

BASES IMMUNOLOGIQUES À LA COMPRÉHENSION DU CONCEPT D'ANTICORPS MONOCLONAL

M. MOUTSCHEN (1), A.J. SCHEEN (2)

RÉSUMÉ : Les anticorps (Ac) sont des molécules bi-fonctionnelles : d'une part, ils lient les antigènes (Ag) par leurs régions variables (Fab, «Fragment antigen binding»), situées à l'une de leurs extrémités; d'autre part, ils «recrutent» les cellules du système immunitaire par l'autre extrémité, leur région constante ou région Fc, ce qui aboutit à la destruction sélective des cellules porteuses de l'Ag considéré. La capacité de reconnaissance de l'Ag par l'Ac est unique. Un Ag possède généralement plusieurs épitopes différents qui sont autant de sites de liaison aux Ac. On peut classer une population d'Ac selon sa capacité à reconnaître un seul ou plusieurs épitopes. On parle alors respectivement d'Ac monoclonaux et polyclonaux. Les Ac monoclonaux reconnaissent le même épitope, car ils sont issus d'une même lignée de plasmocytes, provenant d'une seule cellule. C'est ce qui explique leur remarquable sélectivité. Les Ac monoclonaux possèdent des mécanismes d'action complexes, mais uniques en leur genre : d'une part, ils bloquent ou activent la transduction de signaux; d'autre part, ils dirigent le système immunitaire adaptatif contre certaines cellules cibles, comme par exemple les cellules tumorales. Après avoir été largement utilisés en recherche fondamentale, en recherche appliquée et dans des buts diagnostiques, les Ac monoclonaux, grâce à leurs propriétés spécifiques, sont maintenant largement exploités en thérapeutique.

MOTS-CLÉS : *Anticorps polyclonal - Anticorps monoclonal - Antigène - Immunoglobuline - Système immunitaire*

INTRODUCTION

Ce numéro thématique est consacré aux anticorps (Ac) monoclonaux en thérapeutique (1). Une bonne compréhension du concept d'Ac monoclonal nécessite la maîtrise de quelques connaissances fondamentales en immunologie (2). Les Ac sont des molécules d'immunoglobulines (Ig) ayant une séquence spécifique d'acides aminés qui leur permet d'interagir sélectivement avec l'antigène (Ag) qui induit leur synthèse dans les lymphocytes B, particulièrement les plasmocytes. Les Ac ont trois fonctions principales, coordonnées pour aboutir à la réponse immunitaire : se lier à l'Ag, activer le système du complément et recruter des cellules immunocompétentes. Un Ac est donc une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes, comme les bactéries et les virus, ou les cellules tumorales, qui sont reconnus par l'intermédiaire d'Ag spécifiques. Un Ag possède généralement

BASIS IMMUNOLOGICAL KNOWLEDGE FOR UNDERSTANDING MONOCLONAL ANTIBODIES

SUMMARY : Antibodies (Ab) are molecules with dual functions: on the one hand, they bind to antigens (Ag) through their variable regions (Fab, « Fragment antigen binding »), located at one of their extremities; on the other hand, they recruit cells of the immune system, via the other extremity, the constant region or Fc region, which results in a selective destruction of cells that have the corresponding Ag. The capacity of recognition of Ag by Ab is unique. Ag generally have several different epitopes that all are binding sites for Ab. Ab may be classified according to their ability to recognize one single epitope or several epitopes. They are called monoclonal Ab (mAb) or polyclonal Ab, respectively. MAbs recognize the same epitope because they are issued from one single line of plasmocytes, originating from one single cell. It is the reason why they are so selective. MAbs exert complex, but unique mechanisms of action: they inhibit or activate signal transduction, and they specifically drive the immune system against target cells, such as tumoral cells. After their extensive use in fundamental and in applied research as well as diagnostic tools, mAbs are now largely exploited in therapeutics.

KEYWORDS : *Antigen - Immunoglobulin - Immune system - Monoclonal antibody - Polyclonal antibody*

plusieurs épitopes différents qui sont autant de sites de liaison aux Ac. Chaque clone de plasmocytes (issu d'un seul lymphocyte B naïf initialement activé par un épitope donné) produit des Ac identiques, possédant une haute affinité pour l'épitope en question. Les Ac produits par un tel clone sont donc dits «monoclonaux». A l'inverse, les Ac isolés à partir de fluides biologiques tels que le sang ont évidemment été synthétisés par de multiples clones de lymphocytes B. Bien qu'une proportion importante de ces Ac puissent reconnaître un Ag donné, si l'individu ou l'animal a été immunisé par ce dernier, les Ac en question sont qualifiés de «polyclonaux».

Le but de cet article est de présenter au lecteur intéressé un bref rappel des données essentielles relatives à l'immunologie qui lui permettront d'appréhender le mieux possible le concept d'Ac monoclonal (2) et de comprendre certaines terminologies utilisées dans les différents articles, généraux ou spécifiques, figurant dans ce numéro (Tableau I).

BREF RAPPEL DU RÔLE DES ANTICORPS

Au cours de la réponse immunitaire, les Ac ont trois fonctions principales : d'abord, se lier à l'Ag, ensuite, activer le système du complément, enfin, recruter des cellules immunocompétentes (3).

(1) Professeur d'Immunologie, ULg, Chef du Service, de Médecine interne générale, Infectiologie, CHU Liège.

(2) Professeur ordinaire, ULg, Chef de Service, Service de Diabétologie, Nutrition et Maladies métaboliques et Unité de Pharmacologie clinique, CHU Liège.

TABLEAU I. GLOSSAIRE DE QUELQUES TERMES OU ABRÉVIATIONS UTILISÉS EN IMMUNOLOGIE ET, DE PRÈS OU DE LOIN, EN RELATION AVEC LE CONCEPT D'AC MONOCLONAL. LES ABRÉVIATIONS ET DÉNOMINATIONS SONT PRÉSENTÉES PAR ORDRE ALPHABÉTIQUE.

Ac : anticorps, molécule fabriquée par les lymphocytes B ou plasmocytes, capable de reconnaître et de se fixer sur une structure moléculaire complémentaire de la sienne, appelée antigène (Ag).

Ac bispécifique : Ac capable de se lier de façon simultanée à deux Ag différents.

Ac bivalent : Ac présentant deux sites de liaison contre le même épitope.

Ac monoclonal : Ac ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un Ag donné.

Ac polyclonal : Ac reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné.

ADCC : «Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity».

Ag : antigène, toute substance capable de déclencher une réponse adaptative du système immunitaire.

Allotype : déterminant antigénique des Ig présent chez des individus de la même espèce, mais génétiquement différents.

CD : «Cluster de Différenciation», ensemble défini de récepteurs à la surface cellulaire (épitopes) qui identifie le type de cellules et le stade de différenciation et qui est reconnu par des Ac.

CDR : «Complementarity-Determining Region», zone interagissant avec l'Ag.

CH : partie constante des chaînes lourdes (H pour «Heavy»).

CL : partie constante des chaînes légères (L pour «Light»).

Fab : «Fragment antigen binding», zone du paratope responsable de la fixation à l'Ag.

Fc : fraction constante, responsable des fonctions effectrices de l'Ac.

FcRn : récepteur hépatique responsable de la clairance (et donc intervenant dans la demi-vie) des Ac.

Fv : fraction variable de l'Ac.

Epitope : région spécifique d'un Ag reconnue par un Ac.

HAMA : «Human Anti-Mouse Antibodies», responsables de réactions allergiques.

Hybridome : cellules hybrides obtenues de la fusion d'un plasmocyte et d'une cellule de myélome.

Idiotype : épitope propre à une molécule issue d'un seul clone.

Ig : immunoglobuline, superfamille de glycoprotéines correspondant aux Ac.

Isotype : déterminant antigénique des Ig identiques pour tous les individus de même espèce.

mAb : monoclonal Antibody.

Paratope : région limitée de l'Ac dont la structure spatiale est complémentaire de celle de l'épitope et donc impliquée dans la reconnaissance et la fixation de l'Ag.

Phage display : technique permettant d'exprimer un peptide à la surface de la capsid de phage filamentueux par fusion avec une protéine

RFc : récepteur aux fragments constants localisé sur les cellules immunitaires capable de lier les Ac

ScFv : «Single chain Fv», petit fragment de 25 kDa constitué par les domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère reliés par un peptide de liaison ; la petite taille de ce fragment en facilite la production et permet de l'utiliser pour construire des molécules plus élaborées.

SdAb : «Single domain Antibody».

VH : partie variable des chaînes lourdes (H pour «Heavy»).

VL : partie variable des chaînes légères (L pour «Light»).

LIAISON À L'ANTIGÈNE

Les Ac ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un Ag. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines extrêmement variables aux extrémités des Ac, appelés paratopes et reconnaissant les épitopes correspondants des Ag. La reconnaissance entre Ag et Ac est, par exemple, mise à profit dans la lutte contre les toxines bactériennes. En se fixant sur ces toxines, les Ac anti-toxine les neutralisent et préviennent les liaisons avec les récepteurs cellulaires et les dysfonctions, y compris la mort, des cellules qui s'ensuivent.

De la même manière, de nombreux virus et bactéries n'exercent leur pathogénicité qu'après fixation aux cellules de l'organisme. Les bactéries utilisent des adhésines qui sont des molécules d'adhésion aux membranes cellulaires et les virus possèdent des protéines de fixation sur leur enveloppe externe. Les Ac anti-adhésines et anti-protéines de l'enveloppe virale bloquent l'action de ces agents pathogènes en se liant sur les molécules de fixation.

ACTIVATION DU COMPLÈMENT

Les Ac protègent également l'organisme en déclenchant la cascade du complément. Il s'agit d'un ensemble de protéines du plasma dont l'activation (par la voie classique dans le cas d'Ac) permet de détruire des bactéries par perforation et de faciliter la phagocytose, l'élimination des complexes immuns et la libération de molécules chimiotactiques.

ACTIVATION DE CELLULES IMMUNOCOMPÉTENTES

Après avoir reconnu un Ag grâce à sa partie variable, un Ac peut se lier à des cellules du système immunitaire par sa partie constante. Ces interactions revêtent une grande importance dans le déroulement de la réponse immunitaire. Ainsi, les Ac fixés sur une bactérie peuvent se lier aux macrophages et aux polynucléaires et déclencher une phagocytose. Les lymphocytes NK (Natural Killer) peuvent exercer leur cytotoxicité et lyser des bactéries opsonisées par des Ac.

STRUCTURE DES ANTICORPS

Malgré leur grande hétérogénéité, toutes les Ig sont construites selon un modèle de base commun (Fig. 1). Les travaux sur la structure des Ig entre 1959 et 1969 de Porter et d'Edelman ont été couronnés par le prix Nobel en 1972 (4).

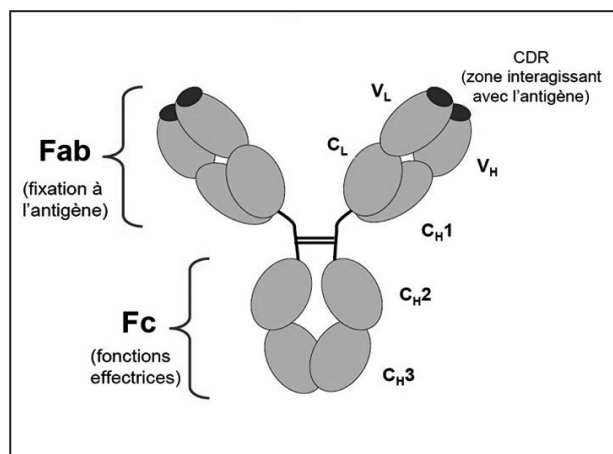


Figure 1. Structure entière d'une immunoglobuline de type IgG1 et démembrement en ses différentes composantes.

GÉNÉRALITÉS

Les Ac sont des glycoprotéines de la superfamille des Ig formées de 4 chaînes polypeptidiques (150.000 uma) : 2 chaînes lourdes (CH) (H pour heavy de 50.000 uma chacune) et 2 chaînes légères (CL) (L pour light de 25.000 uma chacune) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y et sont constituées de domaines Ig de 110 acides aminés environ (Fig. 1). Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable. Les chaînes lourdes sont composées d'un domaine variable et de 3 ou 4 fragments constants selon l'isotype (voir ci-dessous). Pour un Ac donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même que les deux chaînes légères. Les chaînes légères sont de deux types, kappa et lambda. Une même molécule d'Ig a deux chaînes légères du même type. Par contre, le type des chaînes lourdes définit la classe de l'Ig. Il existe cinq types de chaînes lourdes (chaînes γ , α , μ , ϵ et δ), donc cinq classes d'Ig (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, respectivement). Les Ig de chaque classe utilisent soit des chaînes légères kappa, soit des chaînes légères lambda.

Ainsi, les Ac ont trois extrémités. Deux d'entre elles terminent les fragments Fab («Fragment antibody binding»). Elles sont toutes semblables et sont complémentaires de la forme moléculaire de l'Ag. Elles sont appelées extrémités variables car elles sont différentes d'un Ac à l'autre : pour chaque Ag, il existe un Ac avec des extrémités de Fab adaptées. La troisième extrémité appartient à la région constante. Cette extrémité possède une séquence d'acides aminés identiques pour tous les Ac appartenant à une classe ou sous-classe donnée. Cette extrémité est capable de se lier sur des récepteurs membranaires particuliers des cellules du système immunitaire de l'espèce.

DOMAINES CONSTANTS

Les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un Ac à l'autre, caractéristique de l'espèce et de l'isotype. Chaque chaîne légère en possède un exemplaire noté CL. Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois ou quatre domaines constants CH1, CH2, CH3 et CH4. 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.

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.

FRAGMENTS

Comme on peut aisément le déduire de ce qui vient d'être rappelé, le clivage enzymatique spécifique d'une Ig permet d'isoler différents fragments :

- le fragment Fc (cristallisable) : il est le support des propriétés biologiques de l'Ig, en particulier sa capacité à être reconnue 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»).
- 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.
- 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 $F(ab')_2$: 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).

TYPLOGIE DES ANTICORPS

Une Ig peut induire la production d'Ac dirigés contre ses propres déterminants antigéniques. Selon l'appartenance de ces déterminants antigéniques, on définit l'isotypie et l'allotypie. L'isotypie caractérise les déterminants antigéniques des Ig identiques pour tous les individus de même espèce. Les Ac anti-isotypiques sont donc obtenus en injectant des Ig d'une sous-classe donnée chez un animal de laboratoire. L'allotypie caractérise les déterminants antigéniques des Ig présents chez des individus de la même espèce, mais génétiquement différents. A noter que les Ac anti-allotypiques sont obtenus par l'immunisation d'un individu de la même espèce, mais génétiquement distinct. Quant à l'idiotypie, elle caractérise la présence d'un épitope propre à une molécule issue d'un seul clone (Fig. 2).

ISOTYPYIE

Les Ac (ou Ig) sont subdivisés en classes ou isotypes, selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes : les chaînes γ , α , μ , ϵ et δ correspondent respectivement aux immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Il existe également des sous-classes d'Ig, reflétant des différences plus fines entre chaînes lourdes. L'homme possède ainsi quatre sous-classes d'IgG et 2 sous-classes d'IgA. Il existe également des isotypes de chaînes légères, celles-ci pouvant être κ (kappa) ou λ (lambda).

ALLOTYPYIE

Le système Gm met en évidence les divers allotypes des chaînes lourdes des immunoglobulines IgG. Il permet également de différencier les molécules des quatre sous-classes, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Quant au système Km (à l'origine appelé Inv), comme il est porté par la chaîne légère kappa, cet allotype est donc présent sur toutes les classes d'Ig. Enfin, les allotypes définis par le système Am sont situés sur les IgA, et plus précisément sur les chaînes α_2 . Il existe deux isotypes α_1 et α_2 de chaînes α , caractérisant les sous-classes Am1 et Am2 des IgA.

IDIOPTYIE

L'idiotype est un déterminant antigénique propre à une seule Ig (ou du moins à toutes les Ig

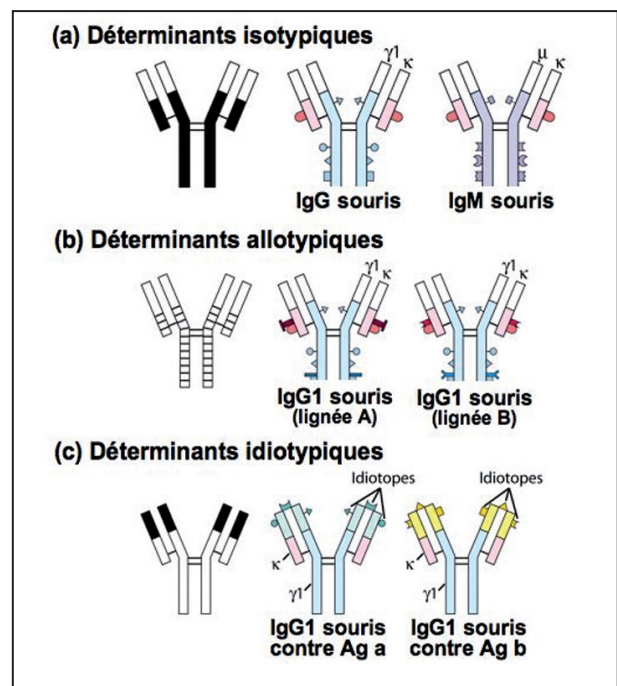


Figure 2. Illustration des phénomènes d'isotypie, allotypie et idiotypie.

produites par un même plasmocyte). Ce déterminant antigénique «idiotypique» fait partie ou est très proche du site de reconnaissance de l'Ag, dans la région hypervariable de l'Ig. Il est intéressant de constater que ces déterminants idiotypiques sont reconnus comme des Ag par les lymphocytes T et B de l'individu qui a lui-même produit l'Ig en question. Ceci paraît transgresser le principe de la tolérance au soi, mais s'explique par le fait que les séquences d'acides aminés qui constituent ces déterminants idiotypiques résultent de modifications somatiques de l'ADN et ne peuvent donc contribuer à l'établissement de la tolérance centrale. Chez un individu donné, la synthèse d'un Ac A dirigé contre un déterminant antigénique donné aboutit à la synthèse d'Ac B dirigés contre les déterminants idiotypiques de l'Ac A. La synthèse de l'Ac B induit la synthèse d'un Ac C dirigé contre le déterminant idiotypique de l'Ac C, et ainsi de suite. Cette reconnaissance en série de déterminants idiotypiques sur les Ig d'un même individu peut évoquer un réseau, qualifié de réseau idiotypique. Si le phénomène de réseau idiotypique existe bel et bien, son rôle exact dans l'homéostasie des réponses immunitaires reste à définir, bien que beaucoup d'hypothèses aient été formulées à ce sujet.

COMMUTATION ISOTYPYIQUE

Les Ac sont codés par des gènes subissant une recombinaison V(D)J dans les lymphocytes B. Cette recombinaison est, en association avec les phénomènes d'hypermutation somatique et de

variabilité jonctionnelle, la source de leur diversité.

Lors de la maturation d'un lymphocyte B, et suivant les stimuli qui ont accompagné cette maturation, les clones de cellules B reconnaissant l'épitope subissent une commutation de classe. Les cellules B immatures, qui de base n'expriment que des IgM et des IgD, peuvent évoluer pour ne plus produire qu'un seul isotype (IgM, IgE, IgA ou IgG), en opérant une recombinaison du gène codant pour les domaines constants des chaînes lourdes, mais en gardant constants les domaines variables. Ce changement de domaines constants est le plus souvent appelé commutation isotypique. Ce phénomène est possible par l'arrangement des gènes codant pour les domaines CH. Sur le génome, les segments de gène codant pour un isotype sont successifs et précédés d'une séquence de commutation. A la réception d'un signal extracellulaire de commutation, le lymphocyte B synthétise une recombinase qui forme une boucle non fonctionnelle entre les séquences de commutation : cette boucle rapproche un segment codant pour un domaine constant et l'association VDJ déjà formée.

ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX

ANTICORPS POLYCLONAUX

Les Ac polyclonaux sont un mélange d'Ac produits par des clones plasmocytaires différents. Il reconnaissent donc, en règle générale, des épitopes distincts présents soit sur la même molécule antigénique, soit sur des Ag différents. Au cours d'une réponse immunitaire contre un agent infectieux, la réponse est toujours polyclonale et dirigée contre de multiples épitopes appartenant à de multiples Ag de l'agent infectieux. Après vaccination utilisant un Ag purifié ou recombinant, on observe une réponse polyclonale, mais qui est restreinte aux épitopes du seul Ag vaccinal. On parle alors d'Ac polyclonaux monospécifiques.

ANTICORPS MONOCLONAUX

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 (5).

Production

Les immunologistes qui essayaient, dans les années 1970, d'élucider la structure fine des Ac ainsi que les règles gouvernant leur synthèse et l'association des chaînes lourdes (H) et des chaînes légères (L) ont cherché à créer des cellules hybrides permettant d'analyser l'expression et l'assemblage de ces chaînes, en utilisant des cellules tumorales B. C'est de là qu'est née la technique originale de production des Ac monoclonaux murins, découverte par Köhler et Milstein et faisant appel à la technique de l'hybridome (1). Elle a été décrite en détail par ailleurs (6) et nous n'y reviendrons pas dans le présent article.

Immunogénicité des Ac monoclonaux murins et stratégies d'amélioration

Comme on l'a vu plus haut, les Ig présentent plusieurs types de déterminants antigéniques. L'administration de ces Ig d'origine animale à un patient peut donc provoquer une réponse immunitaire dirigée contre les déterminants isotypiques, voire idiotypiques, de l'Ac. Ces Ac peuvent réduire l'efficacité thérapeutique de l'Ac monoclonal, voire occasionner des manifestations indésirables par hypersensibilité de type 1 (allergie immédiate) ou de type 3 (par génération de complexes immuns circulants). Pour réduire l'immunogénicité des Ac murins, différentes approches ont été envisagées dès le début des années 1980 et ont conduit, d'abord, à la fabrication d'Ac chimériques murins-humains, puis à l'obtention d'Ac humanisés et, enfin, au développement d'Ac totalement humains (7).

Trois stratégies principales ont été mises en oeuvre pour améliorer l'efficacité et réduire la toxicité des Ac monoclonaux murins (6) :

- la construction d'anticorps chimériques;
- la greffe de régions hypervariables d'Ac monoclonaux de souris sur des régions charpentes («Frameworks, FR») VH et VL humaines («CDR grafting»);
- la construction de banques combinatoires de régions VH et VL humaines, exprimées à la surface de phages filamenteux («phage display»), sous forme de fragments «simple chaîne» («single chain Fv», scFv), liant une région VH et une région VL ou de fragments F(ab), constitués de la chaîne légère associée au segment peptidique VH-CH1, ce dernier correspondant au premier domaine de la région constante (l'alternative est

l'obtention de souris transgéniques qui disposent d'une grande partie des gènes codant les chaînes lourdes et légères humaines) (6).

- *Ac chimériques*

La construction d'un Ac chimérique consiste à isoler l'ADN codant pour la région VH et la région VL d'un Ac monoclonal de souris ou de rat et à le lier à l'ADN codant les régions constantes H et L d'une Ig humaine. Une telle construction génétique permet de produire un Ac hybride dont la partie constante, humaine, n'est pas ou très peu immunogène chez l'Homme (il s'agit, en général, de la région constante des IgG1 humaines et de la région C κ humaine). De tels Ac sont humains à 75 % et moins immunogéniques que les Ac de souris, car les épitopes immunodominants interspèces d'IgG sont principalement localisés dans les domaines CH2 et CH3. Dans la plupart des cas, la spécificité et l'affinité des Ac chimériques restent identiques à celles des Ac murins parentaux.

- *Ac humanisés*

La substitution de régions hypervariables d'Ac monoclonaux de souris ou de rat aux régions hypervariables de domaines VH et VL humains («Complementarity Determining Regions (CDRs) grafting») permet d'obtenir des Ac humanisés. Ces Ac sont, *a priori*, très peu immunogènes chez l'Homme, car seules les régions hypervariables sont d'origine murine. La difficulté ne réside pas tant dans le découpage et la substitution des régions hypervariables de l'Ac murin, que dans le choix des domaines VH et VL humains sur lesquels ces régions hypervariables vont être insérées. L'humanisation requiert également une analyse détaillée de la séquence primaire des domaines variables de l'Ac murin afin d'identifier les acides aminés impliqués dans la formation et/ou la stabilité du site de liaison à l'Ag, et notamment ceux éventuellement situés dans les régions charpentes. Des boucles hypervariables d'Ac de souris possédant des spécificités anti-CD52, anti-IL2R ou anti-HER ont été ainsi greffées sur la région charpente d'une chaîne lourde humaine. En général, la structure du site de liaison est conservée et l'affinité est proche de celle de départ. La plupart des Ac monoclonaux chimériques et humanisés contiennent une région Fc dérivée d'une IgG1 humaine, l'Ig qui possède les caractéristiques et les fonctions les plus intéressantes pour l'immunothérapie.

- *Ac humains*

Pour créer un répertoire d'Ac avec le système de «phage display», décrit par ailleurs (6), on peut utiliser indifféremment des gènes V réar-

rangés *in vivo* provenant d'une population de lymphocytes B ou des gènes V «synthétiques» construits *in vitro*. Les premiers répertoires naturels de gènes V réarrangés ont été clonés par PCR à partir de l'ADN génomique ou de l'ADNc5 des lymphocytes B du sang périphérique, ou d'hybridomes. Ces répertoires naturels peuvent être «naïfs» si les gènes V ont été amplifiés à partir d'individus non immunisés (on obtient alors des fragments d'Ac de faible affinité) ou «biaisés» si les gènes V ont été amplifiés après immunisation (on obtient alors des fragments d'Ac de haute affinité similaires aux IgG obtenues après expansion clonale et maturation d'affinité). Chaque répertoire VH et VL peut être cloné dans des vecteurs différents qui peuvent, ensuite, être recombinés *in vitro* ou *in vivo*. Alternativement, les répertoires peuvent être clonés séquentiellement dans le même vecteur ou assemblés d'abord par PCR, puis clonés. La technique utilisée pour combiner les répertoires VH et VL dicte la diversité structurale et la taille du répertoire. Des banques de très grandes tailles ont été obtenues par utilisation de système de recombinaison de type Cre/Lox ou Int/Att, mais leur construction reste complexe et leur stabilité très difficile à maintenir. Les fragments d'Ac isolés à partir des banques de phage sont ensuite reconfigurés en IgG humaine entière, selon une méthodologie analogue à celle décrite pour les Ac chimériques ou humanisés.

- *Fragments d'Ac*

La mise au point de la technique de fabrication de fragments simple chaîne (scFv, pour «single chain Fv»), liant un domaine VH et un domaine VL sur la même chaîne polypeptidique a permis d'obtenir des fragments d'Ac de type Fv. Cette technique permet, en outre, la production en masse de fragments d'Ac dans des bactéries, contrairement aux Ac entiers toxiques pour ces dernières. Cette mise au point technique a eu une importance considérable pour adapter la technique d'expression de peptides à la surface de bactériophages à l'expression de fragments d'Ac et pour le développement de la technique du «phage display» mentionnée ci-dessus et utilisée pour la production d'Ac humains. En outre, les fragments d'Ac peuvent faire l'objet de modifications ultérieures en fonction de leur usage désiré (fragments divalents, bispécifiques, addition de séquences codant des fragments actifs d'enzymes ou de toxines, ...), ainsi que nous l'avons décrit dans un autre article (8).

Actions

Les Ac monoclonaux agissent de différentes façons. Par leur simple activité de liaison à l'Ag, ils peuvent, tout d'abord, bloquer une signalisation

en liant le ligand soluble ou son récepteur membranaire. L'agrégation d'un récepteur induite par la liaison bivalente d'un Ac peut aussi déclencher un signal conduisant à l'apoptose de la cellule exprimant le récepteur. Les autres actions des Ac monoclonaux thérapeutiques impliquent la stimulation du système immunitaire par l'intermédiaire du fragment Fc, capable de lier les récepteurs Fc exprimés par les cellules immunitaires ou les protéines du complément. Par conséquent, après avoir été appliquée au fragment Fab responsable de l'activité de liaison de l'Ac à l'Ag, l'ingénierie des Ac est maintenant de plus en plus largement utilisée pour optimiser les activités de recrutement du système immunitaire générées par le fragment Fc.

Développements

Les essais cliniques récents ont révélé l'importance de l'interaction entre les Ac et leurs récepteurs, comme, par exemple, le récepteur Fcγ R exprimé par les cellules NK responsables de la lyse des cellules tumorales. Dès lors, il pourrait être souhaitable de modifier la séquence d'acides aminés des Ac de façon à ce qu'ils aient une moindre force d'interaction entre le fragment Fc et des récepteurs inhibiteurs et une plus grande force d'interaction entre ce même fragment Fc et des récepteurs activateurs, ce qui permettrait d'améliorer la réponse à la thérapie.

Une autre voie très active de recherche consiste à optimiser le fragment Fc au niveau de sa glycosylation, depuis la démonstration que la simple présence de certains résidus de sucre suffit à modifier drastiquement la cytolysse induite par l'Ac. La voie de recherche baptisée glycoingénierie consiste à sélectionner des cellules productrices d'Ac n'ajoutant pas ce type de résidus inhibiteurs.

Enfin, certains laboratoires s'intéressent à l'ingénierie du fragment Fc dans le but de modifier son affinité avec un récepteur (le récepteur Fc néonatal FcRn), jouant un rôle dans la clairance de ces Ac. L'objectif final est de prolonger la demi-vie des Ac dans la circulation sanguine de façon à maximiser leur activité thérapeutique.

CONCLUSION

Les Ac sont des protéines complexes du système immunitaire chargées de se lier à un Ag particulier avec une très forte affinité et, surtout, une très bonne spécificité. De plus, ils sont capables de recruter les autres acteurs du système immunitaire pour conduire à l'élimination élective de leurs cibles. Ils ont donc naturellement suscité l'intérêt de nombreux laboratoires pharmaceutiques avec l'espoir de créer de nouvel-

les molécules thérapeutiques capables d'induire la destruction de cellules altérées (car infectées par un pathogène ou cancéreuses), exprimant un Ag spécifique, sans nuire aux cellules normales. La possibilité de produire, chez la souris, une population homogène d'Ac reconnaissant tous le même Ag (Ac monoclonaux) a apporté d'immenses espoirs. 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 (5), mais aussi, à la pharmacothérapie (Ac «armés») (8) et à la thérapie en général (1). 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 (9).

BIBLIOGRAPHIE

1. Scheen AJ, Moutschen M.— Editorial. Les anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 233-236.
2. Siebril S, Dutertre CA, Boix C, Teillaud J-L.— Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : un peu d'histoire, beaucoup d'ingénierie et ... quelques succès cliniques. *Transf Clin Biol*, 2005, **12**, 114-122.
3. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (Eds).— *Kuby Immunology* (4th Edition). WH Freeman and Company, New York, USA, 2002, 670.
4. Raju TN.— The Nobel chronicles. 1972: Gerald M Edelman (b 1929) and Rodney R Porter (1917-85). *Lancet*, 1999, **354**, 1040.
5. Teillaud JL.— Qu'est-ce qu'une biothérapie ? L'exemple des anticorps monoclonaux. *Presse Med*, 2009, **38**, 825-831.
6. Mistretta VI, Cavalier E, Colette J, Chapelle JP.— Production des anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 248-252.
7. Scheen AJ.— Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 244-247.
8. Scheen AJ.— Nouvelles avancées dans l'utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 253-256.
9. Paintaud G, Lejarre F, Ternant D, et al.— Les anticorps monoclonaux : une avancée thérapeutique récente et majeure. *Thérapie*, 2009, **64**, 1-7.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr A.J. Scheen, Service de Diabétologie, Nutrition et Maladies métaboliques, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.