

Epreuve professionnelle de synthèse: étude d'opérations techniques

Obtention d'hybridomes et production d'anticorps monoclonaux

C'est en 1975 que G. Köhler et C. Milstein (Nature (1975), 256 : 495-497) ont montré comment obtenir et cultiver in vitro des cellules hybridomes productrices d'anticorps.

Si des cellules productrices d'anticorps (plasmocytes) isolées à partir d'un animal immunisé sont fusionnées avec des cellules de myélome (qui sont des lymphocytes B tumoraux différenciés), on obtient des cellules hybrides appelées hybridomes. Certains hybridomes sont capables de divisions cellulaires continues et sont sécrétors stables d'anticorps. Les anticorps produits par un clone hybridome stable cultivé sont des anticorps monoclonaux.

1. Rappeler les caractéristiques principales d'un anticorps monoclonal en comparaison à un sérum polyclonal.

Les animaux immunisés le sont souvent à l'aide d'adjuvant et l'animal le plus souvent utilisé est la souris.

2. Définir un adjuvant ? Que contient l'adjuvant de Freund ?

3. Schématiser une réponse primaire et secondaire chez un animal immunisé avec le même antigène. Donner les caractéristiques essentielles de ces réponses immunitaires.

Avec les protocoles utilisés pour la fusion, les événements de fusion sont rares (environ 1 % des partenaires en présence) et seule 1 cellule fusionnée sur 10^5 environ forme un hybride viable. A l'issue d'une manipulation de fusion, il reste donc un très grand nombre de cellules non fusionnées dans le milieu de culture: des cellules de myélome et des cellules partenaires en provenance de l'animal immunisé.

4. Rappeler le nom de la molécule qui favorise la fusion cellulaire et expliquer comment elle agit. L'élimination des cellules de myélome non fusionnées sera facilitée si l'on utilise des cellules HGPRT déficiente (HGPRT hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase) et un milieu sélectif convenable. Le document 1 présente des données biochimiques succinctes relatives à la biosynthèse des nucléotides par les cellules eucaryotes.

La sélection des hybridomes par élimination des cellules de myélome non fusionnées utilise un milieu HAT (milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et du désoxythymidine).

5. A l'aide des données du document 1, expliquer pourquoi les clones survivants sont bien des hybridomes.

Après fusion, les cultures sélectives ont lieu en puits. Les puits montrant la croissance de clones d'hybridomes peuvent être testés au bout de quelques jours pour la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène choisi au départ. De très nombreux échantillons de surnageants de puits doivent être testés puisque 90 % des puits sont habituellement négatifs (on peut limiter les tests en travaillant au départ sur des groupements de surnageants de puits pour ensuite ne tester que les puits des groupements positifs). Par la suite, il faut cloner de nombreux puits qui se sont révélés positifs pour tester à nouveau la production d'anticorps et cloner à nouveau et tester à nouveau jusqu'à obtenir un ou plusieurs hybridomes producteurs stables.

Il existe de très nombreuses méthodes utilisables pour cribler les surnageants de cultures d'hybridomes en puits produisant un anticorps monoclonal.

Le document 2 présente un protocole de détection permettant de mettre en évidence l'éventuelle présence d'anticorps monoclonal dans chaque surnageant.

6. Schématiser le principe de la réaction moléculaire obtenue et en donner le principe.

7. Pour ce test ELISA, quel(s) témoin(s) serait-il convenable de réaliser pour vérifier la spécificité de la réaction et pour distinguer le signal obtenu de celui de l'autohydrolyse du substrat?

Elimination de substance toxique par l'organisme

Les ions nitrates sont transformés dans l'organisme en ions nitrites où ils deviennent toxiques par le biais de la formation de nitrosamines cancérigènes.

La réglementation française limite la teneur en nitrates de l'eau potable et celle des aliments.

Une grande partie des nitrates ingérés est absorbée au niveau de l'intestin et éliminée par voie urinaire.

L'absorption intestinale des ions nitrates se fait selon une diffusion libre.

8. Rappeler ce qu'est la diffusion libre et expliquer les principales différences avec un transport actif.

9. Schématiser un entérocyte et montrer le chemin des nitrates jusqu'au milieu intérieur puis au foie. De nombreuses enzymes digestives sont libérées dans le tube digestif

10. En donnant un exemple d'enzyme et sa cible, expliquer pourquoi ces enzymes n'ont pas d'action sur les nitrates,

Les nitrates sont éliminés par le rein car ils passent sans aucune difficultés la barrière d'ultrafiltration et ne sont que très faiblement réabsorbés (environ 10%) au niveau du tube contourné distal.

11. Par un schéma légende, montrer le parcours des nitrates au niveau du néphron.

Il a été estimé chez le rat (souris) que la dose létale 50 était de 900mg/Kg de poids corporel/jour.

12. Définir la dose létale 50.

13. Montrer sur un graphe comment elle peut être déterminée.

Document 1 : Biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques

Pour assurer la réplication de l'ADN, condition nécessaire à la multiplication cellulaire, la cellule doit fabriquer ou retrouver dans son milieu de culture les ribonucléotides et désoxyribonucléotides qui sont le dATP, le dGTP, le dCTP et le dTTP.

En absence dans le milieu de culture, les cellules produisent les désoxyribonucléotides selon 2 voies, l'une est la biosynthèse de novo et l'autre est une biosynthèse à partir d'un précurseur qu'est l'hypoxanthine.

1. Biosynthèse de novo

L'ensemble des réactions ne sont pas détaillées.

1.1. Le noyau purine peut être assemblé de novo sur le ribose phosphate ce qui conduit à l'IMP (inosinate) L'IMP est ensuite converti en AMP et en GMP qui sont finalement source d'ATP de dATP, de GTP et de dGTP incorporés dans l'ARN et l'ADN.

Parmi ces nombreuses réactions enzymatiques aboutissant à la synthèse des désoxyribonucléotides à base purique, la première nécessite l'action de la dihydrofolate réductase. L'aminoptérine analogue structural du dihydrofolate se comporte en inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase ce qui inhibe la voie de biosynthèse de l'IMP

1.2. Le noyau pyrimidique peut être assemblé de novo sous la forme d'orotate (base pyrimidique). L'orotate est transféré sur un 5-phosphoribosyl-1-phosphate puis décarboxylé ce qui conduit à l'UMP. L'UMP est finalement à l'origine de l'UTP, du CTP, du dCTP et du dTTP.

2 Biosynthèse à partir de précurseurs

2.1. Biosynthèse de bases purique à partir d'hypoxanthine

L'hypoxanthine guanine phosphoryl transférase [HGPRT] catalyse la réaction:

Hypoxanthine + 5-phosphoribose 1-pyrophosphate \rightarrow IMP + PPi

L'IMP donne naissance à l'AMP et au GMP selon les réactions évoquées précédemment. L'aminoptérine n'agit donc pas sur cette voie de biosynthèse.

2. 2. Biosynthèse de bases pyrimidiques à partir de désoxythymidine. La désoxythymidine est une source de dTTP et de dCTP pour la réplication de l'ADN.

Document 2 : dosage d'anticorps monoclonal par test ELIS A

Un support de plaque de microtitration est fourni avec des barrettes à fond plat.

Les barrettes ont été préalablement traitées comme suit :

- dépôt de 100 μ L d'antigène à 100 μ g/mL, incubation de 90 minutes à 37 °C des barrettes recouvertes d'un film auto-adhésif puis rinçage des puits avec du tampon PBS (200 μ L).
- dépôt de 300 μ L de SAB à 3% en tampon PBS, incubation 90 minutes à 37 °C des barrettes recouvertes d'un film auto-adhésif puis rinçage des puits avec du tampon PBS (300 μ L).
- distribuer ensuite dans chacun des puits, 50 μ L de surnageant des puits testés
- recouvrir d'un film auto-adhésif et incubé à 37 °C pendant 1 heure
- effectuer ensuite 2 lavages par du tampon PBS-Tween (200 μ L) et 1 rinçage par du tampon PBS (200 μ L).
- distribuer ensuite dans tous les puits 100 μ L de solution d'anticorps anti-isotypie souris marqué à la peroxydase et laisser incubé 1 heure à 37°C
- ajouter le substrat ABTS-H₂O₂ 0,015%. Recouvrir d'un film auto-adhésif et incubé 30 minutes à l'étuve à 37 °C
- lire après incubation les absorbances de chaque puits à 405 nm.