

Purification des anticorps

La purification des anticorps implique l'isolement de l'anticorps à partir du sérum (anticorps polyclonal), du liquide d'ascite ou du surnageant de culture d'une lignée cellulaire d'hybridome (anticorps monoclonal). Les méthodes de purification vont de très grossières à très spécifiques. Le niveau de purification nécessaire pour obtenir un anticorps utilisable dépend de la ou des applications envisagées pour l'anticorps. Les anticorps peuvent être purifiés par classe (par exemple, IgG) sans tenir compte de la spécificité d'antigène, ou purifiés par affinité pour un antigène qui est spécifique d'un anticorps.

Dépendant de l'usage prévu, on emploiera des préparations plus ou moins purifiées d'anticorps. Certaines applications n'exigent qu'un antisérum, d'autres nécessiteront des anticorps purs, mais la plupart auront des exigences entre ces deux extrêmes.

La technique de purification la plus souvent employée est la chromatographie d'affinité. Mais, avant, on peut procéder à une séparation brute des Ig des autres protéines sériques (albumine, transferrine, etc.) par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Une chromatographie d'échange ionique est aussi possible, quoique moins employée.

La chromatographie d'affinité : est une technique de chromatographie qui permet de séparer un composé en utilisant des interactions biologiques entre un ligand spécifique (greffé sur une matrice macromoléculaire) et son substrat, en l'occurrence la molécule à isoler. Elle est spécialement utilisée pour la purification des anticorps monoclonaux.

Principe de la chromatographie d'affinité avec protéine comme ligand : comme toutes les chromatographies, la chromatographie d'affinité permet de séparer les composants d'un mélange, donc de purifier les substances. Pour cela, elle utilise les propriétés d'interactions biologiques, donc elle peut purifier un composant en une seule étape.

Une matrice insoluble à laquelle est attaché un ligand spécifique de la molécule à purifier et se liant de manière réversible avec celle-ci est utilisée.

Molécule à purifier + ligand spécifique-matrice insoluble \leftrightarrow Molécule-ligand-matrice insoluble

La molécule d'intérêt se fixe donc à la matrice et les autres composants sont élués. Puis on détache celle-ci de la matrice, ainsi la molécule est purifiée. Pour pouvoir séparer des composants par cette méthode, il faut donc connaître la structure et la spécificité de la molécule d'intérêt afin de choisir un bon ligand, c'est-à-dire que le ligand ne doit pas accrocher d'autres composés que la molécule.

De plus en plus, on procède par chromatographie d'affinité avec la protéine A ou la protéine G comme ligand pour la région constante des anticorps (Fc). Ce sont des protéines de source bactérienne ayant la capacité de se fixer sur la région Fc des anticorps. Une protéine récemment découverte, la protéine L, se liant aux chaînes k de certaines classes d'anticorps, devient de plus en plus populaire.

Ensuite, pour purifier l'anticorps spécifique, on peut procéder à une chromatographie d'affinité avec l'antigène comme ligand. Seul l'anticorps contre cette protéine devrait s'attacher sur la colonne, toutes les autres protéines du sérum étant lavées dans l'éluat. On peut aussi utiliser des "peptides artificiels" ressemblant à certains épitopes particulièrement antigéniques de l'antigène (ligands peptidomimétiques). Il ne reste qu'à désorber l'anticorps qui est à ce moment pratiquement pur.

Les colonnes de chromatographie classiques sont aussi en voie d'être remplacées par des billes magnétisées de résine sur lesquelles est lié le ligand choisi. Le gros avantage de cette approche est la rapidité de séparation. Plutôt que de laisser percoler divers tampons à travers une colonne, on peut facilement récupérer les billes magnétisées (et ce qui est lié dessus) avec un aimant....