAC) , chitosan et des polymères réactifs au stimulus, tels que la polyallylamine modifiée (mPAA). L'ajout d'un tel stimulus initie la formation de troupeau ainsi que la précipitation du polymère résiduel, qui peut être éliminé efficacement du bouillon de culture cellulaire. Le mPAA est un polymère cationique qui est précipité par addition de phosphate divalent anionique (Burgstaller et al., 2017).

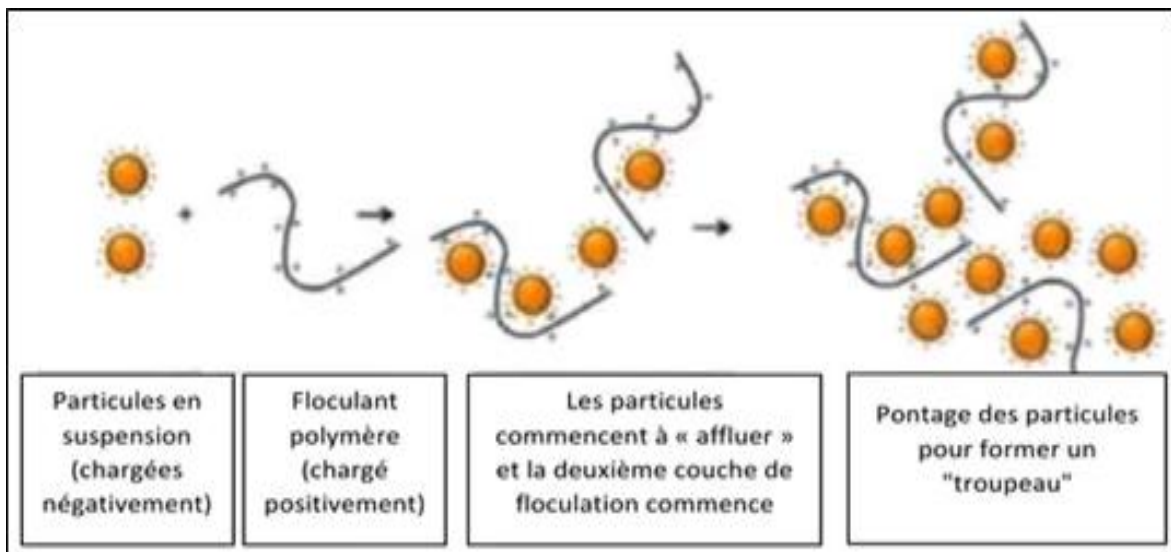


Figure 25 : Aperçu schématique du processus de floculation (Murphy et al., 2016).

***Chapitre III: Domaines
d'applications des anticorps
monoclonaux et polyclonaux***

III.1. Domaine de Diagnostique

III.1.1. Dosage des substances biologiques

Les immuno-essais, ou méthodes de dosage utilisant des anticorps comme réactifs, sont largement répandus dans les laboratoires d'analyse médicales. Ces méthodes de dosage permettent d'identifier et de quantifier de multiples substances dans les milieux biologiques, qu'il s'agisse de dosages de protéines spécifiques (marqueurs de l'inflammation, hormones, facteurs de la coagulation...) ou d'immunoglobulines (anticorps viraux ou bactériens, auto-anticorps...), voire à la fois d'antigènes et d'anticorps viraux (sérologie HIV) (Mistretta et al., 2009).

Les techniques usuelles de dosage des substances biologiques sont effectuées grâce aux techniques immunoenzymatiques (ELISA) ou radioimmunologiques. Il s'agit de techniques simples, rapides et très sensibles, ne consommant que peu de réactifs et pouvant s'effectuer sur de très petits échantillons (Boucheix, 1985).

III.1.1.1. Technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay)

C'est une technique immuno-enzymatique de détection qui se fait au laboratoire et 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 un anticorps (Gala et al., 2020). ELISA est souvent utilisé pour des applications séro-épidémiologique, s'appliquant également aux tests diagnostiques continus et ordinaux en général (Greiner et al., 2000). Depuis l'invention de la technique il y a quatre décennies, ELISA a rapidement trouvé diverses applications dans les disciplines de la qualité alimentaire, de l'environnement, de la biotechnologie et de la chimie, entre autres (Hosseini et al., 2018). Cette technique utilise soit les Acm et Acp ou les deux, dans l'ELISA indirect basé sur Acp et un ELISA sandwich utilisant Acp et Acm (Xu et al., 2014).

III.1.1.2. Techniques radioimmunologiques

La technique de dosage radioimmunologique (RIA) est utilisée pour mesurer un large éventail de matériaux cliniquement et biologiquement significatifs. Cette technique peut être réalisée rapidement et facilement tout en garantissant l'exactitude, la spécificité et la sensibilité, qui ont un impact considérable sur le diagnostic médical. La technique RIA, comme son nom l'indique, atteint la sensibilité grâce à l'utilisation de radionucléides et la spécificité qui est uniquement associée avec des réactions immunochimiques. De plus, le RIA est basé sur le principe de la dilution isotopique, ainsi que sur l'utilisation d'un anticorps spécifique pour se lier à une partie de la substance (antigène) qui doit être mesurée. Lorsqu'un antigène est mélangé avec un anticorps spécifique à cet antigène, une interaction se

produit, formant un complexe antigène/anticorps chimiquement différent de l'antigène ou de l'anticorps (Ebeid et al., 2023). Elles sont utilisées aussi pour la recherche de certains auto-anticorps très particuliers. Elles sont indispensables pour la recherche des auto-anticorps anti-récepteurs membranaires (récepteurs de l'acétylcholine) et des anticorps anti-canaux ioniques (potassiques, calciques) (Humbel, 2016).

Les Acm et Acp sont utilisés aussi dans les techniques d'immunomarquages, tel que ;

III.1.1.3. Technique d'immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) est une technique puissante qui utilise des anticorps marqués par la fluorescence pour détecter des antigènes cibles spécifiques. Elle est largement utilisée dans la recherche scientifique et les laboratoires cliniques (Odell et Cook, 2013). L'IF permet une excellente sensibilité et amplification du signal par rapport à l'immunohistochimie, en utilisant diverses techniques de microscopie. Deux méthodes sont disponibles, selon la portée de l'expérience ou les anticorps spécifiques utilisés : directe (primaire) ou indirecte (primaire et secondaire).

L'IFI est basée sur l'utilisation de deux types d'anticorps : Le premier marquage utilise l'Acm primaire marqué qui se fixe sur l'antigène le deuxième marquage l'Acp secondaire se fixe sur l'Ac primaire (figure 26) (Im et al., 2019).

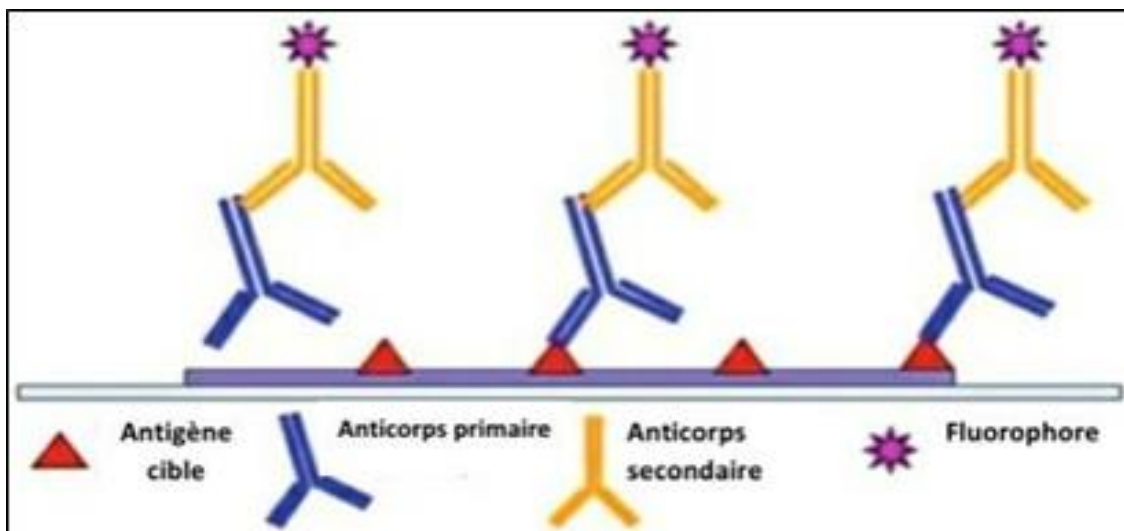


Figure 26 : Immunofluorescence indirect (Im et al., 2019).

III.1.2. Détermination des groupes sanguins ABO (hémagglutination)

Le groupage sanguin est un examen prétransfusionnel obligatoire pour la prévention des accidents immuno-hémolytiques de la transfusion sanguine (Bhallil et al., 2015). Les antigènes des groupes sanguins ABO sont les premiers marqueurs connus chez l'homme, ancrés à la surface membranaire des globules rouges. Habituellement, l'identification de ces antigènes érythrocytaires est révélée par une réaction d'agglutination sur lame ou en tube au moyen, d'une part, des solutions titrées d'anticorps monoclonaux produits par la technique d'hybridome et, d'autre part, des antisérums polyclonaux obtenus par la technique d'immunisation des lapins (Sefu et al., 2012). Les anticorps anti-A et anti-B de type IgM sont des anticorps présents systématiquement, des allo-anticorps anti-A/B de type IgG étant également présents chez certains individus qui se fixent respectivement sur les antigènes des groupes A ou B, ces antigènes de groupe sanguin sont disposés de manière répétitive à la surface des hématies, permettant aux cellules d'être interconnectées par les anticorps et ainsi d'être agglutinées (figure 27) (Arache et Bahadi, 2020).

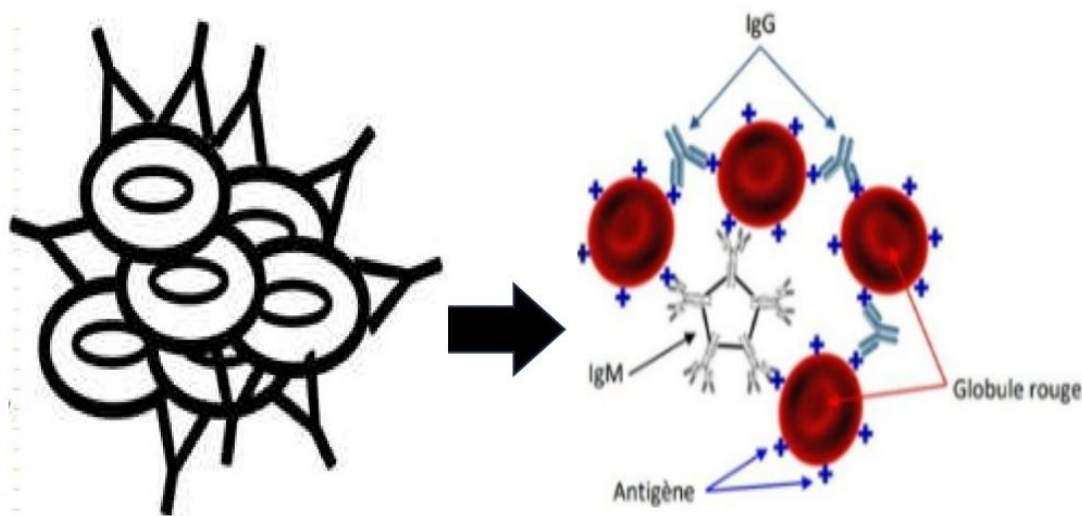


Figure 27 : Schématisation d'une réaction d'agglutination (Liepkalns et al., 2012)

III.1.3. Utilisation des anticorps dans le test de grossesse

Les tests de grossesse (tests immuno-chromatographiques) sont devenus les tests de diagnostic les plus couramment utilisés à la maison. Les tests de grossesse utilisent des anticorps soit monoclonaux ou polyclonaux pour détecter la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) (figure 28). C'est un marqueur idéal de la grossesse car il augmente rapidement et régulièrement en début de grossesse et peut être détecté dans l'urine. Le test de grossesse à domicile le plus avancé actuellement disponible évalue le niveau d'hCG trouvé dans l'urine et prétend fournir aux femmes des résultats fiables en seulement quelques

semaines de grossesse (Gnoth et Johnson, 2014). Une à deux semaines après la conception, l'hormone HCG est produite et retrouvée plus tard dans le filtre (Le sang et l'urine de la femme enceinte). L'HCG a deux sous-unités : alpha et bêta. Les tests de grossesse à domicile fonctionnent en utilisant des substances qui se lient à chacune de ces sous-unités. Ainsi, lorsqu'une femme est enceinte, ces sous-unités de l'hormone HCG résultent de test positif (Hulisz et Urbanski, 1998).

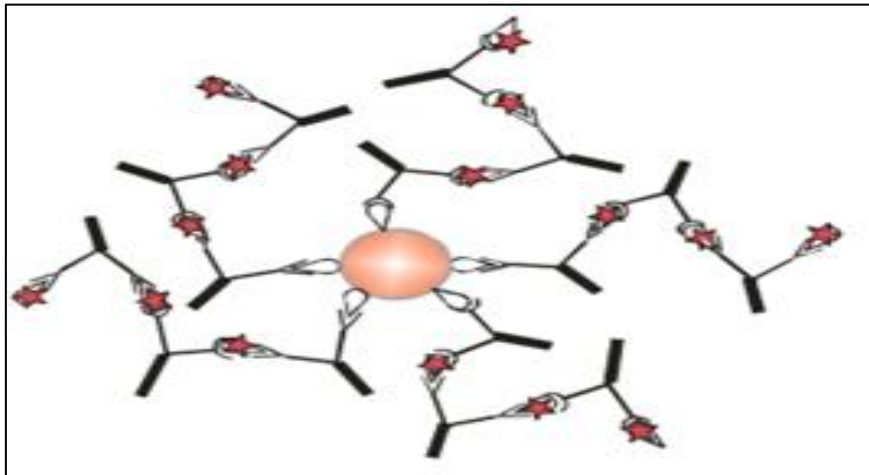


Figure 28 : Effet de l'ajout en alternance d'anticorps polyclonaux utilisées dans le test de grossesse dirigés contre l'hCG (Wide, 2005).

III.1.4. Anticorps monoclonaux comme outil de diagnostic de l'infection au COVID19

La dernière épidémie d'une nouvelle maladie à virus corona est connue sous le nom de COVID-19, causant le syndrome respiratoire aigu sévère corona virus 2 (SARS-CoV-2) est une infection virale hautement transmissible et pathogène qui s'est propagée dans le monde entier. Les virus corona sont connus pour provoquer des maladies chez les humains, les autres mammifères et les oiseaux (Behera et al., 2021). La détection de l'ARN du SRAS-CoV-2 à partir d'échantillons nasopharyngés à l'aide de la transcription inverse en temps réel et de la réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) est la technique de référence pour le diagnostic viral (figure 29). Les tests de détection de l'antigène SARS-CoV-2 utilisant des Acm de souris spécifiques ciblant la nucléocapside sont des alternatives rapides, moins laborieuses et moins chères. Dernièrement les chercheurs ont comparé les performances cliniques de cinq tests de détection d'antigène (AD), dont quatre tests AD rapides (RAD) (biotical, Panbio, Healgen et Roche) et un test AD automatisé (VITROS). Les tests RAD ont montré une sensibilité plus faible permettant l'identification des patients positifs à la RT-PCR avec des charges virales plus élevées tandis que le test VITROS a montré une sensibilité de 100 % et

avait une spécificité de 100 % concluant que le test VITROS permet un SARS-CoV plus rapide, plus facile et moins cher (El Abd et al., 2022).

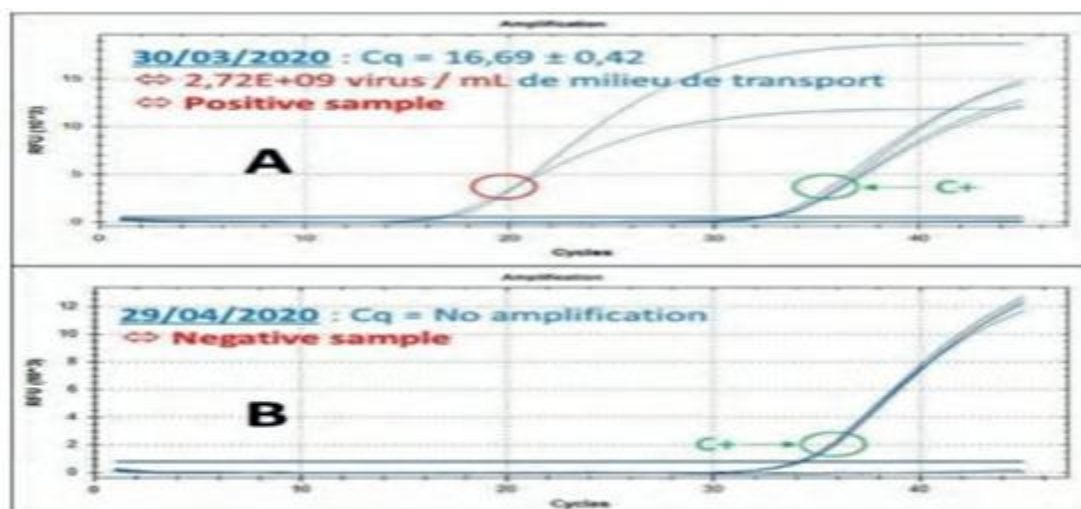


Figure 29 : Résultat RT-qPCR sur le gène E du SARS-CoV-2: A: test positif (Ct = 20) ; B: test négatif (absence de fluorescence) (Gala et al., 2020).

III.2. Domaine thérapeutique

III.2.1. Anticorps monoclonaux

III.2.1.1. Types d'anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux peuvent être de plusieurs types :

a. Anticorps monoclonaux murins

Ils sont les premiers à avoir été utilisés en thérapeutique dès 1975 et sont tous désignés par un nom se terminant par le suffixe **momab**. Ils ont été produits par la technique des hybridomes (Prin-Mathieu et al., 2003).

b. Anticorps chimériques

Ceux-ci sont constitués d'une partie murine variable et d'une partie humaine constante. La fréquence d'induction d'une réponse anti-anticorps a ainsi considérablement diminué, ce qui a permis d'administrer ces médicaments de manière répétée. Ces anticorps portent le suffixe **xumab** (figure 30) (Ochsenbein, 2008). Dans la production de l'anticorps chimère l'approche consiste à cloner les ADNc codant pour les régions variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère des anticorps et de générer une construction avec des séquences codant pour les régions constantes des mêmes chaînes mais de nature humaine. Le plus connu étant le RITUXIMAB (anti-CD20/Mabthera) (Al Saati et Brousset, 2010).

c. Anticorps humanisés

Cette génération était de 85 % à > 90 % d'origine humaine. Ces Acm « humanisés » contenaient des CDR de souris, qui ont été insérées sur une charpente humaine. Le premier Acm humanisé, le daclizumab, a été approuvé en 1997 pour le rejet de greffe d'organe et sont identifiés par la syllabe **zumab** (figure 30) (Silberstein et al., 2015). La production de ce type d'AC consiste à greffer, à l'aide de la même technologie de l'ADN recombinant, les régions hypervariables d'anticorps monoclonaux de souris sur des régions dites de charpente des gènes d'immunoglobulines humaines. En fait, cela consiste à greffer les régions murines spécifiques de l'antigène sur les régions charpentes d'immunoglobuline humaine. Cela réduit encore la part murine de l'anticorps et ne la limite qu'aux régions absolument spécifiques à l'antigène. Les anticorps sont dits humanisés, par exemple l'anti-HER2 (Trastuzumab/Herceptine) (Al Saati et Brousset, 2010).

d. Anticorps « entièrement humains »

Ils ont été développés et contenaient à la fois des chaînes lourdes et légères d'origine humaine. L'adalimumab (Humira, AbbVie Inc., North Chicago, Illinois, États-Unis) a été le premier Acm humain approuvé par la FDA en 2002 pour les maladies auto-immunes articulaires et intestinales. Ces anticorps portent le suffixe **mumab** (figure 30) (Silberstein et al., 2015). La technique d'humanisation d'anticorps monoclonaux est l'utilisation de souris transgéniques. Cette approche consiste à remplacer les gènes codant pour les immunoglobulines murines par les gènes codant pour les immunoglobulines humaines et à immuniser l'animal avec l'antigène ou la protéine d'intérêt. Cette technique permet d'obtenir les anticorps 100 % humanisés. Ces animaux sont disponibles commercialement et plusieurs firmes proposent des souris avec un répertoire entièrement humanisé [XenoMouse (Abgenix), HuMAB (Medarex) mouse] (Al Saati et Brousset, 2010).

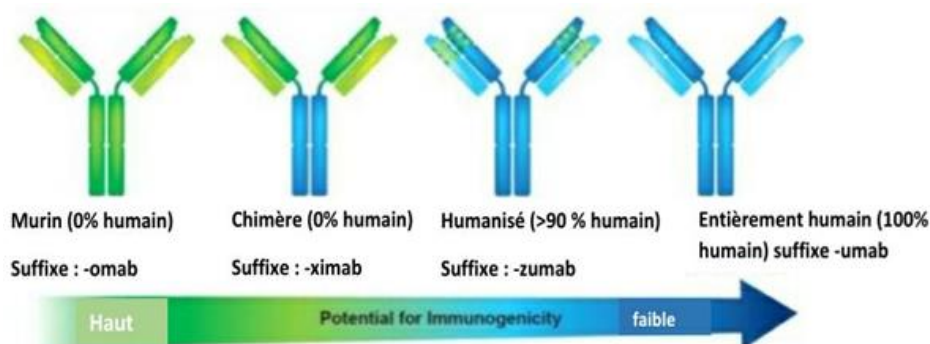


Figure 30 : Évolution des anticorps monoclonaux et potentiel d'immunogénicité (Silberstein et al., 2015).

III.2.1.2. Utilisations thérapeutiques des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont vu des applications dans plusieurs types de pathologies :

a. En oncologie

Les anticorps monoclonaux utilisés en oncologie exercent des effets anti-tumoraux directs qui aboutissent à la mort des cellules tumorales. Ceux-ci mettent en jeu un grand nombre de mécanismes, allant de l'induction d'une apoptose au recrutement de cellules effectrices de l'immunité innée. Cependant, ces anticorps sont également capables d'induire des effets à long terme contre les tumeurs. Ceux-ci sont fondés sur l'induction d'une immunité adaptative anti tumorale où les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ jouent un rôle central. Les anticorps monoclonaux utilisés en oncologie sont de véritables molécules à effet vaccinal, et induisent une mémoire immunitaire qui pourrait être à l'origine des réponses cliniques à long terme parfois observées (Figure 31) (Deligne et Teillaud, 2013).

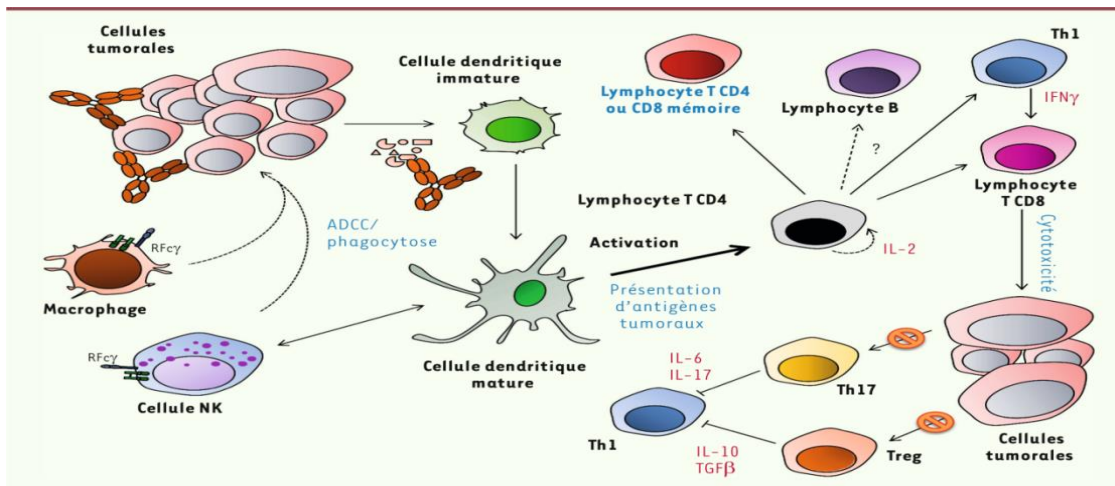


Figure 31: Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique en oncologie (Deligne et Teillaud, 2013)

• Cancer du sein

La cible des anticorps dans le cancer du sein sont les récepteurs à tyrosine kinase. Le gène HER2 appartient à la famille des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine protéine kinase. Lorsqu'il est activé, il induit une cascade de phosphorylations intracellulaires, conduisant à une transcription de protéines et à une croissance cellulaire accrues. Le gène HER2 est surexprimé ou amplifié dans 20 à 30 % des cancers du sein invasifs, la surexpression du (HER2) dans certaines tumeurs cancéreuses du sein a conduit au développement d'un traitement ciblé par un anticorps monoclonal qui est sélectif de la tumeur, efficace pour prolonger l'espérance de vie chez les patientes atteintes de cancers du sein avancés ou précoces (Cornez et Piccart, 2000).

Le trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal humanisé contre HER2, est indiqué chez les patients dont la tumeur présente un nombre de copies amplifié pour l'oncogène HER2 et/ou surexprimé l'oncoprotéine HER2. Le mécanisme d'action du trastuzumab n'est pas entièrement compris, mais a été lié à l'inhibition du cycle cellulaire (Suter et al., 2004) et la diminution du nombre de cellules tumorales est également obtenue par ADCC après fixation d'anticorps sur son antigène. Son utilisation permet par ailleurs d'augmenter la cytotoxicité induite par les chimiothérapies en inhibant la réparation de l'ADN (Prin-Mathieu et al., 2003).

- **Lymphomes**

La cible dans le cas du lymphome est l'Antigène CD20. Le Rituximab (Mabthera®) est un anticorps monoclonal génétiquement modifié pour le traitement du lymphome non hodgkinien, et les lymphomes folliculaires de stade III-IV. C'est un anticorps anti-CD20 chimérique souris/humain, immunoglobuline G1 kappa (Grillo-López et al., 1999). Le mécanisme d'action du rituximab repose sur sa liaison ciblée au CD20 à la surface des lymphocytes B et sur la médiation subséquente de la déplétion des lymphocytes B. Il est entendu que plusieurs mécanismes effecteurs du rituximab contribuent à cet effet, notamment la cytotoxicité médiée par le complément (CDC), la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), l'apoptose et la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) (Jurczak et al., 2019). La plus importante de ces stratégies est l'association du rituximab et de la chimiothérapie CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone), qui s'avère très efficace dans le traitement du LNH (Cerny et al., 2002).

- b. Transplantation d'organe**

- **Anti- CD3**

Le muromonab CD3 (Orthoclone OKT3®) est un anticorps monoclonal murin purifié dirigé contre l'antigène CD3, qui se trouve sur toutes les cellules T humaines matures. Les essais cliniques montrent que le muromonab CD3 est efficace pour inverser les épisodes aigus de rejet de greffe rénale, hépatique, cardiaque et combinée rein-pancréas (Todd et Brogden, 1989). Le muromonab bloque *in vitro* l'activation du lymphocyte T. *In vivo*, il entraîne une lymphopénie en opsonisant les cellules T et module l'antigène CD3 (Vanhove, 2009).

- **Anti- CD25**

Les Acm anti-CD25 chimériques (basiliximab) et humanisés (daclizumab) sont des Acm IgG2α de rats dirigés contre la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine-2 (CD25), qui sont devenus des standards dans le traitement prophylactique du rejet après greffe rénale. Le champ d'utilisation des anti-CD25 s'étend également aux transplantations hépatique,

cardiaque, pulmonaire, à la greffe d'îlots pancréatiques. Le mécanisme d'action est un blocage de l'association des chaînes α et β du récepteur à l'IL-2 empêchant ainsi la liaison de l'IL-2 à son récepteur. Les Acm anti-CD25 n'entraînent pas de déplétion T chez l'homme. Ils entraînent cependant une diminution transitoire du nombre de cellules Treg dans le sang sans impact clinique apparent. Les études confirment qu'un traitement d'induction avec des Acm anti-CD25 associés à la cyclosporine et à des stéroïdes possède une efficacité et réduit les infections (Vanhove, 2009).

c. Maladies inflammatoires

Les anticorps monoclonaux sont utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires, et des exemples de maladies à médiation immunitaire et inflammatoires qui répondent aux anticorps monoclonaux comprennent la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, le psoriasis et, le psoriasis en plaques et l'asthme (Bonamichie et Castells, 2018)

• Psoriasis Pustuleux Généralisé

Le Spesolimab est un anticorps monoclonal humanisé anti-récepteur de l'interleukine-36, utilisé pour traiter les patients présentant une poussée de GPP (Bachelez et al., 2019). Le mécanisme d'action exact du Spesolimab dans la prise en charge des poussées psoriasiques n'est pas clair. Cependant, on pense qu'il améliore l'inflammation en inhibant la signalisation de l'IL-36. Il se lie au complexe récepteur IL-36R, empêchant la liaison de l'activation en aval de l'IL-36 des voies de signalisation du récepteur (Iznardo et Puig, 2021).

• Maladie de Crohn

L'infliximab est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 dirigé contre le TNF α qui a prouvé son efficacité dans le traitement de la maladie de Crohn, un trouble intestinal chronique grave qui peut être sévère réfractaire ou fistulisée (Lelong et al., 2005). Le mécanisme anti-inflammatoire des anticorps anti-TNF α , mis à part leur activité neutralisante directe du TNF, n'est pas complètement compris. Il a été démontré que l'infliximab exerce un effet pro-apoptotique sur les lymphocytes T et inhibe la production de cytokines de type Th1. Ainsi, l'administration d'infliximab à des patients atteints de la maladie de Crohn entraîne une diminution de la production *in vitro* de TNF- α et d'IFN- γ par les lymphocytes T intestinaux et du sang périphérique, un nouvel effet important de l'infliximab est l'inhibition de la production de GM-CSF par les lymphocytes T muqueux (Kirman et al., 2004).

d. Maladies cardiovasculaires (MCV)

Les MCV sont l'une des principales causes de décès et d'invalidité dans les sociétés occidentales. À ce jour, peu d'Acm ont été développés pour le traitement des MCV ou de leurs facteurs de risque ; Cependant, avec plusieurs agents en développement, cela est susceptible de changer dans un proche avenir (Catapano et Papadopoulos, 2013).

- **Athérosclérose coronaire**

Le Canakinumab est un anticorps monoclonal humain d'isotype IgG1/k ciblant l'interleukine-1 β (IL-1 β). Il prévient l'activation de la production de médiateurs inflammatoires, dont la synthèse de l'interleukine-6 (IL-6) impliquée dans la production de la CRP. Ce médicament est actuellement approuvé pour réduire les complications de l'athérosclérose coronaire (Chin et al., 2019). Le Canakinumab réduit significativement la hsCRP, l'IL-6 est sans impact apparent sur le LDLC ou le HDLC (Ridker et al., 2012).

e. Maladies allergiques

- **Asthme allergique**

Pour traiter l'asthme sévère, il est parfois nécessaire d'avoir recours aux nouvelles thérapies, qui incluent les anticorps monoclonaux. Actuellement, en France, quatre produits biologiques sont disponibles sur le marché pour aider la gestion des maladies allergiques et la prescription par les allergologues L'omalizumab est le premier traitement biologique approuvé pour le traitement de l'asthme sévère (Tabardel et al., 2022).

L'omalizumab est une IgG murine humanisée. Anticorps monoclonal kappa qui est administré par voie sous-cutanée toutes les 2 à 4 semaines à une dose calculée en fonction du poids corporel du patient et des concentrations plasmatiques totales d'IgE. Il se lie aux IgE circulantes libres, l'empêchant ainsi de se lier à des récepteurs de haute affinité. Le traitement par Omalizumab réduit considérablement les exacerbations de l'asthme, et améliore la qualité de vie (Humbert et Tonnel, 2005).

f. Maladies respiratoires

- **Syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2)**

Depuis le début de la pandémie, différents anticorps monoclonaux ou combinaisons d'anticorps ont été développés. Ils ciblent différents épitopes de la protéine spike du SARS-CoV-2 située à la surface du SARS-CoV-2 (Dauby, 2022) neutralisant ainsi la capacité du virus à se fixer et à pénétrer dans les cellules humaines. Un des traitements les plus efficaces à ces stades de prophylaxie pré- et post-exposition serait donc potentiellement des anticorps monoclonaux en bithérapie afin de prévenir l'échappement viral (Kherabi et al., 2022).

En prophylaxie pré-exposition, l'utilisation de la bithérapie tixagevimab/cilgavimab a montré une réduction significative de l'incidence des infections symptomatiques par le SARS-CoV-2. La combinaison tixagevimab/cilgavimab est aujourd'hui le seul traitement qui garde un pouvoir neutralisant et pour laquelle nous possédons des données de sécurité au travers de l'étude PROVENT. Celle-ci étudie l'usage d'une dose unique de 300 mg de tixagevimab/cilgavimab administrée en intra-musculaire en prophylaxie pré-exposition et rapporte une réduction de 83 % du risque d'être infecté sur une période de 6 mois (Hildebrand et Goffard, 2022).

L'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) a autorisé en accès précoce la combinaison casirivimab/imdevimab en prophylaxie pré- et post-exposition, la bithérapie Casirivimab/imdevimab (Ronapreve™; REGEN-COV™) est une combinaison co-emballée de deux anticorps monoclonaux humains neutralisants immunoglobuline gamma 1 (IgG1) contre la protéine de pointe du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) (Deeks, 2021).

Tableau 03 : Anticorps monoclonaux humanisés utilisés en clinique (Newcombe et Newcombe, 2007).

| Nom | Forme de l'anticorps | Antigène cible | Mécanismes d'action | Indication clinique |
|--|-------------------------------|-----------------------|---|--|
| Daclizumab (Zenapar®) | IgG1 | CD25 | Prévient l'interaction de l'IL-2 avec son récepteur | Prévention des rejets de greffe rénale |
| Palivizumab (Synagis®) | IgG1 | Protéine F du VRS | Neutralise l'activité du VRS | Prévention des infections respiratoires basses dues au VRS |
| Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotorg®) | IgG4 liée à la calichéamicine | CD33 | Délivrance de la calichéamicine, inducteur de cassure des brins d'ADN et apoptose | LAM |

| | | | | |
|-----------------------------------|------|--------------|--|---|
| Alemtuzumab (Campath®) | IgG1 | CD52 | CCDA, CDC | LLC |
| Efalizumab (Raptiva®) | IgG1 | CD11a | Prévient l'interaction de CD11a/18 (LFA1) avec CD54 (ICAM-1) | Psoriasis Cancer du côlon métastatique |
| Bevacizumab (Avastin®) | IgG1 | VEGF | Prévient l'interaction de VEGF avec son récepteur | Cancer du côlon métastatique |
| Natalizumab (Tysabri®) | IgG4 | Intégrine 04 | Réduit la migration des cellules T | Sclérose en plaques |

III.2.2. Anticorps polyclonaux

Les thérapies par anticorps polyclonaux sont aujourd'hui largement utilisées en médecine pour la neutralisation virale et des toxines et pour la thérapie de remplacement chez les patients présentant des déficits en immunoglobulines. Au cours des 20 dernières années, les immunoglobulines intraveineuses ont montré des effets immuno modulateurs et anti-inflammatoires bénéfiques dans de nombreuses maladies. Des préparations d'anticorps hyperimmuns ont été utilisées au cours du siècle dernier pour le traitement d'une variété d'agents infectieux et d'urgences médicales, y compris la toxicité de la digoxine, l'envenimation des serpents et les morsures d'araignées (Newcombe et Newcombe, 2007).

III.2.2.1. Thérapeutique polyclonale commercialisée d'origine animale

Les anticorps polyclonaux dérivés du sérum d'animaux sont actuellement le choix thérapeutique préféré et souvent le seul choix thérapeutique pour certaines urgences médicales aiguës afin d'éliminer des mélanges complexes et mal caractérisés d'antigènes cibles. Les anticorps polyclonaux purifiés sont souvent digérés à l'aide de protéases spécifiques telles que la papaine ou la pepsine, et les fragments spécifiques de liaison à l'antigène (Fabs) sont ensuite purifiés pour éliminer le fragment Fc et d'autres impuretés et contaminants (Newcombe et Newcombe, 2007).

a. Neutralisation des toxines

- **CroFab™**

L'envenimation par la vipère est une condition médicale critique vécue par plusieurs milliers de personnes par an aux États-Unis. Actuellement, l'antivenin disponible est un anticorps polyclonal fractionné dérivé d'ovin. Le fab immunitaire polyvalent de Crotalidae

(CroFab) est un fragment Fab spécifique au venin de l'immunoglobuline G qui se lie et neutralise les toxines du venin (Price et al., 2013).

- **DigiFab™**

La digoxine est toujours utilisée dans le traitement de la fibrillation auriculaire, de l'insuffisance cardiaque et d'arythmies cardiaques. Ce médicament peut provoquer des intoxications graves chez les personnes âgées en raison de leurs comorbidités (Desmond et al., 2017). Le DigiFabMD est offert sous forme de préparation lyophilisée, purifiée et stérile de fragments d'immunoglobuline Fab (monovalent) antidigoxine d'origine ovine (Dubé, 2012). Le Fab est produit par immunisation de moutons avec la digoxindicarboxyméthylamine (DigiFab), suivie d'une purification du Fab à partir du sang (McMillin et al., 2002). La toxicité de la digoxine peut être rapidement et en toute sécurité inversée par l'administration intraveineuse de fragments immuns anti-digoxine (Fab) tels que DigiFab qui agissent en liant la digoxine avec une haute affinité (10^9 - 10^{10} L/mol), favorisant le mouvement de la digoxine hors des tissus et donc en favoriser l'élimination (Boyer-Joubert et al., 2003).

- b. Transplantation d'organe**

- **Thymoglobuline®**

La globuline anti-thymocyte de lapin (r-ATG) est une préparation d'anticorps polyclonaux déplétant les lymphocytes (Kho et al., 2012) utilisée pour la prévention et le traitement du rejet aigu (RA) après transplantation rénale. La thymoglobuline est principalement utilisée pour traiter le rejet vasculaire, résistant aux stéroïdes et à médiation par les anticorps (Thiyagarajan et al., 2013).

La thymoglobuline agit comme un agent d'appauvrissement rapide des lymphocytes T, principalement par lyse cellulaire dépendante du complément dans le compartiment sanguin et mort cellulaire apoptotique dans les tissus lymphoïdes. Bien que le principal effet immunosuppresseur soit l'épuisement des lymphocytes T, il a également été démontré que la thymoglobuline module les marqueurs de surface cellulaire, y compris un certain nombre d'intégrines (Mueller, 2007).

- **Atgam®**

La globuline anti-thymocyte (ATG) est un antisérum polyclonal introduit en médecine clinique il y a plus de 30 ans (Siddiqui et al., 2019). ATG font partie de l'arsenal immunosuppresseur actuellement utilisé par les cliniciens pour prévenir ou traiter le rejet aigu en transplantation d'organe solide. L'ATG est un mélange d'immunoglobulines antilymphocytaires non spécifiques ciblant non seulement des sous-ensembles de

lymphocytes T mais également plusieurs autres cellules immunitaires et non immunitaires, ce qui rend sa composition précise en immunoglobulines difficile à apprécier ou à comparer d'une préparation à l'autre (Bamoulid et al., 2017).

III.2.2.2. Thérapeutique polyclonale commercialisée d'origine humaine

De nombreux agents thérapeutiques polyclonaux humains sont des produits plasmatiques fractionnés ou des dérivés plasmatiques fabriqués à partir de sang humain. Par la séparation sélective et la purification des protéines cibles. Les immunoglobulines polyclonales à usage intraveineux sont purifiées à l'échelle de la production à partir de plasma obtenu à partir de sang. Des échantillons prélevés sur plusieurs centaines à des milliers de donneurs humains. Les IgG intraveineuses polyclonales (IgIV) sont utilisées depuis de nombreuses années pour le traitement des patients présentant des déficits en anticorps (Newcombe et Newcombe, 2007).

a. Neutralisation virale

- **Hépatite B**
 - **HBIG**

L'hépatite chronique causée par l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) représente un fardeau sanitaire majeur à l'échelle mondiale, des millions de personnes sont chroniquement infectées par le VHB, en raison de complications potentiellement mortelles de cette infection, notamment la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire l'immunoglobuline contre l'hépatite B (HBIG) peut fournir une protection passive rapide contre l'infection après une exposition aiguë à l'infection (Zankharia et al., 2020).

L'immunoglobuline intraveineuse HBIG est un anticorps polyclonal contre l'hépatite B (HBIG) dérivée du plasma humain qui a prouvé son efficacité et sa réponse dose-dépendante dans la prévention de la récurrence du virus de l'hépatite B (VHB). Le mécanisme exact de l'immunisation passive est inconnu : HBIG peut bloquer l'entrée du VHB et la liaison aux hépatocytes, neutraliser le VHB circulant et cibler les cellules infectées par le VHB par une réponse immunitaire médiée par les anticorps (Congly et al. 2011).

- **Prévention de l'infection par le virus respiratoire syncytial**
 - **Respigam®**

Actuellement, RespiGam, une immunoglobuline du virus respiratoire syncytial (VRS) (Oertel, 1996) est un anticorps dérivé du plasma humain prescrits dans la maladie à VRS (Sawyer, 2000). Le VRS- IGIV est une immunoglobuline polyclonale intraveineuse (IV)

CHAPITRE III : Domaines d'applications des anticorps monoclonaux et polyclonaux

enrichie en anticorps neutralisants contre le VRS. Le VRS-IGIV est administré par une perfusion IV de 2 à 4 h (Maggon et Barik, 2004).

Tableau 04 : Exemples de thérapeutiques polyclonales actuellement disponibles (Newcombe et Newcombe, 2007).

| Thérapeutique polyclonale commercialisée | Description du produit | Application thérapeutique |
|---|--|---|
| d'origine animale | | |
| Vipera TAb™ | Antivenin européen de vipère (ovin) purifié par affinité | Vipère commune (Vipera Ammodytes, Vipera Aspis, Vipera Berus) antivenin |
| Antivenin (Micrurus fulvius) | Antivenin (Micrurus fulvius) Origine équine | Antivenin de serpent corail nord-américain |
| Antivenin (larodectus mactans) | Antivenin (latrodectus mactans) Origine équine | Antivenin d'araignée veuve noire |
| Diphthérique Antitoxine | Antitoxine diphthérique (Equin) | Traitement de la diphtérie |
| Lymphoglobuline® | Immunoglobuline anti-thymocyte (Equin) | Thérapie immunosuppressive |
| D'origine humaine | | |
| BayRab® | antirabique humaine (humaine) | Infection suspectée de rage |
| BayTet® | Immunoglobuline (humaine) contre le tétanos | Prophylaxie contre le tétanos |
| BayGam® | Immunoglobuline (humaine) | Protection passive contre l'hépatite A |
| Cytogame® | Immunoglobuline du cytomégalovirus intraveineuse (humaine) | Prophylaxie contre la maladie à cytomégalovirus |
| Nabi-HB® | Immunoglobuline de l'hépatite B (humaine) | Protection passive contre l'hépatite B |

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion

Les anticorps sont des réactifs critiques le plus souvent utilisés par les chercheurs en sciences de la vie et en médecine translationnelle. La conception et le développement réfléchis d'anticorps permettent d'utiliser ces outils dans de nombreuses applications, techniques et instruments différents. Toutes les formes d'anticorps, polyclonaux, monoclonaux à base d'hybridomes et monoclonaux recombinants, ont à la fois des avantages et des inconvénients en tant qu'outils de recherche et ont des attributs qui les différencient les uns des autres. Ce qui est clair, c'est que les anticorps, ont été, sont maintenant et continueront d'être des réactifs critiques le plus souvent utilisés par les chercheurs en sciences de la vie, et que les anticorps sont des outils de transformation utilisés pour diagnostiquer et traiter les maladies.

Le terme « anticorps polyclonal » est défini comme la population totale d'anticorps présents dans le sérum animal. Cette population complexe contient différentes sous-classes d'anticorps, notamment les IgG, IgM, IgE, IgA et IgD. Chaque anticorps représente le produit de sécrétion d'un seul lymphocyte stimulé et sa descendance clonale.

Les anticorps polyclonaux recombinants, la troisième génération d'anticorps thérapeutiques, ont la capacité de s'attaquer à des cibles complexes et hautement mutagènes, et offriront sans aucun doute un avenir commercial prometteur.

Les anticorps monoclonaux constituent la deuxième catégorie de médicaments en importance après les vaccins. Les nouvelles technologies ont favorisé le développement d'anticorps humains conçus pour une fonction optimale et une production efficace.

Les succès récents des AcM pour la prophylaxie et le traitement de certaines maladies ont suscité l'espoir d'une utilisation plus efficace et beaucoup plus large à l'avenir. L'histoire de la vaccinologie et les récents succès contre les agents infectieux incitent également à l'optimisme, mais il existe encore de nombreuses maladies pour lesquelles il n'existe pas de thérapeutiques et de vaccins efficaces. De nouvelles connaissances fondamentales sur le fonctionnement du système immunitaire sont nécessaires. Le séquençage et la caractérisation des anticorps pourraient fournir une mine de connaissances qui, combinées aux avancées dans d'autres domaines de la science et de la technologie, pourraient aider au développement de meilleurs traitements et vaccins.

Les anticorps monoclonaux offrent un traitement alternatif aux patients cancéreux qui ont échoué ou ont progressé avec une chimiothérapie standard. La recherche clinique continue d'explorer de nouveaux antigènes à cibler dans l'espoir de découvrir la « balles magique » pour éliminer complètement le cancer.

Perspectives futures

La pression du marché, plutôt que la surveillance réglementaire, entraînera des changements dans la façon dont les anticorps, sont produits et validés. Ces changements auront probablement le plus grand impact sur un sous-ensemble de producteurs qui n'ont pas encore adopté des normes élevées pour la production et la validation des anticorps. La communauté de la recherche en sciences de la vie bénéficierait grandement de normes universelles pour la validation des anticorps qui sont spécifiques à l'application dans leur approche de la validation. La perspective des chercheurs évoluera probablement, ce qui permettra de mieux comprendre quand et comment utiliser un anticorps d'une manière « adaptée à l'usage ». Comblé ce manque de connaissances peut entraîner le déploiement approprié de formes d'anticorps Acp, Acm ou Acr pour la collecte de données de haute qualité. Comme les agences de financement et certaines revues ont déjà commencé à modifier les exigences pour améliorer la spécification des réactifs critiques dans les subventions et les publications, il est probable que les universités et les producteurs d'anticorps eux-mêmes renforceront leurs efforts pour mieux éduquer les chercheurs sur la sélection et l'utilisation des anticorps dans un contexte spécifique à l'application.

Références
bibliographique

- ❖ **Al Saati, T., & Brousset, P. (2010).** Données récentes sur la production d'anticorps monoclonaux à visée diagnostique en histopathologie. *Revue francophone des laboratoires*, 2010(418), 51-55.
- ❖ **Anis, S. F., Hashaikeh, R., & Hilal, N. (2019).** Microfiltration membrane processes: A review of research trends over the past decade. *Journal of Water Process Engineering*, 32, 100941.
- ❖ **Arache, W., & Bahadi, A. (2020).** Apport de la biologie dans la greffe rénale d'un donneur vivant. *Journal Marocain des Sciences Médicales*, 22(2).
- ❖ **Ascoli, C. A., & Aggeler, B. (2018).** Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques*, 65(3), 127-136.
- ❖ **Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C., & O'Kennedy, R. (2012).** Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, 56(2), 116-129.
- ❖ **Azevedo, A. M., Rosa, P. A., Ferreira, I. F., & Aires-Barros, M. R. (2007).** Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *Journal of biotechnology*, 132(2), 209-217.
- ❖ **Bachelez, H., Choon, S. E., Marrakchi, S., Burden, A. D., Tsai, T. F., Morita, A., Turki, H., Hall, D. B., Shear, M., Baum, P., Padula, s. J., & Thoma, C. (2019).** Inhibition de la voie de l'interleukine-36 pour le traitement du psoriasis pustuleux généralisé. *New England Journal of Medicine*, 380(10), 981-983.
- ❖ **Bamoulid, J., Staeck, O., Crépin, T., Halleck, F., Saas, P., Brakemeier, S., Ducloux, D., & Budde, K. (2017).** Anti-thymocyte globulins in kidney transplantation: focus on current indications and long-term immunological side effects. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 32(10), 1601-1608.
- ❖ **Bean, E. S. (2000).** Polyclonal antibodies. *Methods in antibody production and characterization*. CRS Press, Taylor and Francis Group, New York, 31-50.
- ❖ **Behera, B. C., Mishra, R. R., & Thatoi, H. (2021).** Recent biotechnological tools for diagnosis of corona virus disease: A review. *Biotechnology progress*, 37(1),
- ❖ **BHALLIL, O., Benseffaj, N., Ouadghiri, S., Drissi Bourhanbour, A., & Essakalli, M. (2015).** Le groupage sanguin: difficultés d'interprétation. *Journal de Biologie Médicale*, 3(12), 280-285.
- ❖ **Boes, M. (2000).** Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular immunology*, 37(18), 1141-1149.
- ❖ **Bonamichi-Santos, R., & Castells, M. (2018).** Diagnostic et prise en charge de l'hypersensibilité médicamenteuse et de l'anaphylaxie dans le cancer et les maladies

- inflammatoires chroniques: réactions aux taxanes et aux anticorps monoclonaux. *Revue clinique en allergie et immunologie*, 54, 375-385.
- ❖ **Boucheix, C. (1985).** Applications cliniques des anticorps monoclonaux. *La Revue de médecine interne*, 6(4), 403-410.
 - ❖ **Bournazos, S., Gupta, A., & Ravetch, J. V. (2020).** The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nature Reviews Immunology*, 20(10), 633-643.
 - ❖ **Boyer-Joubert, C., Lorthiois, E., & Moreau, F. (2003).** To market, to market-2002.
 - ❖ **Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (2009).** Purification procedures. *Guide to protein purification Jungbauer, A., and Hahn R.(eds). Elsevier*, 347-370.
 - ❖ **Bürki, C., Volleberg, M., Blomgren, L., Froese, S., & Hersberger, M. (2023).** Reference ranges for the polyethylene glycol (PEG) precipitation activity (% PPA) of eight routine enzyme activities. *Practical Laboratory Medicine*, 33, e00304.
 - ❖ **Buyel, J. F., & Fischer, R. (2014).** Flocculation increases the efficacy of depth filtration during the downstream processing of recombinant pharmaceutical proteins produced in tobacco. *Plant biotechnology journal*, 12(2), 240-252
 - ❖ **Castro-Muñoz, R., Serna-Vázquez, J., & García-Depraect, O. (2022).** Current evidence in high throughput ultrafiltration toward the purification of monoclonal antibodies (mAbs) and biotechnological protein-type molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(6), 827-837
 - ❖ **Catapano, A. L., & Papadopoulos, N. (2013).** The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis*, 228(1), 18-28.
 - ❖ **Cerny, T., Borisch, B., Introna, M., Johnson, P., & Rose, A. L. (2002).** Mechanism of action of rituximab. *Anti-cancer drugs*, 13 Suppl 2, S3–S10
 - ❖ **Chin, E. M., Gendron, É., Li, Q., & Lordkipanidzé, M. (2019).** Thérapie anti-inflammatoire au canakinumab pour la maladie coronarienne: étude CANTOS. *Pharmactuel*, 52(1), 18-24.
 - ❖ **Congly, S. E., Burak, K. W., & Coffin, C. S. (2011).** Hepatitis B immunoglobulin for prevention of hepatitis B virus infection and recurrence after liver transplantation. *Expert review of clinical immunology*, 7(4), 429–436.
 - ❖ **Cornez, N., & Piccart, M. J. (2000).** Cancer du sein et Herceptin®. *Bulletin du cancer*, 87(11), 847-58.
 - ❖ **Correia, I. (2010, May).** Stability of IgG isotypes in serum. *In MAbs* (Vol. 2, No. 3, pp. 221-232). Taylor & Francis.

- ❖ **Dauby, N. (2022).** COVID-19: traitements actuels à l'ère de la vaccination. *Rev Med Brux*, 43, 370-375.
- ❖ **Deeks E. D. (2021).** Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs*, 81(17), 2047–2055.
- ❖ **Delahaut, P. (2017).** Immunisation–Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. *Methods*, 116, 4-11.
- ❖ **Deligne, C., & Teillaud, J. L. (2013).** Le double visage des anticorps monoclonaux en oncologie - Immunité passive et vaccination [The Janus face of monoclonal antibodies in oncology: passive immunity and vaccination]. *Medecine sciences : M/S*, 29(1), 57–63.
- ❖ **Desmond, C., Bernadet, P., Dondia, D., Courtois, A., Delarche, N., & Labadie, M. (2017).** Surdosage en digoxine: lorsqu'une inefficacité du traitement antidotique remet en cause le diagnostic.... *Journal Européen des Urgences et de Réanimation*, 29(1), 80-84.
- ❖ **Dubé, P. A. (2012).** Fragments d'anticorps spécifiques de la digoxine: le Canada passe du DigiBind au DigiFab. *Bulletin d'information toxicologique*, 1, 20.
- ❖ **Ebeid, N. H., El-Shershaby, H. M., Shafik, H. M., & Moustafa, K. A. (2023).** Establishment of liquid phase double antibody radioimmunoassay system for in-vitro determination of erythropoietin hormone in human serum. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1-10.
- ❖ **El Abd, Y., Tabll, A., Smolic, R., & Smolic, M. (2022).** Mini-review: The market growth of diagnostic and therapeutic monoclonal antibodies–SARS CoV-2 as an example. *Human Antibodies*, 30(1), 15-24.
- ❖ **Gala, J. L., Nyabi, O., Durant, J. F., Chibani, N., & Bentahir, M. (2020).** Méthodes diagnostiques du COVID-19. *Louvain Med*, 139(05-06), 228-235.
- ❖ **Greiner, M., Pfeiffer, D., & Smith, R. D. (2000).** Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive veterinary medicine*, 45(1-2), 23-41.
- ❖ **Grillo-López, A. J., White, C. A., Varns, C., Shen, D., Wei, A., McClure, A., & Dallaire, B. K. (1999), October.** Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. In *Seminars in oncology* (Vol. 26, No. 5 Suppl 14, pp. 66-73).
- ❖ **Gulhane, C. A., Fuladi, O. A., Bakal, R. L., & Manwar, J. V. (2022).** Recent advances in various chromatographic techniques used for analysis of drugs in

- pharmaceutical products: A review. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 19(2), 288-295.
- ❖ **Gutzeit, C., Chen, K., & Cerutti, A. (2018).** The enigmatic function of IgD: some answers at last. *European journal of immunology*, 48(7), 1101-1113.
 - ❖ **Hage, D. S. (1999).** Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical chemistry*, 45(5), 593-615
 - ❖ **Han, X., Hewig, A., & Vedantham, G. (2011).** Recovery and purification of antibody. *Antibody Expression and Production*, 305-340..
 - ❖ **Hanly, W. C., Artwohl, J. E., & Bennett, B. T. (1995).** Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR journal*, 37(3), 93-118.
 - ❖ **Herich, R. (2017).** Is the role of IgA in local immunity completely known?. *Food and Agricultural Immunology*, 28(2), 223-237.
 - ❖ **Herzenberg, L. A., Black, S. J., Tokuhisa, T., & Herzenberg, L. A. (1980).** Memory B cells at successive stages of differentiation. Affinity maturation and the role of IgD receptors. *The Journal of experimental medicine*, 151(5), 1071-1087.
 - ❖ **HILDEBRAND, M., & GOFFARD, J. (2022).** Place des anticorps monoclonaux neutralisants dans le traitement de la COVID-19 dans la vie réelle: le grand écart avec les études cliniques randomisées. *Rev Med Brux*, 43, 538-540.
 - ❖ **Hober, S., Nord, K., & Linhult, M. (2007).** Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography B*, 848(1), 40-47.
 - ❖ **Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., Martínez-Chapa, S. O., Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, C., & Martínez-Chapa, S. O. (2018).** Advantages, disadvantages and modifications of conventional ELISA. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z*, 67-115.
 - ❖ **Hubadillah, S. K., Jamalludin, M. R., Othman, M. H. D., & Iwamoto, Y. (2022).** Recent progress on low-cost ceramic membrane for water and wastewater treatment. *Ceramics International*, 48(17), 24157-24191.
 - ❖ **Humbel, R. L. (2016).** Comment rechercher les auto-anticorps? Choix et performances des méthodes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2016(484), 11-14.
 - ❖ **Humbert, M., & Tonnel, A. B. (2005).** Traitement par anticorps anti-IgE de l'asthme allergique difficile à contrôler. *Revue des maladies respiratoires*, 22(6), 983-990.
 - ❖ **Huse, K., Böhme, H. J., & Scholz, G. H. (2002).** Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 51(3), 217-231.

- ❖ **Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019).** An introduction to performing immunofluorescence staining. *Biobanking: methods and protocols*, 299-311.
- ❖ **Iznardo, H., & Puig, L. (2021).** Exploring the Role of IL-36 Cytokines as a New Target in Psoriatic Disease. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4344.
- ❖ **Jurczak, W., Długosz Danecka, M., & Buske, C. (2019).** Rituximab biosimilars for lymphoma in Europe. *Expert opinion on biological therapy*, 19(10), 1045–1056.
- ❖ **Keyt, B. A., Baliga, R., Sinclair, A. M., Carroll, S. F., & Peterson, M. S. (2020).** Structure, function, and therapeutic use of IgM antibodies. *Antibodies*, 9(4), 53.
- ❖ **Khan, M., Shah, S. H., Salman, M., Abdullah, M., Hayat, F., & Akbar, S. (2023).** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Chemiluminescent Immunoassay: A General Overview. *Global Journal of Medical, Pharmaceutical, and Biomedical Update*, 18.
- ❖ **Kherabi, Y., Lescure, F. X., Yazdanpanah, Y., & Peiffer-Smadja, N. (2022).** COVID-19: *les thérapeutiques*. *M decine et Maladies Infectieuses Formation*.
- ❖ **Kho, M. M. L., Bouvy, A. P., Cadogan, M., Kraaijeveld, R., Baan, C. C., & Weimar, W. (2012).** The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transplant immunology*, 26(4), 186-190.
- ❖ **Kirman, I., Whelan, R. L., & Nielsen, O. H. (2004).** Infliximab : mécanisme d'action au-delà de la neutralisation du TNF- α dans les maladies inflammatoires de l'intestin. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 16(7), 639-641.
- ❖ **Leenaars, M. (1997).** Adjuvants in Laboratory Animals: *evaluation of immunostimulating properties and side effects of Freund's complete adjuvant and alternative adjuvants in immunization procedures*.
- ❖ **Leenaars, M., & Hendriksen, C. F. (2005).** Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR journal*, 46(3), 269-279.
- ❖ **Lelong, J., Duburque, C., Fournier, C., Colombel, J. F., Desreumaux, P., Tonnel, A. B., & Wallaert, B. (2005).** Accoutumance médicamenteuse à l'infliximab dans la maladie de Crohn. *Revue des maladies respiratoires*, 22(2), 239-246.
- ❖ **Levan-Petit, I., Lelièvre, É., Barra, A., & Lecron, J. C. (1999).** L'IgD: une immunoglobuline un peu oubliée revient sur le devant de la scène.

- ❖ **Li, Z., Rodriguez, E., Azaria, S., Pekarek, A., & Hage, D. S. (2017).** Affinity monolith chromatography: A review of general principles and applications. *Electrophoresis*, 38(22-23), 2837-2850.
- ❖ **Liepkalns, J. S., Hod, E. A., Stowell, S. R., Cadwell, C. M., Spitalnik, S. L., & Zimring, J. C. (2012).** Biphasic clearance of incompatible red blood cells through a novel mechanism requiring neither complement nor Fc γ receptors in a murine model. *Transfusion*, 52(12), 2631-2645.
- ❖ **Lin A. V. (2015).** Direct ELISA. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1318, 61–67.
- ❖ **Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005).** Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*, 46(3), 258-268.
- ❖ **Liu, H. F., Ma, J., Winter, C., & Bayer, R. (2010, September).** Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. In *MAbs* (Vol. 2, No. 5, pp. 480-499). Taylor & Francis.
- ❖ **Lünemann, J. D., Nimmerjahn, F., & Dalakas, M. C. (2015).** Intravenous immunoglobulin in neurology—mode of action and clinical efficacy. *Nature Reviews Neurology*, 11(2), 80-89.
- ❖ **Ma H , Shieh KJ , Lee S .** Etude de la technique ELISA. *Nat Sci* . 2006 ; 4 : 36-7
- ❖ **Madadkar, P., Sadavarte, R., Butler, M., Durocher, Y., & Ghosh, R. (2017).** Preparative separation of monoclonal antibody aggregates by cation-exchange laterally-fed membrane chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1055, 158-164.
- ❖ **Maggon, K., & Barik, S. (2004).** New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology*, 14(3), 149-168.
- ❖ **Maibom-Thomsen, S. L., Trier, N. H., Holm, B. E., Hansen, K. B., Rasmussen, M. I., Chailyan, A., Marcatili, P., Højrup, P., & Houen, G. (2019).** Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *PloS one*, 14(6), e0217624.
- ❖ **Mayolo-Deloisa, K., Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2017).** General concepts and definitions of aqueous two-phase systems. *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*, 1-18
- ❖ **McPherson, A., Malkin, A. J., & Kuznetsov, Y. G. (1995).** The science of macromolecular crystallization. *Structure*, 3(8), 759-768.

- ❖ **Mills, CE, Ding, E., & Olsen, B. (2019).** Purification des protéines par transitions de phase induites par l'éthanol du polypeptide de type élastine (ELP). *Recherche en chimie industrielle et technique*, 58 (27), 11698-11709.
- ❖ **Mistretta, V., Cavalier, E., Collette, J., & Chapelle, J. P. (2009).** Production des anticorps monoclonaux. *Revue Médicale de Liège*, 64(5-6).
- ❖ **Mistretta, V., Cavalier, E., Collette, J., Lutteri, L., & Chapelle, J. P. (2009).** Intérêt des anticorps monoclonaux dans le laboratoire d'analyses biomédicales. *Revue Médicale de Liège*, 64(5-6).
- ❖ **Moser, A. C., & Hage, D. S. (2010).** Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis*, 2(4), 769-790.
- ❖ **Mueller, T. F. (2007).** Mechanisms of action of thymoglobulin. *Transplantation*, 84(11S), S5-S10.
- ❖ **Müller, R., Gräwert, M. A., Kern, T., Madl, T., Peschek, J., Sattler, M., Groll, M., & Buchner, J. (2013).** High-resolution structures of the IgM Fc domains reveal principles of its hexamer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), 10183-10188.
- ❖ **Murphy, C., Devine, T., & O'Kennedy, R. (2016).** Technology advancements in antibody purification. *Antibody Technol J*, 6, 17-32.
- ❖ **Naik, A. D., Menegatti, S., Gurgel, P. V., & Carbonell, R. G. (2011).** Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media. *Journal of Chromatography A*, 1218(13), 1691-1700.
- ❖ **Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., & Murray, P. G. (2000).** Monoclonal antibodies. *Molecular pathology: MP*, 53(3), 111-117.
- ❖ **Newcombe, C., & Newcombe, A. R. (2007).** Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics. *Journal of Chromatography B*, 848(1), 2-7.
- ❖ **Nguyen, T. G. (2022).** The therapeutic implications of activated immune responses via the enigmatic immunoglobulin D. *International Reviews of Immunology*, 41(2), 107-122.
- ❖ **Ochsenbein, A. F. (2008, February).** Anticorps monoclonaux comme substances thérapeutiques. *In Forum Med Suisse* (Vol. 8, No. 8, pp. 140-3).
- ❖ **Odell, I. D., & Cook, D. (2013).** Immunofluorescence techniques. *The Journal of investigative dermatology*, 133(1), e4.

- ❖ **Oertel, M. D. (1996).** RespiGam: an RSV immune globulin. *Pediatric nursing*, 22(6), 525-529.
- ❖ **Oostindie, S. C., Lazar, G. A., Schuurman, J., & Parren, P. W. (2022).** Avidity in antibody effector functions and biotherapeutic drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(10), 715-735.
- ❖ **Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A., & Carneiro-Sampaio, M. (2012).** IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- ❖ **Pandey, S. (2010).** Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 1(2), 017.
- ❖ **Perše, M., & Večerić-Haler, Ž. (2019).** The role of IgA in the pathogenesis of IgA nephropathy. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6199.
- ❖ **Petrušić, V., Živković, I., Stojanović, M., Stojićević, I., Marinković, E., & Dimitrijević, L. (2011).** Hexameric immunoglobulin M in humans: desired or unwanted?. *Medical hypotheses*, 77(6), 959-961.
- ❖ **Pfaunmiller, E. L., Paulemond, M. L., Dupper, C. M., & Hage, D. S. (2013).** Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405, 2133-2145.
- ❖ **Plested, J. S., Coull, P. A., & Gidney, M. A. J. (2003).** Elisa. *Haemophilus influenzae Protocols*, 243-261.
- ❖ **Poddar, S., Sharmeen, S., & Hage, D. S. (2021).** Affinity monolith chromatography: A review of general principles and recent developments. *Electrophoresis*, 42(24), 2577-2598
- ❖ **Prasanna, R. R., & Vijayalakshmi, M. A. (2010).** Characterization of metal chelate methacrylate monolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. *Journal of Chromatography A*, 1217(23), 3660-3667.
- ❖ **Price, A. B., Russell, W. S., King, J. B., Thompson, A. J., & Tuuri, R. E. (2013).** Time to Administration of Crotalid Antivenin in the Pediatric Emergency Department: A Quality Improvement Intervention. *Annals of Emergency Medicine*, 62(4), S124.
- ❖ **Prin-Mathieu, C., Aguilar, P., Béné, M. C., Faure, G., & Kolopp-Sarda, M. N. (2003).** Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques. *Revue française des laboratoires*, 2003(357), 31-39.

- ❖ **Przybycien, T. M., Pujar, N. S., & Steele, L. M. (2004).** Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(5), 469-478.
- ❖ **Ra, C., Jouvin, M. H. E., Blank, U., & Kinet, J. P. (1989).** A macrophage Fc γ receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature*, 341(6244), 752-754.
- ❖ **Racine, R., & Winslow, G. M. (2009).** IgM in microbial infections: taken for granted?. *Immunology letters*, 125(2), 79-85.
- ❖ **Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011).** Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Science and Technology*, 1(1), 7-16
- ❖ **Ramos-de-la-Peña, A. M., González-Valdez, J., & Aguilar, O. (2019).** Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *Journal of separation science*, 42(9), 1816-1827.
- ❖ **RArora, S., Ayyar, B. V., & O’Kennedy, R. (2014).** Affinity chromatography for antibody purification. Protein Downstream Processing: *Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods*, 497-516.
- ❖ **Rathore, A. S., Kumar, D., & Kateja, N. (2018).** Recent developments in chromatographic purification of biopharmaceuticals. *Biotechnology letters*, 40, 895-905.
- ❖ **Ridker, P. M., Howard, C. P., Walter, V., & Thuren, T. (2012).** Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on IL-6, fibrinogen, and hscrp: a randomized placebo controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(13S), E1539-E1539.
- ❖ **Rosa, P. A., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2007).** Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *Journal of chromatography. A*, 1141(1), 50–60.
- ❖ **Sawyer, L. A. (2000).** Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases. *Antiviral research*, 47(2), 57-77.
- ❖ **Srirapu, S. (2023).** Monoclonal Antibodies and their Applications in Cancer. *Journal of Student Research*, 12(2).
- ❖ **Scheen, A., & Moutschen, M. (2009).** Les anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Revue Médicale de Liège*, 64(5-6).

- ❖ **Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010).** Structure and function of immunoglobulins. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S41-S52.
- ❖ **Schubert, S., & Freitag, R. (2007).** Comparison of ceramic hydroxy-and fluoroapatite versus Protein A/G-based resins in the isolation of a recombinant human antibody from cell culture supernatant. *Journal of Chromatography A*, 1142(1), 106-113.
- ❖ **Sefu, A. B., Tshiband-a-Tshish, A., Mavanga, N. M., Malime, P. K., Kabongo, R. K., & Ramazani, S. Y. (2012).** Production locale des antisérums de groupe sanguin ABO. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 27(6), 339-344.
- ❖ **Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016).** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*, 77(7), C98-C101.
- ❖ **Shen, C. H. (2019).** Quantification and analysis of proteins. **Diagnostic Molecular Biology, 187-214.**
- ❖ **Shukla, A. A., Etzel, M. R., & Gadam, S. (Eds.). (2006).** *Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry*. CRC press. Page 298-300.
- ❖ **Siddiqui, S., Cox, J., Herzig, R., Palaniyandi, S., Hildebrandt, G. C., & Munker, R. (2019).** Anti-thymocyte globulin in haematology: Recent developments. *The Indian journal of medical research*, 150(3), 221.
- ❖ **Silberstein, S., Lenz, R., & Xu, C. (2015).** Therapeutic monoclonal antibodies: what headache specialists need to know. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 55(8), 1171-1182.
- ❖ **Simonin, G., Geny, B., & Paraf, A. (1979).** Mécanisme d'action des adjuvants de l'immunité au niveau cellulaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 132(2), 259-267.
- ❖ **Singh, R., & Purkait, M. K. (2019).** Microfiltration membranes. *In Membrane separation principles and applications* (pp. 111-146). Elsevier.
- ❖ **Sousa-Pereira, P., & Woof, J. M. (2019).** IgA: structure, function, and developability. *Antibodies*, 8(4), 57.
- ❖ *Journal* .Monoclonal Antibodies and their Applications in Cancer .(Srirapu, S. (2023) .(2)12 ,of Student Research
- ❖ **Stein, A., & Kiesewetter, A. (2007).** Cation exchange chromatography in antibody purification: pH screening for optimised binding and HCP removal. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 848(1), 151–158.

- ❖ **Stiehm, E. R. (1984).** Use of Human Gammaglobulin. *Chest*, 86(3), 32s-33s.
- ❖ **Stills, H. F. (2012).** Polyclonal antibody production. In *The laboratory rabbit, Guinea pig, Hamster, and other rodents* (pp. 259-274). Academic Press.
- ❖ **Stils Jr, H. F. (2005).** Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR journal*, 46(3), 280-293.
- ❖ **Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2015).** The structural role of antibody N-glycosylation in receptor interactions. *Structure*, 23(9), 1573-1583.
- ❖ **Subramanian, A. (2002).** Immunoaffinity chromatography. *Molecular biotechnology*, 20, 41-47.
- ❖ **Surova, E., & Jumaa, H. (2014).** The role of BCR isotype in B-cell development and activation. *Advances in immunology*, 123, 101-139.
- ❖ **Suter, T. M., Cook-Bruns, N., & Barton, C. (2004).** Cardiotoxicity associated with trastuzumab (Herceptin) therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *The Breast*, 13(3), 173-183.
- ❖ **Tabardel, M., Clark, E., Demoly, P., & Caimmi, D. (2022).** Les anticorps monoclonaux à disposition des allergologues pour traiter l'asthme sévère. *Revue Française d'Allergologie*, 62(6), 572-577.
- ❖ **Terrier, B., & Mouthon, L. (2006).** Les auto-anticorps en pratique clinique. *Revue des maladies respiratoires*, 23(6), 743-745.
- ❖ **Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Reddy, G., Reddy, S. V., Delfosse, P., & Reddy, D. V. (2000).** Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10), 5079–5082.
- ❖ **Thiyagarajan, U. M., Ponnuswamy, A., & Bagul, A. (2013).** Thymoglobulin and its use in renal transplantation: a review. *American journal of nephrology*, 37(6), 586-601.
- ❖ **Todd, P. A., & Brogden, R. N. (1989).** Muromonab CD3: a review of its pharmacology and therapeutic potential. *Drugs*, 37, 871-899.
- ❖ **Trochimiak, T., & Hübner-Woźniak, E. (2014).** Review EFFECT OF EXERCISE ON THE LEVEL OF IMMUNOGLOBULIN A IN SALIVA. *Biology of Sport*, 29(4), 255-261.
- ❖ **Vanhove B. (2009).** Anticorps monoclonaux en transplantation [Monoclonal antibodies in organ transplantation]. *Medecine sciences : M/S*, 25(12), 1121–1125.

- ❖ **Vermout, S., Denis, M., Losson, B., & Mignon, B. (2003).** Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann Méd Vét*, 147, 393-401.
- ❖ **Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014).** IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.
- ❖ **Vladutiu, A. O. (2000).** Immunoglobulin D: properties, measurement, and clinical relevance. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(2), 131-140.
- ❖ **Walker, J. M. (Ed.). (1996).** *The protein protocols handbook* (Vol. 1996). Springer Science & Business Media. Page 991.
- ❖ **Xu, X., Zhang, Y., Shi, M., Sheng, W., Du, X., Yuan, M., & Wang, S. (2014).** Two novel analytical methods based on polyclonal and monoclonal antibodies for the rapid detection of *Cronobacter* spp.: development and application in powdered infant formula. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 335-340.
- ❖ **Yokoyama, W. M., Christensen, M., Santos, G. D., Miller, D., Ho, J., Wu, T., Dziegielewski, N., & Neethling, F. A. (2013).** Production of monoclonal antibodies. *Current protocols in immunology*, 102(1), 2-5.
- ❖ **Zankharia, U. S., Kudchodkar, S., Khoshnejad, M., Perales-Puchalt, A., Choi, H., Ho, M., Zaidi, F., Ugen, K. E., Kim, J. J., Weiner, D. B., & Muthumani, K. (2020).** Neutralization of hepatitis B virus by a novel DNA-encoded monoclonal antibody. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(9), 2156-2164.

Résumé :

Les anticorps sont des protéines naturelles qui fonctionnent comme des entités de liaison à l'antigène sur la membrane des cellules B, qui sont également sécrétées par les plasmocytes. Depuis la création du premier anticorps monoclonal (Acm) en 1975 par Georges Köhler et César Milstein, par la technique des hybridomes. Les Acm sont devenus un des outils thérapeutiques et diagnostiques les plus puissants de la médecine moderne. Pour produire Acm, les lymphocytes B sont prélevés de la rate d'un animal qui a été provoqué avec l'antigène pertinent, sont ensuite fusionnés avec des cellules tumorales myéломateuses, permet ainsi d'obtenir des hybridomes qui sont des cellules cancéreuses, se multiplieront rapidement et produiront de grandes quantités d'anticorps. Alors que la production des anticorps polyclonaux se fait par l'immunisation d'un animal (lapin) avec un antigène. Les animaux immunisés permettent de récupérer dans leurs sérums un cocktail d'immunoglobulines possédant une proportion relativement faible 5 à 10 % d'anticorps dirigés contre l'antigène qui a été utilisé pour l'immunisation (antisérum). Les thérapies par Acp sont largement utilisées en médecine pour la neutralisation virale et des toxines ainsi que pour la thérapie de remplacement chez les patients présentant des déficits en immunoglobulines.

Mots clés : anticorps, monoclonaux, polyclonaux, immunisation, diagnostique, thérapie.

Abstract :

Antibodies are natural proteins that function as antigen-binding entities on the membrane of B cells, which are also secreted by plasma cells. Since the creation of the first monoclonal antibody (Mab) in 1975 by Georges Köhler and César Milstein, through hybridoma technology, Mabs have become one of the most powerful therapeutic and diagnostic tools in modern medicine. To produce Mab the B lymphocytes are taken from the spleen of an animal which has been challenged with the relevant antigen, are then fused with myeloma tumor cells thus obtaining hybridomas being cancerous cells, will multiply rapidly and will produce large amounts of antibodies. While the production of polyclonal antibodies is done by immunizing an animal (rabbit) with an antigen. The immunized animals make it possible to recover in their sera a cocktail of immunoglobulins possessing a relatively low proportion of 5 to 10% of antibodies directed against the antigen which was used for the immunization (antiserum). Pab therapies are widely used in medicine for viral and toxin neutralization and for replacement therapy in patients with immunoglobulin deficiencies

Keywords : antibody, monoclonal, polyclonal, immunization, diagnostic, therapy.

ملخص:

الأجسام المضادة هي بروتينات طبيعية تعمل ككيانات مرتبطة بالمستضد على غشاء الخلايا البائية ، والتي تفرزها أيضًا خلايا البلازما. منذ إنشاء أول جسم مضاد أحادي النسيلة (Acm) في عام 1975 من قبل جورج كولر وسيزار ميلشتاين ، عن طريق تقنية الورم الهجين ، أصبحت Acms واحدة من أقوى الأدوات العلاجية والتشخيصية في الطب الحديث. لإنتاج Acm ، يتم أخذ الخلايا البائية من طحال حيوان تم تحريضه بالمستضد ، ثم يتم دمجها مع خلايا الورم النخاعي ، مما ينتج عنه أورام هجينة وهي خلايا سرطانية ، تتكاثر بسرعة وتنتج كميات كبيرة من الأجسام المضادة . بينما يتم إنتاج الأجسام المضادة متعددة النسيلة عن طريق تحصين حيوان (أرنب) بمستضد. تجعل الحيوانات المحصنة من الممكن استعادة مزيج من الغلوبولين المناعي في مصلها يحتوي على نسبة منخفضة نسبيًا، من 5 إلى 10 ٪ من الأجسام المضادة الموجهة ضد المستضد الذي تم استخدامه للتحصين (المصل المضاد). تستخدم علاجات Acp على نطاق واسع في الطب لتحبيد الفيروس والسموم وكذلك العلاج البديل في المرضى الذين يعانون من نقص الغلوبولين المناعي.

الكلمات المفتاحية: جسم مضاد، وحيد النسيلة، متعدد النسيلة، تحصين، تشخيص، علاج.