

Chapitre 5 : anticorps monoclonaux et recombinants

1. Définition des immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines porteuses de l'activité d'anticorps (Ac, en anglais Ab), c'est-à-dire capables de se lier, via le paratope, spécifiquement à un déterminant antigénique unique, ou épitope. Ce sont les effecteurs solubles de l'immunité humorale spécifique d'antigène

2. Structure des immunoglobulines

-deux Chaînes lourdes et légères

Les Ac sont des glycoprotéines de la superfamille des Ig formées de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (CH) (H pour heavy) et 2 chaînes légères (CL) (L pour light) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule

-Région charnière

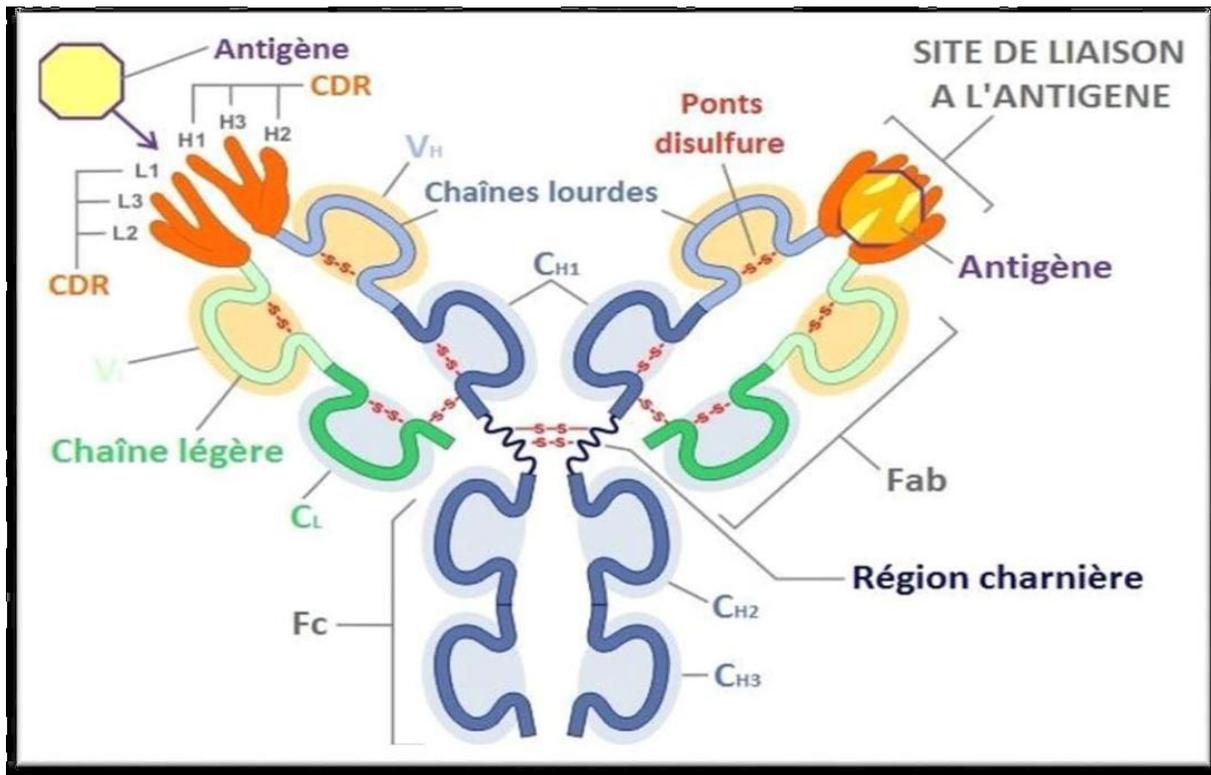
C'est la région au niveau de laquelle les bras de la structure d'anticorps sont en forme de Y. Cette région est appelée « charnière » car c'est à ce niveau que la molécule présente un certain degré de flexibilité).

Les domaines constants

Les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un Ac à l'autre, caractéristique de l'espèce et de l'isotype. Chaque chaîne légère en possède un exemplaire noté CL. Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois ou quatre domaines constants CH1, CH2, CH3 et CH4 (Figure 1). Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'Ag, mais interviennent dans l'activation du système du complément

Les Domaines variables

Un Ac possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux «bras» de l'Ig. L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (VH) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (VL) constitue le site de reconnaissance (ou paratope) de l'Ag. Ainsi, une molécule d'Ig possède deux sites de liaison à l'Ag, un au bout de chaque bras. Ces deux sites sont identiques, d'où la possibilité de lier deux molécules d'Ag par Ac.



Fragment Fab

Ces fragments ont été appelés Fab car ils contiennent les sites de liaison à l'antigène de l'anticorps. Chaque fragment Fab est monovalent. Le site de liaison de l'anticorps est créé par la mise en commun des domaines VH et VL. Des combinaisons de différents domaines VH et VL conduit à des anticorps qui peuvent se lier à des déterminants antigéniques différents

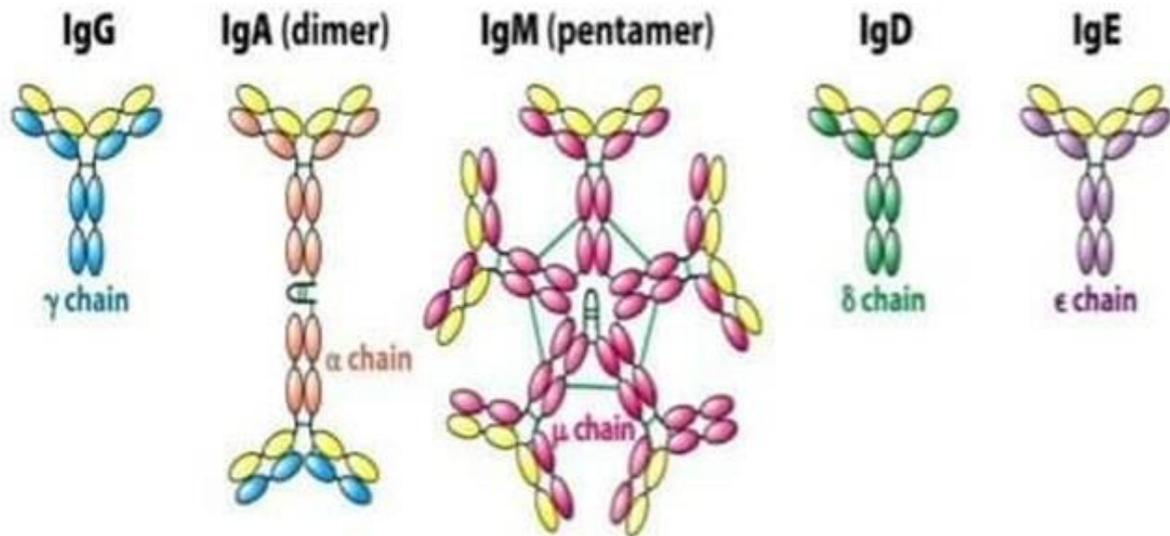
Fragment Fc

Les fonctions effectrices des immunoglobulines sont essentiellement portées par cette partie de la molécule. Des fonctions différentes sont portées par différents domaines du fragment Fc. Normalement, le fait qu'un anticorps puisse exercer une fonction dépend de sa fixation préalable à l'antigène

3. Classes et sous-classes des immunoglobulines

L'isotype de l'anticorps est déterminé par les régions constantes des chaînes lourdes. L'homme, comme tous les mammifères, possède 5 isotypes d'anticorps : IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Le domaine constant de la chaîne lourde est appelé respectivement $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma$, $C\epsilon$ et $C\alpha$. Il existe 4 sous-classes d'IgG notées IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 ainsi que 2 sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2), qui sont définis par les domaines constants des chaînes lourdes $C\gamma1$, $C\gamma2$, $C\gamma3$, $C\gamma4$, $C\alpha1$ et $C\alpha2$, respectivement. Les autres isotypes (IgM, IgD et IgE) ne possèdent pas de sous-classe.

Chaque chaîne lourde est associée à une chaîne légère kappa ou lambda. Les IgG, IgD et IgE sont des formes dites monomériques, les IgA et les IgM existent quant à elles soit sous forme monomérique soit sous forme multimérique (Figure 3). On trouve des formes circulantes, les IgG, A, M et E, mais aussi des formes membranaires, les IgM et D



4- définition des Anticorps monoclonaux

Les Anticorps monoclonaux (AcM) sont reconnus comme une population identique d'anticorps provenant d'un « seul et unique » clone de cellules B. Ils ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné et ils présentent toujours les mêmes caractéristiques et plus particulièrement la même spécificité. Tandis que les anticorps recombinants sont des anticorps produits à partir de gènes recombinants, généralement insérés dans des cellules hôtes comme les cellules de mammifères ou de bactéries.

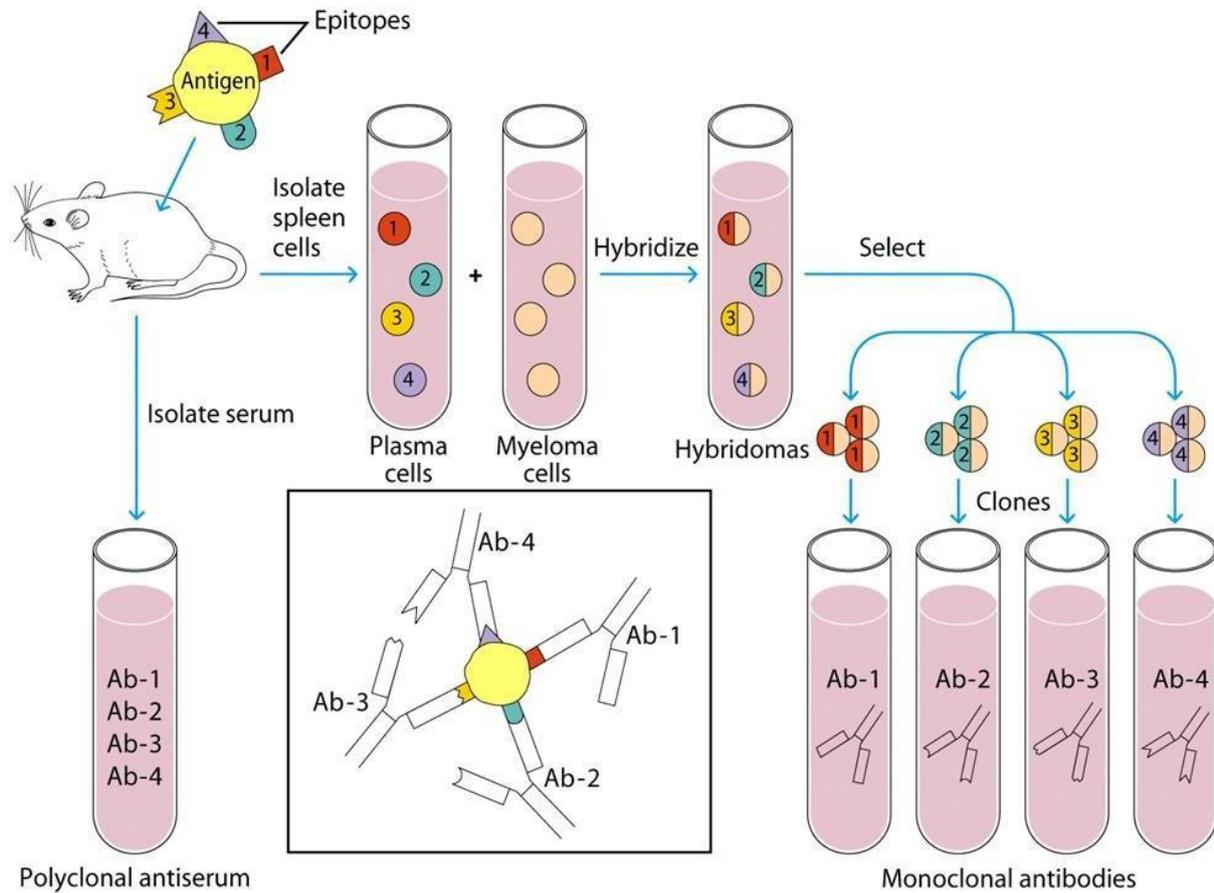
5- définition Les anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux sont un mélange hétérogène d'anticorps produits par des cellules différentes. La sensibilité et la spécificité de ces anticorps sont ainsi très différentes les uns des autres. Ils sont donc hétérogènes et possèdent une spécificité étendue. Ils présentent beaucoup de réactions croisées indésirables.

6- Différences entre les Anticorps monoclonaux et Anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux (AcP) sont capables de reconnaître plusieurs épitopes différents d'un même antigène. Ils offrent une faible spécificité par rapport aux anticorps monoclonaux, car ils sont composés par un mélange complexe d'immunoglobulines ciblant tous les épitopes de l'antigène, tandis que les anticorps monoclonaux ciblent un unique épitope. Ils possèdent une

large gamme de sélectivités et affinités ce qui peut donner lieu à des réactivités croisées ou à des interférences dans un essai immunologique. Ceci dit qu'ils sont moins stables que les AcM.



7-Les différentes générations d'anticorps monoclonaux et leurs productions

7-1-Production des Anticorps monoclonaux Par la Technique d'hybridome (Les anticorps murins)

Les AcM ont été découverts par Kehler et Milstein en 1975 suite à la mise en œuvre de la technique d'hybridation cellulaire. Cette technologie est développée, essentiellement à partir de cellules de souris, d'une part, d'autre part en raison de l'existence de lignées de myélomes murins. Le principe général de la production d'hybridome repose sur la fusion de lymphocytes B, sécrétant des anticorps mais ne se multipliant pas *in vitro*, avec des cellules de myélome lymphoïde, ayant la capacité de se multiplier rapidement et indéfiniment *in vitro* dans un milieu de culture adéquat (Fig 2).

La technique d'hybridome se déroule en cinq étapes :

- Immunisation de l'animal et obtention de lymphocytes B.

- La fusion des plasmocytes avec des cellules de myélome lymphoïde.
- La sélection des cellules hybrides.
- Le screening et Le clonage des hybridomes d'intérêt.
- La production en masse d'AcM .

a) Immunisation et choix de l'animal :

L'immunisation se fait principalement sur la souris car son génome est environ à 95% d'homologie avec celui de l'homme, elle permet d'obtenir à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre nécessaires pour l'étape de la fusion. De plus c'est un animal de durée de vie courte et se reproduit facilement. La souche la plus utilisée est la BALB/C qui est une lignée consanguine albinos, immunodéficiente permettant ainsi une bonne réponse de son système immunitaire à une stimulation antigénique

Le principe de la production repose sur l'injection d'un antigène d'intérêt chez un rongeur qui va développer une réaction immunitaire contre cet antigène. Il y aura production de lymphocytes B sécrétant des immunoglobulines spécifiques dirigées contre l'antigène injecté. Ces lymphocytes B sont récupérés dans la rate après splénectomie de l'animal

b) La fusion des deux types cellulaires

Toutes les étapes suivantes doivent être réalisées dans des conditions stériles pour prévenir toute contamination bactérienne et fongique.

Le but de cette étape est de fusionner une cellule de souris productrice d'un anticorps monoclonal avec une lignée de cellules humaines « immortelles » ayant la particularité de se diviser indéfiniment

Les cellules lymphoïdes de la rate ou des ganglions lymphatiques de l'animal sont isolées. Elles sont ensuite fusionnées, en présence de polyéthylène glycol, avec des cellules myélomateuses préalablement cultivées et sélectionnées in vitro pour leur déficience en hypoxanthine-guanine Phosphoribo -syltransférase (HGPRT-) ou, plus rarement, en thymidine kinase (TK).

c) La sélection des cellules hybrides (Formation des hybridomes)

Les cellules ainsi formées, appelées hybridomes, exprimeront les caractères des deux lignées cellulaires parentales. Cependant, les cellules ne fusionnent pas toutes et le procédé conduit à un mélange complexe comprenant des cellules de myélome et des plasmocytes non fusionnés ainsi que des cellules fusionnées. Parmi les cellules fusionnées, trois combinaisons coexistent

: la fusion de deux plasmocytes, de deux cellules de myélome et la fusion désirée plasmocyte-myélome

Le mélange de toutes ces cellules (hybrides et cellules parentales) est placé sur un milieu de culture sélectif appelé milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine). Le principe de cette sélection est basée sur la mutation (HGPRT-) d'une part, et sur le pouvoir de l'aminoptérine a bloqué la synthèse endogène des bases puriques et pyrimidiques d'autre part.

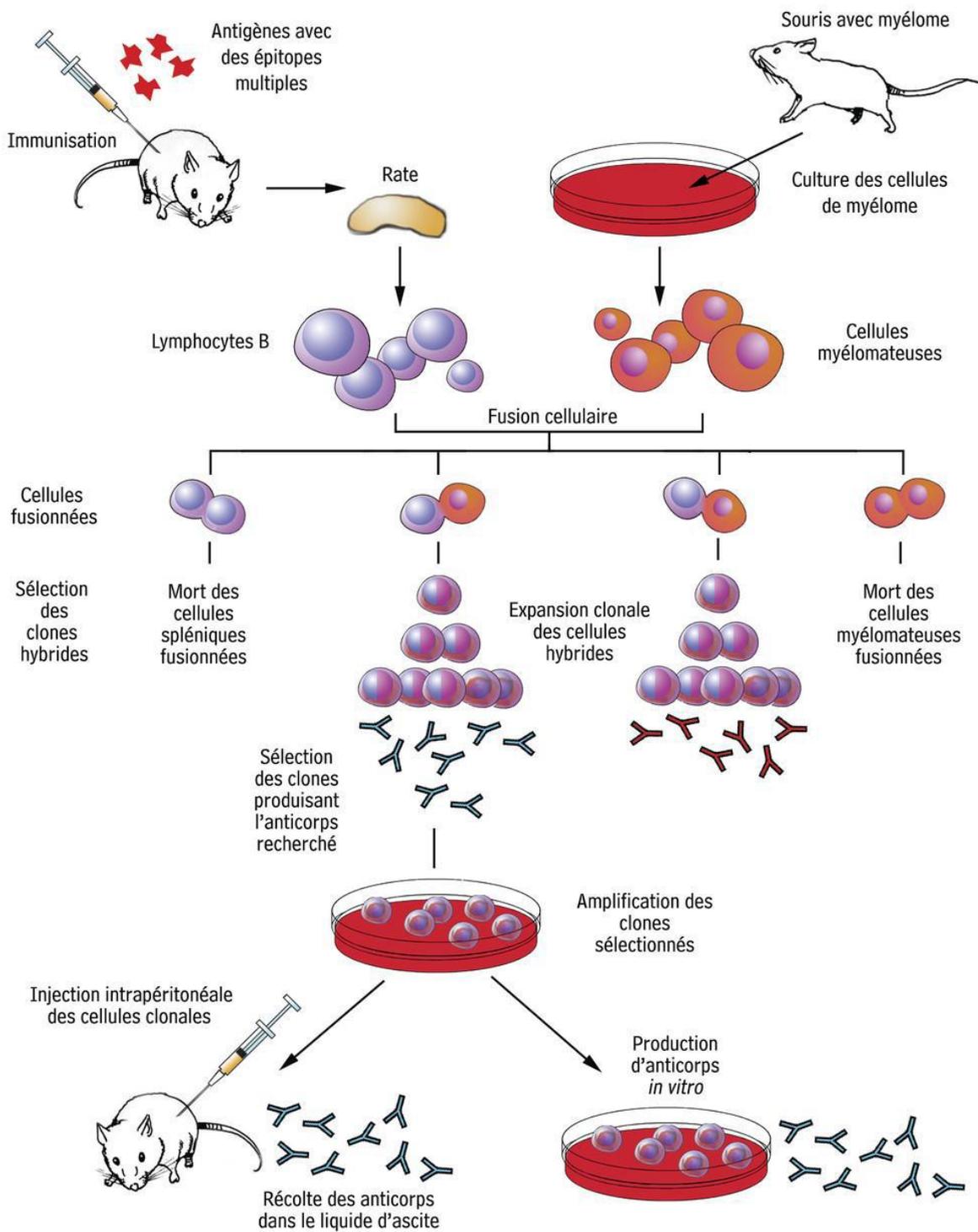
En effet, en absence de l'enzyme les cellules de myélome ne peuvent utiliser l'hypoxanthine exogène pour synthétiser les purines, donc elles meurent, alors que les hybridomes, non déficitaires en cette enzyme qui est apportée par les lymphocytes B sensibilisés, peuvent utiliser l'hypoxanthine et la thymidine dans la voie exogène afin de synthétiser l'ADN et l'ARN nécessaires la multiplication. Les lymphocytes B non fusionnées ayant une durée de vie plutôt courte, meurent rapidement

d) Screening et clonage des cellules productrices d'anticorps

Parmi les cellules fusionnées, seules quelques-unes secrètent des anticorps, ces hybridomes doivent être isolés et multipliés par clonage. Après avoir testé chaque clone pour déterminer les anticorps produits, les cultures positives seront choisies et sélectionnées par clonage supplémentaire. Le résultat aboutit à un hybridome qui forme des anticorps monoclonaux

e) Production des anticorps monoclonaux en masse

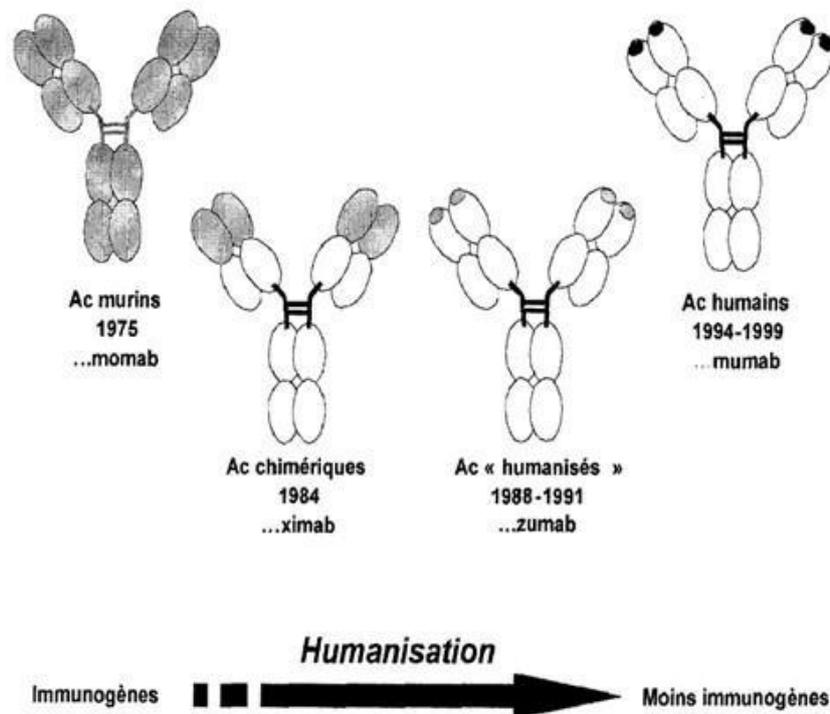
La production de ces anticorps monoclonaux s'effectue finalement in vitro en utilisant un bioréacteur ou in vivo chez une souris. L'Ac peut être ensuite purifié par chromatographie du liquide d'ascite. Pour répondre à la demande croissante d'Ac monoclonaux, des techniques de croissance in vitro des cellules d'hybridomes à de très hautes densités ont été développées.



8- Les anticorps monoclonaux recombinants

Les premiers anticorps monoclonaux produits par des hybridomes murins (première génération) apparaissent comme des outils remarquables pour la recherche, mais décevants pour l'intervention thérapeutique (une courte demie vie et une forte immunogénicité).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux en thérapie humaine nécessite la réduction de l'immunogénicité des anticorps. La technique d'humanisation a donc été développée dans le but d'obtenir des anticorps capables de reconnaître un antigène donné chez l'homme, sans provoquer de réactions immunogènes dues à la présence de structures murines. Mais grâce au progrès de la technologie et du génie génétique, les AcM recombinants ont vu le jour. D'abord en 1984 avec les AcM chimériques, constitués des domaines constants humains associées aux domaines variables murins, puis en 1989 les AcM humanisés où seule la partie reconnaissant l'antigène (c'est à dire le CDR) est murine. Et enfin en 1994 les AcM entièrement humains.



1. Les anticorps recombinants chimériques

Les premières tentatives d'humanisation d'anticorps murin ont d'abord conduit à la construction d'anticorps chimériques, dans lesquels les régions constantes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines murines sont remplacées par des régions constantes humaines.

Les anticorps chimériques : ils sont formés par l'association des domaines variables d'un anticorps monoclonal murin et des domaines constants d'un anticorps humains. Ces anticorps chimériques sont à 70% humains ce qui les rend considérablement moins immunogènes chez l'homme et leur permet d'interagir avec les cellules effectrices et d'induire la cascade du complément via leur région Fc humaine.

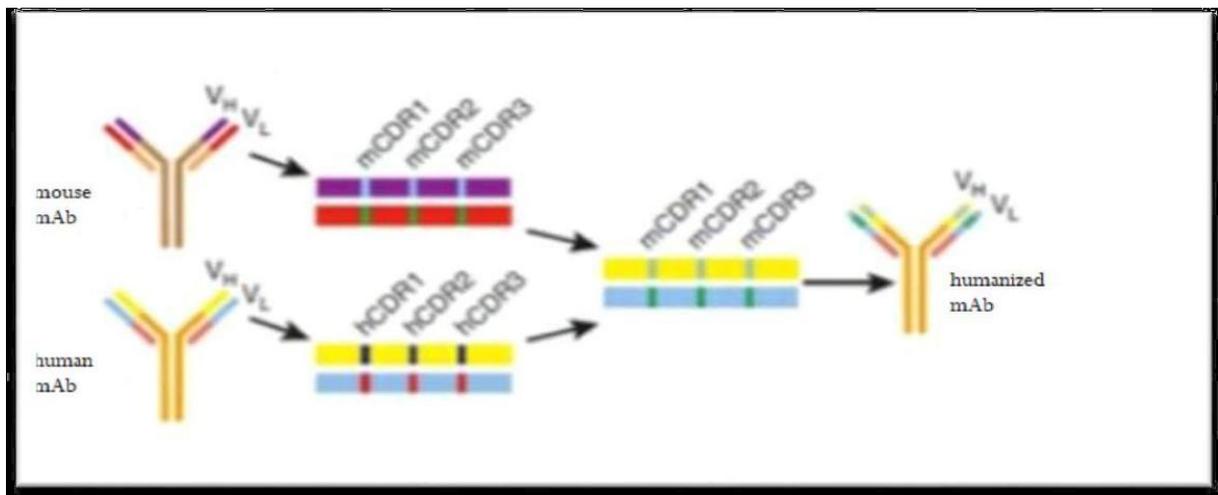
La construction d'anticorps chimériques, qui consiste à isoler l'ADN codant pour le domaine VH et le domaine VL d'un AcM murin et à le lier à l'ADN codant les domaines constants H et L d'une immunoglobuline humaine. Cela permet de produire un anticorps hybride dont la partie constante est humaine.

Dans la plupart des cas, la spécificité et l'affinité des anticorps chimériques restent identiques à celles des anticorps murins parentaux. De légères modifications de la spécificité fine ont cependant été parfois observées, suggérant une influence des régions constantes sur la topologie des domaines variables.

2. Les anticorps recombinants humanisés

Les anticorps humanisés sont technologiquement plus difficiles à obtenir que les anticorps chimériques. Le principe général de l'humanisation, tel que proposé par Greg Winter à la fin des années 1980, consiste à greffer les régions hypervariables (Complementary Determining Regions, CDR) d'un anticorps d'intérêt, souvent murin, sur les régions charpentes (Framework Region, FR) d'un anticorps humain.

Dans les anticorps humanisés, toutes les séquences d'acides aminés provenant de la souris sont remplacées par des séquences humaines, à l'exception des **Complementary Determining Regions (CDR) responsables de la formation de site de fixation à l'antigène**.



3. Les anticorps recombinants entièrement humains

Des sauts technologiques réalisés récemment permettent d'obtenir des anticorps recombinants entièrement humains (Avril, 2013). Aujourd'hui, une grande partie des anticorps entrant en phase clinique sont complètement humains et 9 anticorps thérapeutiques humains sont actuellement sur le marché (7 nouvelles approbations depuis 2009). Ces anticorps sont en

théorie « transparents » pour le système immunitaire des patients et évitent les réactions d'hypersensibilité observées avec les anticorps contenant encore des fragments murins. Plusieurs méthodologies ont été mises au point pour générer de tels anticorps, totalement humains.

9- Propriétés pharmacocinétiques des anticorps monoclonaux

Les AcM sont des protéines de haut poids moléculaire (150Kda), caractérisées par leur hydrophilie, leur pharmacocinétique (la relation entre la dose et la concentration) est différente de celle des médicaments classiques qui sont généralement des molécules issues d'une synthèse chimique et dotés d'une masse moléculaire faible. Leur devenir est décrit par des phases d'absorption (pour les administrations par voie EV), de distribution et d'élimination.

9.1-Absorption :

Elle dépend du mode d'administration (sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire). Or, la majorité des anticorps monoclonaux est administrée par voie IV, ce qui permet une exposition rapide et complète avec un passage dans le système lymphatique ou sanguin et une absorption variable, bien que cette dernière reste lente et difficile à quantifier précisément.

9.2-Distribution :

Elle correspond principalement au ciblage tissulaire de la molécule dans l'organisme, plusieurs études ont montré que la distribution dépend directement de la physiologie et de la vascularisation tissulaire. Dans le traitement du cancer, le ciblage thérapeutique est particulièrement important parce que les anticorps monoclonaux diffusent mal et de manière hétérogène dans les tumeurs. La méthode de référence pour étudier la distribution tissulaire est l'étude de la réactivité tissulaire croisée dans laquelle la fixation de l'AcM sur différents tissus humains et animaux est analysée.

9.3- Elimination :

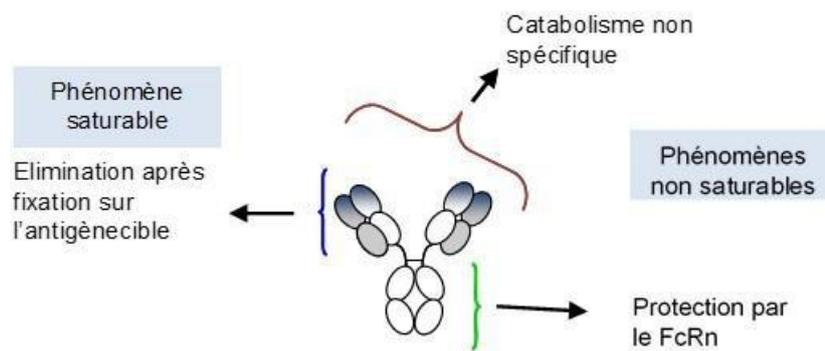
Peu de données concernent l'élimination des AcM (une demi-vie d'élimination terminale longue de 8 - 28 jours), mais comme ils sont analogues aux IgG endogènes (La majorité des AcM sont des immunoglobulines de type G) ils semblent être catabolisés essentiellement par trois mécanismes (Fig 6).

9.3.1-La pinocytose : lorsqu'ils passent dans le liquide interstitiel, les AcM sont, comme toutes les protéines, captés par les cellules endothéliales vasculaires par pinocytose (ou cell drinking) : les AcM migrent alors dans les endosomes puis sont dégradés dans les lysosomes et relargués

de la cellule. C'est une voie de catabolisme non spécifique et non saturable, qui concerne toutes les protéines circulantes.

9.3.2-Elimination après fixation sur leur cible : les AcM sont éliminés soit par internalisation lorsque le récepteur est cellulaire (le complexe immun est dégradé) soit par formation d'un complexe immun si la cible est circulante (élimination par le système immunitaire de la cible et de l'anticorps). C'est une voie spécifique et saturable puisqu'elle dépend du type d'antigène et de son nombre.

9.3.3- élimination dépendante du récepteur FcRn : par définition le FcRn (neonatal Fc receptor) est un récepteur saturable, situé dans les cellules endothéliales, intestinales et rénales, il assure le passage trans-cellulaire des IgG et leur recyclage. En effet, le FcRn fixe les AcM via leur portion Fc et les détourne de la voie de dégradation habituelle pour les rediriger vers la surface cellulaire. Ce phénomène explique ainsi la longue demivie des AcM, certains AcM étant protégés par cette « portion » FcRn et relargués dans la circulation sanguine.



10- Applications et modes d'action des anticorps monoclonaux

Les AcM ont été appliqués pour longtemps en immunologie fondamentale pour les études des lignées cellulaires, des marqueurs des cellules non lymphocytaires, des cellules pathologiques, et le protéomique. Actuellement, ils sont utilisés en thérapie dans plusieurs domaines : l'hémo-oncologie, le déficit immunitaire, les maladies auto-immunes, la cancérologie, l'infectiologie, le rejet de greffes et l'enzymothérapie.

Selon la cible et la maladie à traiter, Les anticorps thérapeutiques peuvent agir par différentes voies d'action. On distingue trois modes principaux : le blocage, la signalisation et le ciblage.

-Blocage : c'est une voie d'action directe, au cours de laquelle les ACM peuvent mimer ou bloquer le ligand naturel d'un récepteur comme celui des facteurs de croissance, de cytokines

ou d'autres médiateurs solubles. Ex : le Trastuzumab, qui se fixe sur le récepteur HER-2 empêchant la fixation du facteur de croissance EGF et donc la prolifération cellulaire.

-La signalisation : c'est une voie indirecte recrutant d'autres effecteurs et faisant appel à la plurivalence antigénique de l'AcM. En effet, l'anticorps permet le regroupement au niveau membranaire de la cible les marqueurs antigéniques reconnus et de déclencher par la suite des cascades de phosphorylations intracellulaires induisant une apoptose de la cellule cible.

-Le ciblage : c'est une voie directe, activée principalement en cas d'invasion microbienne. L'AcM reconnaît l'agent pathogène et induit son élimination par trois mécanismes : la CDC (complement dependent cytotoxicity), l'ADCC (Anti body Dependent Cellular Cytotoxicity) et la phagocytose.