

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE  
ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Immunologie Appliquée

---

### Thème : Les Anticorps monoclonaux

---

Présenté par :

- ✓ Brinis Chourouk
- ✓ Bouguettouche Dounia
- ✓ Boudour Meriem

Devant le jury composé de :

|              |                 |                      |
|--------------|-----------------|----------------------|
| Présidente : | Pr. BENJEDDOU D | Université de Guelma |
| Examineur :  | Dr. HEMICI A    | Université de Guelma |
| Encadreur :  | Dr. MAIRIF S    | Université de Guelma |

Juillet 2021

## *Remerciements*



Tout d'abord, nous tenons à remercier DIEU le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail.

Un grand merci à madame **Bendjadou D.**, vous nous avez fait l'honneur d'accepter d'être la présidente du jury.

Un grand merci également à monsieur **Hemici A.** d'avoir accepté d'être examinateur de notre mémoire. Nous sommes vraiment heureuses que vous soyez présentes le jour de notre soutenance.

Nous tenons à remercier madame **Mairif S.** qui nous a encadrés dans la réalisation de notre travail. Votre soutien et votre aide, en tant qu'encadrant de notre mémoire, nous ont été indispensables.

Notre reconnaissance s'adresse aussi à nos familles et nos amis pour leur encouragement et support inconditionné.



## DÉDICACES

Louange à **Dieu** tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

Je dédie cette thèse :

### **A mon très cher Papa : Mohamed**

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es.

Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension...

Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours.

Aucun dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation.

Je t'aime papa et j'implore le tout puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

### **A ma très chère Mama**

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Tu as tant souhaité que je parvienne à ce but je te serai reconnaissante toute ma vie, qu'Allah t'accorde une longue vie.

### **A ma chère sœur Chahinez (Noussa) et mon cher frère Chakib**

Qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

### **A mon cher grand père Ahmed et ma chère grand-mère Messaouda,**

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que dieu vous préserve santé et longue vie.

### **A mes chères tantes,**

Habiba, Farida, Mimi, Samira et Latifa Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

A mes meilleures amies : **Safa et Noussa**

A mes chère trinômes : **Meriem et Dounia**

**CHOUROUK**



*Je dédie ce travail :*

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie  
ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'études,  
pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et  
sécurité. À mon père pour ses encouragements incessants et son  
soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs  
gages de réussite.*

*Que Dieu les protège et que ce travail soit la preuve modeste d'une  
reconnaissance infinie et d'un profond amour pour eux.*

*À mes sœurs : Amira, Wissal, Meriem et Anfel.*

*À ma grande mère Akila*

*A mon oncle khaled*

*A mes cousines Rawnak, Hadil et Imane*

*A Mouhamed le père de mon amie*

*A mes chère trinômes : Meriem et Chourouk*

*À ma grande famille, mes collègues et tous ceux et toutes celles que j'ai  
involontairement omis de citer et qui n'en demeurent pas moins chers.*

*Dounia*





### **A ma source de bienveillance Maman**

*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 et ce que je serais demain, ma réussite est la tienne.*

### **À Mon cher papa**

*Permettez-moi de vous exprimer mon grand amour, mon attachement et ma plus haute considération pour votre personne. Je suis très fier 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 sœur Najwa :** source de joie et de bonheur

**À mes chers frères :** Mourad, Nabil, Youssef, Karim et Mohammed pour leur appui et leur encouragement.

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

### **À mes trinômes Dounia et Chourouk**

*Pour leur soutien moral, leur patience et leur compréhension tout au long de ce mémoire et surtout pour notre amitié, merci*

**Meriem**

**Table des matières**

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

**Chapitre 01 : Généralités sur les immunoglobulines**

1. Définition .....3

2. Structure générale des immunoglobulines .....3

2.1. Domaines constants .....3

2.2. Domaines variables .....4

2.3. Fragments .....4

3. Classes et sous classes des immunoglobulines .....5

4. Organisation et réarrangements des gènes codant les immunoglobulines.....8

4.2. Réarrangements des gènes.....9

**CHAPITRE 02 : Les anticorps monoclonaux et leur productions**

1. Anticorps polyclonaux ..... 11

2. Les anticorps monoclonaux ..... 11

2.1. Historique ..... 11

2.2. Définition..... 13

2.3. Catégories d'anticorps monoclonaux et leurs nomenclatures ..... 13

2.3.1. Anticorps Murins (o-mab) ..... 13

2.3.2. Anticorps chimériques (xi-mab)..... 14

2.3.3. Anticorps humanisés (zu-mab)..... 14

2.3.4. Anticorps humains (u-mab) ..... 15

2. 4. Technique permettant de la production des anticorps monoclonaux ..... 17

2.4.1. Obtention des Anticorps murins..... 17

|  |    |
|--|----|
| 2.4.2. Obtention des anticorps recombinants chimériques et humanisés .....       | 19 |
| 2.4.3. Obtention des Anticorps entièrement humain .....                          | 21 |
| □ Technique de Phage display .....   | 21 |
| □ Utilisation de lymphocytes B humains .....                                     | 23 |
| □ Principe .....   | 23 |
| □ Technique de souris transgénique .....   | 25 |
| 2.5. Les anticorps monoclonaux thérapeutique .....                               | 27 |
| 2.5.1. Cibles et mécanismes d'action d'anticorps monoclonaux thérapeutiques..... | 28 |
| 2.5.1.1. Les anticorps neutralisant un antigène soluble .....                    | 28 |
| 2.5.1.2. Les anticorps liant un antigène membranaire .....                       | 28 |
| 2.6. Optimisation des anticorps thérapeutiques .....                             | 29 |
| 2.6.1. Optimisation des propriétés de liaison à l'antigène.....                  | 29 |
| 2.6.2. Optimisation des fonctions effectrices .....                              | 31 |
| 2.6.3. Optimisation des propriétés pharmacocinétiques et de biodistribution..... | 32 |
| 2.6.4. Optimisation de l'immunogénicité.....                                     | 32 |
| 2.6.5. Optimisation des propriétés biophysiques .....                            | 34 |

### **CHAPITRE 03 : L'utilisations Des Anticorps Monoclonaux**

|   |    |
|---|----|
| 1. Anticorps utilisés en diagnostic .....                           | 37 |
| 2. Anticorps utilisés en thérapie .....                             | 38 |
| 2.1. Les anticorps thérapeutiques utilisés en transplantation ..... | 38 |
| 2.2. Anticorps thérapeutiques utilisés en oncologie .....           | 39 |
| 2.2.1. Anticorps ciblant les tumeurs solides.....                   | 40 |
| □ Trastuzumab : (Herceptin®).....                                   | 41 |
| □ Mécanisme d'action de trastuzumb .....                            | 41 |
| □ Panitumumab (Vectibix ®) .....                                    | 41 |
| □ Mécanisme d'action de panitumumab .....                           | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.Anticorps thérapeutiques utilisés en Rhumatologie .....  | 42 |
| 2.4.Les anticorps thérapeutiques utilisés dans les maladies immunes inflammatoires<br>chroniques ..... | 43 |
| □ Anticorps anti-TNF.....  | 43 |
| □ Anticorps dirigés contre d'autres cytokines .....  | 44 |
| 2.5.Les anticorps monoclonaux thérapeutiques utilisés en allergies.....                                | 44 |
| □ Omalizumab (Xolair®).....  | 45 |
| Conclusion .....   | 47 |
| Références Bibliographiques  |    |
| Résumé   |    |
| Abstract   |    |
| ملخص   |    |

## Liste des abréviations

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| <b>AC</b>    | Anticorps                            |
| <b>AcM</b>   | Anticorps monoclonal                 |
| <b>ACP</b>   | Anticorps polyclonal                 |
| <b>ADCC</b>  | Antibody-dependent cell cytotoxicity |
| <b>AG</b>    | Antigène                             |
| <b>AMM</b>   | Anticorps Monoclonaux Membranaire    |
| <b>BLyS</b>  | lymphocyte stimulator B              |
| <b>CDR</b>   | Complementarity Determining Regions  |
| <b>CDRs</b>  | Complementarity-Determining Regions  |
| <b>CEA</b>   | Carcynombryonnaire                   |
| <b>CpG</b>   | Chromatographie en Phase Gazeuse     |
| <b>EBV</b>   | Virus Epstein-Barr                   |
| <b>EGF</b>   | Epidermal growth factor              |
| <b>EGFR</b>  | Epidermal Growth Factor              |
| <b>EGFR2</b> | Epidermal growth factor receptor 2   |
| <b>EpCAM</b> | Epithelial cell adhesion molecule    |
| <b>ERc</b>   | Récepteur aux fragments constants    |
| <b>Fab</b>   | fragment antigen- binding            |
| <b>Fc</b>    | Région Constante                     |
| <b>FDA</b>   | Food and Drug Administration         |
| <b>FR</b>    | Framework Region                     |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>HACA</b>  | Human Anti-Chimeric Antibodies                  |
| <b>HAMA</b>  | Human Anti-Mouse Antibodies                     |
| <b>HAT</b>   | Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine           |
| <b>HGPRT</b> | Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transférase |
| <b>IG</b>    | Immunoglobulines                                |
| <b>IgG</b>   | Immunoglobulines G                              |
| <b>IL</b>    | Interleukine                                    |
| <b>IM</b>    | Intramusculaire                                 |
| <b>IV</b>    | Intraveineuse                                   |
| <b>IyB</b>   | Lymphocytes B                                   |
| <b>LES</b>   | Erythémateux Systémique                         |
| <b>LyT</b>   | Lymphocytes T                                   |
| <b>PR</b>    | polyarthrite rhumatoïde                         |
| <b>PSMA</b>  | Prostate Specific Membrane Antigen              |
| <b>RSV</b>   | Anti-respiratory syncytial virus                |
| <b>RTK</b>   | Récepteurs à Tyrosine Kinase                    |
| <b>RTX</b>   | Rituximab                                       |
| <b>SC</b>    | Sous-Cutanée                                    |
| <b>SCID</b>  | Déficit immunitaire sévère combinée             |
| <b>SEP</b>   | Sclérose en Plaques                             |
| <b>SPA</b>   | Spondylarthrite ankylosante                     |
| <b>TNF</b>   | Tumor Necrosis Factor                           |

|                               |                                    |
|-------------------------------|------------------------------------|
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | Tumor Necrosis Factor $\alpha$     |
| <b>VEGF</b>                   | Vascular Endothelial Growth Factor |
| <b>VH</b>                     | Domaine variable de chaine lourde  |
| <b>VL</b>                     | Domaine variable de chaine légère  |
| <b>YACs</b>                   | Yeast Artificial Chromosomes       |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Structure schématique d'une immunoglobuline G .....   | 5  |
| <b>Figure 2.</b> Les différents isotopes des anticorps .....   | 7  |
| <b>Figure 3.</b> Organisation des gènes des immunoglobulines chez l'Homme .....  | 9  |
| <b>Figure 4.</b> La diversité jonctionnelle est à l'origine de l'immense variabilité des paratope ..                       | 10 |
| <b>Figure 5:</b> Technique des hybridomes. ....  | 19 |
| <b>Figure 6.</b> Les différentes générations d'anticorps thérapeutiques .....  | 21 |
| <b>Figure 7.</b> Technique du phage display .....  | 22 |
| <b>Figure 8.</b> Immortalisation des cellules B mémoires humaines .....  | 25 |
| <b>Figure 9.</b> Technique de souris transgénique .....  | 26 |
| <b>Figure 10.</b> Les différents effets biologiques des anticorps thérapeutiques .....                                     | 29 |
| <b>Figure 11.</b> Modifications permettant d'améliorer l'homogénéité et les propriétés<br>biophysiques des anticorps ..... | 36 |
| <b>Figure 12.</b> Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique en<br>oncologie .....                | 40 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1.</b> Caractéristiques structurales Fonctionnelles principales des différentes classes d'anticorps .....  | 7  |
| <b>Tableau 2.</b> Nomenclature internationale simplifiée des différentes catégories d'anticorps monoclonaux .....   | 16 |
| <b>Tableau 3.</b> Nomenclature internationale détaillée des différents types d'anticorps monoclonaux, tenant également compte de la cible potentielle ..... | 16 |
| <b>Tableau 4.</b> Immunogénicité de quelques anticorps thérapeutiques sur marché .....  | 34 |

# **Introduction**

### Introduction

Durant un siècle, les recherches se sont poursuivies et ont permis de caractériser les substances dotées de cette capacité de neutralisation : les anticorps appelés aussi immunoglobulines (Ig) (Goubet *et al.*, 2018). Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant au groupe des superfamille des immunoglobulines (Ig) sécrétées par Les cellules B pour identifier et neutraliser les organismes étrangers ou les antigènes (Nelson *et al.*, 2010). Le concept des anticorps monoclonaux est né au début du siècle dernier avec les « balles magiques » de Paul Ehrlich dans ses recherches sur la syphilis. (Marion Rouault, 2017).

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).

La biothérapie ne s'est cependant vraiment développée que récemment, après l'ingénierie des Ac et la démonstration de la possibilité de cloner les gènes codant pour les différentes chaînes de ces Ac. Sont ainsi nés successivement les Ac monoclonaux chimériques, humanisés et totalement humains, ouvrant une ère nouvelle à la biothérapie, mais aussi, à la pharmacothérapie (Ac « armés ») et à la thérapeutique en général. Ces progrès n'ont pu se faire que grâce à la combinaison d'une meilleure connaissance des mécanismes immunologiques et d'avancées significatives de la biotechnologie (Moutschen et Scheen, 2009).

En thérapeutique, si les Ac monoclonaux, dits de « première génération », se sont montrés décevants en raison de leur immunogénicité élevée et de leur demi-vie trop courte, les progrès réalisés par la suite, notamment en biologie moléculaire, ont permis de disposer de molécules beaucoup mieux tolérées. Ainsi, d'autres générations d'Ac se sont succédé : les Ac chimériques, puis les Ac humanisés et, enfin, les Ac totalement humains (Scheen, 2009). Les applications de ces nouveaux anticorps sont nombreuses et variées ; citons, par exemple, la diminution ou l'arrêt d'une prolifération tumorale, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la prévention d'une invasion virale, la neutralisation de toxines,.... Etc (Prin-Mathieu *et al.*, 2003).

Notre manuscrit est structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre comportera des généralités sur les immunoglobulines, leurs structures générales et ses classes et sous classes ainsi que leur réarrangement génétique.

Le deuxième chapitre présentera les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux, leurs catégories, leur technique de production et leur optimisation.

Dans le troisième chapitre expliquera les domaines d'utilisations des anticorps monoclonaux en diagnostic, en thérapie, en transplantation, en oncologie, en rhumatologie, dans les maladies immunes inflammatoires chroniques et en allergies.

Enfin, notre mémoire se termine par une conclusion générale suivie par les références bibliographiques.

**Chapitre 01**  
**Généralité sur les**  
**immunoglobulines**

## 1. Définition

Les anticorps appelés également immunoglobulines (Ig) sont des molécules produites par les lymphocytes B (Ly B). Ce sont des macromolécules protéiques ayant pour rôle de reconnaître et de se lier à un antigène qui lui est spécifique. Cette reconnaissance et cette fixation seront le début de la cascade de réaction entraînant la réponse immunitaire (Bardet, 2012).

Les immunoglobulines sont des molécules symétriques composées de deux chaînes lourdes (H) identiques et de deux chaînes légères (L) identiques, reliées deux à deux par des ponts disulfures et formant une structure dite en « Y ». Il existe cinq types de chaînes lourdes (gamma  $\gamma$ , alpha  $\alpha$ , mu  $\mu$ , delta  $\delta$  et epsilon  $\epsilon$ ) qui définissent respectivement les cinq classes d'immunoglobulines G, A, M, D et E, et deux types de chaînes légères (kappa  $\kappa$  et lambda  $\lambda$ ) qui peuvent se combiner avec n'importe quel type de chaînes lourdes (Marion, 2017).

Pour un anticorps donné, il y a un seul type de chaînes légères. Chez l'homme, en terme de proportionnalité, on retrouve deux anticorps porteurs de chaînes kappa pour un anticorps porteur de chaînes lambda

Ces chaînes polypeptidiques sont composées de domaines, formés par deux feuillets  $\beta$  antiparallèles formant une structure tertiaire compacte. Chaque domaine est relié par des ponts disulfures et stabilisé par les interactions hydrophobes résultant des acides aminés composant les feuillets. Les chaînes lourdes (55kDa) possèdent un domaine constant composé de trois - voire quatre- régions (CH1 à 3, voire 4) et un domaine variable (VH), et les chaînes légères (25kDa) possèdent un domaine constant (CL) ainsi qu'un domaine variable (VL) (Marion, 2017).

## 2. Structure générale des immunoglobulines

Les anticorps peuvent être divisés en trois classes, ou fractions, en fonction de leur masse atomique : la fraction 7S ayant une masse atomique d'environ 150kDa, la fraction 11S ayant une masse atomique d'environ 300 kDa et la classe 19S ayant une masse atomique d'environ 900 kDa (Dennis, 2012).

### 2.1. Domaines constants

Les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps 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. Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'Ag, mais interviennent dans l'activation du système du complément. Les cellules immunitaires possédant les récepteurs aux fragments constants (Rfc) sont capables de lier les Ac. En se fixant par l'extrémité de leur fragment constant sur des cellules effectrices du système immunitaire, les Ac permettent la lyse de la cellule ou de la particule virale qui présente à sa surface l'Ag reconnu (Moutschen et Scheen, 2009).

## 2.2. 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. Les fragments Fab reconnaissent une protéine et se fixent à elle, créant un complexe immun (Moutschen et Scheen, 2009).

## 2.3. Fragments

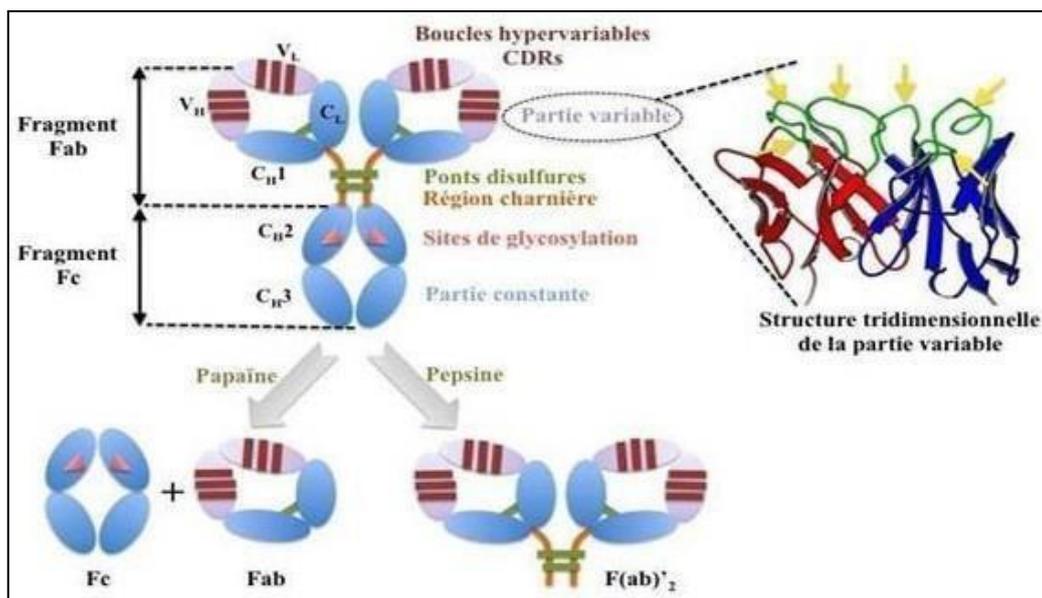
Le clivage enzymatique spécifique d'une Ig permet d'isoler différents fragments : - le fragment Fc (crystallisable) : il est le support des propriétés biologiques de l'Ig, en particulier sa capacité à être reconnu par des effecteurs de l'immunité et à activer le complément ou à faciliter la phagocytose par les macrophages (opsonisation), mais il ne reconnaît pas l'Ag ; il est constitué des fragments constants des chaînes lourdes (CH2) au-delà de la région charnière («hinge») (figure 1) (Moutschen et Scheen, 2009).

- Le fragment Fv : c'est le plus petit fragment gardant les propriétés de l'AC qui possède des domaines Ig

; il fixe donc l'Ag avec la même affinité que l'AC complet et est monovalent ; il est constitué uniquement des régions variables VL et VH (Moutschen et Scheen, 2009).

- Le fragment Fab : il a la même affinité pour l'Ag que l'AC complet et est monovalent; il est formé de la chaîne légère en entier (VL+CL) et d'une partie de la chaîne lourde (VH+CH1). - Le fragment F (ab')<sub>2</sub> : il a la même affinité que l'AC entier pour l'Ag et est divalent ; il correspond à l'association de deux fragments Fab reliés par un petit fragment des parties constantes des chaînes lourdes, la région charnière (hinge) (Moutschen et Scheen,

2009).



**Figure1.** Structure schématique d'une immunoglobuline G [1].

### 3. Classes et sous classes des immunoglobulines

Chez l'homme, les anticorps se répartissent en cinq classes qui diffèrent par leurs propriétés physicochimiques, leurs structures, leurs concentrations sériques et leur comportement en tant qu'antigène. C'est d'ailleurs cette dernière caractéristique qui est utilisée pour classer les anticorps : on parle de déterminants antigéniques (Van Loghem et Litwin, 1972). Il en existe trois types : les déterminants isotypiques, allotypiques et idiotypiques.

Les déterminants antigéniques des chaînes lourdes sont appelés déterminants isotypiques et permettent de définir les cinq grandes classes d'anticorps : IgG, IgA, IgD, IgM et IgE, correspondant respectivement à la présence de chaînes lourdes de type gamma, alpha, delta, mu et epsilon (tableau 1) (Bengtén *et al.*, 2000). D'autres déterminants isotypiques de chaînes lourdes caractérisent des sous-classes d'anticorps. C'est le cas pour les IgG, qui présentent quatre sous-classes chez l'homme :  $\gamma$  1, 2, 3 et 4, et pour les IgA, pour lesquelles on trouve deux sous-classes,  $\alpha$  1 et  $\alpha$  2. Il existe également des déterminants isotypiques sur les chaînes légères qui se répartissent ainsi en deux groupes : kappa et lambda. Sur un même anticorps, les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères sont identiques en termes de classe ou de sous-classe et les déterminants isotypiques sont présents chez tous les individus d'une même espèce (Zelaschi *et al.*, 1983).

Les déterminants allotypiques correspondent aux polymorphismes des gènes codant

pour les anticorps d'une même espèce. En effet, au sein d'une population, certains individus vont présenter des allèles différents pour certains gènes codant les immunoglobulines, générant ainsi des variants allotypiques. Il existe des déterminants allotypiques pour les chaînes gamma, alpha et kappa, notés respectivement (Zelaschi *et al.*, 1983).

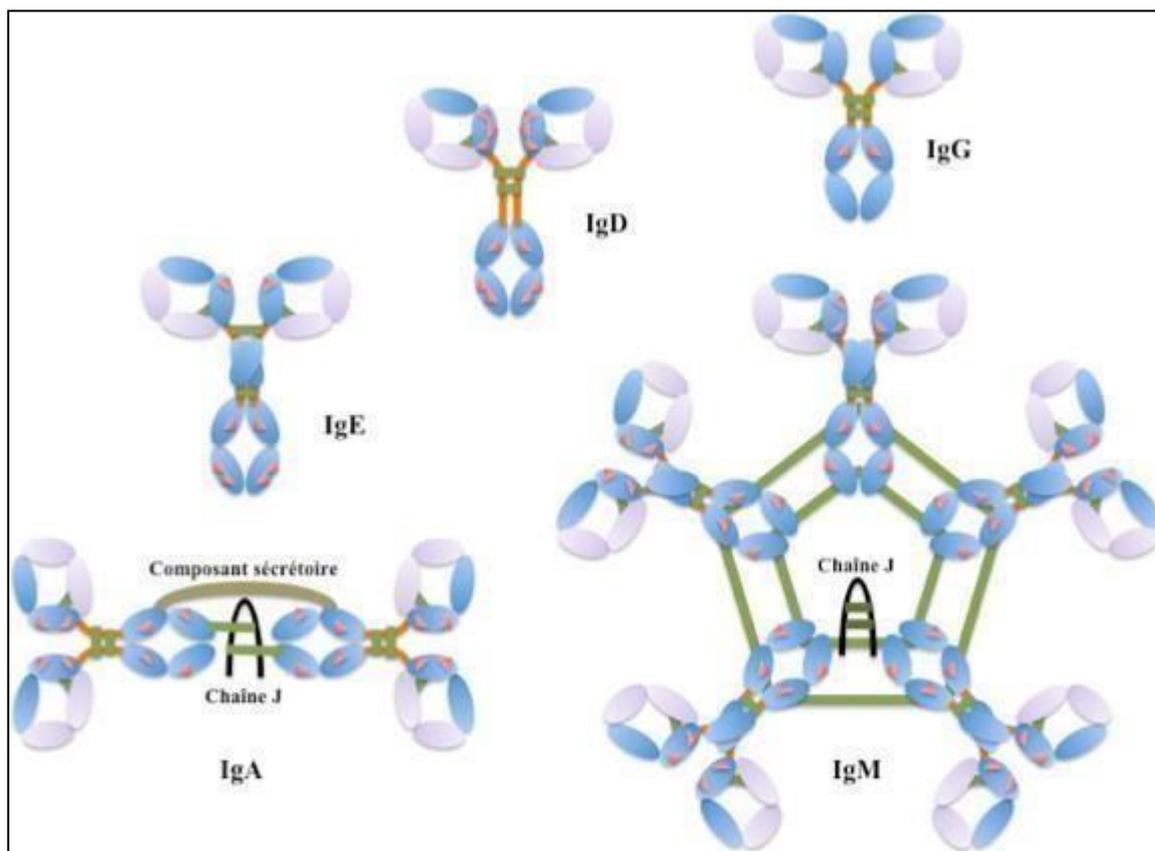
Enfin, les déterminants idiotypiques permettent de regrouper les anticorps ayant des spécificités antigéniques similaires. Ces déterminants se trouvent dans les régions variables, à proximité des sites de liaison aux antigènes, et sont spécifiques à chaque individu (Geha, 1981).

Les cinq classes d'anticorps définies grâce aux déterminants isotypiques présentent des structures et des fonctions physiologiques différentes (figure 2). On trouve des formes monomériques (IgG, IgE) ou multimériques (IgG, A, M, E) ou membranaires (IgD, IgM). Les IgG sont les plus abondantes dans le sérum (70 % des anticorps) et interviennent principalement dans les réponses immunitaires secondaires. Elles participent à la protection de l'organisme vis-à-vis des pathogènes ou des toxines en induisant leur neutralisation et leur destruction par le complément, les phagocytes ou les cellules cytotoxiques. Les IgG sont également la seule classe à pouvoir traverser la barrière placentaire conférant ainsi une immunité passive au fœtus (Leach *et al.*, 1996). Les IgA représentent environ 20% des anticorps sériques et constituent la classe prédominante dans les fluides corporels (salive, larmes, lait maternel, sécrétions nasales, génitales, mucus bronchique, digestif) assurant ainsi la protection au niveau des points d'entrée de l'organisme. Les IgA sont sécrétées sous forme de dimères grâce à l'ajout d'une chaîne J reliant les deux monomères. Elles sont ensuite internalisées au niveau des cellules épithéliales des muqueuses via le récepteur poly-Ig qui assure la transcytose et le relargage des IgA associées à leur composant sécrétoire dans les fluides mucosaux (Woof et Kerr, 2006). Les IgM représentent environ 8% des anticorps sériques ; elles sont les premières immunoglobulines exprimées par les cellules B matures (sous forme de monomères membranaires composant le BCR), et apparaissent durant les phases précoces d'une infection. Dans le sérum, les IgM sont sous forme pentamérique (parfois hexamérique), ce qui leur confère une forte avidité permettant une agglutination efficace des antigènes, couplée à une forte capacité d'activation du complément (Ehrenstein et Notley, 2010). Les IgD sont majoritairement membranaires, exprimées par les lymphocytes B matures, mais on les retrouve également en faible quantité dans le sérum (< 1% des anticorps).

Depuis leur découverte en 1964, leurs fonctions physiologiques restent énigmatiques

(Chenk et Cerutti ,2011) Co-exprimées à la surface des lymphocytes B ( $L_B$ ) matures avec les IgM, les IgD ont la fonction de récepteur à l'antigène (BCR) et pourraient intervenir dans l'anergie des  $L_B$  (Duty *et al.*, 2009) D'autres études récentes suggèrent que les Ig ont un rôle dans l'immunité mucoale des voies respiratoires (Chen K *et al.*, 2009).

Les IgE sont l'isotype le moins abondant dans le sang. Elles sont impliquées dans les phénomènes allergiques et dans l'immunité antiparasitaire. Dans l'allergie, les IgE fonctionnent via leur interaction avec les récepteurs Fc de type epsilon ( $Fc\epsilon R$ ), exprimés principalement à la surface des mastocytes, basophiles, éosinophiles, macrophages, monocytes et plaquettes. La fixation des complexes IgE- allergène sur les  $Fc\epsilon R$  induit le relargage de médiateurs inflammatoires et vasoactifs responsables des symptômes liés à la réaction allergique (Stone KD *et al.*, 2010).



**Figure2.** les différents isotopes des anticorps [2].

**Tableau 1.** Caractéristiques structurales Fonctionnelles principales des différentes classes d'anticorps [2].

| Classes                     | IgG   | IgA                                       | IgM                               | IgD                               | IgE             |
|-----------------------------|---|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Structures                  | monomère                                    | monomère ou dimère                        | pentamère                         | monomère                          | monomère        |
| Poids moléculaire (kDa)     | 150   | 160-350                                   | 950                               | 170-180                           | 190             |
| % carbohydrates             | 2-3   | 7-11                                      | 10-12                             | 9-14                              | 12-13           |
| Sous classes                | $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$    | $\alpha 1, \alpha 2$                      |                                   |                                   |                 |
| % anticorps totaux sériques | 70<br>50 ( $\gamma 1$ ), 15 ( $\gamma 2$ )  | 20<br>15 ( $\alpha 1$ ), 5 ( $\alpha 2$ ) | 10                                | 0,2                               | 0,004           |
| Demi-vie (jours)            | 21-24 / 7 ( $\gamma 3$ )                    | 4-7                                       | 5-10                              | 0,5                               | 1-5             |
| Passage transplacentaire    | Oui   | Non                                       | Non                               | Non                               | Non             |
| Activation du complément    | $\gamma 3 > \gamma 1 > \gamma 2 > \gamma 4$ | $\pm (\alpha 1)$                          | +++                               |                                   |                 |
| Fixation au FcR             | Fc $\gamma$ R                               | Fc $\alpha$ R                             |                                   | Fc $\delta$ R                     | Fc $\epsilon$ R |
| Localisation                | sérum                                       | sérum (monomère),<br>mucus (dimère)       | sérum,<br>membrane L <sub>B</sub> | sérum,<br>membrane L <sub>B</sub> | sérum           |

#### 4. Organisation et réarrangements des gènes codant les immunoglobulines

##### 4.1. Les gènes codant pour les Igs

Les chaînes lourdes (H) et légère (L) d'Ig sont chacune codées par une famille multigénique distincte, ( Leder , 1982) et les domaines V et C individuels sont chacun codés par des éléments indépendants : le gène C pour les parties constantes, et différents fragments de gènes pour la partie variable.

Deux types de fragments V et J pour les gènes codant pour la partie variable des chaînes légères et troistypes de fragments V, D et J pour les gènes codant pour la partie variable des chaînes lourdes.

Les immunoglobulines sont le produit de la combinaison de l'ensemble de ces gènes. Cette combinaison se fait au hasard et explique la diversité du répertoire des Igs. (Figure 3 et figure 4). En effet, chaînes légères sont issues de l'association V-J-C tandis que les chaînes lourdes associent les gènes V-D-J-C (Dudley *et al.*, 2005).

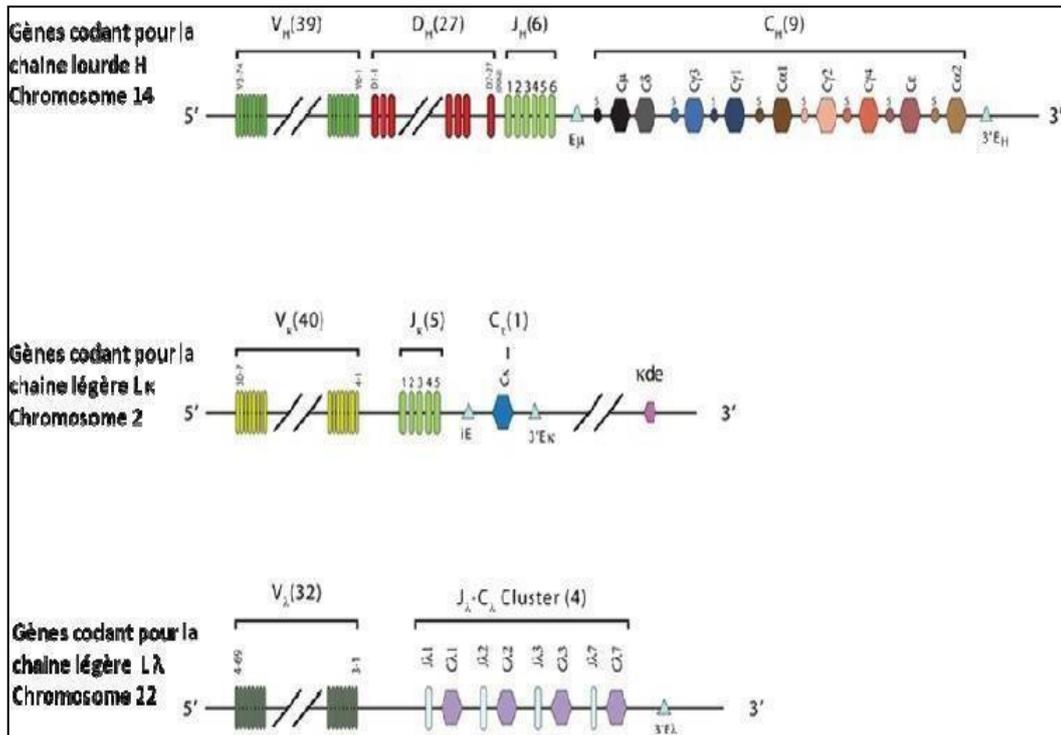
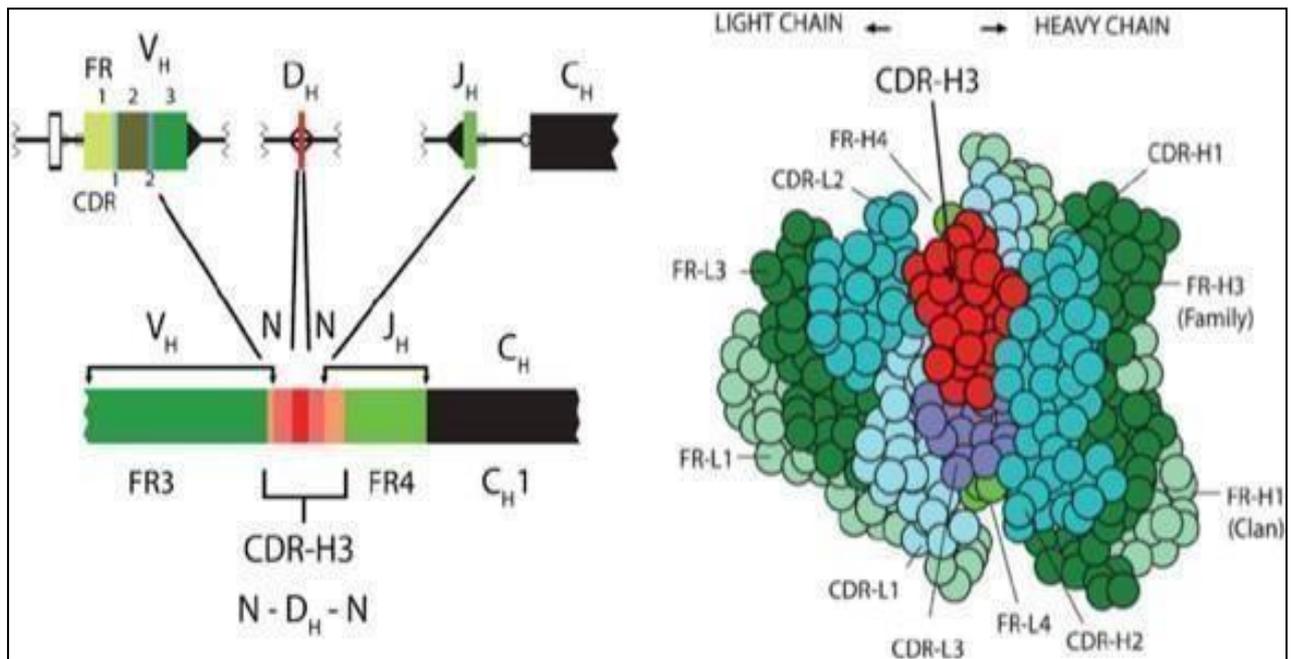


Figure 3. Organisation des gènes des immunoglobulines chez l'Homme

(Schroeder et Cavacini, 2010).

#### 4.2. Réarrangements des gènes

Le système immunitaire est capable de produire un nombre important d'immunoglobulines différentes permettant ainsi la protection contre des antigènes variés, jamais rencontré par l'hôte. La diversité des anticorps produits s'explique d'une part par le grand nombre de gènes codant pour les Igs et d'autre part par le nombre important de combinaisons possible, entre les différents gènes et les différents fragments de gènes variables. De plus, lors des associations des différents gènes des réarrangements ou mutations peuvent survenir. Ce phénomène explique à nouveau la grande diversité des anticorps pouvant exister dans l'organisme. Ces mutations interviennent essentiellement au niveau des fragments des gènes variables V, Det J. (Dudley *et al.*, 2005).



**Figure 4.** La diversité jonctionnelle est à l'origine de l'immense variabilité des paratope  
(Schroeder et Cavacini, 2010)

**CHAPITRE 02**  
**Les anticorps**  
**polyclonaux et les**  
**anticorps monoclonaux**

## 1. Les anticorps polyclonaux

Selon Sucha Cheryedath (2004) Les anticorps polyclonaux (pAbs) sont un mélange complexe de plusieurs épitopes qui sont habituellement produits par différents clones de lymphocyte B d'un animal. Ces anticorps décèlent et grippent a beaucoup dedifférents épitopes d'un antigène unique et par conséquent peuvent former des réseaux avec des antigènes.

Des échantillons de sang sont prélevés chez l'animal pour évaluer le niveau de production d'Ac. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé en effectuant une importante prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de lapurification des Ac à partir du sérum (Mistretta *et al*, 2009).

Le choix de l'espèce animale utilisée dépend de plusieurs facteurs, dont le volume de sérum requis (qui dépend lui-même de la quantité d'Ac polyclonaux à produire) et le type d'immun essai. L'âge, le sexe et l'état de santé de l'animal sont également importants (Leenaars et Hendriksen , 1999).Les espèces animales les plus fréquemment utilisées pour la production d'Ac polyclonaux sont le lapin, la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde, la chèvre, le mouton et le poulet (Leenaars et Hendriksen,2005). Des espèces animales de grande taille (par exemple, des chevaux) peuvent aussi être utilisées afin d'obtenir des volumes plus importants d'antisérum, mais l'entretien de ces animaux est plus coûteux. Par ailleurs, il est possible d'extraire les immunoglobulines du lait des bovins, des brebis et des chèvres, ce qui représente une méthode non invasive pour la production de grands volumes d'Ac polyclonaux (Mistretta *et al*, 2009).

## 2. Les anticorps monoclonaux

### 2.1. Historique

La première utilisation des anticorps pour la thérapie remonte à 1890, lorsque Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato découvrirent que l'état d'immunité conféré par l'injection d'une faible dose de toxine diphtérique pouvait être communiqué à des individus naïfs par transfert de sérum (Von Bekring et Kitasko ,1890). C'est ainsi que naissait lasérothérapie, qui fut une véritable révolution thérapeutique et médicale, encore utilisée aujourd'hui pour neutraliser des toxines suite à des infections bactériennes ou à des envenimations. L'activité neutralisante des antisérums fut rapidement attribuée aux anticorps (un terme initialement utilisé par Paul Ehrlich en 1891), gamma globulines du sérum, dont la structure fut élucidée partiellement en 1950 par Rodney Porter. Parallèlement, en 1948, Astrid Fagreus montra que

des cellules B spécialisées, les plasmocytes, étaient responsables de la biosynthèse des anticorps *in vivo* (Fgreaus, 1948). C'est dans ce contexte, qu'en 1975, César Milstein et Georges Köhler réussirent à développer une technique permettant de produire des anticorps *in vitro*, à partir de cellules hybrides résultant de la fusion entre des lymphocytes B murins et un myélome de la même espèce (Köhler et Milstein, 1975). Chaque clone cellulaire hybride, une fois isolé, produit le même anticorps qui est donc qualifié de monoclonal. La mise au point de ce procédé résulte en fait de la combinaison des travaux de Georges Barski sur la production de cellules hybrides, de Michael Potter sur l'établissement de lignées myélomateuses murines *in vitro*, de Yoshio Okada sur la fusion cellulaire par le virus de Sendai et de John Littlefield sur des cellules comportant des déficiences enzymatiques (Barski *et al*, 1960). Grâce à cet ensemble d'avancées techniques, Köhler et Milstein ont donc réussi à fusionner des splénocytes provenant de souris immunisées avec un myélome murin déficient pour une enzyme nécessaire à la biosynthèse des nucléotides par la voie de sauvetage (opposée à la voie *de novo*), l'HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase). Cette déficience enzymatique permet de sélectionner facilement les cellules hybrides (ou hybridomes) grâce à un agent de sélection ajouté au milieu de culture, l'aminoptérine. Celle-ci bloque la seule voie de biosynthèse des nucléotides qu'il reste aux cellules myélomateuses non fusionnées (la voie *de novo*), permettant d'une part, d'induire la mort de ces cellules, et d'autre part, de sélectionner par complément génique les hybridomes issus de la fusion cellulaire (Bernard, 2012).

Le milieu de culture sélectif contient également de l'hypoxanthine qui assure la synthèse des bases puriques le temps que la complémentation se mette en place, et de la thymidine qui permet de compenser l'effet antagoniste indésirable de l'aminoptérine sur la thymidylate synthase. Le milieu sélectif est communément appelé milieu « HAT » pour Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine. Les lymphocytes B non fusionnés vont, quant à eux, disparaître au bout de quelques jours puisqu'ils sont incapables de se multiplier *in vitro*. Les hybridomes ainsi sélectionnés ont donc : (1) la capacité de se multiplier indéfiniment, (2) la capacité de sécréter des anticorps. L'obtention de clones uniques sécrétant des anticorps monoclonaux

Spécifiques pour la cible nécessite des étapes supplémentaires de dilutions limites pour atteindre un stade clonal, et de criblage pour vérifier la liaison spécifique à l'antigène (Bernard, 2012).

Depuis 1975, la découverte de Köhler et Milstein a largement été utilisée pour générer

des anticorps monoclonaux utilisés en recherche, pour le diagnostic médical et pour la thérapie de diverses pathologies. En 1986, le premier anticorps monoclonal thérapeutique murin est accepté par la FDA (Food and Drug Administration). Cet anticorps, le muromonab (Orthoclone OKT3™), est dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T et s'est révélé efficace pour limiter les réactions inflammatoires à l'origine des rejets lors des transplantations d'organes (Cosimi *et al.*, 1981). Néanmoins, le développement d'autres anticorps thérapeutiques murins, depuis cette date, a été limité à cause de la présence d'effets secondaires importants. En effet, une utilisation chronique d'anticorps murins chez l'homme induit le déclenchement de réponses immunitaires avec la production d'anticorps humains anti-souris ou HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) (Schroff *et al.*, 1985).

## 2.2. Définition

Un Ac monoclonal (Mab en anglais «Monoclonal antibody») est un Ac (ou Ig) produit à partir d'un seul clone de plasmocyte, au contraire des Ac polyclonaux isolés directement à partir d'un animal immunisé (mélange d'Ac différents). C'est pourquoi il se nomme «monoclonal». Ceci signifie que chaque Ac produit par cette cellule est exactement identique.

Les Ac monoclonaux ont été artificiellement produits contre un Ag bien déterminé dans un but bien défini. Ils sont extrêmement spécifiques puisqu'ils ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un Ag donné. Ils permettent donc une biothérapie ciblée contre un certain nombre de maladies (Waldmann et Thomas, 2003).

Les anticorps monoclonaux, dont le développement s'est accéléré suite aux découvertes des docteurs Milstein et Köhler, sont les produits issus des biotechnologies qui se sont développés le plus rapidement, aussi bien pour le diagnostic et le suivi clinique des patients que pour le traitement de pathologies par thérapies ciblées (Desgranges, 2004).

## 2.3. Catégories d'anticorps monoclonaux et leurs nomenclatures

### 2.3.1. Anticorps Murins (o-mab)

Les AcM murins ont été les premiers AcM mis sur le marché, avec le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®) approuvé en 1986 dans la prévention du rejet de greffe de rein.

Sa structure était de type IgG2 et agissait en bloquant les récepteurs CD3 à la surface des lymphocytes T (Liu, 2014). Les anticorps murins ne sont que très rarement utilisés en thérapeutique à l'heure actuelle, du fait de leur faible demi-vie ainsi que de leur forte immunogénicité. En effet, leur injection entraîne la production rapide d'anticorps humains anti-souris (HAMA) dirigés contre les AcM murins – reconnus comme antigènes du non-soi – provoquant une résistance au traitement, une allergie voir même un choc anaphylactique (Kaplou et Carnoy, 2015) .

### 2.3.2. Anticorps chimériques (xi-mab)

Les AcM chimériques sont composés de deux parties : le fragment Fc humain, et le fragment antigen- binding (Fab) murin, dont les parties variables sont greffées sur le fragment Fc (Dennis *et al.* , 2012), cette partie humaine représentant en moyenne 70% de la structure de l'AcM. Les avantages amenés par cette technique sont multiples. Tout d'abord les AcM chimériques étant en grande partie d'origine humaine, leur immunogénicité diminue, et la résistance au traitement apparaît plus tardivement. De plus, le Fc humain permet aux AcM ayant reconnu l'antigène cible d'activer un certain nombre de fonctions effectrices cellulaires et humorales (Chames *et al.*, 2009)

La chimérisation permet de varier les isotypes des anticorps et, donc, de manipuler les fonctions potentielles de l'anticorps (par exemple, la fixation du complément). Un autre avantage est l'augmentation de la demi-vie de l'Ac, qui passe de moins de 20 heures avec les Ac murins à plusieurs jours, s'approchant des 21 jours des IgG humaines endogènes (Mould et Sweeney, 2007).

Enfin, par rapport aux Ac murins, le recours à des Ac hybrides souris–homme permet de réduire la réponse HAMA, et, donc, d'améliorer le profil de tolérance en limitant le risque de xéno-immunisation (Clark, 2000).

Ceci facilite l'utilisation de ces agents thérapeutiques. Cependant, les Ac monoclonaux chimériques comportent une partie non négligeable de protéines murines (33 % environ), suffisante pour encore pouvoir induire une réponse immune humaine anti-souris (tableau 2). Dans la nomenclature internationale, on peut aisément reconnaître ces Ac chimériques par la syllabe «xi» précédant le suffixe «mab» (tableau 3) (Scheen, 2009).

### 2.3.3. Anticorps humanisés (zu-mab)

Afin d'augmenter la part humaine des Ac, un progrès supplémentaire a pu être obtenu. Il consiste à substituer les CDRs («Complementarity-Determining Regions», région Hypervariable) d'une IgG humaine par ceux de l'Ac monoclonal de souris, conférant ainsi à l'IgG humaine la spécificité de l'Ac murin parental (Scheen, 2009).

Ces Ac, qualifiés d'humanisés, ont été produits dans les années 1988-1991 (Riechmann *et al.*, 1988). Ils contiennent seulement la petite partie variable murine composée des régions hypervariables ou CDR qui sont en contact étroit avec l'antigène. Ces CDR sont greffés dans la région variable d'une Ig humaine

Ils induisent beaucoup moins de réponses immunes anti-souris (HAMA) que les Ac chimériques dont ils sont dérivés (7% par rapport à 20 à 40%). Mais, l'affinité de l'Ac humanisé n'est pas toujours aussi élevée que l'Ac d'origine, ce qui, dans certains cas, peut entraîner une baisse d'efficacité. Dans la nomenclature internationale, on peut aisément identifier ces Ac humanisés par la syllabe «zu» précédant le suffixe «mab». Un exemple de cette catégorie est donné par le trastuzumab (Herceptin®) dont le nom peut être scindé comme suit : tras- + -tu(m)- + -zu- + -mab : il s'agit donc d'un Ac monoclonal humanisé dirigé contre une tumeur (en l'occurrence le cancer du sein) (Baty et Chames, 2006 ; Hudson et Souriau, 2003).

#### 2.3.4. Anticorps humains (u-mab)

Des Ac entièrement humains et biocompatibles ont été recherchés pour l'immunothérapie passive et sont devenus accessibles à partir de 1994. La technique des hybridomes a progressivement été remplacée par d'autres méthodes dont la technologie de l'ADN recombinant, la technique du «phage display» et le recours à des souris transgéniques (Hudson et Souriau, 2003 ; Baty et Chames, 2006). Il est vraisemblable que les Ac monoclonaux qui arriveront jusqu'à l'étape finale de la commercialisation et de l'utilisation en thérapeutique dans les prochaines années appartiendront de plus en plus à cette catégorie d'Ac humains. On peut les reconnaître par la voyelle «u» précédant le suffixe «mab» (Scheen, 2009).

Un exemple de cette famille est l'adalimumab (Humira®) dont le nom peut être scindé comme suit : ada- + -li(m)- + -u- + -mab : il s'agit donc d'un Ac monoclonal humain modulant l'immunité (indiqué notamment dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde). L'utilisation d'Ac humains devrait permettre d'encore améliorer le profil de tolérance par rapport aux Ac humanisés (Scheen, 2009).

La demi-vie de ces AcM est encore augmentée par rapport aux autres types, étant donnée

leur très faible immunogénicité ainsi que le faible risque de production d'HAMA. En conséquence, les traitements par AcM humains peuvent être administrés à intervalles plus étendus, et avec un risque de provoquer une réaction allergique fortement diminué (Legros, 2016).

**Tableau 2.** Nomenclature internationale simplifiée des différentes catégories d'anticorps monoclonaux (Scheen,2009).

| Type d'anticorps | Suffixe | % humain | Antigénicité | Quelques exemples                                  |
|------------------|---------|----------|--------------|--|
| Murins           | «momab» | 0        | +++          | Muromomab (Orthoclone®)<br>Ibridomomab (Zevalin®)  |
| Chimériques      | «ximab» | 60-70    | +            | Infliximab (Remicade®)<br>Rituximab (Mabthera®)    |
| Humanisés        | «zumab» | > 90     | ± 0          | Trastuzumab (Herceptin®)<br>Bévacizumab (Avastin®) |
| Humains          | «mumab» | 100      | ± 0          | Adalimumab (Humira®)                               |

**Tableau 3.** Nomenclature internationale détaillée des différents types d'anticorps monoclonaux, tenant également compte de la cible potentielle (Scheen, 2009).

| Préfixe         | Cible              | Source               | Suffixe         |             |
|-----------------|--------------------|----------------------|-----------------|-------------|
| <b>Variable</b> | -o(s)-             | Os                   | -u- Homme       | <b>-mab</b> |
|                 | -vi(r)-            | Virus                |                 |             |
|                 | -ba(c)-            | Bactérie             |                 |             |
|                 | -li(m)-            | Immunitaire          | -o- Souris      |             |
|                 | -le(s)-            | Infection            |                 |             |
|                 | -ci(r)-            | Cardio-vasculaire    | -a- Rat         |             |
|                 | -mu(l)-            | Musculo-squelettique |                 |             |
|                 | -ki(n)-            | Interleukine         | -c- Hamster     |             |
|                 | -co(l)-            | Tumeur colique       |                 |             |
|                 | -me(l)-            | Mélanome             | -i- Primate     |             |
|                 | -ma(r)-            | Tumeur mammaire      |                 |             |
|                 | -go(t)-            | Tumeur testiculaire  | -xi- Chimérique |             |
|                 | -go(v)-            | Tumeur ovarienne     |                 |             |
|                 | -pr(o)-            | Tumeur prostatique   | -zu- Humanisé   |             |
|                 | -tu(m)-            | Tumeurs diverses     |                 |             |
| -neu(r)-        | Système nerveux    | -axo- Hybride        |                 |             |
| -tox(a)-        | Toxine comme cible | rat/murin            |                 |             |

## 2. 4. Technique permettant de la production des anticorps monoclonaux

### 2.4.1. Obtention des Anticorps murins

- **Technique d'hybridome**

La mise au point de la technique d'obtention des anticorps monoclonaux (AcM) par Georges Köhler et César Milstein, publiée en 1975 dans le journal Nature, fondée sur la fusion de lymphocytes B «immuns» de souris avec des cellules de myélome et conduisant à la génération de cellules hybrides B (hybridomes) productrices d'AcM a représenté un grand pas en avant pour la biologie et la biologie clinique (figure 5) (Bourtet et Teillaud, 2006).

- **Obtention et sélection des hybridomes**

Pour obtenir des anticorps monoclonaux, les lymphocytes de la rate d'une souris immunisée sont isolés et fusionnés avec des cellules tumorales murines (myélome). Cette opération est nécessaire car la durée de vie des lymphocytes produisant des anticorps n'est que quelques semaines en culture. Par fusion avec une cellule tumorale apparaissent des cellules hybrides encore appelées hybridomes qui sont potentiellement immortelles et à fort

multiplication. La fusion de cellules est un événement rare dont la fréquence est augmentée par l'emploi de polyéthylène glycol (Habti, 2007). Pour ne récupérer que les cellules réellement fusionnées, la culture primaire est incubée à une durée assez importante avec un milieu Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine (HAT), qui contient l'Hypoxantine, de l'Aminoptérine et de la Thymidine. Un analogue de l'acide Dihydrofolique, bloque de façon compétitive la Dihydrofolate réductase. Comme ceux-ci sont essentiels à la synthèse d'ADN, les cellules de myélome ne peuvent pas survivre en présence d'aminoptérine. Les cellules de la rate sont au contraire capables de contourner ce blocage en utilisant l'Hypoxantine et la Thymidine, mais elles meurent également en raison de leur durée de vie limitée. Seuls les hybridomes peuvent survivre à la culture en milieu HAT parce qu'ils disposent de l'immortalité des myélomes et des voies métaboliques secondaires des cellules de rate (Habti, 2007).

- **Production des anticorps monoclonaux**

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. La production de ces anticorps monoclonaux s'effectue finalement *in vitro* en utilisant un bioréacteur ou *in vivo* chez une souris (Elalaoui, 2005).

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 (Goldsby *et al.*, 2003).

Les animaux, souris ou rats, utilisés à la fois pour l'immunisation en vue de la préparation du clone d'hybridome et pour la production subséquente d'Ac monoclonaux (production *in vivo*), doivent être de même souche (syngéniques) pour des raisons d'histocompatibilité. Les souris Balb/c sont le plus souvent utilisées, car, de surcroît, les cellules myélomateuses parentales employées dans le processus de fusion proviennent souvent de ces souris. Une alternative est d'avoir recours aux souris SCID (syndrome d'immunodéficience sévère combinée) qui, bien que coûteuses, produisent moins d'Ac murins non spécifiques avec un rendement équivalent d'Ac monoclonaux spécifiques, ce qui a pour effet de faciliter la purification de ces derniers (Leenaarset Hendriksen, 2005 ; Campbell, 1996).

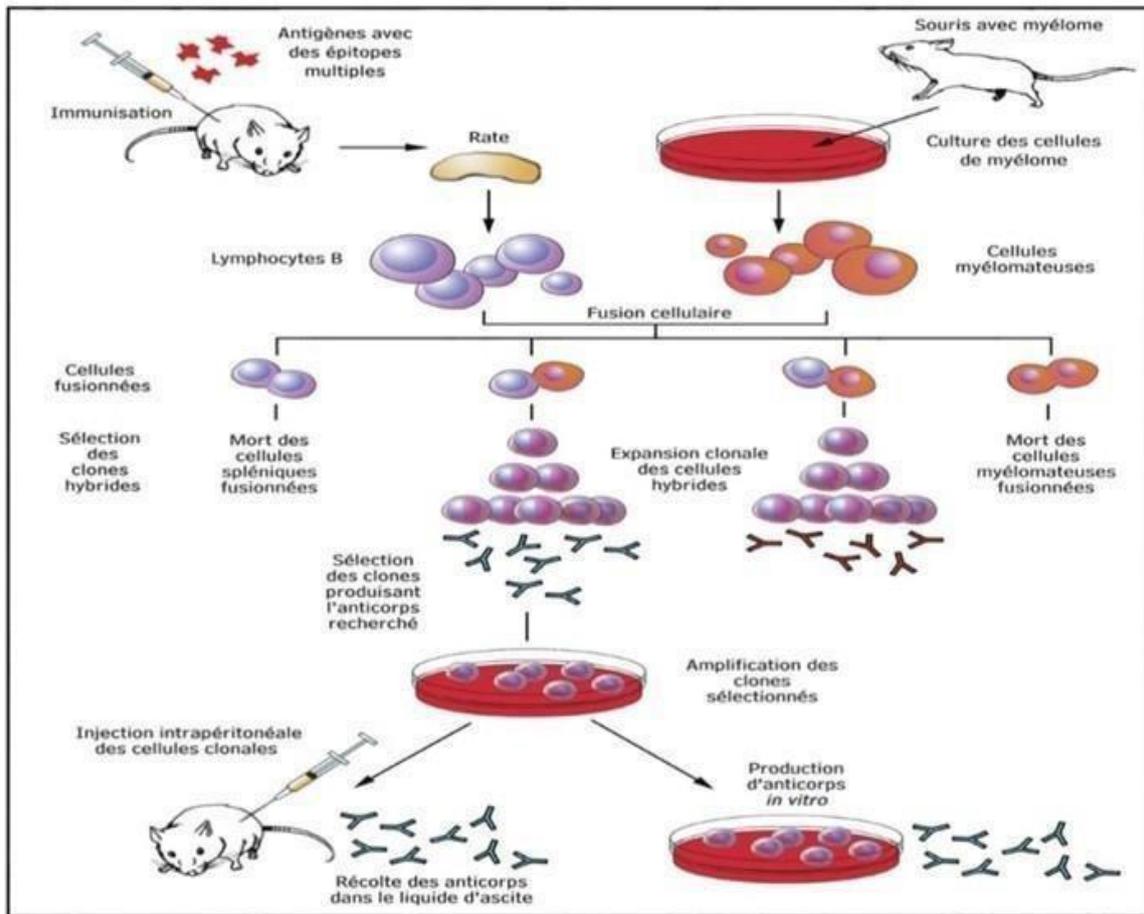


Figure 5: Technique des hybridomes [3].

#### 2.4.2. Obtention des anticorps recombinants chimériques et humanisés

Les progrès de la biologie moléculaire dans les années 80-90 ont permis de cloner les gènes codant pour les immunoglobulines. Ainsi, l'obtention d'anticorps monoclonaux via la technique des hybridomes donne désormais accès aux séquences des chaînes lourdes et légères mais surtout aux séquences des régions variables et hypervariables des anticorps thérapeutiques, qui peuvent donc être clonées puis insérées dans des vecteurs d'expression (Orlandi *et al.*, 1989).

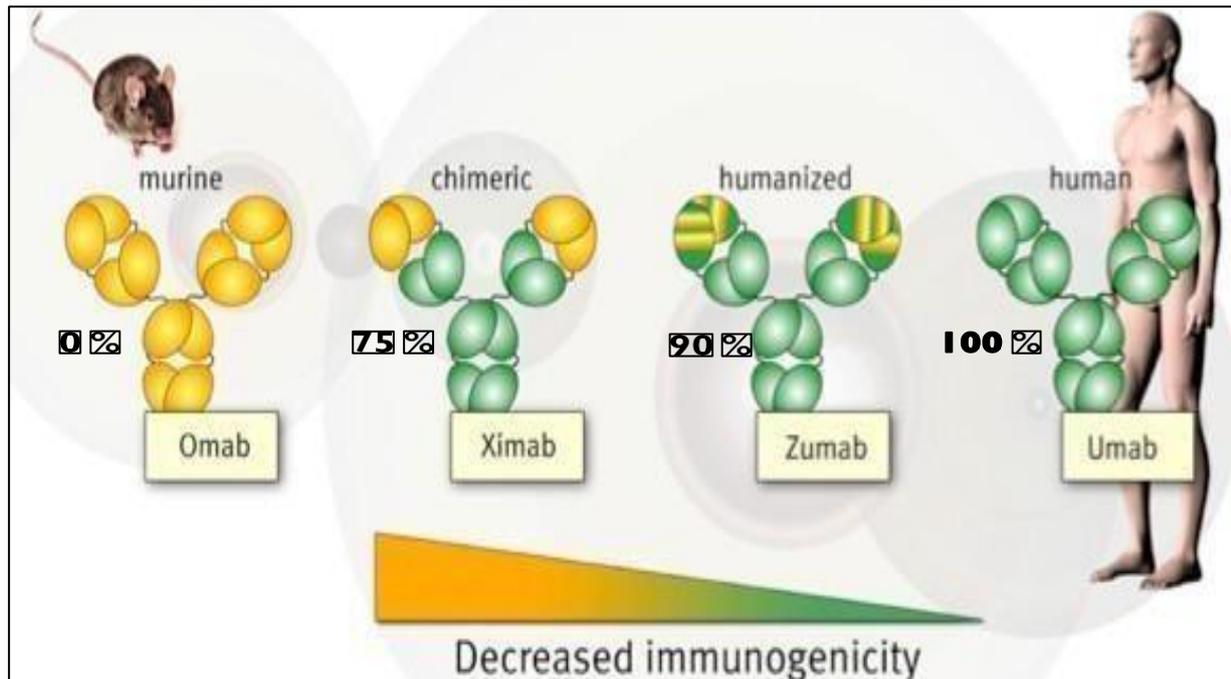
Dès 1984, des anticorps chimériques comprenant des parties constantes humaines et des parties variables murines sont obtenus (Morisson *et al.*, 1984). Ces anticorps chimériques comportent environ 75% de séquences humaines et un fragment Fc totalement humain. Cette construction permet de diminuer considérablement l'immunogénicité chez l'homme et assure une bonne interaction de l'anticorps avec les FcRs humains, améliorant ainsi la demi-vie et les fonctions effectrices. Le premier anticorps chimérique mis sur le marché fut l'abciximab (Réopro™), en 1994. Depuis, 7 septanticorps chimériques ont été approuvés dont un en 2011,

le Brintuximab vedotin (Adcetris™), qui est un anticorps chimérique conjugué à une toxine (l'auristatine) indiqué pour le traitement des lymphomes. Malgré la proportion réduite de séquences murines, ces anticorps génèrent encore des réactions immunitaires de type HACA (Human Anti-Chimeric Antibodies), responsables d'effets indésirables fréquents chez les patients (Hwang et Foote, 2005).

Ainsi, d'autres anticorps dits humanisés, ne présentant que 10 % de séquences murines, ont vu le jour dès 1986 (Jones *et al.*, 1986).

La manipulation des anticorps monoclonaux par génie génétique a commencé au début des années 1980. Les principaux objectifs de ces manipulations ont été alors l'obtention d'anticorps chimériques, humanisés ou humains, ainsi que la modification de leur affinité, ou la capacité à les exprimer sous forme de fragments ou de protéines de fusion avec des molécules leur conférant par exemple une cytotoxicité accrue (Siberil, 2005).

L'humanisation des anticorps est un processus complexe dont la réussite n'est pas garantie. En effet, le simple greffage des CDRs murins sur un anticorps humain conduit souvent à des anticorps de mauvaise affinité et de faible spécificité pour la cible. Par conséquent, des modifications supplémentaires comme des mutations ponctuelles dans les CDRs ou le transfert d'une ou plusieurs régions FR (Framework Region) murines, sont souvent nécessaires pour restaurer l'affinité et la spécificité des anticorps humanisés par rapport à leurs analogues murins (Wu *et al.*, 1999). Une seconde stratégie d'humanisation, nommée « resurfacing », consiste à produire tout d'abord un anticorps chimérique puis à muter certains acides aminés dans les régions FR murines (des acides aminés localisés en surface) pour donner à l'anticorps un profil plus humain (figure 6) (Roguska *et al.*, 1994).



**Figure 6.** Les différentes générations d'anticorps thérapeutiques [4].

### 2.4.3. Obtention des Anticorps entièrement humain

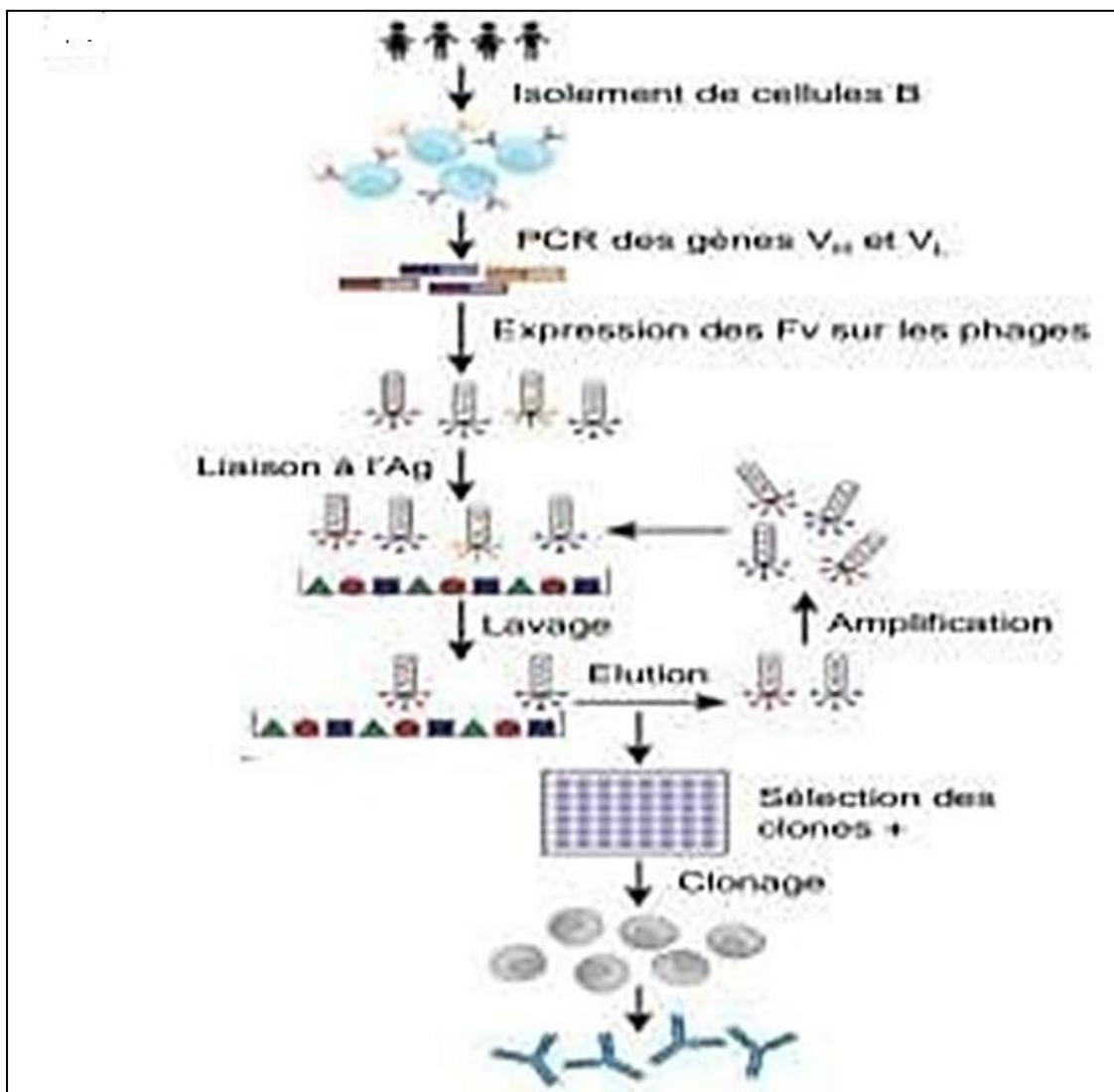
- **Technique de Phage display**

Le « phage display » est une technique de sélection *in vitro* permettant d'obtenir des Ac totalement humains à partir de banques combinatoires construites avec des domaines à la fois variables et constants humains (figure 7). Les domaines spécifiques contre l'antigène d'intérêt sont fusionnés aux régions constantes d'IgG humaines pour générer des Ac humains complets (Scheen, 2009).

Le phage display est issu des recherches de Georges Smith qui, en 1985, démontra que des peptides pouvaient être fusionnés dans la protéine P3 d'une souche particulière de bactériophage d'*E. Coli*, le bactériophage filamentueux M13. La protéine de fusion peut ensuite être utilisée pour des études de binding contre un antigène cible. Les phages M13 possèdent un ADN simple brin positif et infectent spécifiquement les souches *E. coli* F+ (Legros Velentin, 2016).

De plus, l'association de la protéine exposée en surface (phénotype) avec son ADN codé par le phage (génotype) permet d'accéder rapidement aux séquences des molécules sélectionnées car l'ADN est directement isolé avec la protéine pour laquelle il code. Cette méthode est très efficace puisqu'il est possible de sélectionner un phage dont la fréquence était

de 1/108 dans la banque originale. Le nombre croissant de publications apparues ces dernières années indique que la technologie du phage display représente un outil performant pour de très nombreuses applications (Christelle *et al.*, 1998). Plusieurs champs d'applications ont été exploités dans le cadre de la technique du phage display mais l'application qui reste, tout de même, principale est la construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps. En effet, leurs domaines variables peuvent être exprimés dans des phages sous forme de fragments Fab ou sous forme de scFv. La production d'anticorps monoclonaux est rendue possible grâce à cette technique surtout quand celle-ci n'est pas possible par la technique de l'hybridome pour des raisons techniques ou éthiques (Marie-Paule *et al.*, 2013).



**Figure 7.** Technique du phage display (Virginie, 2009).

- **Utilisation de lymphocytes B humains**

La production d'anticorps monoclonaux totalement humains est basée sur l'obtention et la purification de lymphocytes B humains. Ces lymphocytes B humains proviennent de donneurs humains. Deux types de donneurs humains sont utilisés

- 1) Des donneurs ayant déjà été en contact avec l'antigène, appelés les donneurs immunisés/infectés ou encore vaccinés,
- 2) Des donneurs n'ayant jamais été en contact avec l'antigène, appelés des donneurs naïfs.

- **Principe**

Récupérer du sang de donneurs, purifier et sélectionner les lymphocytes B humains, les fusionner avec un partenaire cellulaire de type myélome, ou un partenaire viral. La clonalité et la spécificité sont obtenues comme dans le cas de la production d'anticorps murins par des étapes supplémentaires de clonage par dilution limite et de criblage. La production des anticorps humains peut directement être initiée sur les lymphocytes B. Toutefois, la durée de vie d'un lymphocyte B est courte et les lymphocytes B ne se multiplient pas *in vitro*. C'est pour cela que dès 1970, des essais pour stabiliser les lymphocytes B humains ont porté sur les possibilités de fusionner ou d'immortaliser des lymphocytes B humains avec un partenaire cellulaire de type myélome. Contrairement à la technique des hybridomes chez la souris, des difficultés pour fusionner et stabiliser les lymphocytes B humains sont apparues. D'autre part, peu de myélomes humains sont disponibles et adaptés à la fusion avec des lymphocytes B humains. L'immortalisation avec un virus, le virus Epstein-Barr (EBV) a également été utilisé. L'EBV est un herpes virus qui possède la capacité de transformer ou d'«immortaliser» les lymphocytes B humains provoquant l'expansion clonale permanente de ces cellules. Pour améliorer le rendement et la stabilité, l'immortalisation peut être couplée à une étape supplémentaire de fusion. L'utilisation du virus d'Epstein-Barr (EBV) s'est révélée relativement efficace. Cette stratégie a permis de générer des anticorps monoclonaux contre divers antigènes (virus, toxines...). Quelques exemples très marquants, l'obtention d'anticorps humains contre le SRAS ou contre H1N1 par l'équipe de Lanzavecchia en 2002 et 2004 à partir de lymphocytes de donneurs ayant déjà rencontré la cible

Les inconvénients majeurs de cette technique résident dans le faible rendement de

l'étape d'immortalisation et dans la difficulté à stabiliser les lymphocytes B immortalisés (Mazhoura, 2012).

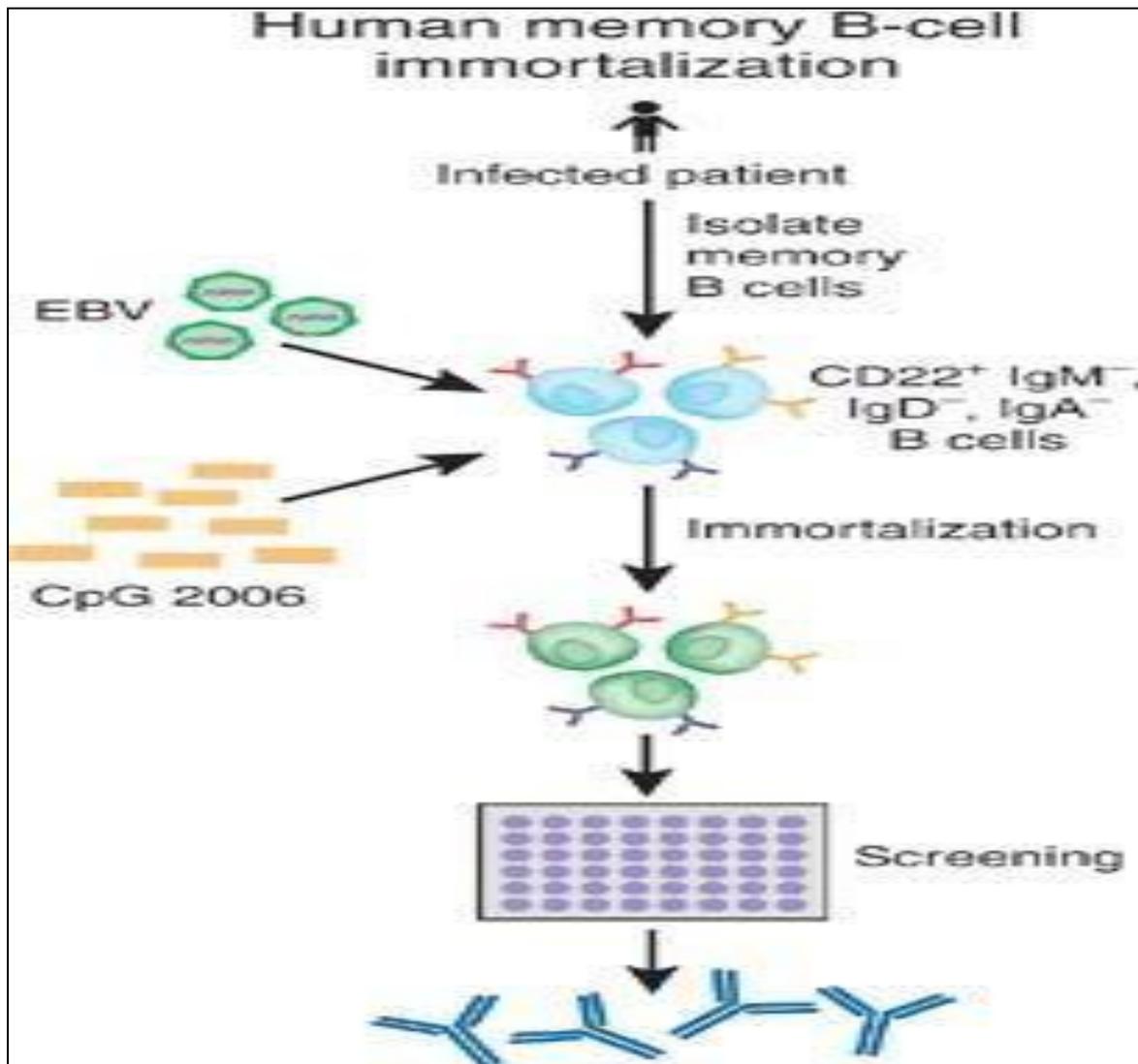
Récemment pour pallier ce problème, l'addition de séquences oligo nucléotidiques immuno stimulatrices CpG (Chromatographie en Phase Gazeuse) pendant l'immortalisation a permis d'augmenter l'efficacité d'immortalisation et la stabilité des clones. De même, l'association de la technique d'immortalisation avec celle de la fusion, impliquant des partenaires humains de fusion augmente la probabilité d'immortalisation et la stabilité des clones.

De plus, même si l'utilisation de lymphocytes B humains permet de disposer a priori de l'ensemble du répertoire immunologique, l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques

D'une cible est grandement favorisée lorsque les lymphocytes B proviennent d'individus immunisés/vaccinés. On peut alors sélectionner des lymphocytes B mémoires mais cela peut se révéler difficile à réaliser dans le cas de pathogènes très virulents ou peu répandus (Toxine Charbonneuse, Bacillus Anthracis, Yersinia Pestis, VIH, Ricine, ...) (Mazhoura, 2012).

Ainsi, des stratégies d'immunisations in vitro utilisant des lymphocytes B naïfs ont été développées. Ces stratégies permettent d'obtenir des anticorps humains contre n'importe quelle cible y compris des cibles pour lesquelles des lymphocytes B immunisés ne seraient pas disponibles. Avec l'immunisation in vitro, il est difficile d'obtenir des anticorps de haute affinité. C'est pour cela que divers protocoles d'immunisation in vitro ont été développés. D'autre part, la majorité des anticorps obtenus par cette voie sont des IgMs (Figure 8) (Mazhoura, 2012).

L'obtention d'anticorps humains grâce à l'utilisation de lymphocytes B humains reste pour le moment au stade de la recherche et nécessite diverses mises au point. Cependant, cette stratégie ouvre des perspectives intéressantes notamment dans le cadre de l'immunisation in vitro (Mazhoura, 2012).

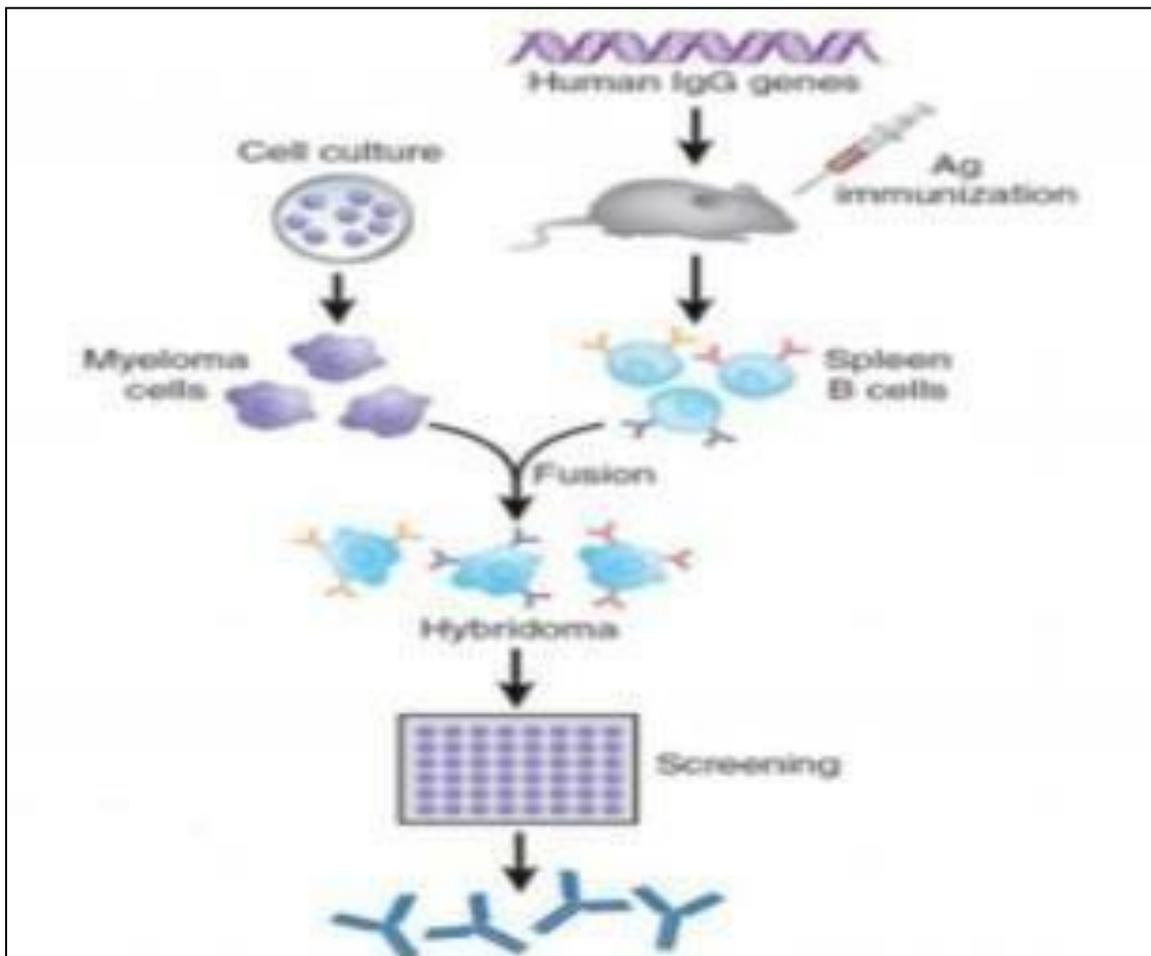


**Figure 8.** Immortalisation des cellules B mémoires humaines (Virginie, 2009)

- **Technique de souris transgénique**

L'obtention de souris transgéniques contenant une grande partie des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères humaines (figure 9). Cette approche consiste à remplacer les Loci des gènes d'immunoglobulines (Ig) de souris par les loci équivalents humains en utilisant des fragments d'ADN génomique humain, contenus dans des Yeast Artificial Chromosomes (YACs). Des souris dont une grande partie des loci IgH et Igk avait été inactivée et des souris transgéniques contenant une partie des Loci d'Ig humaines ont été générées et croisées. Il a été alors montré que les souris issues de ce croisement produisent des anticorps humains de type IgM, ou IgG lors de réponses secondaires, indiquant que les fragments introduits permettent un certain degré de commutation de classe. De plus, l'analyse des AcM obtenus a montré que des mutations somatiques affectaient les régions variables

indiquant l'existence d'une maturation apparemment correcte de la réponse anticorps. Ces souris permettent ainsi de générer des AcM humains de haute affinité contre n'importe quel antigène. Une approche fondée sur l'introduction de fragments chromosomiques humains entiers (technologie « trans chromosomique », Tc) a été également développée. Des souris invalidées en ce qui concerne leurs Loci IgH et Igk ont été rendues double-trans chromosomique par introduction de fragments dérivés des chromosomes humains 14 et 22 contenant respectivement le Locus IgH et le locus IgK. Cela a permis de générer des souris dont un certain nombre de cellules somatiques contiennent 100% des gènes codant les chaînes lourdes et les chaînes légères  $\kappa$  humaines. Ces souris produisent des quantités élevées d'IgG humaines en réponse à différents immunogènes. Des anticorps monoclonaux humains peuvent être obtenus alors par la technique classique d'obtention d'hybridomes B (Xiao-Dong *et al.*, 2001).



**Figure 9.** Technique de souris transgénique (Michel *et al.*, 2009).

### 2.5. Les anticorps monoclonaux thérapeutique

L'idée d'utiliser des anticorps pour guérir des maladies remonte à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle puisque dès 1890, Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato puis Emile Roux réalisèrent des essais cliniques en utilisant du sérum d'animaux. Ils ont découvert que le sérum d'animaux, ayant subi au préalable des injections de la toxine diphtérique, conférait à l'homme une protection contre la diphtérie (Eibl, 2008). L'activité neutralisante du sérum fut rapidement attribuée aux anticorps (un terme initialement utilisé par Paul Ehrlich en 1891), gamma globulines du sérum, dont la structure fut élucidée partiellement en 1950 par Rodney Porter (Porter, 1950). La neutralisation de toxines par sérothérapie fut appliquée à l'homme et de nombreux chercheurs ont repris la technique afin de disposer de « médicaments » ou antidotes contre des venins de serpents et de scorpions.

L'utilisation de sérum était alors le seul moyen permettant de traiter certaines maladies infectieuses comme la rougeole, les oreillons ou des infections respiratoires (Keller et Stiehm, 2000). La sérothérapie fut remplacée par la vaccination et l'antibiothérapie, car elle induisait de nombreux accidents anaphylactiques dus à l'origine animale des sérums (Smolens, 1961). Elle est toutefois toujours utilisée dans certains cas comme le traitement de maladies médiées par des toxines (tétanos, botulisme, diphtérie) ou des morsures venimeuses. L'apparition des anticorps monoclonaux murins a pu remplacer l'utilisation d'immuns sérums animaux et apporta un grand renouveau en thérapeutique. Le Muromonab ou Orthoclone OKT3<sup>®</sup> dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T. Son rôle a été de limiter les réactions inflammatoires intervenant dans les rejets de greffes (Cosimi *et al.*, 1981). Néanmoins, le développement d'autres anticorps thérapeutiques murins contre de nouvelles cibles a été limité à cause de la présence d'effets secondaires importants. En effet, l'administration d'anticorps murins à l'Homme déclenche des réactions immunitaires caractérisées par la production d'anticorps humains anti-souris ou HAMA (**H**uman **A**nti-**M**ouse **A**ntibodies) conduisant dans certains cas à des chocs anaphylactiques (Schroff *et al.*, 1985). Dans un premier temps, pour limiter les réponses immunitaires de type HAMA, seulement des fragments Fab ou Fab' <sub>2</sub> des anticorps murins ont été utilisés. Par exemple, pour le traitement des hépato carcinomes, le Metuximab, un fragment (Fab' <sub>2</sub> radio marqué), a été utilisé en Chine. Depuis, le développement des techniques d'ingénieries moléculaires ont permis de produire des anticorps thérapeutiques. Cependant, la médecine a encore recours aux anticorps murins notamment en oncologie pour des couplages à des toxines ou à des radio-isotopes (Ibritumomab, Tositumomab).

### 2.5.1. Cibles et mécanismes d'action d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

Les anticorps utilisés à des fins thérapeutiques peuvent exercer différents modes d'action selon la cible et la pathologie à traiter. Le choix de la molécule cible est majeur puisque cela définit l'efficacité de l'anticorps et les effets secondaires qu'il pourrait entraîner (Casadevall *et al.*, 2004).

Les cibles des anticorps peuvent être classées en deux types :

- 1) **Antigènes solubles**
- 2) **Antigènes membranaires**

Selon la cible, le mode d'action varie.

#### 2.5.1.1. Les anticorps neutralisant un antigène soluble

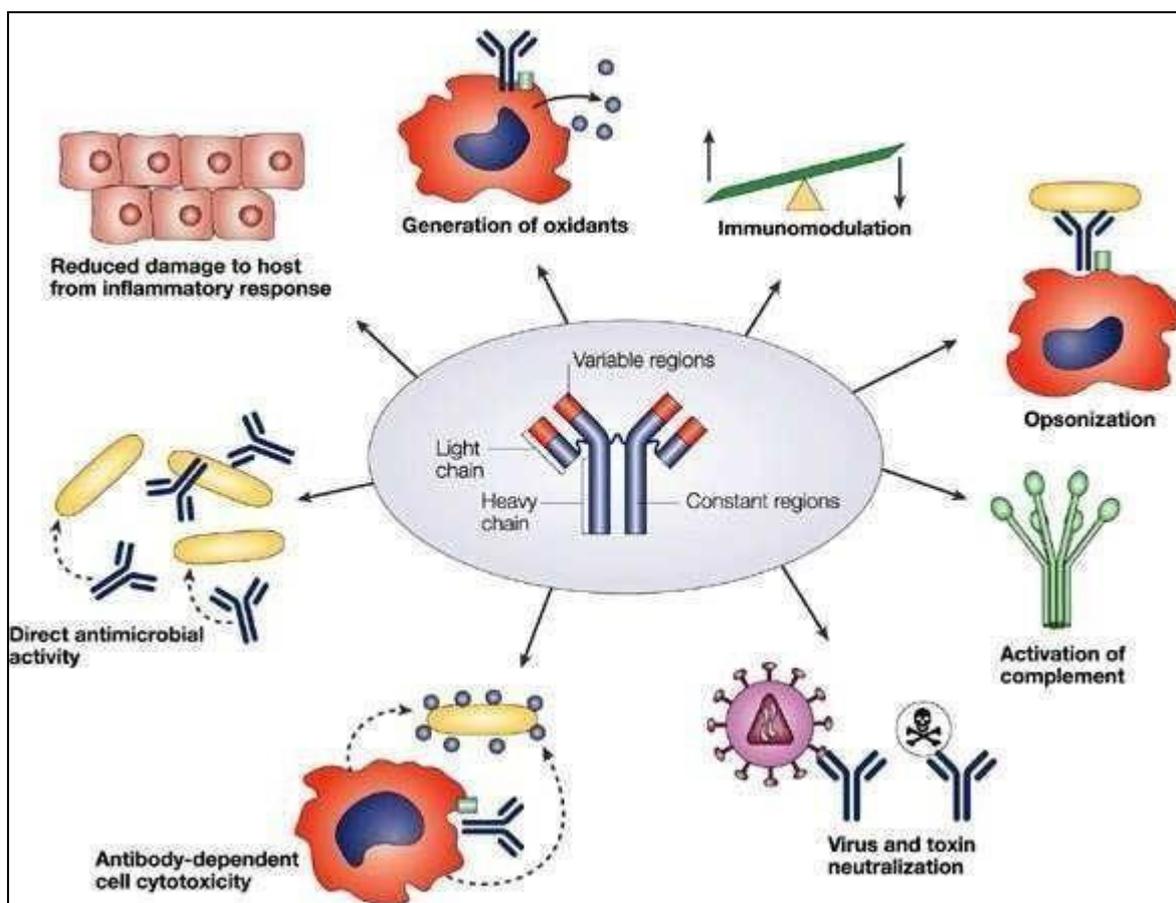
La fixation d'un anticorps neutralisant a pour effet de bloquer l'activité biologique de l'antigène sur sa cible. Ainsi l'inhibition de la liaison de l'antigène (toxines, cytokines, chimiokines, ...) sur son récepteur spécifique va bloquer la voie de signalisation normalement induite. Ces anticorps neutralisants représentent un peu moins d'un tiers des anticorps sur le marché. Les molécules ciblées sont principalement des cytokines comme le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) ou des interleukines (IL-12/IL-23, IL-1, IL-6). On retrouve également un composant du complément (C5) et des facteurs de croissance (VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), et EGFR (Epidermal Growth Factor)). Les anticorps monoclonaux ciblant les toxines ne sont pas encore présents sur le marché mais en cours de développement. En ce qui concerne la neutralisation de virus, les anticorps agissent de la même façon en se fixant à la protéine d'enveloppe responsable de la liaison de la particule virale à sa cible cellulaire, bloquant ainsi son entrée et l'infection de la cellule. Les anticorps peuvent également immobiliser et agglutiner les agents infectieux, et favoriser l'opsonisation et leur destruction (phagocytose, ADCC et CDC) (Mazhoura, 2012).

#### 2.5.1.2. Les anticorps liant un antigène membranaire

Les anticorps liant un antigène membranaire représentent la plupart des anticorps monoclonaux ayant reçu une AMM ou en développement. Dans ce cas, l'anticorps se lie à l'antigène présent à la surface de la cellule cible, et peut déclencher un large type d'effets (Figure 10) (Mazhoura, 2012).

La plupart des cibles des Acm qui ont une AMM (Anticorps monoclonaux membranaires) ou qui sont dans une phase avancée de développement clinique sont des Ag membranaires.

L'effet de l'Acm peut être dû à des mécanismes effecteurs aboutissant à la mort de la cellule cible et/ou à l'induction de mécanismes moléculaires intracellulaires après interaction de l'Ac avec la molécule cible (apoptose, cytotase). L'expression et/ou le comportement de la cible membranaire, en termes de densité, de trafic et/ou de signalisation après interaction avec l'Acm, sont des facteurs déterminants de l'efficacité de ce dernier. Un mécanisme additionnel qui permet à la cellule cible d'échapper à la cytotoxicité dépendante du complément est l'expression à la surface de cette cellule de molécules inhibitrices de l'action du complément [membrane cofactor protein (MCP)/CD46, decay accelerating factor (DAF)/CD55, CD59] (Abés *et al.*, 2009).



**Figure 10.** Les différents effets biologiques des anticorps thérapeutiques (Casadevall *et al.*, 2004).

## 2.6. Optimisation des anticorps thérapeutiques

### 2.6.1. Optimisation des propriétés de liaison à l'antigène

La zone de l'Ac interagissant avec l'épitope est appelée paratope et est localisée au niveau des domaines VH et VL. Six régions, dites hypervariables, localisées au sein de ces domaines variables et appelées CDR (complementarity determining regions), constituent la zone de contact avec l'épitope et confèrent donc la spécificité de liaison à l'Ag. L'interaction épitope-paratope met en jeu des surfaces d'environ 500 à 600 Å<sup>2</sup> (Mariuzza *et al.*, 1987), le nombre d'acides aminés directement impliqués dans la liaison pouvant aller de six jusqu'à une vingtaine. Cette liaison spécifique de l'épitope à son paratope est non covalente et réversible, et met en jeu des interactions énergétiquement faibles mais nombreuses (forces de van der Waals, forces électrostatiques, ponts hydrogènes et/ou interactions hydrophobes (Amzel et poljak, 1979 ; Mariuzza *et al.*, 1987 ). Selon la nature de l'Ag, le paratope peut être de type cavité (interaction avec des petites molécules), de type sillon (interaction avec des peptides) ou encore de type plan (interaction avec des protéines globulaires). Les Ac sont capables de lier une grande variété d'Ag (sucres, lipides, peptides, composés chimiques, etc.). Cependant, un Ac donné ne reconnaît qu'un seul épitope, même si ce dernier peut être partagé par une isoforme, un orthologue ou un Ag différent. Ce partage s'explique soit par la présence de la même séquence d'acides aminés ou d'une séquence très proche, soit par un mimétisme important entre deux molécules qui n'ont structurellement rien à voir l'une avec l'autre. On parle alors de réaction croisée d'un Ac avec d'autres Ag (Marian *et al.*, 1991 ; Oldstone, 1998).

La règle selon laquelle un Ac ne lie qu'un seul Ag semble cependant relative, au moins avec certains anticorps, comme cela a été montré avec l'étude cristallographique d'un Ac anti-haptène (une petite molécule n'induisant la production d'Ac que lorsqu'elle est couplée à une grosse molécule « porteuse »). Il a été en effet montré que cet Ac pouvait se lier aussi à une protéine, non pas du fait d'un mimétisme moléculaire entre l'épitope de cette protéine et l'haptène, mais du fait de l'existence d'isomères d'anticorps préexistants<sup>1</sup> avant toute fixation à l'Ag, ces isomères ayant une capacité de fixation à la protéine ou au haptène (James *et al.*, 2003).

Outre le paramètre d'affinité, la liaison d'un anticorps à un antigène est également caractérisée par sa spécificité. Cet aspect est particulièrement important lorsque l'antigène possède plusieurs isoformes moléculaires ou appartient à une famille protéique caractérisée par des structures et séquences proches. Dans ce cas, il est possible que l'anticorps se fixe significativement à d'autres antigènes, ce qui peut être à l'origine d'effets indésirables toxiques, pour pallier ce problème, les anticorps peuvent être sélectionnés en fonction des réactions croisées qu'ils présentent avec des cibles apparentées, et/ou éventuellement optimisés après

sélection par mutagenèse des régions variables afin de limiter la fixation à d'autres antigènes (Savirtana *et al.*, 1998).

### 2.6.2. Optimisation des fonctions effectrices

Bien que normalement peu efficaces, les fonctions effectrices des AcM aglycosylés peuvent être modulées par modification du fragment Fc. En effet, les AcM glycosylés ont bénéficié d'amélioration de leurs fonctions effectrices par mutagenèse dirigée au niveau du fragment Fc. Par exemple, la mutation S239D/I332E a montré une affinité pour le récepteur FcγRIIIa 100 fois supérieure par rapport à l'AcM non muté (Lazar *et al.*, 2006). Ces mutations ont donc été reprises afin d'améliorer les propriétés des AcM aglycosylés. Ainsi, la mutation N297D qui empêche la glycosylation au niveau de l'Asn 297, a été couplée aux mutations S239D/I332E, ce qui a permis de passer d'une affinité quasi nulle à une affinité égale à 28% de celle du même AcM glycosylé. En couplant la mutation N297D à la mutation A330Y/I332E, l'affinité est augmentée à 43% par rapport à celle de l'AcM glycosylé (Lazar *et al.*, 2009).

L'utilisation d'AcM aglycosylés a également entraîné la découverte de mutations de ces derniers permettant de leur conférer une affinité spécifique pour un type de FcγR, et de sélectionner une activité favorisant l'ADCC ou une activité favorisant la réaction inflammatoire. Ainsi, la double substitution E382V/M428I a induit une affinité spécifique de l'anticorps pour les FcγRI et une affinité quasi nulle pour les autres récepteurs, entraînant une exacerbation de l'ADCC via les cellules dendritiques. En comparaison, le même anticorps glycosylé avait une plus faible ADCC liée aux cellules dendritiques par activation concomitante de plusieurs FcγR, dont le FcγRIIb possédant une action inhibitrice de l'ADCC. La mutation permet donc de stabiliser une conformation particulière permettant à l'AcM de se lier sélectivement au FcγRI lorsqu'il est aglycosylé (Jung *et al.*, 2010).

Cette sélectivité est par ailleurs annulée par l'adjonction d'un oligosaccharide sur l'Asn 297. La mutation M428I améliorerait également la demi-vie de l'AcM. D'autres mutations ont permis de multiplier la demi-vie des AcM aglycosylés par 3 chez le singe, et par 4 chez la souris, telles que les mutations M428L and N434S. D'autres modifications, telle que la double substitution S298G/T299A ont permis d'activer sélectivement les fonctions effectrices de l'AcM via les récepteurs FcγRI, FcγRIIIa et FcγRIIIa sans activer les récepteurs FcγRIIb qui ont des propriétés inhibitrices. Différentes mutations ont été aussi testées sur le Trastuzumab (Herceptin®), notamment la mutation Fc1004 comprenant 5 mutations (S298G/T299A/N390D/E382V/M428L). En comparaison avec le Trastuzumab utilisé en

clinique, le Trastuzumab-Fc1004 a montré une affinité 160 fois supérieure pour le récepteur FcγRIIa, ainsi qu'une sélectivité 25 fois supérieure pour le FcγRIIa par rapport au FcγRIIb (Jung *et al.*, 2013).

### 2.6.3. Optimisation des propriétés pharmacocinétiques et de biodistribution

La demi-vie et la bio distribution des anticorps sont deux paramètres étroitement liés qui dépendent à la fois de l'anticorps (fragment, anticorps entier, murin, humanisé,) et de l'antigène cible (densité, internalisation,). Il est parfois souhaitable d'augmenter la demi-vie pour améliorer l'efficacité, pour diminuer les doses et la fréquence des injections pour réduire les coûts pour optimiser la distribution et la rétention dans les tissus ciblés (Chan et Carter, 2010).

La majorité des AcM est administrée par voie intraveineuse (IV), ce qui permet l'injection de larges volumes et une exposition systémique rapide et complète. Cependant, certains d'entre eux tels que l'adalimumab, l'omalizumab et le palivizumab sont administrés par voie sous-cutanée (SC) ou intramusculaire (IM). En général, après administration SC, les macromolécules d'une taille supérieure à 16 kDa sont majoritairement absorbées par le système lymphatique alors que celles d'une taille inférieure à 2 kDa sont majoritairement absorbées par les vaisseaux sanguins (Tang et Meibohm, 2006). Cependant, le mécanisme d'absorption des IgG après administration SC est encore incertain car il n'a jamais été directement étudié (Wang *et al.*, 2008). Le FcRn pourrait jouer un rôle dans l'absorption SC des AcM car, dans un modèle de souris invalidée pour le FcRn, la fraction absorbée était beaucoup plus faible (28 %) que chez les souris non mutées (83 %) (Wang *et al.*, 2008).

Le ranibizumab est un fragment Fab d'anticorps humanisé anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) qui est administré directement dans le vitré de l'œil dans le traitement de la forme néovasculaire (humide) de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Le ranibizumab passe dans la circulation systémique, bien que ses concentrations sériques soient faibles (Emea, 2008). Le bécacizumab, une IgG1κ anti-VEGF, est également utilisé dans la même indication hors autorisation de mise sur le marché. L'évaluation de cet AcM « complet » dans les modèles animaux a montré que, comme l'AcM Fab ranibizumab, il pénètre dans la rétine après injection intra vitréenne (Heiduschka *et al.*, 2007), et qu'il peut être mesuré dans le sérum, ce qui est compatible avec la présence du FcRn dans les tissus de l'œil, rapportée chez le rongeur (Kim *et al.*, 2008).

### 2.6.4. Optimisation de l'immunogénicité

L'immunogénicité des anticorps thérapeutiques n'est pas toujours facile à prévoir. En

effet, elle dépend à la fois de facteurs liés au produit (séquence primaire, glycosylations, agrégation, impuretés) mais aussi de facteurs inhérents aux patients et/ou à la pathologie (polymorphisme du CMH, âge des patients, maladies auto-immunes, associations médicamenteuses, mode et fréquence d'administration) (Stas et Lasters, 2009). De plus, certains anticorps humains, initialement développés pour limiter l'immunogénicité chez l'homme, induisent toujours un taux élevé de réponses immunitaires (tableau 4) (Hwang et Foote, 2005 ; Stas et Lasters, 2009).

Le contexte pathologique peut influencer la réaction immunitaire du patient à l'administration d'Acm thérapeutiques. Par exemple, en général, un même Acm induira une réponse de moindre intensité s'il est prescrit pour une maladie tumorale (indication pour laquelle beaucoup d'Acm ont été initialement développés) que s'il est utilisé dans un contexte de maladie inflammatoire ou auto-immune (ce qui souvent est une indication secondaire des Acm). Un élément supplémentaire est l'évolution dans le temps de la réponse immune : c'est particulièrement vrai avec les anticorps intégralement humains prescrits dans le contexte de maladies chroniques - donc à long terme - et souvent en association avec d'autres produits susceptibles à leur tour de moduler la réponse immune. De plus, l'immunogénicité de l'adalimumab et de l'infliximab, deux anti-TNF (tumor necrosis factor), est notablement réduite par l'administration concomitante de médicaments rhumatologiques (Baert *et al.*, 2003).

En règle générale, l'induction d'anticorps anti-Acm (réaction HAHA) chez un patient dépend du schéma thérapeutique : l'administration de l'Acm de façon prolongée ou par cures intermittentes répétées dans des affections chroniques induira plus fréquemment une immunisation qu'un traitement de courte durée dans le contexte d'une affection aiguë (Goldstein *et al.*, 1986 ; Schroeder *et al.*, 1989).

Un paramètre déterminant est le degré de « non-soi » que l'organisme hôte attribue à la protéine thérapeutique étrangère. L'organisme considérera ainsi qu'une protéine thérapeutique d'origine bactérienne (staphylokinase par exemple utilisée comme thrombolytique) lui est beaucoup plus « étrangère » qu'une protéine thérapeutique ayant un fort degré d'homologie avec une protéine circulante endogène. C'est une des raisons qui expliquent l'immunogénicité beaucoup plus forte des Acm murins comparée à celle des Acm humanisés et entièrement humains (Hwang et Foot, 2005). La présence d'agrégats et de complexes immuns dans la préparation sont aussi de puissants inducteurs d'une réponse immune anti-anticorps. Les agrégats sont facilement captés par les cellules présentatrices d'antigènes, déclenchant une réponse humorale importante stimulée par l'activation des lymphocytes T *helper* (voir

*Encadré*). Certains variants d'agrégats exposant des motifs structuraux répétés peuvent même provoquer le pontage des récepteurs B, induisant la prolifération des lymphocytes B et l'activation d'une réponse immune indépendamment de l'activation des lymphocytes T (Bachmann *et al.*, 1993).

L'immunogénicité d'un produit se définit par la fraction des patients ayant reçu ce produit qui développent des ADA contre celui-ci. Les méthodes prédictives, qui sont appliquées aux étapes successives du développement préclinique d'un Acm thérapeutique (*Figure 1*) et utilisent des approches *in vitro*, *in silico*, ou *in vivo* peuvent apprécier le degré potentiel d'immunogénicité, et guider l'optimisation de la fabrication. Toutefois, compte tenu de sa variabilité d'expression, la mesure réelle de cette immunogénicité ne pourra se faire qu'une fois le produit administré au patient. Au cours des dernières années, des mises au point et des recommandations ont été publiées sur ce thème de la mesure des ADA chez les patients et lors des étapes précliniques (Gupta *et al.*, 2007 ; Shankar *et al.*, 2008)

**Tableau 4.** Immunogénicité de quelques anticorps thérapeutiques sur marché (Stas et Lasters, 2009).

| Nom de marque / DCI              | Format            | Cible                | Immunogénicité (%) |
|----------------------------------|-------------------|----------------------|--------------------|
| <b>ANTICORPS MURINS</b>          |                   |                      |                    |
| Bexxar / Tositumomab             | IgG murine (IC)   | CD20                 | 9                  |
| Zevalin / Ibritumomab-tiuxétan   | IgG murine (IC)   | CD20                 | 3                  |
| OKT3 / muromonab                 | IgG murine        | CD3                  | 54                 |
| <b>ANTICORPS CHIMERIQUES</b>     |                   |                      |                    |
| Rituxan / rituximab              | IgG chimérique    | CD20                 | 0-65               |
| Erbitux / cétuximab              | "                 | EGFR                 | 5                  |
| Réopro / abciximab               | "                 | GPIIb / IIa          | 4-21               |
| Simulect / basiliximab           | "                 | IL2R                 | <2                 |
| Rémicade / infliximab            | "                 | TNF- $\alpha$        | 6-61               |
| <b>ANTICORPS HUMAINES</b>        |                   |                      |                    |
| Tysabri / natalizumab            | IgG humanisé      | Intégrine $\alpha$ 4 | 7                  |
| Zénapax / daclizumab             | "                 | IL2R                 | 8-34               |
| Synagis / palivizumab            | "                 | RSV                  | <2                 |
| Avastin / bévacizumab            | "                 | VEGF                 | <2                 |
| Soliris / eculizumab             | "                 | C5                   | <2                 |
| Raptiva / efalizumab             | "                 | CD11a                | 2-6                |
| Mylotarg / Gentuzumab ozogamicin | IgG humanisé (IC) | CD33                 | <2                 |
| Campath / alemtuzumab            | "                 | CD52                 | 10-75              |
| Herceptin / trastuzumab          | "                 | HER2                 | <2                 |
| Xolair / omalizumab              | "                 | IgE                  | <2                 |
| <b>ANTICORPS HUMAINS</b>         |                   |                      |                    |
| Humira / adalimumab              | IgG humaine       | TNF- $\alpha$        | 1-87               |

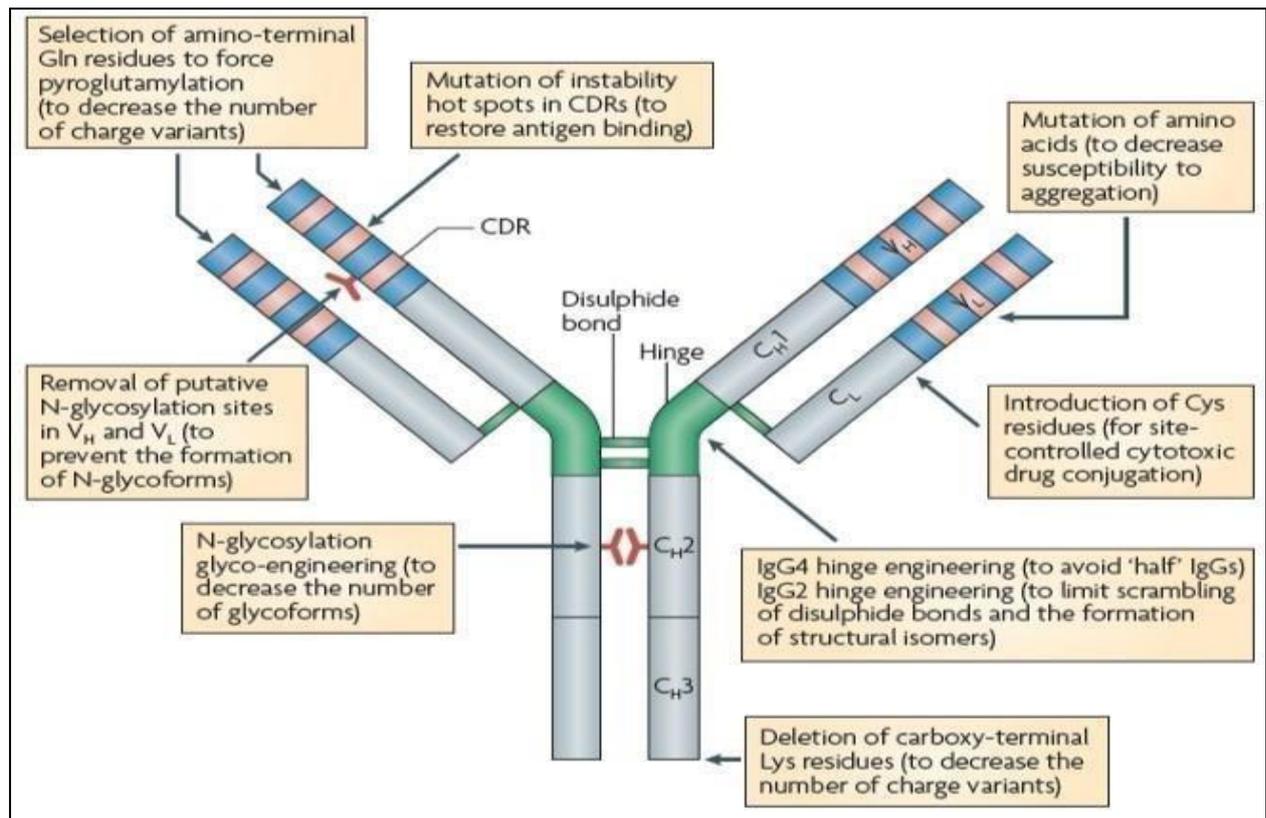
### 2.6.5. Optimisation des propriétés biophysiques

Les anticorps thérapeutiques sont des produits biopharmaceutiques complexes. Le

développement de techniques analytiques fines a permis une meilleure caractérisation de ces protéines et a mis en lumière la présence de multiples microvariants dont l'impact sur l'efficacité la sécurité du produit est encore peu étudié Beck *et al.*, 2010). Certains microvariants de charge ou de structure sont liés à une dégradation physique ou chimique des anticorps et peuvent avoir une influence importante sur la stabilité, la pharmacocinétique, l'immunogénicité et l'activité biologique du produit (Manache *et al.*, 2009).

Des dégradations physico- chimiques classiquement retrouvées pour les anticorps incluent la dénaturation, l'agrégation, l'hydrolyse, la déamidation et l'oxydation (Manache *et al.*, 2009).

L'agrégation constitue une des voies majeures de dégradation des anticorps. Elle est associée à une perte de fonctionnalité mais également au déclenchement de réactions immunitaires. Des zones potentiellement propices à l'agrégation peuvent être identifiées au niveau des régions variables. Par ailleurs, la déamidation est également un phénomène bien caractérisé qui touche les résidus glutamines et asparagines. Ces acides aminés sont transformés en glutamate et aspartate générant ainsi des modifications de charges qui peuvent altérer la conformation et la pharmacocinétique de l'anticorps. Certains motifs particulièrement sensibles à la déamidation ont été identifiés. Afin de limiter l'apparition de tels phénomènes, il est possible d'intervenir à deux niveaux. Soit directement au stade de la production en modifiant, par ingénierie génétique, les séquences responsables de l'agrégation ou de la formation de variants de charge (Beck *et al.*, 2010) (figure 11).



**Figure 11.** Modifications permettant d'améliorer l'homogénéité et les propriétés biophysiques des anticorps (Beck *et al.*, 2010).

**CHAPITRE 03**  
**L'utilisations Des**  
**Anticorps Monoclonaux**

### 1. Anticorps utilisés en diagnostic

Les anticorps sont largement utilisés pour l'identification d'un antigène au sein d'un mélange (liquide biologique, coupe tissulaire, suspension cellulaire, ...) et pour le dosage d'antigènes en solution. L'une des premières applications des anticorps et de l'interaction antigène/anticorps fut et continue d'être à ce jour les immuno dosages pour le diagnostic de marqueurs de maladies (VIH, CMV, ...) ou de marqueurs cellulaires. Les anticorps sont utilisés également dans la recherche fondamentale comme outils et traceurs dans des techniques comme le Western Blot ou l'immuno précipitation. D'autre part, les anticorps ont été utilisés en imagerie médicale. Pour cela, les anticorps ont subi des modifications et ont été chimiquement marqués avec des composés fluorescents, magnétiques, radioactifs et par d'autres variétés de composés. En effet, dès le début des années 1970, plusieurs laboratoires ont étudié la faisabilité de l'utilisation d'anticorps marqués avec des radio-isotopes pour localiser par imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux (Primus *et al.*, 1973), (Mach *et al.*, 1974). Ces recherches ont été étendues au diagnostic de tumeurs chez l'homme (Mach *et al.*, 1983). Le satumomab (Oncoscint®) une IgG radio marquée à l'indium 111, dirigé contre la glycoprotéine TAG-72 est utilisé depuis 1992 pour le diagnostic des récurrences de cancers colorectaux ou ovariens (Pinkas *et al.*, 1999).

Dans l'imagerie, l'utilisation de marqueurs à partir de fragments d'anticorps s'est développée. En 1996, trois fragments d'anticorps et une IgG entière ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). L'arcitumomab (CEA-Scan), un fragment F(ab')<sub>2</sub> marqué au technétium 99m, reconnaît l'antigène carcino embryonnaire (CEA) et est aussi utilisé pour le diagnostic des récurrences de cancers colorectaux (Erb et Nabi, 2000).

Cet anticorps a cependant été retiré du marché européen pour des raisons commerciales. L'imciromab (Myoscint®) marqué à l'indium 111, un fragment Fab dirigé contre la myosine, est utilisé pour le diagnostic des nécroses du myocarde (Sarda *et al.*, 2001). Un autre fragment Fab, le nofetumomab (Verluma®) marqué au technétium 99m dirigé contre une glycoprotéine de 40 kDa est utilisé pour le diagnostic des cancers du poumon à petites cellules (Straka *et al.*, 2000).

Enfin, le capromab (Prostascint®), une IgG entière marquée à l'indium 111, diagnostique les récurrences des cancers prostatiques en se liant à l'antigène membranaire PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) (Murphy *et al.*, 2000). Plus récemment en 2004, le fanolesomab (NeutroSpec®), une IgM entière marquée au technétium 99m, dirigée contre le

CD15 a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux États-Unis pour le diagnostic de l'appendicite (Line *et al.*, 2004). Ce dernier médicament a été retiré du marché américain suite à plusieurs déficiences cardiopulmonaires observées chez certains patients.

## 2. Anticorps utilisés en thérapie

Les anticorps monoclonaux (AcM) ont pris une place de plus en plus importante dans la thérapeutique et plus d'une centaine d'AcM était en développement clinique en 2011. Ces bio-médicaments (protéines recombinantes produites par des cellules en culture) ont une masse moléculaire et des mécanismes d'action très différents des médicaments « classiques », généralement obtenus par synthèse chimique. L'objectif était d'évaluer si les spécificités des AcM, en termes de structure et de mode d'action, ont des conséquences sur leur développement clinique, leur évaluation par les autorités de santé et leur suivi à long terme (tolérance, bon usage et médico-économie). Seuls les AcM « nus », c'est-à-dire non conjugués à un isotope radioactif ou à une toxine, et les immunoglobulines G (IgG) « complètes » ont été discutés, les autres formes d'AcMo constituant des cas particuliers. Par ailleurs, les biosimilaires s'inscrivent dans un contexte très différent. Une précédente table ronde sur les AcM, non dédiée à leur développement clinique, a servi de base aux discussions (Paintaud *et al.*, 2007)

### 2.1. Les anticorps thérapeutiques utilisés en transplantation

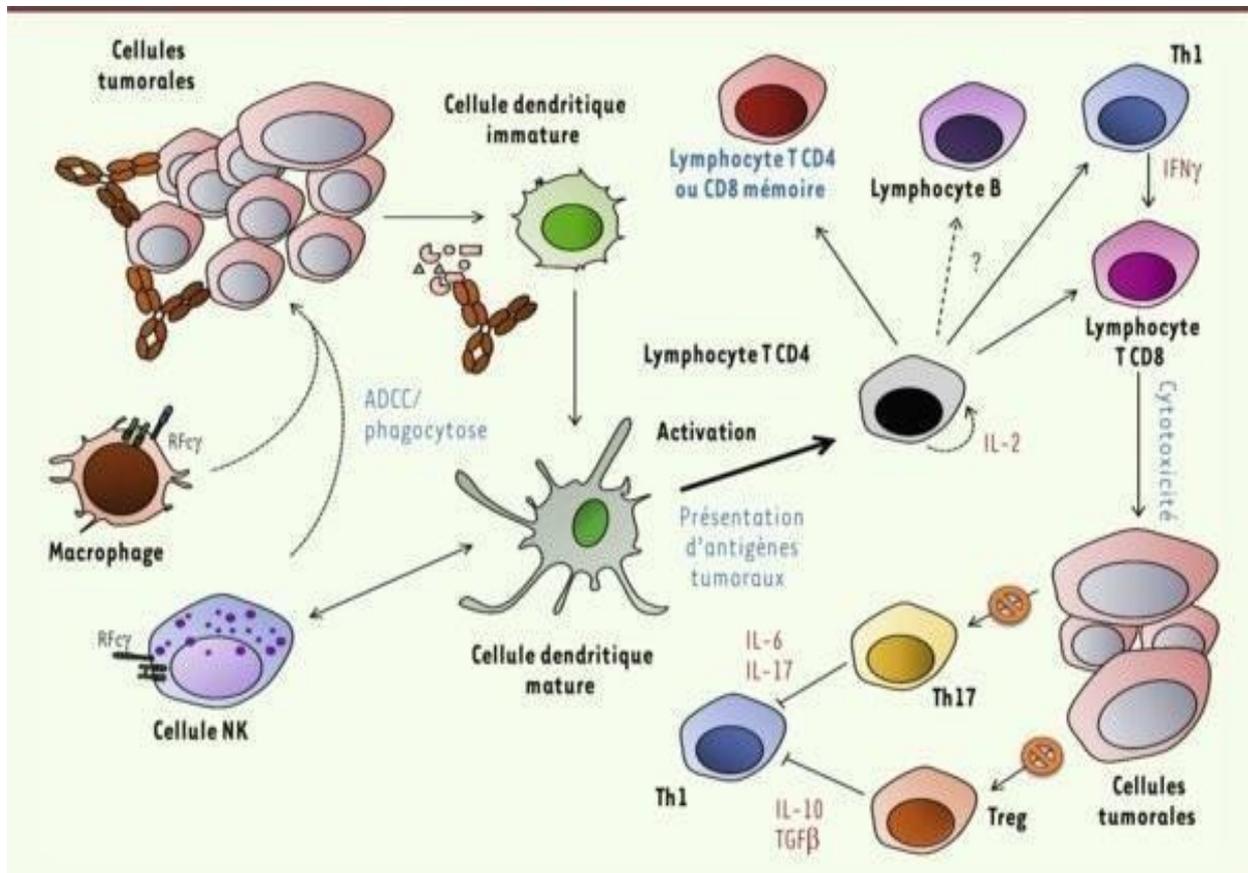
Moins de dix ans après la découverte des hybridomes par Kohler et Milstein en 1975, le premier anticorps monoclonal était injecté chez l'Homme pour prévenir le rejet des greffes. Il s'agissait d'un anticorps dirigé contre la molécule CD3 qui intervient dans la transduction du signal aux cellules T après la reconnaissance de l'antigène. Paradoxalement, en raison d'hésitations pharmaceutiques rétrospectivement injustifiées la classe thérapeutique se développa lentement. Il fallut attendre les années 1990 pour voir émerger d'autres spécificités. Parallèlement, on avait appris à modifier les anticorps par génie génétique pour les humaniser en changeant la majorité des déterminants d'espèce de la souris qui les avait produits par des déterminants humains. Il se révéla même possible de produire des anticorps totalement humains selon plusieurs stratégies faisant appel à des souris transgéniques ou chimériques (homme/souris) ou même à des productions totalement *in vitro* (phage display). Ce fut alors une efflorescence de nouveaux anticorps utilisés dans des indications très variées : toujours la transplantation d'organes (anti-CD2, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD40L), mais également la pathologie infectieuse (anti-respiratory syncytial virus : RSV), les cancers (anticorps anti-CD20 et anticorps dirigés contre les antigènes de tumeur) et les maladies auto-immunes (avec le grand

succès des anticorps anti-TNF). Il s'avère en fait que les anticorps monoclonaux représentent une voie d'approche exceptionnellement efficace dans des domaines où les produits chimiques conventionnels rencontrent des limites difficilement surmontables. Cette action particulière des anticorps monoclonaux tient, à la fois, à leur spécificité très fine pour leurs cibles (qui peuvent être variées à l'infini), mais aussi à leur capacité de donner des signaux positifs à des cellules dont les fonctions ne sont souvent qu'inhibées par les petites molécules. Une illustration de ce mode d'action est l'effet récemment démontré par notre équipe de la restauration de la tolérance au soi par un anticorps anti-CD3 chez des sujets récemment devenus diabétiques et chez qui une rémission très durable de la maladie fut induite après un traitement de seulement une semaine. (Bach, 2008)

## 2.2. Anticorps thérapeutiques utilisés en oncologie

Au cours des vingt dernières années, une meilleure connaissance des mécanismes de l'oncogenèse, de la croissance et de la progression tumorale ont conduit à considérer davantage le cancer sous un angle « moléculaire ». Dans certains cas, la connaissance des anomalies moléculaires impliquées dans le processus de cancérisation a permis de définir des éléments diagnostiques et pronostiques, en complément des données classiques histopathologiques et cliniques. Ces données peuvent aussi être utilisées pour permettre le développement d'agents anticancéreux plus ciblés (immunothérapie). L'effet anti tumoral de ces AcM repose sur des mécanismes parfois très différents, dépendants des molécules ciblées : une première catégorie d'AcM est dirigée contre les cellules tumorales, une seconde contre des molécules modulant l'environnement tissulaire et cellulaire des tumeurs (figure 12). La vision initiale qui prévalait lorsque ces anticorps ont été développés était celle d'une sorte de « sérothérapie monoclonale », une immunothérapie passive (Watier, 2009). Celle-ci reposait sur les capacités de ces anticorps à bloquer l'activation et/ou la prolifération des cellules tumorales (en ciblant par exemple des récepteurs de facteurs de croissance comme le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) ou HER2/neu [erbB-2, human *EGFR2*, epidermal growth factor receptor 2]), à induire une apoptose, même discrète (anti-CD20), ou à interférer avec les capacités d'adhérence des cellules tumorales (AcM ciblant EpCAM, epithelial cell adhesion molecule). Cette immunothérapie passive reposait également sur l'activation des mécanismes effecteurs de l'immunité, comme la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC, antibody-dependent cell cytotoxicity), la phagocytose, ou l'activation de la voie classique du complément aboutissant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire responsable de la mort des cellules tumorales (figure 14). De nombreux efforts d'ingénierie ont été entrepris au cours de la

dernière décennie pour optimiser ces fonctions effectrices, principalement en manipulant la région constante (Fc) de ces anticorps (qui sont principalement des Fc d'IgG1 humaines) (Abés *et al.*, 2009).



**Figure 12.** Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique en oncologie [5]

### 2.2.1. Anticorps ciblant les tumeurs solides

Les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) forment une importante famille de récepteurs transmembranaires présentant une activité tyrosine kinase intra cytoplasmique. Ces récepteurs, dont plus d'une vingtaine de familles différentes ont été identifiées, sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire ou la différenciation.

La famille des human epidermal growth factor receptors (HER) comprend quatre membres, HER1(ou EGFR), HER2 (ou cErB2/neu), HER3 et HER4, impliqués principalement dans la prolifération de cellules normales mais aussi dans la croissance anormale de cellules de certains types de tumeur humaines (Pierre Fumoleau *et al.* , 2007).

Ces récepteurs HER, très impliqués dans le développement tumoral, sont les cibles

idéales de thérapies anticancéreuses. Les anti-RTK sont soit des anticorps monoclonaux, soit des composés chimiques inhibiteurs de tyrosine kinase. Leur utilisation est fondée sur des critères diagnostiques renseignant le niveau d'expression de leurs cibles. Comme il a été rapporté avec les anti-EGFR, ces thérapies peuvent être confrontées à des phénomènes de résistance, liés à des perturbations au niveau des voies de signalisation, du microenvironnement tumoral ou encore du système immunitaire. Ces voies de résistance peuvent être spécifiques d'un type de récepteur ou communes à l'ensemble des RTK (Sridhar K, 2005)

- **Trastuzumab : (Herceptin®)**

C'est un anticorps monoclonal recombinant de type IgG1 humanisé dirigé contre le récepteur transmembranaire HER2. Son utilisation thérapeutique représente une avancée considérable dans le traitement des patientes sur exprimant HER2 en situation aussi bien métastatique qu'adjuvante ou néoadjuvante. Il a d'emblée été utilisé chez les patientes qualifiées de HER2+, soit HER2 (3+) en immunohistochimie (Pierre *et al.*, 2007).

Trastuzumab est indiqué dans le traitement du cancer du sein métastatique, avec surexpression tumorale de HER2.

- **Mécanisme d'action de trastuzumb**

Les deux principaux mécanismes d'action de trastuzumab sont un effet antiprolifératif : il exerce un blocage sélectif des récepteurs HER2 entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale ; et un effet cytotoxique puissant : il fait intervenir les mécanismes immunitaires en augmentant la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante qui entraîne une destruction spécifique des cellules sur exprimant HER2. (Aline, 2009)

Le panitumumab Vectibix® est indiqué en monothérapie pour le traitement des patients atteints de cancer colorectal métastatique exprimant EGFR et présentant le gène KRAS non muté (type sauvage) après échec des protocoles de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, oxaliplatine et irinotecan (Giusti *et al.*, 2007).

- **Panitumumab (Vectibix®)**

Le **panitumumab** est le premier anticorps monoclonal de type IgG2 entièrement humain dirigé contre l'EGFR. Cet agent se lie au domaine extracellulaire de l'EGFR et empêche la dimérisation du récepteur. Cette union conduit à l'internalisation du complexe récepteur-

ligand et empêche l'autophosphorylation EGFR, et l'activation des protéines de signalisation en aval. L'effet net est l'inhibition de la prolifération cellulaire et la croissance tumorale et l'induction de l'apoptose ( Kimmie et ndrew ,2008)

- **Mécanisme d'action de panitumumab**

Le panitumumab se fixe au domaine de liaison du ligand de l'EGFR et inhibe l'autophosphorylation du récepteur induite par tous les ligands connus de l'EGFR. La fixation du panitumumab à l'EGFR a pour effet l'internalisation du récepteur, l'inhibition du développement cellulaire, l'induction d'une apoptose et la diminution de la production d'interleukine 8 et du facteur de croissance endothélial vasculaire (Tim Kruser *et al.* , 2008 )

### 2.3. Anticorps thérapeutiques utilisés en Rhumatologie

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une affection sévère, potentiellement invalidante, dont le traitement est difficile, et parfois décevant (Sany, 2003).

Il existe actuellement deux principaux modes d'action des anticorps thérapeutiques utilisés en rhumatologie. Le premier consiste à neutraliser une cytokine impliquée dans l'immunité ou un facteur de croissance. Le premier anticorps thérapeutique efficace pour traiter les rhumatismes inflammatoires a été un anticorps dirigé contre le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) (Elliott *et al.* , 1994).

D'autres cytokines pro-inflammatoires ont été ensuite ciblées comme l'interleukine (IL)- $1\beta$  avec le canakinumab, ou l'IL-6. Des anticorps dirigés contre leur récepteur, comme le tocilizumab ou le sarilumab, qui reconnaissent le récepteur de l'IL-6, ont également été développés avec succès (McInnes et Schett, 2017). D'autres cytokines plus spécifiquement impliquées dans l'action des lymphocytes représentent également des cibles d'intérêt telles que le B lymphocyte stimulator (BLyS). Ainsi, un anticorps anti-

BLyS (aussi appelé BAFF), le bélimumab, bloque l'activation des lymphocytes B auto-réactifs (Stohl, 2013). Pour bloquer la voie des lymphocytes Th17, dont l'implication dans les rhumatismes inflammatoires a été largement démontrée, il existe plusieurs anticorps (Mease, 2015), dont certains neutralisent directement une ou plusieurs isoformes de l'IL-17, comme le sécukinumab, l'ixékizumab ou le bisékizumab. D'autres agissent plus en amont, en bloquant un des récepteurs de l'IL-23 qui active la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes Th17. L'ustékinumab agit ainsi sur la sous-unité p40 du récepteur, tandis que le guselkumab et le

risankizumab agissent sur sa sous-unité p19. Le deuxième mode d'action consiste à cibler une molécule membranaire spécifique d'une cellule qui peut soit réguler son activation, soit induire sa mort. Le rituximab (RTX) est ainsi un anticorps dirigé contre la molécule de surface CD20 qui est surtout exprimée sur les lymphocytes B après le stade pré-B et avant leur différenciation en plasmocyte (Edwards et Cambridge, 2006).

#### **2.4. Les anticorps thérapeutiques utilisés dans les maladies immunes et inflammatoires et chroniques**

L'étiologie des maladies inflammatoires chroniques d'origine auto-immune comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), la spondylarthrite ankylosante (SPA), le lupus érythémateux systémique (LES), le psoriasis, la maladie de Crohn, ou la sclérose en plaques (SEP) reste énigmatique. Les antigènes responsables de ces maladies sont mal définis comme l'est la hiérarchie de leur implication. En revanche, notre connaissance détaillée des mécanismes intermédiaires d'entretien de l'inflammation et de la destruction tissulaire a permis d'identifier des cibles puis des molécules thérapeutiques, et notamment Acm. (Pennica *et al.*, 1984)

- **Anticorps anti-TNF**

Les gènes codant le TNF $\alpha$  et l'interleukine-1 (IL-1) ont été séquencés en 1984 (Pennica *et al.*, 1984) et les cytokines correspondantes identifiées comme les médiateurs de l'inflammation et de la destruction articulaire (Henderson et Pettifer, 1989). La responsabilité du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 a été ensuite clairement démontrée dans les modèles expérimentaux de maladies articulaires et dans la PR. Les souris transgéniques sur exprimant le TNF $\alpha$  sont atteintes d'une inflammation et d'une destruction poly articulaires. Ces découvertes ont permis de définir ces deux cytokines comme des cibles thérapeutiques intéressantes et les essais cliniques des molécules interférant avec leur action ont confirmé de façon éclatante cette hypothèse. L'infliximab, premier Acm anti-TNF $\alpha$  utilisé dans les années 1990, démontrait son efficacité dans la PR (Elliot *et al.*, 1993), en monothérapie mais surtout en association avec un traitement classique comme le méthotrexate. L'adalimumab, Acm anti-TNF $\alpha$  entièrement humanisé, induisait les mêmes résultats positifs quelques années plus tard. De façon concomitante, l'éta nercept, forme soluble du récepteur du TNF $\alpha$  couplée à un fragment Fc, faisait aussi preuve d'une efficacité franche dans la PR l'effet thérapeutique sur l'inflammation était franc et souvent rapide (2 à 6 semaines en moyenne après l'institution du traitement), et associé à un ralentissement notable de la destruction articulaire (évalué dans les études prospectives à long terme) ; le rapport bénéfice/risque était finalement très favorable malgré le

rôle majeur du TNF $\alpha$  dans la défense anti-infectieuse et anti tumorale qui pouvait faire craindre des effets délétères de type infectieux ou tumoral (Vital et Emery, 2008)

On considère qu'aujourd'hui plus d'un million de patients ont bénéficié d'un traitement anti- TNF $\alpha$  dans la PR, la SPA, mais aussi la maladie de Crohn (où seuls les Acm anti-TNF $\alpha$  sont efficaces mais pas l'éta nercept) (Feldmann et Maini ,2008) . Le bénéfice à long terme de tels traitements est acquis, mais la rémission complète (dont la définition est encore sujet de controverse) est inconstante et justifie le développement d'autres stratégies de blocage de l'inflammation.

- **Anticorps dirigés contre d'autres cytokines**

Le blocage de l'IL-1 était une stratégie théoriquement aussi logique que celle du blocage du TNF $\alpha$ . Dans l'inflammation chronique articulaire, les modèles expérimentaux tendent à montrer que l'IL-1 agit plus en aval que le TNF $\alpha$  et favorise directement et de façon plus importante la destruction ostéocartilagineuse. Le développement clinique d'un traitement ciblant l'IL-1 a abouti à la conception non pas d'un Acm mais d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 (anakinra) qui, à l'usage, a révélé un effet clinique moins spectaculaire que celui des anti-TNF $\alpha$  sur l'inflammation et la destruction articulaires. Depuis peu, un Acm anti-IL-1 $\beta$  fait l'objet d'essais cliniques, cette fois plus prometteurs. Il faut noter que le dénosumab, Acm dirigé contre RANK-L (qui est responsable de l'activation ostéoclastique dans l'ostéoporose et les maladies inflammatoires comme la PR) est aussi en phase d'essais cliniques (Brennan et Innes ,2008)

L'IL-6, induite par le TNF $\alpha$  et l'IL-1, connue pour son rôle d'activation des protéines hépatiques de la phase aiguë de l'inflammation, est la cytokine inflammatoire la plus abondante dans l'articulation. Le tocilizumab, Acm dirigé contre la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-6, est d'une efficacité comparable à celle des Ac anti-TNF $\alpha$  dans la PR. (Gallois *et al.* ,2009)

## 2.5. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques utilisés en allergies

La première phase de l'allergie est une phase « silencieuse ». Elle se traduit par la production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B à la suite d'un premier contact avec l'antigène, qui est alors défini comme allergène. On parle de phase de sensibilisation. La production des IgE dépend directement de l'interaction entre les cellules B et T et notamment de la production d'IL-4 (interleukine 4), IL5 (interleukine 5), IL6 (interleukine 6), IL10 (interleukine 10) et d'IL-13 (interleukine 13) par les cellules T auxiliaires de type 2 (TH2). En effet, ces cytokines sont responsables de la commutation isotypique vers les IgE. L'induction

d'une réponse TH2 dépend de nombreux facteurs tels que la prédisposition génétique (atopie), l'environnement, l'hygiène. (hrirou , 2011)

Les IgE fixées sur leur récepteur attendent un second contact avec l'allergène : aucun signe clinique n'est apparent.

Lors du second contact avec l'allergène, celui-ci va être reconnu par les IgE fixées sur les récepteurs membranaires RFcεI des mastocytes et des basophiles. Il se fixe par deux épitopes distincts sur deux IgE présentes à la surface membranaire, créant ainsi un pontage des IgE. Ce pontage induit l'activation des cellules effectrices (mastocytes et basophiles) par induction d'un flux calcique qui entraîne la libération d'un ensemble de médiateurs (hrirou , 2011).

- Des médiateurs préformés, en particulier l'histamine qui résulte de l'exocytose du contenu granulaire, et des protéases.
- Des médiateurs néoformés (prostaglandine D2, leucotriène C4 et facteur d'activation des plaquettes) synthétisés à partir de l'acide arachidonique.

Ces médiateurs conduisent à l'apparition rapide de signes cliniques de la réaction d'hypersensibilité immédiate, c'est-à-dire dilatation des vaisseaux, oedème muqueux, contraction du muscle lisse bronchique (Lucie, 2005)

A l'heure actuelle, seul un anticorps monoclonal anti-IgE (omalizumab) a bénéficié d'une autorisation aux Etats-Unis pour le traitement des asthmes allergique modérés à sévères chez l'adulte et l'adolescent

- **Omalizumab (Xolair®)**

L'omalizumab est un anticorps monoclonal de souris (IgG) humanisé à 95% pour éviter la sensibilisation des patients aux protéines de souris, dirigé contre le segment Fc de l'IgE humain, par lequel celui-ci se fixe aux récepteurs (Michils et Sternon, 2005).

L'omalizumab se fixe aux IgE circulantes et empêche leur fixation sur les récepteurs de haute affinité (FcεRI) des cellules effectrices. Ils réduisent ainsi la quantité d'IgE circulantes pouvant déclencher les réactions allergiques immédiates et retardées. Donc l'inhibition de la libération subséquente des médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, les leucotriènes et les cytokines. De plus, le médicament ralentirait l'activité des mastocytes et des polynucléaires

basophiles (Christoph *et al.*,2004).

# **Conclusion**

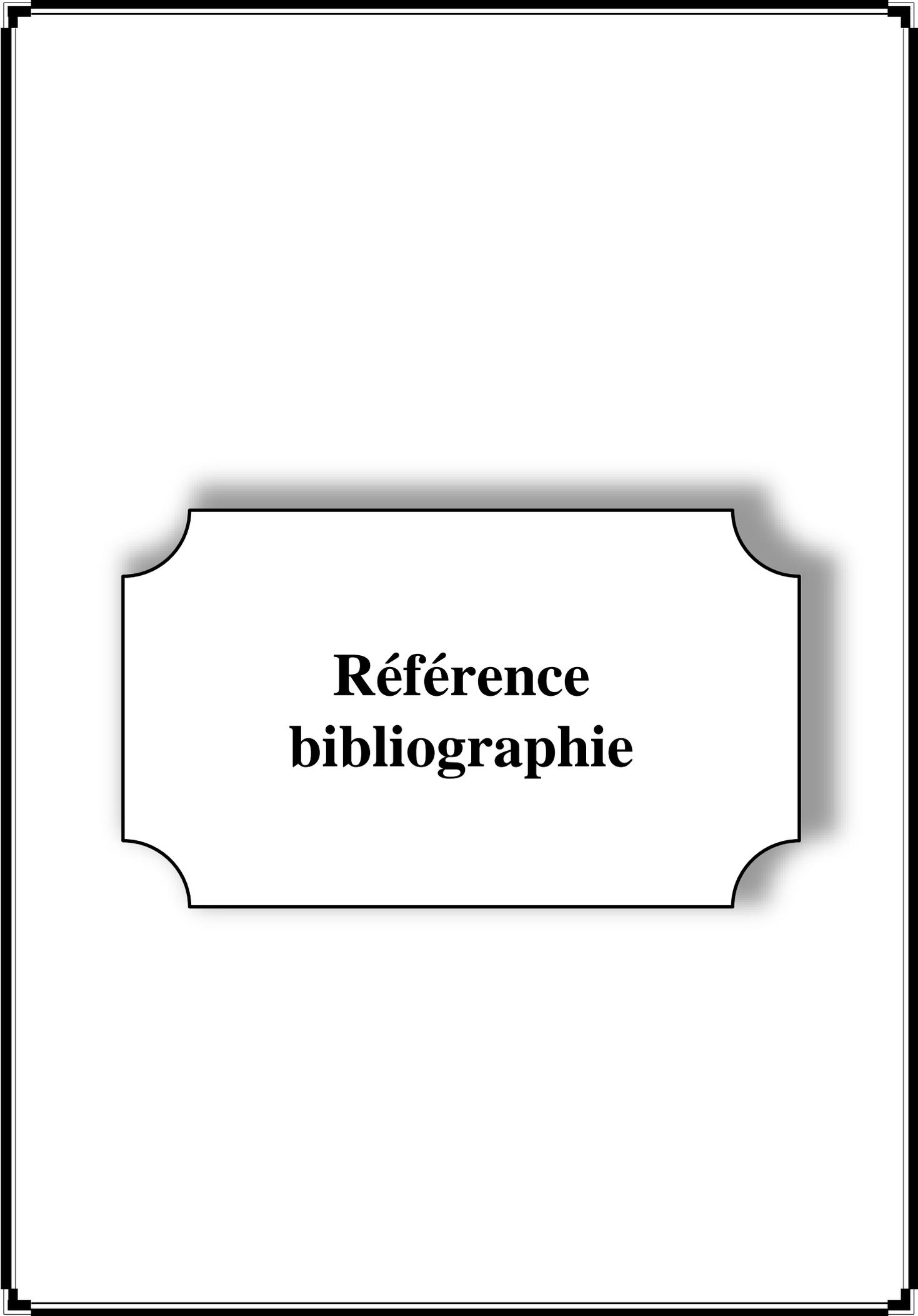
### Conclusion

Les anticorps, produits en réponse à la présence d'un agent du non-soi dans l'organisme, se sont révélés être des outils remarquables en médecine, pour traiter différentes maladies. En effet, des années de recherche ont permis de modifier et d'améliorer ces molécules en faisant d'elles d'excellentes candidates thérapeutiques. Leur grande spécificité et affinité en font des outils bien adaptés pour la cancérologie et la neutralisation des toxines.

Aujourd'hui, plusieurs formes d'anticorps thérapeutiques sont disponibles : les anticorps murins, les anticorps chimériques, les anticorps humanisés et les anticorps totalement humains. En raison de l'absence d'effets secondaires provoqués à leur administration à l'Homme, les anticorps totalement humains semblent être le meilleur candidat pour cette application (Mazhoura, 2012).

L'histoire de l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux est encore relativement récente. Après une phase initiale d'intérêt, il y eut environ deux décennies de doutes et de déceptions. Au bout de ces deux décennies et grâce à l'obstination des scientifiques et des médecins, il s'avère que les thérapies innovantes fondées sur la manipulation du système immunitaire viennent modifier le pronostic de certaines pathologies tumorales. En effet, la mise au point de la technique d'obtention d'anticorps monoclonaux par Georges Kohler et Cesar Milstein en 1975 a représenté un grand pas en avant pour la biologie et la biologie clinique. Jusqu'à l'arrivée de la technique des anticorps monoclonaux, il était très difficile de produire, d'isoler et de purifier des anticorps tous réellement identiques. En thérapie, des mélanges d'anticorps, tels que les sérums antitétaniques, sont utilisés depuis longtemps. Le problème majeur de ces sérums est la difficulté à garantir une composition et donc une efficacité constante. De plus, ces substances provoquent parfois des réactions allergiques très graves (Aline, 2009).

Des progrès significatifs ont été accomplis avec la mise au point d'anticorps chimériques, puis humanisés, et enfin totalement humains, d'action plus ciblée et aux effets indésirables beaucoup moins importants. Ce n'est qu'en 1986 que le premier anticorps monoclonal, l'orthoclone OKT3, obtient son autorisation de mise sur le marché dans le domaine thérapeutique de la transplantation. Désormais, la recherche a permis la mise sur le marché d'anticorps monoclonaux utilisés dans des domaines thérapeutiques aussi divers que les maladies inflammatoires, utilisation en transplantation, en cancérologie, en rhumatologie et en allergie ...etc . Les anticorps monoclonaux apparaissent donc une nouvelle arme thérapeutique appelée à se développer dans le futur, associé à d'autres traitements (Aline, 2009).



**Référence  
bibliographie**

### Références Bibliographiques

- ✗ **Abès R., Dutertre C.ET Teillaud JL.** (2009) : Les anticorps : mieux les connaître pour mieux s'en servir. *Med Sci (Paris)* ; 25 : 1011–1019.
- ✗ **Abès R., Dutertre CA.ET . Teillaud GL.**(2009) : [Antibodies: better knowledge for a better use]. *Med Sci (Paris)*, v. 25, p. 1011-9.
- ✗ **Aline Schindele** . (2009) : Les Anticorps Monoclonaux hal-01739115 de la Production à l'utilisation en Oncologie. hal-01739115 ; 61 – 169 P .
- ✗ **Bach J f.** ( 2008) : Les anticorps monoclonaux thérapeutiques . la France ,paris.
- ✗ **Bachmann MF., Rohrer UH.ET Kundig TM** : (1993).The influence of antigen organization on B cell responsiveness .*Science*.51–1448 : 262 ;
- ✗ **Baert F., Noman M.ET Vermeire S.**(2003) : Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* ; 348 : 601–8 .
- ✗ **Barski G., Sorieuil S.ET Cornefert F.** (1960) [Production of cells of a « hybrid » nature in culturs in vitro of 2 cellular strains in combination]. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci* ; **251**: 1825-1827.
- ✗ **Baty D .ET Chames P.** 2006 : Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie.*Immuno-analyse et Biologie Spécialisée* ; 21 : 255-263.
- ✗ **Beck A., Wurch T., Bailly C .ET Corvaia N.** (2010) : Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol* ; 10:345-352 .
- ✗ **Bengtén E., Wilson M., Miller N., Clem LW., Pilström L. Et Warr GW.** (2000) : Immunoglobulinisotypes: structure, function, and genetics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* ; 248:189-219.
- ✗ **Bertrand Allard.**(2012) : production et caractérisation polyclonales d'anticorps polyclonales et monoclonales ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers . thèse doctorale, université paris-sud 11 , 239p
- ✗ *Biochem J* ;46:479-484.
- ✗ **Bourel Dominique .ET Jean-Luc Teillaud.** (2006) : Anticorps monoclonaux : tourset détournement technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques : *C. R. Biologies*; 629: 239–220 p.
- ✗ **Brennan F . ET Mc Innes IB.**(2008) : Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* ; 118 : 3537–45 p.
- ✗ **Campbell AM.**( 1996 ) : Production and purification of antibodies, in Diamandis EP ET ChristopoulosTK Ed. *Immunoassay*. Academic Press, Californie ; 95-115 p.
- ✗ cancer therapy .*Critical Reviews in Oncology:Hematology* 23–17 : 38; p.
- ✗ **Casadevall A., Dadachova E .ET Pirofski LA.** (2004) : Passive antibody therapy for

infectiousdiseases.: Nat Rev Microbiol, v. 2, p. 695-703.

- ✎ **Chames P., Van Regenmortel M., Weiss E. et Baty, D.**(2009) : Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, *British Journal of Pharmacology* ; 157:220–233.
- ✎ **Chan AC.ET Carter PJ.** : (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* ; 10:301-316.
- ✎ **Chen K., Xu W., Wilson M., He B., Miller NW., Bengtén E. et al.** (2009) : Immunoglobulin Denhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol* ; **10**: 889-898.
- ✎ **ChenK. Et CeruttiA.** (2011): The function andre gulationofimmunoglobulin D.*Curr.Opin.Immunol*; **23**:345-352.
- ✎ **Christelle Souriau., The Duc Hua., Marie-Paule Lefranc . Et Mylène Weill.** ( 1998) Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. médecine/sciences ; 14 : 300-9.p
- ✎ **Christoph Aebi., Barazzone C., Günthardt J., Hammer J., Kind C. ET Nadal D.**(2004) :. Consensus concernant la prévention des infections par le virus respiratoire syncytial (VRS) avec l'anticorps humanisé monoclonal palivizumab (Synagis®).; 6 (15): 17-19 p.
- ✎ **Clark M.** 2000 : Antibody humanization: a case of the «Emperor's new clothes». *Immunol Today*; 21 : 397-402.
- ✎ **Clément Bardet** .(2012) : Les anticorps monoclonaux : pharmacothérapie et place dans lathérapeutiqueactuelle . Thèse doctorale, université de Limoges ; 151p.
- ✎ **Cosimi AB., Burton RC., Colvin RB., Goldstein G., Delmonico FL., LaQuaglia MP. Et al.** (1981): Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody *Transplantation*. 539-32:535;
- ✎ **Dennis K., Flaherty .ET Ph.D : Immunology For Pharmacy, Elsevier Mosby,** 2012.
- ✎ **Dennis K., Flaherty.ET Ph.D.** ( 2012) : Immunology For Pharmacy, Elsevier Mosby .
- ✎ **Desgranges C.** (2004) : Anticorps monoclonaux et thérapeutique, *Pathol Biol* ; 52:351-364.
- ✎ **Douillard., S. Carrel. Et M. Herlyn.** (1983) : Tumor localization in patients by radiolabeled monoclonal antibodies against colon carcinoma. : *Cancer Res* ; v. 43, p. 5593-600.
- ✎ **Dudley DD., Chaudhuri J., Bassing CH. ET Alt FW.** (2005) : Mechanism and control of V(D)Jrecombination versus class switch recombination . similarities and differences *Adv .Immuno*11-43 :**86** ;
- ✎ **Duty JA., Szodoray P., Zheng N., Koelsch KA., Zhang Q., Swiatkowski M. et al.** (2009) : Functional anergy in a subpopulationof naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med* ; **206**:139-151 .
- ✎ **Edwards JC.ET Cambridge G.** (2006) : B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* ; 6: 394–403 .

- ✗ **Ehrenstein MR. Et Notley CA.** (2010): The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol* ; **10**: 778-786
- ✗ **Eibl M M .** (2008) ; History of immunoglobulin replacement. *Immunol Allergy Clin North Am* ;28 : 737-64 p.
- ✗ **Elalaoui Y.** (2005): L'immunothérapie anticancéreuse l'exemple des anticorps monoclonaux. Thèse pharmacie ; faculté de médecine et de pharmacie Rabat : No13.
- ✗ **Elliot MJ., Maini RN.ET Feldmann M.**(1993) : Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha; 36 : 1681–90 p.
- ✗ **Elliott MJ., Maini RN.ET Feldmann M.** (1994) :Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis ; 344: 1105–1110.
- ✗ **EMA.** (2008) : Avastin product information. Human Medicines.
- ✗ **Erb, D. A., Et H. A. Nabi.** (2000) : Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers.
- ✗ **Fagraeus A .** (1948) : Antibody production in relation to the development of plasma cell. *Acta Med. Scandinav. Suppl* ;204 p .
- ✗ **Feldmann M. ET Maini RN.**(2008) :Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. ; 223 : 7–19 p.
- ✗ **Gallois A .,Mazzorana M .,Vacher J.ETJurdic P:** (2009) vision globale et intégrée du tissu squelettique et du système immunitaire. *Med Sci(Paris)* ; 25 : 259–65p.
- ✗ **Geha RS.** (1981) : Regulation of the immune response by idiotypic-antiidiotypique interactions. *N. Engl. J. Med* ;**305**:25-28 .
- ✗ **Giusti RM ., Shastri KA ., Cohen MH ., Keegan P. ET Pazdur R.** ( 2007 ) : FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix). *Oncologis* ;12(5): 577-83 p.
- ✗ **Goldsby RA ., Kindt TJ. ET Osborne BA.** 2003 : Immunologie: Le cours de Janis Kuby. Dunod,Paris ; 104-109 p.
- ✗ **Goldstein G ., Fuccello AJ.ET Norman DJ .** (1986) : OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3. *Transplantation* ; 42 : 507–11.
- ✗ **Goubet Anne-Gaëlle., Lisa Derosa., Aurélien Marabelle.ET Laurence Gupta S ., Indelicato SR.ET Jethwa V.**(2007) : Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics, *J Immunol Methods* ; 321 : 1–18.
- ✗ **Habti N :** (2007) : Biotechnologie des anticorps. Les technologies de laboratoire :32-17 p.
- ✗ **Heiduschka P ., Fietz H.ET Hofmeister S .** (2007) : Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* ; 48 : 2814–23.

- ☒ **Henderson B.ET Pettifer ER.(1989)** : Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour
- ☒ **Hrirou ibrahim .(2011)** :les anticorps monoclonaux thérapeutique .thèse doctorale ,université Mohammed V –souissi ,maroc ;106 p.
- ☒ **Hudson PJ .ET Souriau C. 2003** : Engineered antibodies. *Nat Med* ; 9 : 129-134
- ☒ **Hwang WYK . ET Foote J . (2005)** : Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* ;36 : 3-10.
- ☒ **Hwang WYK Et Foote J. (2005)** : Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* ;36:3-10P.
- ☒ in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis .*Curr Opin Rheumatol*.133–127 :27 ; .
- ☒ **J. Sany : Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. Conception actuelle . John LibbeyEurotext, Paris(2003)**
- ☒ James LC ., Roversi P. ET Tawfik DS.(2003 : )Antibody multispecificity mediated by conformational diversity .*Science*.7–1362 : 299 ;
- ☒ Jone PT., Dear PH., Foote J., Neuberger MS Et Winter G. (1986) : Replacing the complementary- determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* ;321 :522-525 P.
- ☒ Jung T., Kelton W., Kang H., Andersen T., Sandlie I., Sarkar A.ET al . (2013) : Effective phagocytosis of low Her2 tumor cell lines with engineered aglycosylated IgG displaying high FcγRIIIa affinity and selectivity. *ACS Chem Biol* ; 8:368-375.
- ☒ -Jung T., Reddy T., Kang H., Borrok J., Sandlie I ., Tucker W.ET al.(2010) : AglycosylatedIgG variants expressed in bacteria that selectively bind FcγRI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc Nat Acad Sci U S A* ; 107:604-609.
- ☒ Kaplon H .ET Carnoy C. (2015) : Acthera : Guide des anticorps monoclonaux et protéinesde fusionà usage thérapeutique.
- ☒ Keller M A . ET Stiehm E R .( 2000) : Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* ;13 :602-14 p.
- ☒ Kim H ., Fariss RN.ET Zhang C. (2008) :Mapping of the neonatal Fc receptor in therodenteye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* ; 49 : 2025–9.
- ☒ Kimmie Ng . ET ndrew X.( 2008) :Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 65 ;8–20 p.
- ☒ Kohler G . ET Milstein C.( 1975) : Continuous cultures of fused cells secreting antibody ofpredefined specificity. *Nature* ; 256 : 495-497 .
- ☒ Köhler G ET Milstein C. (1975) : Continuous cultures of fused cells secreting antibody ofpredefined specificity. *Nature* ; 256:495-497.

- ✕ Lazar A., Chirino J., Dang W., Desjarlais R., Doberstein K., Hayes J. ET al. (2009) : Optimized Fc variants and methods for their generation. US Patent :20090092599.
- ✕ Lazar A., Dang W., Karki S., Vafa O., Peng S., Hyun L. ET al. (2006) :Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc Natl Acad Sci USA ; 103:4005-4010.
- ✕ Leach J., Sedmak D., Osborne J., Rahill B., Lairmore M. Et Anderson C. (1996): Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal- fetal antibody transport. *The Journal of Immunology* ; **157**: 3317-3322.
- ✕ Leder P.( 1982) : The genetics of antibody diversity. ;246(5):102–115 p.
- ✕ Leenaars M . ET Hendriksen CF.(2005) : Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies . evaluation and recommendations. ILAR J ; 46 : 269-279p.
- ✕ Leenaars M .ET Hendriksen CF. (2005) : Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. ILAR J ; 46 :269-279 p.
- ✕ Leenaars M .ET Hendriksen CF.(1999) : The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM Workshop 35. ATLA : 79-95p.
- ✕ Legros Valentin.(2016) : Les modifications post traductionnelles des nouvelles générations d'anticorps monoclonaux : glycosylation et conjugaison à des molécules thérapeutiques . Thèse Doctorale, université de lille 2 ; 91p.
- ✕ Line, B. R., R. J. Breyer., K. D. McElvany., D. C. Earle. Et M. B. Khazaeli. (2004) : Evaluation of human anti-mouse antibody response in normal volunteers following repeated injections of fanolesomab (NeuroSpec), a murine anti-CD15 IgM monoclonal antibody for imaging infection. : Nucl Med Commun ; v. 25, p. 807-11.
- ✕ Liu J. K.H .( 2014) : The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations, *Annals of Medicine and Surgery* ; 3:113-116.
- ✕ Mach ., J P., Carrel S., Merenda C., Sordat B. ET Cerottini J C ( 1974) : In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. *Nature* ;248 :704-6 p.
- ✕ Mach, J. P., J. F. Chatal., J. D. Lumbroso., F. Buchegger., M. Forni., J. Ritschard., C. Berche., J.Y.
- ✕ Male DK., Brostoff J., Roitt IM., Masson PL., Issy les moulineaux . Et Elsevier M
- ✕ Manache L., Dulieu C .ET Boussif O. (2009) : [Therapeutic antibodies: importance of galenics for efficacy and safety]. *Med Sci (Paris)* ; 25:1063-1069.
- ✕ Marian IS., Bradwell AR.ET Olson AJ. (1991) : Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol* ; 217 : 133–51.

- ✎ Marie-Paule LEFRANC., Mylène WEILL., The Duc HUA., Christelle SOURIAU. ET Gérard LEFRANC. (2013) :Présentation à la surface de phages filamenteux . les multiples applications du phage display. Last updated.
- ✎ Marion Rouault . (2017) : Des balles magiques de Paul Ehrlich aux anticorps monoclonaux dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde . Thèse doctorale , université Bretagne Loire , 149p.
- ✎ Marion Rouault. (2017) : Des balles magiques de Paul Ehrlich aux anticorps monoclonaux dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Thèse doctorale, université Bretagne Loire ;149p.
- ✎ Mariuzza RA ., Philips SE. ET Poljack RJ.(1987) : The structural basis of antigen-antibody recognition. *Annu Rev Biophys Biophys chem* ; 16 : 139-59 .
- ✎ Mazhoura Ait Mebarek .(2012) : Nouvelles approches méthodologiques pour l'obtention d'anticorps humains monoclonaux. *Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI* ; 27 P .
- ✎ McInnes IB .ET Schett G. (2017) : Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis; 389: 2328–2337.
- ✎ Michel Cogné., Sophie Duchez. ET Virginie Pascal. ( 2009) : Transgénèse animale Ethumanisation des anticorps ; *Médecine sciences* ::1149-54 p.
- ✎ Michils . ET J. Sternon.(2005) L'omalizumab (Xolair®), un anticorps monoclonal anti-IgE pour traiter l'asthme sévère. *Rev Med Brux* ; 27 : 167-172.
- ✎ Mistretta V ., Cavalier E. ET Collette J . ( 2009) : Intérêt des anticorps monoclonaux dans le laboratoire d'analyses médicales. *Rev Med Liège* ;64 : 257-263.
- ✎ Mistretta V., Cavalier E., Collette J., et J.P. ChaPelle .( 2009): Intérêt des anticorps monoclonaux dans le laboratoire d'analyses médicales. *Rev Med Liège*; 64 : 248-252 p .
- ✎ Morisson SL., Johnson MJ., Herzenberg LA Et Oi VT.(1984) : Chimeric human antibody molecules : mouse antigen-binding domains with human constant domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ;81 :6851-6855.
- ✎ Mould DR .ET Sweeney KR. , 2007 : The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies - mechanistic modeling applied to drug development? *Curr Opin Drug Discov Devel* ; 10 : 84-96.
- ✎ Moutschen M, ET scheen AJ.(2009) : bases immunologiques a la compréhension du concept d'anticorps monoclonal; 64 : 5-6 : 237-243.
- ✎ Murphy, G. P., P. B. Snow., J. Brandt., A. Elgamal. Et M. K. Brawer. (2000) : Evaluation of prostate cancer patients receiving multiple staging tests, including ProstaScint scintiscans. : *Prostate* ; v.42, p. 145-9.
- ✎ necrosis factor alpha in the rabbit. evidence for synergistic interactions between cytokines *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 75 ; 306–10 .

- ✕ Nelson AL., Dhimolea E. ET Reichert JM.(2010) :Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*; 9(10):767e74.
- ✕ Oldstone MB . (1998) : Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* ; 12 : 1255–65.
- ✕ Orlandi R., Güssow DH., Jones PT. Et Winter G. (1989) : Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ;86:3833-3837 p.
- ✕ P. G. Steg., and D. Le Guludec. (2001) : Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms. : *J Am Coll Cardiol* ; v. 37, p. 786-92.
- ✕ Paintaud G., Tonelli D. ET Postaire E.(2007) : Biothérapies des médicaments comme les autres Therapies ; 62: 229-34p .
- ✕ Pennica D., Nedwin GE.ET Hayflick JS .(1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure. expression and homology to lymphotoxin; 312 : 724–9 p.
- ✕ Pierre Fumoleau ., Mario Campone ., Bruno Coudert., Françoise Mayer., Laure Favier . ET Emanuelle Ferrant. (2007) / Cancer du sein et ciblage des récepteurs ErbB. *Bull Cancer* 94 ;147-170 P.
- ✕ Pinkas, L., P. D. Robins., L. A. Forstrom., D. W. Mahoney., and B. P. Mullan. (1999) : Clinical experience with radiolabelled monoclonal antibodies in the detection of colorectal, and ovarian carcinoma recurrence and review of the literature. : *Nucl Med Commun* ; v. 20, p. 689-96.
- ✕ Porter RR . (1950) : A chemical study of rabbit antiovalbumin. *Biochem J* ;46:473-478 p.
- ✕ Porter RR. (1950) : The formation of a specific inhibitor by hydrolysis of rabbit antiovalbumin.
- ✕ Primus, F. J., R. H. Wang., D. M. Goldenberg. Et H. J. Hansen. (1973) : Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen. : *Cancer Res* ; v ,33 .p.82-2977 .
- ✕ Prin-Mathieu C .,Aguilar P . ET Béné MC. ( 2003) :Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques. *Rev Française des Labo* :31-39.
- ✕ Riechmann L ., Clark M., Waldmann H.ET Winter G. 1988 : Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* ; 332 :323 327.
- ✕ Roguska MA., Pedersen JT., Keddy CA., Henry AH., Searle SJ . ET Lambert JM. (1994) : Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ;91:969-973P.
- ✕ Sarda, L., P. Colin., F. Boccarda., D. Daou., R. Lebtahi., M. Faraggi., C. Nguyen., A. Cohen.,
- ✕ Saviranta P., Pajunen M., Jauria P., Karp M., Pettersson K.ET Mäntsälä P .ET Lövgren T . (1998) : Engineering the steroid-specificity of an anti-17beta-estradiol Fab by random mutagenesis and competitive phage panning. *Protein Eng* ; 11:143-152 .

- ☒ Scheen AG (2009) : nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux ; *RevMed Liège*; 64 : 5-6 : 244-247.
- ☒ Scheen AJ .ET Moutschen M.( 2009) Editorial : Les anticorps monoclonaux enthérapeutique. *Rev Med Liège* ; 64 : 233-236.
- ☒ Scheen AJ. (2009) : Nomenclature internationale des différents types d'anticorpsmonoclonaux. *Rev Med Liège* ; 64 : 244-247.
- ☒ Scheen AJ .ET Moutschen M. 2009 : Editorial. Les anticorps monoclonaux enthérapeutique. *RevMed Liège* ; 64 : 233-2.
- ☒ Scheen AJ. ( 2009) : Nomenclature internationale des différents types d'anticorpsmonoclonaux. *RevMed Liège* ;64 :244-247p.
- ☒ Schroeder HW . ET Cavacini L . (2010) : Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy .Clinical. Immunology* ;**125**: 41-52 p.
- ☒ Schroeder TJ., First MR.ET Hurtubise PE.(1989) : Immunologic monitoring withOrthoclone OKT3 therapy. *J Heart Transplant* 1989; 8 : 371–80.
- ☒ Schroff RW., Foon KA., Beatty SM., Oldham RK. Et Morgan AC Jr . (1985) : Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* ; 45: 879-885.
- ☒ Shankar G ., Devanarayan V .ET Amaravadi L. (2008) : Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Biomed Anal online*.
- ☒ Siberil S ., Dutertre CA. ET Boix C : )2005 (..Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : unpeu d'histoire ,beaucoup d'ingénierie ,et ... quelques succès cliniques .*Transf Clin Biol* : 12 ;122-114P.
- ☒ Smolens J.(1961) : The persistence in the human circulation of horse and human tetanus antitoxins : 899-902 p.
- ☒ Sridhar K : )2005( .Antitumor activity of HER-2 inhibitors .*Cancer Letters* 23–9; p.
- ☒ Stas P . ET Lasters I. (2009) : Immunogenicity of therapeutic antibodies. *Med Sci (Paris)* ;
- ☒ Stohl W.( 2013) : Future prospects in biologic therapy for systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* ; 9: 705–720.
- ☒ Stone KD., Prussin C. Et etcalfe DD. (2010) : IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J.Allergy Clin. Immunol* ; **125**:S73-80 .
- ☒ Straka, M. R., J. M. Joyce. Et D. T. Myers. (2000) : Tc-99m nofetumomab merpentan complements anequivocal bone scan for detecting skeletal metastatic disease from lung cancer.
- ☒ Such Cherydath .(2004) : antibody ; 37 : 200-325 .
- ☒ Tang L .ET Meibohm B. (2006 : )Pharmacokinetics of peptides and proteins. In : Meibohm

B ,ed .*Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biotech drugs* .Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.43–17 :

- ⊗ Tim J. Kruser ., Amol J., Shyhmin Huang ., Robert Radinsky ., Daniel J. ET Paul M.Harari . (2008) : Augmentation of radiation response by panitumumab in model of UPPERaerodigestive tract cancer: *Int. J. Radiation Oncology Biol.*; 2 (72): 534–542 p.
- ⊗ Van Loghem E. ET Litwin SD. (1972) : Antigenic determinants on immunoglobulins of nonhuman primates. *Transplant. Proc* ; 4 :129-135
- ⊗ Virginie pascal . ( 2009) : Vers l'utilisation des immunoglobulines A humaines ou de leurs variantes à des fins thérapeutiques .Université de Limoges :22.
- ⊗ Vital EM . ET Emery P. (2008) :The development of targeted therapies in rheumatoid arthritis. *J* ;31 : 219–27p.
- ⊗ Von Behring E. ET Kitasko S. (1890) : Über das Zustandekommen der Diphtherie- Immunität und der tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschr* ; 49:1113-1145 p.
- ⊗ Waldmann . Et Thomas A. 2003 :Immunotherapy: past, presentand future. *Nat Med* ; 9 : 269
- ⊗ Wang W ., Wang EQ.ET Balthasar JP.(2008) : Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* .Avastin product information ;84:548–58.
- ⊗ Watier H.( 2009) : De la sérothérapie aux anticorps recombinants « nus » : plus d'un siècle de succès en thérapie ciblée. *Med Sci (Paris)* ; 25 : 999–1009.
- ⊗ with technetium-99m-labeled antiCEA Fab' fragment. : *J Nucl Med Technol*, v. 28, p. 12-8 ; quiz 21.
- ⊗ Woof JM. Et Kerr MA. (2006): The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol* ;
- ⊗ Wu H., Nie Y., Huse WD Et Watkins JD.(1999) : Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *Journal of Molecular Biology* ;294:151-162.
- ⊗ Xiao-Dong Yang .,Xiao-Chi Jia .,Jose R.F .Corvalan ., Ping Wang. ET C .Geoffrey Davis (
- ⊗ Zelaschi D., Newby C., Parsons M., van West B., Cavalli-Sforza LL., Herzenberg LA. et al

### ❖ Webographie

- [1]: <http://xray.bmc.uu.se/lars/Practicals/Immun/antibody.html>.(Consulté le 01/05/2021).
- [2]:[http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/\\_UK/IGproperties/Hu\\_IGproperties.html](http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/_UK/IGproperties/Hu_IGproperties.html) (Consulté le 2/05/2021).
- [3]: Source: monde.ccdmd.qc.ca. (Consulté le 4/05/2021).
- [4]: Source du schéma : Joost Bakker, Genmab (consulté le 5/05/2021) .
- [5]: <https://doi.org/> (consulté le 29/05/2021).

### Résumé

Contrairement à un antisérum polyclonal, un anticorps (Ac) monoclonal est une préparation homogène spécifique d'un unique épitope de la surface d'un antigène complexe. C'est en 1975 que Köhler et Milstein produisent les premiers Ac monoclonaux en utilisant une méthode qui est devenue rapidement l'une des technologies clés de l'immunologie.

Les anticorps monoclonaux sont parmi les produits pharmaceutiques qui se développent le plus rapidement par des essais cliniques. Les immenses progrès réalisés en biotechnologie et en particulier avec les techniques de recombinaison génétique permettent d'obtenir des anticorps monoclonaux murins, chimériques, humanisés et de plus en plus des anticorps monoclonaux totalement humains.

Les anticorps monoclonaux ont représenté une avancée majeure dans le développement des thérapies ciblées, en permettant un traitement dirigé contre des cellules ou des protéines spécifiques, notamment dans le traitement des cancers et des maladies auto-immunes. Produits d'abord en faibles quantités et avec une structure d'anticorps de souris, les anticorps monoclonaux sont maintenant produits en quantité industrielles.

**Mots clés :** Anticorps monoclonaux, anticorps polyclonaux, anticorps monoclonaux recombinants, thérapie ciblée, production.

**Abstract**

In contrast to a polyclonal antiserum, a monoclonal antibody is specific to a single epitope on the surface of a complex antigen. In 1975, Köhler and Milstein produced the first monoclonal antibodies by using a method which rapidly became a key technology in immunology.

Monoclonal antibodies are among the pharmaceuticals that grow most rapidly through clinical trials. The immense advances made in biotechnology and in particular with genetic recombination techniques make it possible to obtain murine, chimeric, humanized monoclonal antibodies and increasingly totally human monoclonal antibodies.

Monoclonal antibodies have represented a major advance in the development of targeted therapies, allowing treatment directed against specific cells or proteins, especially in the treatment of cancers and chronic inflammatory diseases. First produced in small quantities and with a mouse antibody structure, monoclonal antibodies are now produced in industrial quantities.

**Keywords :** Monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, recombinant monoclonal antibodies, targeted therapy, production.

على عكس المصل مضاد متعدد النسيلة، الجسم المضاد أحادي النسيلة هو إعداد متجانس وخاص لمحدد واحد على سطح مولد ضد معقد. في عام 1975 أنتج كل من كولر وميلشتاين أولى لأجسام المضادة أحادية النسيلة باستخدام طريقة سرعان ما أصبحت واحدة من التقنيات الرئيسية في علم المناعة.

الأجسام المضادة أحادية النسيلة هي من بين المنتجات الصيدلانية التي تتطور بسرعة كبيرة وذلك عن طريق التجارب السريرية. إن التقدم الهائل المنجز في مجال التكنولوجيا الإحيائية، ولا سيما مع تقنيات إعادة الارتباطات الوراثية، يجعل من الممكن الحصول على اجسام مضادة أحادية النسيلة من أصل الفئران، جسم مضاد أجزاءه مشكلة او كيمييري، الأجسام المضادة أحادية النسيلة المونسنة او البشرية و الاجسام المضادة احادية النسيلة البشرية بشكل تام.

وقد مثلت الأجسام المضادة أحادية النسيلة تقدما كبيرا في تطوير العلاجات المستهدفة. مما يسمح بالعلاج الموجه ضد خلايا أو بروتينات محددة ، خاصة في علاج السرطانات والأمراض الالتهابية المزمنة. فقد انتجت لأول مرة بكميات صغيرة بهيكل الأجسام المضادة الفأرية ، أما الآن فيتم إنتاج الأجسام المضادة أحادية النسيلة بكميات صناعية.

**الكلمات المفتاحية:** جسم مضاد أحادي النسيلة، جسم مضاد متعدد النسيلة، الأجسام المضادة أحادية النسيلة المركبة، العلاج المستهدف، الانتاج.