



HAL
open science

Les anticorps monoclonaux comme biosimilaires thérapeutiques : cibles, modes d'actions et aspects pharmaco-économiques

Saad Charef-Eddine Nouar

► **To cite this version:**

Saad Charef-Eddine Nouar. Les anticorps monoclonaux comme biosimilaires thérapeutiques : cibles, modes d'actions et aspects pharmaco-économiques. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01165683

HAL Id: dumas-01165683

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01165683>

Submitted on 19 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2015

N°

**LES ANTICORPS MONOCLONAUX COMME BIOSIMILAIRES
THERAPEUTIQUES : CIBLES, MODES D'ACTION ET ASPECTS PHARMACO-
ECONOMIQUES**

THÈSE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Saad Charef-eddine NOUAR
Né le 17/07/1988 à Sétif (ALGERIE)

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

le 15 Juin 2015 devant le jury composé de :

M. le Professeur DROUET Emmanuel – Président du jury

Professeur d'Université et responsable du laboratoire UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble.

M. le Professeur DROUET Christian – Directeur de thèse

Professeur d'Université et responsable de laboratoire AGIM, Centre d'exploration de l'angioedème du CHU de Grenoble.

Mme. le docteur GHANNAM Arije

Directeur de Recherche et de Développement chez KininX SAS et GREPI, UJF Grenoble.

M. le Docteur ROUSTIT Mattieu

Unité de Pharmacologie Clinique, Centre d'Investigation Clinique du CHU de Grenoble et Laboratoire HP2, UJF Grenoble.

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

**LES ANTICORPS MONOCLONAUX COMME BIOSIMILAIRES
THERAPEUTIQUES : CIBLES, MODES D' ACTIONS ET
ASPECTS PHARMACO-ECONOMIQUES**

Sous la direction du :

Pr DROUET Christian

Professeur d'Université et responsable de laboratoire AGIM,
Centre d'exploration de l'angioedème, CHU de Grenoble

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT****Année 2014-2015****ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE**

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUC	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

UFR de Pharmacie de Grenoble



DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOESSIDJEWE	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT)»**

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche Institut

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DCE : Doctorants Contractuels

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse

IPB :

IBS : Institut de Biologie Structurale

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maitres de Conférences des Universités

MCU-PH : Maitres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

PU : Professeurs des Universités

PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation

UMR : Unité Mixte de Recherche

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS :

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur DROUET Emmanuel d'avoir accepté de me faire l'honneur de présider le jury de thèse et d'avoir été l'un des professeurs qui m'ont marqué. Professeur, vous avez toute ma reconnaissance.

Je remercie le Professeur DROUET Christian pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet de thèse aussi enrichissant. Je le remercie pour ses remarques, ses orientations et ses relectures. Professeur, veuillez trouver ici toute ma reconnaissance.

Un grand merci à Madame le Docteur GHANNAM Arije d'avoir accepté de participer au jury de thèse de pharmacie, de s'être montrée disponible et d'avoir été réactive *vis-à-vis* de mes e-mails.

Je remercie le Docteur ROUSTIT Mattieu d'avoir accepté de participer au jury de thèse et d'avoir participé à ma formation de Pharmacien.

Je remercie tous les membres de jury de s'être montrés intéressés par ce travail et d'avoir pris sur leur temps pour lire le document et participer au jury de thèse.

Un grand merci à tout le personnel des facultés de Pharmacie de Grenoble et de Strasbourg pour avoir participé à ma formation et pour m'avoir donné l'opportunité de suivre une formation professionnalisante et de qualité.

Je remercie tous mes professeurs de l'école primaire « MAHDADI Abdallah », des 3 collèges : « le 1^{er} Novembre 54 », « ZERROUKI Kheira » et « ALLEM Mansour » et du lycée « Malika GAÏD » qui ont veillé à ce qu'on reçoive une formation de qualité nous permettant de nous préparer pour l'avenir. Je remercie Mr ADJISSI, le meilleur professeur de Français qu'on ait pu avoir, pour ses cours interactifs, son sens de l'humour et pour nous avoir donné de bonnes bases en Français. Je remercie aussi Mme BENOUDINA pour nous avoir appris à aimer les cours d'Anglais.

Un TRES GRAND MERCI à mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études. Merci à « Ma » et à « Baba » pour leurs conseils, leur patience et surtout d'avoir fait beaucoup d'efforts pour supporter la distance qui nous sépare.

MERCI à mes deux frères, Housseem et Hatem, et à ma petite sœur, Inchad Hadil, pour tous les moments de joies passés ensemble et d'avoir supporté, eux aussi, mon absence. Merci pour leurs encouragements.

Je remercie les membres de ma grande famille (mes grands parents, mes oncles, mes tantes, mes cousins, ...) pour leurs encouragements et leurs prières.

Merci à Salma pour m'avoir supporté et pour m'avoir soutenu pendant les moments de doute. Merci à Alaeddine dit « Belguassem » (☺) pour les moments de bonheurs qu'on a passé ensemble. Merci pour les barbecues et les excursions organisées. Je remercie à cette occasion tante Fatma et oncle Hssan pour leur accueil chaleureux à Djerba.

Je remercie le docteur MAGHLAOUA Mohammed, le professeur Abdelkrim KERAGHEL, mes deux chers oncles ILYES Djamel et AKIL Djamel pour m'avoir rendu des services sans lesquels la poursuite de mon parcours universitaire n'aurait pas été possible.

Je remercie RABAHI Tahar pour m'avoir ouvert les portes de chez lui quand je suis arrivé en France. Merci pour son aide et pour ses conseils précieux qui m'ont permis de m'envoler ensuite.

Je remercie Monsieur CLAIRET Georges pour m'avoir accordé sa confiance et pour m'avoir donné la chance de travailler dans sa pharmacie au moment où je rencontrais beaucoup de difficultés pour trouver des jobs-étudiant.

Je remercie au passage tous mes anciens employeurs, mes maîtres de stages et toutes les équipes avec qui j'ai travaillé, pour la confiance accordée et la bonne ambiance.

Merci à tous mes amis : DIETRICH Jonathan (dit « Zigmund »), TERZI Amine (dit « Amine Titi »), GHARZOULI Mohamed, BENMERZOUG Antar, BOULFRAD Fayçal, CHEMMOU Fehmi, BARKI Youssef, DAHI Nouredine, BELFODIL Fares, ... Merci pour leur soutien aux moments de doute et pour tous les moments sympathiques passés ensemble.

Je remercie FARGEOT Thierry pour la « batmobile » (☺) et pour la formation accélérée en négociation de prix. Je remercie toute l'équipe de Lilly Fegersheim (Franck, Chloe, Viviane, Pascale, Thierry T., Rosanna, Aurélie, les 2 Anaïs, ...) pour l'accueil chaleureux, pour la bonne ambiance et pour leur soutien et leurs conseils utiles.

Merci à tous les amis de Grenoble, Paris, Strasbourg et Valenciennes.

Merci à toute personne ayant contribué de prêt ou de loin à ma formation.

Table des matières

REMERCIEMENTS :	6
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES ABREVIATIONS :	15
1. INTRODUCTION :	17
2. DE LA SEROTHERAPIE A LA « BIOTHERAPIE CIBLEE » : UNE HISTOIRE D'UNE EVOLUTION CONTINUE	20
3. LES TECHNIQUES DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX	25
3.1. Phage-display	26
3.2. Animaux transgéniques : la technique de l'hybridome	28
3.3. Plantes transgéniques	30
3.4. Systèmes bactériens	31
3.5. Levures et champignons filamenteux	33
3.5.1. Les champignons filamenteux :	33
3.5.2. Les levures :	34
4. COMPARAISON DES COUTS DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE PRODUCTION D'ACM :	35
5. DONNEE STRUCTURALES :	37
5.1. La structure d'un anticorps monoclonal prototype	37
5.2. Anticorps monoclonaux et molécules dérivés	43
5.2.1. Anticorps murins	43
5.2.2. Anticorps chimériques	44
5.2.3. Anticorps humanisés	45

5.2.4.	Anticorps humains	45
5.2.5.	Fragment d'anticorps.....	46
5.2.6.	Protéines de fusion	47
5.3.	Contribution de la structure à la fonction - domaines activateurs du complément et interface d'interaction avec les RFc et l'importance de la glycosylation :	48
5.3.1.	Le choix entre les sous classes d'anticorps :	49
5.3.2.	Fonctions ½ vie plasmatique du Fragment Fc	54
5.3.3.	L'ingénierie des fonctions effectrices: interaction du Fc avec le FcγR et le C1q.....	58
5.3.4.	Influence de la Fc-glycosylation sur les fonctions effectrices :	60
5.3.4.1.	Les résidus Galactose terminaux affecte la CDC :	62
5.3.4.2.	Les résidus GlcNAc terminaux affecte la CDC :	63
5.3.4.3.	L'absence des Fucose augmente l'activité ADCC des IgG :	63
5.3.4.4.	La sialylation affecte les fonctions effectrices :	63
5.3.4.5.	L'effet d'une structure chargée en Man sur l'activité ADCC :	64
5.3.4.6.	Les interactions hydrophobes et hydrophiles entre les sucres terminaux et les acides aminés du fragment Fc :	65
5.3.4.7.	Interactions saccharides-saccharides :	66
6.	LES CIBLES ET MODES D' ACTIONS DES ACM THERAPEUTIQUES ET DE LEURS DERIVES :	70
6.1.	Neutralisation de l'interaction ligand soluble-récepteur	70
6.1.1.	Cytokines solubles : Exemple des TNF-α.....	70
6.1.1.1	L'utilisation d'anticorps anti-TNF-α :	71
6.1.1.2.	L'utilisation du récepteur soluble TNFR	73
6.1.2.	Immunoglobulines solubles : Ac anti IgE-Fc.....	75
6.1.3.	Facteurs de croissance : anti-VEGF	76
6.1.4.	Composant du complément (C5) : anti-C5	77
6.2.	Blocage de l'activation d'un récepteur :	80
6.2.1.	Anticorps antagonistes : Anti CTLA-4.....	80
6.2.2.	Anticorps neutralisant d'un antigène membranaire :	81
6.2.2.1	anti-EGFR.....	81
6.2.2.2	anti-CD25.....	83
6.2.2.3	anti-GPIIb/GPIIIa	86
6.2.2.4	anti-RANK/RANKL	87
6.3.	Induction d'apoptose : anti-CD 20	88
6.4.	Induction d'une immuno-modulation par blocage de molécules membranaires.....	91
6.4.1.	anti-CD52.....	91
6.4.2.	Anti-CCR4	92
6.5.	Cibles cellulaires: blocage de fonction - mort cellulaire par ADCC.....	93
6.5.1.	anti-Intégrine alpha 4	93

6.5.2.	anti-Protéine F	95
6.5.3.	anti-EpCAM.....	97
6.6.	Vectorisation d'une drogue :	99
6.6.1.	Anticorps immunoconjugués : exemple de Trastuzumab emtansine ou Kadcyła®	99
6.6.2.	Anticorps associé à un radioactif: exemple de Capromab ou Proscint®	102
7.	LA SURVEILLANCE DES ANTICORPS MONOCLONAUX:	105
7.1.	SURVEILLANCE DES ANTI-TNF- α :	105
7.2.	SURVEILLANCE THERAPEUTIQUE DU RITUXIMAB :	107
7.2.1.	Pharmacocinétique du Rituximab :	107
7.2.2.	Les lymphocytes B :	107
7.2.3.	Les xéno-anticorps :	108
7.2.4.	les facteurs d'activation des cellules B (TNF)	108
7.2.5.	les auto-anticorps :	108
7.3.	SURVEILLANCE THERAPEUTIQUE DES ANTI-EGFR :	108
8.	EVOLUTION ECONOMIQUE DU MARCHE DES ACM :	111
CONCLUSION :		ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
BIBLIOGRAPHIE :		121

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: « MAGIC BULLETS » PAR PAUL EHRLICH, 1900.	20
FIGURE 2: RESULTATS D'ELECTROPHORESE DE LAPINS PAR E. KABAT ET A. TISELIUS, 1939.	21
FIGURE 3: A. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BACTERIOPHAGE FILAMENTEUX. B. EXEMPLE D'EXPRESSION A LA SURFACE D'UN VECTEUR PHAGE OU D'UN VECTEUR PHAGEMIDE. ^[61]	26
FIGURE 4: SELECTION D'UN REPERTOIRE DE MOLECULES EXPRIMEES A LA SURFACE DE PHAGES FILAMENTEUX POUR LEUR LIAISON A UNE CIBLE. ^[61]	27
FIGURE 5: PROCEDE DE FABRICATION D'UN ACM SPECIFIQUE D'UN ANTIGENE SELON KÖHLER ET MILSTEIN. HGPRT(-) (DEFICIENCE EN HYPOXANTHINE-GUANINE PHOSPHO-RIBOSE TRANSFERASE). MILIEU HAT (HYPOXANTHINE, AMINOPTERINE ET THYMIDINE). ^[2]	29
FIGURE 6: LA STRUCTURE EN DOMAINES D'UNE IMMUNOGLOBULINE. ^[90]	37
FIGURE 7: SCHEMA ILLUSTRANT LES PHENOMENES D'ISOTYPYIE, D'ALLOTYPE ET D'IDIOTYPYIE. ^[34]	38
FIGURE 8: COMPOSITION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL. ADAPTEE DU SCHEMA : MEDECINE THERAPEUTIQUE, VOLUME 10, NUMERO 1, JANVIER-FEVRIER 2004, 39-46. ^[3]	39
FIGURE 9: OPTIMISATION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET EFFECTRICES PAR L'INGENIERIE MOLECULAIRE. ^[8]	40
FIGURE 10: L'ACTIVITE ADCC ET CDC D'UN ACM. ^[52]	41
FIGURE 11: SCHEMA ILLUSTRATIF DES 4 TYPES D'ACM ET DE LEURS DERIVES. ^[71]	43
FIGURE 12: LES MODES D' ACTIONS DES ANTICORPS EN FONCTION DE LA CIBLE MEMBRANAIRE OU SOLUBLE. MEDECINE/SCIENCES. 2009 ; 25 : 1011-9. ^[8]	49
FIGURE 13: REPRESENTATION SCHEMATIQUES DES 4 SOUS CLASSES D'IGGs. ^[126]	50
FIGURE 14: LE COMPORTEMENT <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i> DES IGG1, 2, 3 ET 4. [NATURE BIOTECHNOLOGY 25, 1369 - 1372 (2007)].	52
FIGURE 15: RECYCLAGE DES IMMUNOGLOBULINES PAR LE FCRN DANS LES CELLULES. LES PROTEINES SERIQUES, Y COMPRIS LES IGGs, SONT CAPTEES PAR LES VESICULES D'ENDOCYTOSE. L'ACIDIFICATION (PH 6.0) DE L'ENDOSOME FORME INDUIT UNE FIXATION DE L'IGG (FCRNAB) PAR LE FCRN. LES COMPLEXES (FCRN-FCRNAB) SONT ENSUITE RECYCLES ET LIBERES DANS LA CIRCULATION SANGUINE A UN PH NEUTRE (PH 7.4). LES IGGs NON FIXEES PAR LE FCRN SONT, ELLES, DEGRADEES PAR LE LYSOSYME. ^[124]	55
FIGURE 16: STRUCTURE DE LA MAJORITE DE N-GLYCANES RENCONTREES DANS LES IGGs HUMAINES. CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY 2008, 20:471-478.	61
FIGURE 17: L'INFLUENCE DES SUCRES TERMINAUX DU FRAGMENT Fc SUR L'ACTIVITE EFFECTRICE DES IGGs. CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY 2008, 20:471-478.	62
FIGURE 18: L'INFLUENCE DES SUCRES TERMINAUX SUR LES FONCTIONS EFFECTRICES. T SHANTHA RAJU. CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY 2008, 20:471-478. ^[56]	65
FIGURE 19: LES INTERACTIONS IMPLIQUEES DANS LA STABILITE ET LES FONCTIONS EFFECTRICES DES ANTICORPS. CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY 2008, 20:471-478. ^[56]	68
FIGURE 20: PRINCIPALES CIBLES DES BIOTHERAPIES IMMUNOLOGIQUES. ^[48]	70
FIGURE 21: STRUCTURE DE LA MOLECULE DE CERTOLIZUMAB PEGOL. ^[77]	72
FIGURE 22: REPRESENTATION DES CHAINES LOURDES ET LEGERES LIEES PAR UN PONT DISULFURE DU CERTOLIZUMAB. CITING IMGT/MAB-DB : POIRON, C. ET AL., JOBIM 2010. PAPER 13 (2010).....	72
FIGURE 23: MECANISME D'ACTION DE L'ETANERCEPT (EMBREL®). ^[73]	74
FIGURE 24: DIAGRAMME D'UNE ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DE GLYCOSYLATION DE L'ETANERCEPT. ^[75]	74
FIGURE 25: LES VOIES D'ACTIVATION DU COMPLEMENT ET LE SITE D'INTERVENTION DE L'ECULIZUMAB. ^[85]	78
FIGURE 26: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ECULIZUMAB. ^[86]	79
FIGURE 27: MODELE DU ROLE DU CTLA 4 DANS LA REGULATION DES CELLULES T. ^[89]	80

FIGURE 28: ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T. ^[94]	84
FIGURE 29: LE CONCEPT RANK/RANKL/OPG. ^[102]	87
FIGURE 30: MECANISME D'ACTION DU RITUXIMAB (A : SIGNAL DIRECT. B : CDC ET ADCC AVEC UN POTENTIEL ANTAGONISME ENTRE CES 2 MECANISMES). ^[103]	90
FIGURE 31: MODELE PROPOSE POUR LE MECANISME D'ACTION DU PALIVIZUMAB ET MOTAVIZUMAB. ^[113]	97
FIGURE 32: STRUCTURE DU CATUMAXOMAB. ^[106]	98
FIGURE 33: LA STRUCTURE DU TRASTUZUMAB EMTANSINE OU KADCYLA®. ^[114]	100
FIGURE 34: INTERNALISATION ET RECYCLAGE DU RECEPTEUR HER2. ^[115]	100
FIGURE 35: LE MECANISME D'ACTION ET L'ACTIVITE BIOLOGIQUE D'ACM IMMUNOCONJUGUE. ^[127]	101
FIGURE 36: L'ANTIGENE SPECIFIQUE A LA PROSTATE ET L'EPITOPE DU CAPROMAB. ^[118]	102
FIGURE 37: IMAGES FUSIONNEES DE SPECT (SINGLE-PHOTON EMISSION COMPUTED TOMOGRAPHY) /CT D'UN PLAN, AXIAL, SAGITTAL ET CORONAL. ^[117]	103
FIGURE 38: BIO-MEDICAMENTS EN DEVELOPPEMENT D'APRES PHRMA BIOTECHNOLOGY 2013. ^[128]	111
FIGURE 39: LE MARCHE PARTAGE DE 25 ACM ACTIVEMENT COMMERCIALISES EN FONCTION DES VENTES. ^[122]	113
FIGURE 40: LES VENTES D'ANTICORPS MONOCLONAUX PAR AIRE THERAPEUTIQUE EN 2010. ^[122]	113
FIGURE 41: LA PROPORTION DES 4 TYPES D'ANTICORPS MONOCLONAUX EN DEVELOPPEMENT CLINIQUE DURANT LES PERIODES 1990-1999 ET 2000-2008. ^[123]	114
FIGURE 42: LE NOMBRE CUMULATIF DES ACM HUMAINS ENTRANT EN ETUDES CLINIQUES ENTRE 1985 ET 2008. ^[123]	115
FIGURE 43: LES VENTES TOTALES DU MARCHE PHARMACEUTIQUE DE PRESCRIPTION (MILLIARDS DE \$), DE 2003 A 2015. ^[122]	117

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: COMPARAISON DU COUT ESTIME DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE PRODUCTION D'ANTICORPS. S.S. FARID / J. CHROMATOGR. B 848 (2007) 8–18.	35
TABLEAU 2: NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES DIFFERENTS TYPES D'ANTICORPS MONOCLONAUX, TENANT COMPTE DE LA CIBLE POTENTIELLE. ^[45]	42
TABLEAU 3: LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES 4 SOUS CLASSES D'IGG. ^[125]	51
TABLEAU 4: SPECIFICITE DES ACM UTILISES DANS LA TRANSPLANTATION D'ORGANES. ^[94]	86
TABLEAU 5: VENTES DES 25 ACM ACTIVEMENT COMMERCIALISES EN 2010. ^[122]	112
TABLEAU 6: LISTE DES MEDICAMENTS ACTIVEMENT COMMERCIALISES (US/EU) EN JUIN 2011. ^[122]	116
TABLEAU 7: PREVISIONS DE VENTES ONT ETE GENEREES PAR TYPE DE MOLECULES. ^[122]	118

Liste des abréviations :

Ac: anticorps

aa: acide aminé

Acm: anticorps monoclonaux

ADA: Anti-Drug Antibodies

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity.

Ag: Antigène

ATL: Adult T-cell Leukemia-Lymphoma

CAM: Complexe d'Attaque Membranaire

CCR4: CC chemokine receptor 4

CD: Cluster de différenciation

CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity

CDR: Complementarity Determining Regions

CH: Heavy Chain

CHO: Chinese Hamster Ovary cell

CL: Light Chain

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes

CCP: Cyclic Citrullinated Peptides

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocytes Associated protein 4

DCI: Dénomination Commune Internationale

E.Coli: Escherichia Coli

EMA: European Medicines Agency

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule

F: Phénylalanine

Fuc: Fucose

Fab: Fragment antigen binding

Fc: Fragment cristallisable

FcRn: neonatal Fc Receptor

FDA: Food and Drug Administration

FR: Facteurs Rhumatoïdes

Gal: Galactose

GlcNAc: N-acétyl-Glucosamine

GP: GlycoProtéines

GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

HAMA: Human Anti-Mouse Antibody

HAT: Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2

HGPRT: Hypoxanthine-Guanine Phospho-Ribose Transférase

HPN: Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne

HTLV-1: Human T-cell Leukemia Virus I

Ig: Immunoglobulines

IL: InterLeukines

INF γ : Interferon- γ

Inib: inhibiteurs de la tyrosine kinase

NK: Natural Killer

NANA: N-AcetylNeuraminic Acid (acide sialique)

MadCAM-1: Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1

Man: Mannose

OPG : OstéoPrétéGérine

PEG: Poly-Ethylène Glycol

PR: Poly arthrite Rhumatoïde

PSMA: Prostate Spécifique Membrane Antigen

RANK: Receptor Activator of Nuclear factor kB

RANK-L: Ligand

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

scFv: single-chain variable Fragment

SEP: Sclérose En Plaque

SPECT: Single-Photon Emission Computed Tomography

TCR: T Cell Receptor

T-DM1: Trastuzumab emtansine

TGF- α : Transforming Growth Factor alpha

Th1: T helper 1

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor

TK: Tyrosine Kinase

V: Valine

VH: Variable Heavy

VL: Variable Light

VRS: Virus Respiratoire Syncytial

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

1. Introduction :

Par l'article L5111-1 Modifié par la loi n°2007-248 du 26 Février 2007-art.3 JORF 27 Février 2007, « on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique ». Selon la directive européenne 2003/63/CE, « un médicament biologique est un produit dont la substance active est une substance biologique. Une substance biologique est une substance produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimico-biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle ». Un biomédicament, contrairement à un médicament d'origine chimique, est donc défini non seulement par ses propres caractéristiques mais aussi par la maîtrise, à la fois, de son procédé de fabrication ainsi que ses essais de caractérisation structurale et fonctionnelle vis-à-vis de la cible.

Citer le mot bio-médicament conduit naturellement à penser aux traitements innovants développés depuis 3 décennies grâce à une évolution des concepts illustrée par le passage d'une sérothérapie vieillissante datant de la fin du XIX^{ème} siècle à la découverte des anticorps monoclonaux (Acm) murins grâce aux observations de l'hybridome de Köhler et Milstein publiées en 1975 dans la revue Nature et qui leur a valu le prix Nobel en 1984. Ce développement conceptuel a été accompagné, au cours des années 80, par une évolution marquée des techniques d'ingénierie moléculaire qui a permis l'utilisation clinique des Acm suite à l'échec des anticorps murins de première génération dû à leur neutralisation par les anticorps humains anti-souris (*Human Anti-Mouse Antibody* « HAMA »).

Le développement des Acm a apporté un nouvel espoir pour traiter des maladies incurables ou déjà curables tout en minimisant les effets indésirables des thérapies

lourdes utilisées. Ceci représente une alternative incontournable qui permettrait une éventuelle guérison tout en apportant une amélioration du cadre de vie des patients.

Les notions évoquées précédemment mènent à se poser plusieurs questions :

- Quelles sont les différentes voies d'actions des Acn et de leurs dérivés ?
- Quelles sont les différentes cibles cliniquement utilisables à ce jour ?
- Quelle est la tendance actuelle d'évolution du marché de la « biothérapie ciblée » ?

**DE LA SEROTHERAPIE A LA
« BIOTHERAPIE CIBLEE » : UNE
HISTOIRE D'UNE EVOLUTION
CONTINUE**

2. De la sérothérapie à la « biothérapie ciblée » : une histoire d'une évolution continue

L'origine de la sérothérapie remonte à la découverte en 1888 de la toxine diphtérique par le Docteur Emile Roux et Alexandre Yersin. Elle a pris sa vraie naissance à partir de l'année 1890 quand Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato avaient publié leurs observations concernant l'administration de doses sublétales de toxine diphtérique à des animaux immunitairement naïfs permettant ainsi leur protection d'une exposition ultérieure à des doses létales. Ils en ont conclu aussi que cette immunité acquise pourrait être transférée grâce à une transmission de sérum d'où l'appellation « sérothérapie ». Cette méthode a été très rapidement transposée et appliquée chez l'humain à partir de 1891 en utilisant des sérums de mouton ou de cheval. Au cours de cette période, la mortalité liée à la diphtérie est donc passée, en France, de 45% à 24%.

Albert Calmette et Césaire Phisalix ont reporté ce nouveau concept de l'époque au traitement de l'envenimation par morsure de serpents et de scorpion. Ce succès thérapeutique contribue, à ce jour, à la prise en charge des envenimations. Les sérums utilisés sont préparés en utilisant les venins venant d'espèces différentes. Leurs compositions diffèrent selon les localisations géographiques desquelles proviennent les espèces concernées.

En 1900, Paul Ehrlich, un pionnier de l'immunologie du début du siècle dernier, propose le concept de récepteurs secrétés par les cellules du système immunitaire en réponse à des agents exogènes. Il prévoyait leur utilisation comme des « magic bullets ». Le diagramme ci-dessous, repris de l'une de ses dernières publications, présente une très grande ressemblance avec la vision actuelle du mécanisme d'action des anticorps monoclonaux.^[1]

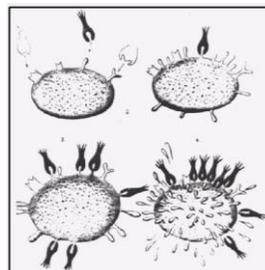


Figure 1: « Magic bullets » par Paul Ehrlich, 1900.

La théorie proposée par Ehrlich est appelé « théorie sélectrice ». Celle-ci se traduit par une possibilité de développer un produit qui cible et tue les cellules malades uniquement. Il postule donc qu'il se développe une multiplication et une production massive de copies du même récepteur que la cellule a préalablement fixé.

Entre 1895 et 1904, Jules Bordet découvre le mode d'action des sérums hémolytiques et bactériolytiques. Il clarifie ainsi le mécanisme impliquant l'immunité humorale dans la défense antibactérienne. Ses travaux démontrent que la bactériolyse est la résultante de l'action de deux entités : une composante thermolabile non-spécifique appelée Alexine (complément) et une autre composante thermostable spécifique appelée sensibilisatrice (Anticorps). Le phénomène d'agglutination précédant la lyse est, *quant-à-lui*, dû à l'intervention des anticorps (Ac) en l'absence du concours du complément.

Durant la même époque, Karl Landsteiner décrit les groupes sanguins en étudiant le phénomène de coagulation du sang. Il a réussi, un peu plus tardivement, à découvrir le facteur « rhésus » du nom du macaque ayant servi à l'expérimentation. En 1936, il écrit un livre intitulé « The specificity of serological reactions » dans lequel il décrit la spécificité des anticorps.

Tiselius A. et Kabat E. publient en 1939 des résultats d'électrophorèse de sérum de lapin (voir figure 2). Ils en ont concluent que les anticorps faisaient partie des gammaglobulines et que les fonctions antitoxine, précipitine et agglutinine, attribuées auparavant à des composés différents du sérum, n'étaient rien qu'une seule entité (Ac). L'année précédant cette découverte, Kabat démontre l'hétérogénéité des anticorps grâce à une ultracentrifugation de sérums équins.

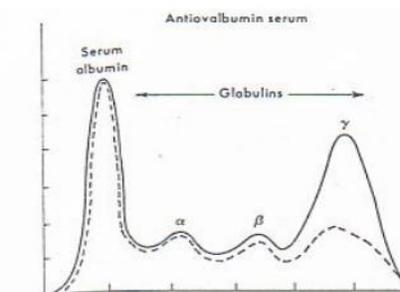


Fig. 16-1. Electrophoresis of serum from a rabbit intensively immunized with ovalbumin, before (—) and after (---) removal of Ab molecules by specific precipitation with ovalbumin. [From Tiselius, A., and Kabat, E. A. *J Exp Med* 69:119 (1939).]

Figure 2: Résultats d'électrophorèse de lapins par E. Kabat et A. Tiselius, 1939.

Merrill Chase a réussi, en 1942, à transférer l'immunité antituberculeuse entre des cochons grâce à un transfert de globules blancs. Quelques années plus tard (en 1948), Astrid Fagraeus décrit dans sa thèse doctorale l'implication des lymphocytes B dans la production des anticorps. Le rôle joué par les lymphocytes dans la mise en place, à la fois, d'une réponse humorale et cellulaire a été démontré en 1959 par James Gowans.

A la fin des années 1950, les scientifiques Jerne, Talmage et Burnet prouvent que la « théorie sélectrice » d'Ehrlich était vraie à l'exception que les récepteurs spécifiques neutralisants ne sont pas membranaires mais solubles. Ils donnent alors naissance à la théorie de sélection clonale qui a été prouvée quand Gustav Nossal démontra qu'un clone de lymphocytes B produit toujours le même anticorps.

Pendant l'année 1960, Edelman, Porter et Hilschmann ont décrit la structure primaire et secondaire des anticorps. Ils découvrent aussi que les protéines de Bence-Jones, retrouvées dans les urines dans un certain type d'hémopathies, sont des chaînes légères d'immunoglobulines. Cette découverte a pu être réalisée grâce à la protéolyse ménagée en utilisant la papaïne puis la pepsine, elle-même découverte quelques années plutôt.

La même année, Georges Barski réalise des cultures cellulaires mixtes composées de cellules somatiques murines. Il a utilisé une première catégorie tumorigène et une deuxième dépourvue de cette capacité. Ces cellules pouvaient être différenciées grâce à l'aspect différent de leurs chromosomes qui peuvent être identifiés par des marqueurs différents. En menant ces expériences, il obtient des cellules hybrides comportant les caractères des cellules de départ. Il en conclut un transfert de l'information génétique. Afin de se débarrasser des cellules parentales non hybrides, John Littlefield a créé des cellules ayant des déficiences enzymatiques différentes affectant les voies de synthèse de l'ADN. En ajoutant au milieu de culture des drogues métabolisées par ces voies, les cellules non hybrides meurent et les cellules hybrides persistent car elles disposent du matériel nécessaire pour métaboliser les drogues.

Il a fallu attendre 1975 afin que Césaire Milstein et Georges Köhler publient, sur la revue « Nature », l'obtention des anticorps monoclonaux grâce à la méthode de l'hybridome décrite un peu plus tard dans ce document.

Cette découverte avait contribué à l'utilisation des Acm à des fins de diagnostique dans un premier temps avant que leur utilisation clinique puisse être réalisée. La première réussite thérapeutique a été couronné par la mise sur le marché en 1986 du premier anticorps monoclonal l' « OKT3 » appelé MUROMONAB (MURine MONoclonal Anti-Body). Cet anticorps a été défini pour la première fois en 1979. Il a été utilisé chez les transplantés rénaux où il induit une lymphopénie permettant de prévenir les rejets. Il est le seul anticorps murin ayant obtenu une AMM à ce jour. Il s'agit d'un Ac reconnaissant la chaîne ϵ du récepteur CD3 qui, lui, est associé au récepteur TCR des lymphocytes T.

Les récepteurs CD (Cluster de différenciation), il faut le rappeler, sont définis comme étant des récepteurs présents à la surface cellulaire et reconnus par les anticorps. Ils permettent ainsi l'identification des cellules et leurs stades de différenciation. Cette identification est basée sur la détection de ces marqueurs membranaires à l'aide d'Acm suivie d'une analyse par cytométrie en flux. Ces marqueurs sont désignés depuis 1982 sous la nomenclature de « cluster of differentiation » (classe de différenciation) CD suivie d'un numéro. La cellule est alors désignée par la combinaison des CD exprimés (+) et des CD absents (-). NB : le rôle de certains CD n'est pas connu.^[64]

En 1992, un Acm de diagnostique (agent d'imagerie), l'In-111-Satumomab est approuvé par la FDA. L'Abciximab, lui, fut le 2ème de la famille des Acm thérapeutique à être approuvé en 1994. Il n'est en réalité qu'un fragment d'anticorps chimérique comportant des régions constantes humaines. En 1997, les premiers Acm entiers sont approuvés aux USA, l'un chimérique, Rituximab, et l'autre humanisé, Daclizumab.^[57]

Ces différents éléments mène à se poser plusieurs questions : Quelles sont les techniques de production d'un anticorps monoclonal ? Quelle est sa structure ? Quelles sont ses fonctions ? Et enfin quelle est la relation structure-fonction ?

LES TECHNIQUES DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

3. Les techniques de production des anticorps monoclonaux

Le marché de la biotechnologie date de la fin des années 1970s avec la mise en place des techniques de l'ADN recombinant. L'intérêt industriel s'est manifesté immédiatement et en 1982 la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé la commercialisation de l'Humuline, un analogue recombinant de l'insuline humaine produit dans la bactérie E. Coli. Pendant longtemps, la FDA autorisait uniquement les modifications des bactéries et l'expression de petites protéines non glycosylées, comme l'insuline, en raison des préoccupations liées à l'introduction de nouvelles toxicités telles que les substances bactériennes contaminantes, qui augmenteraient les réactions immunogéniques chez les patients. Cependant, avec l'évolution de marqueurs sélectifs de résistance (ex : les marqueurs de résistance aux antibiotiques) et la possibilité de production dans des organismes eucaryotes, la FDA a commencé à se montrer plus flexible envers les innovations technologiques. Ceci a conduit à une augmentation continue du nombre de nouvelles entités biologiques approuvées.^[60]

La plupart des AcM approuvés sont produits avec des processus similaires notamment la fermentation discontinue (alimentée ou non) de cellules de mammifères suivie d'étapes de purification sur chromatographie avec des filtrations intermédiaire et des opérations de clairance virale.^[59]

Sous la pression de la diminution des coûts de production, les industriels ont cherché à trouver des systèmes alternatifs tels que : les systèmes d'expression transgéniques, E. Coli et les levures pour les fragments d'anticorps. Avec l'augmentation des titres des cellules de mammifères, il existe aussi des efforts pour améliorer la technologie utilisée en aval. Afin qu'un anticorps monoclonal puisse atteindre son potentiel commercial maximal, toutes les améliorations apportées doivent démontrer qu'elles apportent une diminution de leurs coûts.^[59]

Il paraît important de noter que ces techniques de production n'ont pas évolué uniquement pour améliorer l'affinité des AcM mais aussi afin d'améliorer la stabilité des AcM déjà existants.

3.1. Phage-display

La technique du phage display est une technique de production et de sélection des peptides. Elle est basée sur la présentation de ces derniers à la surface des phages filamenteux, suite à une opération de clonage aléatoire d'oligo-nucléotides en 5' des gènes des protéines membranaires pIII et pVIII. Elle a été décrite pour la première fois par Georges Smith en 1985 et est devenue depuis un outil très puissant.^[61]

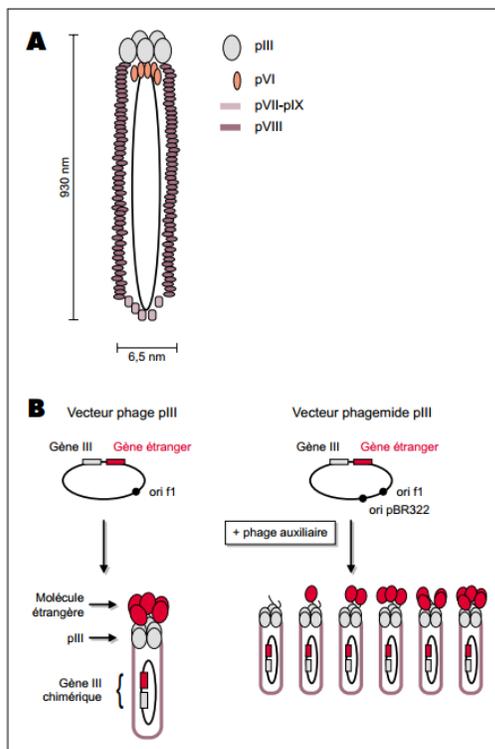


Figure 1. **A. Représentation schématique du bactériophage filamenteux**. Le phage présente une longueur de 930 nm et un diamètre de 6,5 nm. Son ADN est logé à l'intérieur d'un cylindre flexible composé d'environ 2 700 monomères de protéine pVIII. Une extrémité de la particule présente 5 copies des protéines pVII et pIX tandis que l'autre extrémité présente 5 copies des protéines pIII et pVI. Les protéines pIII exposées sur la tête du phage sont impliquées dans l'attachement aux pili de la bactérie hôte qui précède l'infection. Les protéines pVIII composent le manteau du phage. **B. Exemple d'expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide.** Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phage pIII, toutes les protéines pIII du phage sont fusionnées à la molécule étrangère. Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phagemide pIII, la protéine pIII du phagemide fusionnée à la molécule étrangère et la protéine pIII sauvage codée par le phage auxiliaire sont exprimées dans la même cellule. Plusieurs combinaisons d'expression sont possibles et le nombre de molécules étrangères exprimées en surface est variable.

Figure 3: A. Représentation schématique du bactériophage filamenteux. B. exemple d'expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide.^[61]

Les peptides d'intérêt (les fragments d'anticorps) sont présentés, à la surface, en fusion avec les domaines N-terminaux des protéines pIII et pVIII présentes sur l'enveloppe du phage. Du fait du nombre limité de protéines pIII, la présence des peptides sur celles-ci ne semble pas altérer l'aspect du phage. En revanche, le nombre important de protéines pVIII provoquerait un encombrement stérique et limite le nombre d'acides aminés du peptide d'intérêt à environ 8aa. Au-delà de ce nombre, il serait nécessaire de diluer les protéines pVIII par la présence de protéines sauvages d'un phage auxiliaire, permettant ainsi d'éviter toute gêne stérique. Le facteur limitant de la taille des peptides est, en réalité, la taille de la banque de phage à mettre en place afin

que toutes les combinaisons aléatoires d'acides aminés soient représentées. Il est important de mentionner aussi qu'au-delà de 6-7 acides aminés les banques obtenues sont partielles car elles nécessitent 10^{11} transformants.^[61]

Les phages recombinants sont sélectionnés selon la capacité des molécules d'intérêts à fixer une cible. Cette dernière, à savoir la cible, peut être un anticorps monoclonal, un récepteur ou une enzyme selon que les molécules d'intérêt soient respectivement : un épitope, un récepteur ou une enzyme. La sélection des fragments d'anticorps ayant une nouvelle spécificité est, *quant-à-elle*, assurée en utilisant des antigènes purifiés. Suite à de nombreux lavages, les phages qui restent fixés sur les antigènes sont élués puis isolés et enfin amplifiés par infection de bactéries. Les phages sélectionnés subissent ensuite 3 à 4 cycles de sélection-amplification et sont enfin analysés et testés pour l'activité recherchée.^[61]

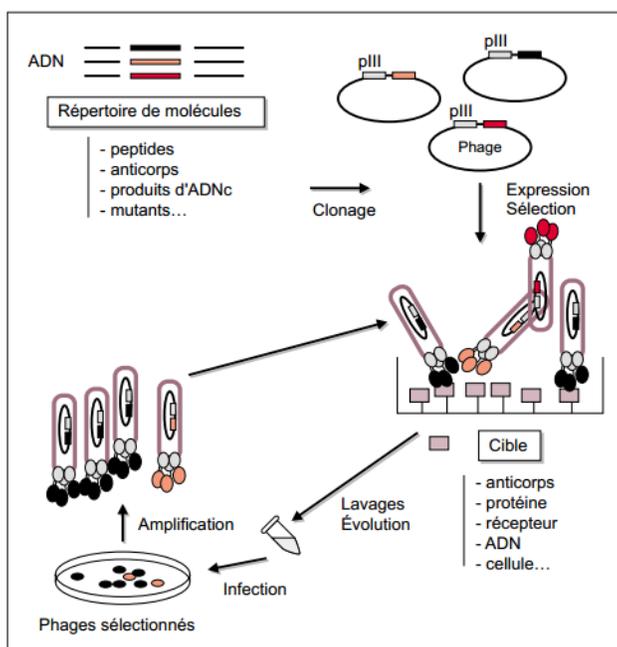


Figure 2. **Sélection d'un répertoire de molécules exprimées à la surface de phages filamenteux pour leur liaison à une cible (biopanning).** Le mélange de phages est incubé avec la cible en milieu de saturation. Après plusieurs lavages, les phages fixés sont élués puis utilisés pour infecter des bactéries en phase exponentielle de croissance. Les phages sélectionnés sont ensuite amplifiés puis utilisés pour un nouveau tour de sélection.

Figure 4: Sélection d'un répertoire de molécules exprimées à la surface de phages filamenteux pour leur liaison à une cible.^[61]

Contrairement à la méthode de criblage classique qui, *elle*, nécessite de nombreuses manipulations, cette technique permet d'introduire une diversification additionnelle et d'ajouter des pressions de sélection à chaque cycle de sélection-

amplification. Le criblage se fait donc sur 10^6 à 10^{10} molécules recombinantes différentes dans un volume réduit de quelques microlitres. La sélection est effectuée de manière tellement efficace qu'un phage présentant une fréquence de $1/10^8$ peut être amplifié. Etant donné que l'ADN est isolé avec la protéine pour laquelle il code, il serait important de noter que l'association de la protéine avec son ADN permet un séquençage rapide des molécules sélectionnées.^[61]

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.^[61]

3.2. Animaux transgéniques : la technique de l'hybridome

Des cellules spléniques immunisées contre des globules rouges de mouton ont été fusionnées avec des cellules d'un myélome immortel *in vitro*. La fusion a été réalisée par l'utilisation du virus de Sendai. Les hybridomes obtenus comportent les mêmes caractères que les cellules de départ. Ils sont donc caractérisés par leurs capacités de multiplication indéfinie et par une production d'anticorps anti-globules rouges du mouton. Les cellules issues du même hybridome produisent un seul type d'anticorps appelé dans ce cas « monoclonal ».

Pour rappel, les cellules de mammifères utilisent 2 voies de synthèse de nucléotides. La 1^{ère} voie empruntée est la *biosynthèse de novo* qui est basée sur une synthèse de nucléotide à partir de précurseurs sur lesquels il y a un transfert de groupe méthyle ou formyle à partir du tétrahydrofolate.

La présence d'aminoptérine, un analogue de l'acide folique présent dans le milieu HAT, bloque cette voie de synthèse. La cellule est donc contrainte à utiliser la voie d'épargne. Il se passe alors un transfert d'une base (purique ou pyrimidinique) sur

un phospho-ribose afin de former un nucléotide. Ce transfert est assuré par une des 2 enzymes : HGPRTase ou TK (Tyrosine Kinase).

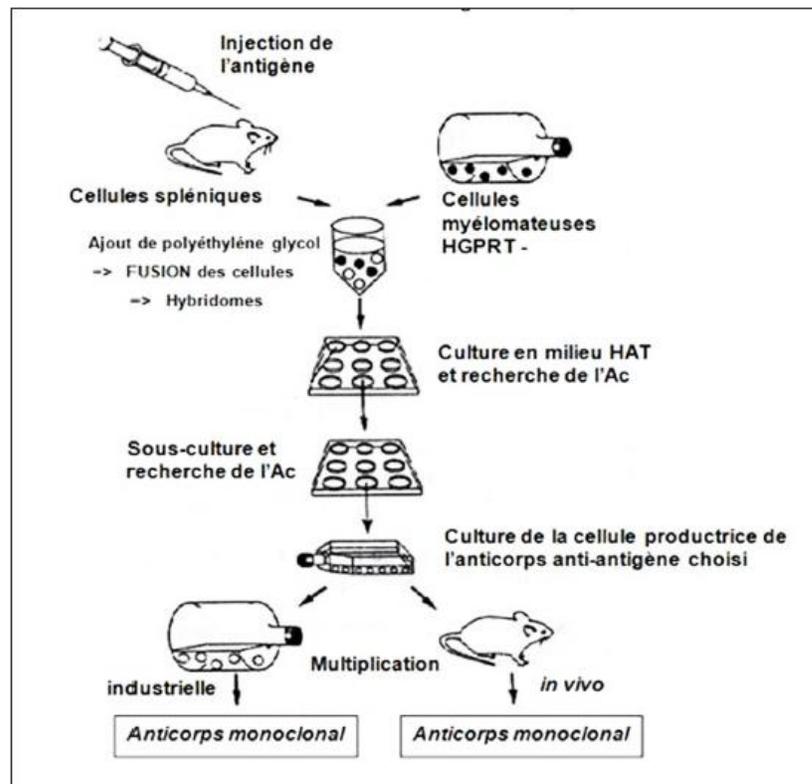


Figure 5: Procédé de fabrication d'un Acm spécifique d'un antigène selon Köhler et Milstein. HGPRT(-) (Déficiency en Hypoxanthine-Guanine Phospho-Ribose Transférase). Milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine).^[2]

En plus du blocage de la voie de néosynthèse par la présence d'aminoptérine, la voie d'épargne est rendue impossible à cause de la déficience des cellules myélomateuses en HGPRTase. Ces cellules et les hybridomes issus de 2 cellules myélomateuses finissent donc par mourir.

D'autre part, les cellules spléniques (lymphocytes B) disparaissent du milieu car elles n'ont pas la capacité de survivre *in vitro*. Les seules cellules qui réussissent à survivre sont donc les hybridomes issus des cellules myélomateuses et des lymphocytes B car ils disposent de l'enzyme HGPRT des lymphocytes B et ont la caractéristique d'une multiplication infinie *in-vitro* apporté par la cellule myélomateuse.

Il est à noter que l'utilisation du Poly-Ethylène Glycol (PEG) comme agent de fusion, en remplacement du virus de Sendai, a rendu plus simple la technique de l'hybridome.

3.3. Plantes transgéniques

L'expression des Acm dans des plantes transgéniques est une technologie bien établie et beaucoup de travaux ont été écrits à ce sujet. Cette technologie doit faire face à des défis tels que : la capacité de production, les glycosylations, les coûts de production, les délais et enfin les problèmes propres à ces systèmes de production.^[58]

Les avantages de la production dans les plantes transgéniques des Acm et des protéines thérapeutiques en général incluent : le faible coût de production, la facilité du scale-up ou du scale-down afin de répondre à la demande du marché, un coût plus faible que dans le cas des systèmes mammaliens ou les autres systèmes transgéniques et enfin l'absence des pathogènes provenant du monde animal notamment les virus et les prions. Ces avantages ne sont, cependant, pas très apparents au vu des questions relatives à la fabrication de plantes transgéniques qui, elle, est fondée sur des hypothèses erronées.^[58]

Etant donné que les plantes ont réussi à être acceptées comme des systèmes de production d'anticorps, des progrès ont été réalisés dans les domaines de la caractérisation des modifications post-traductionnelles et de leurs effets sur les fonctions des anticorps. Les différences de glycosylation entre les systèmes animaux et les plantes ont laissés supposer que les Acm produits par des plantes pourrait être immunogènes voire allergiques. A titre d'exemple, les plantes utilisent souvent des liaisons alpha (1,3)-fucose et peuvent avoir des béta(1,2)-lié xylose, qui sont toutes les deux inconnus par les systèmes immunitaires des mammifères. Une étude a démontré que la présence de ces liens chez des IgG1 monoclonales murines ne provoquait pas une réponse quand elles sont injectées chez la souris tandis qu'une injection de la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase) provoquait une production d'anticorps anti-glycanes spécifiques de plantes. Cette étude a démontré aussi qu'il existe des protéines végétales portant des glycanes spécifiques aux végétaux contre lesquelles des anticorps dominants sont produits. Les sucres injectés seuls ne provoqueraient pas

cette réaction antigénique. Des résultats similaires, dans une autre étude, ont été observés concernant des Acm murins produits dans le maïs qui ne provoquait pas de réaction immunitaire chez la souris.^[58]

La production de produits thérapeutiques dans plusieurs plantes a été examinée et comparée dans une étude en prenant en compte le coût, la production et le « processing ». Quelle que soit la plante utilisée, 4 critères ont été pris en considération afin d'assurer la qualité du produit fini à savoir la conformité avec:

- la législation du « United States Department of Agriculture ».
- les programmes de Contrôle Qualité
- les programmes d'Assurance Qualité.
- et l'isolation des autres plantes, si un croisement peut se produire, il faut assurer la préservation depuis la plantation des semences jusqu'à la formulation finale.

Les barrières réglementaires et technologiques considérées, par l'industrie pharmaceutique et les industries de cultures cellulaires mammifères, comme tellement importantes qu'une dépendance aux plantes transgéniques serait trop risquée pour que celle-ci deviennent productrices rentables.^[58]

Afin de répondre aux problématiques soulevées par l'utilisation de plantes dans la production pharmaceutique, y compris celles des anticorps, la « Biotechnology Industry Organisation » a édité un document concernant ce sujet. L'utilisation des techniques modernes de biotechnologie permet une production efficiente des produits pharmaceutiques en utilisant des petits champs de culture. Ceci résulte d'une combinaison des techniques classiques de productions pharmaceutiques avec les techniques de production des plantes.^[58]

3.4. Systèmes bactériens

La glycosylation des anticorps recombinants entiers a rendu nécessaire l'utilisation des cellules mammaliennes comme système de production. Ce type de cellules permet une N-Glycosylation semblable à celle des humains. Quelques inconvénients sont, cependant, à souligner notamment au moment du scale-up ou du « bioprocessing » où une prolongation des temps des bioprocédés et une augmentation

des coûts sont observés. En revanche, les fragments d'anticorps non glycosylés, mais ayant des propriétés de fixation d'antigènes, peuvent, eux, être produits dans des systèmes bactériens.

Les systèmes procaryotes sont très largement utilisés dans la production des protéines recombinantes. Pour cause, la rapidité de leur croissance en présence de nutriments pas chers, leur capacité à atteindre des densités cellulaires importantes, la compréhension et la facilité de manipuler leurs systèmes génétiques.^[60]

E. Coli, une bactérie Gram négatif, est le premier organisme microbiologique utilisé pour la production des bio-médicaments et représente, aujourd'hui, 40% des produits mis sur le marché. Après la mise sur le marché de l'Humuline® (une insuline humaine) plusieurs molécules biologiques, dont le TNF-alpha Fab et les fragments d'anticorps, ont été produites de manière réussie dans ce système.^[60]

Bien que la production cytoplasmique d'*E. Coli* permet des rendements importants de production intracellulaire, elle est souvent associée à la formation de corps d'inclusion. Ce phénomène provient de 2 évènements. D'une part, l'expression déséquilibrée caractéristique des éléments d'aide au repliement. D'autre part, l'impossibilité de former des ponts disulfures dans l'environnement réducteur du cytoplasme. Ce problème peut être traité par l'expression concomitante de protéines chaperonnes ou par un transport de la protéine d'intérêt à l'espace péri plasmique en la fusionnant avec un peptide au N-terminal. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour les fragments d'anticorps. Cependant, si un repliement de la protéine d'intérêt est possible, la technique des corps d'inclusion reste une technique de valeur.

En résumé, les fragments d'anticorps non glycosylés peuvent être produits dans *E. Coli* et les outils nécessaires sont déjà connus. Des anticorps entiers ont été récemment produits dans *E. Coli* mais la glycosylation était absente. L'identification des voies de N-glycosylations dans *Campylobacter jejuni* et la possibilité de les introduire dans *E. Coli* peut ouvrir la voie de production des anticorps entiers dans *E. Coli*. Des investissements par les industries pharmaceutiques sont effectués afin de réintroduire *E. Coli* dans leurs systèmes de production.^[60]

L'utilisation d'organismes vivants comme système de production pharmaceutique offre plusieurs avantages comparativement à la synthèse chimique. Les micro-organismes peuvent à la fois produire des molécules de poids moléculaire important (les protéines) et mener à bien, grâce à leurs machinerie enzymatique native, des réactions énantio- ou régio-sélective alors que ces réactions s'avèrent plus compliquées à réaliser par les voies de synthèse chimique. Leurs utilisations permettent aussi l'utilisation répétée des enzymes ou des cellules immobilisées donnant ainsi des réductions importantes des coûts de production. Il faut aussi souligner que les processus employant des micro-organismes ne génèrent pas de polluants organiques ou inorganiques tels que le mercure ou le toluène.^[60]

3.5. Levures et champignons filamenteux

3.5.1. Les champignons filamenteux :

Les champignons sont des organismes caractérisés par leur structure filamenteuse ramifiée ou en forme d'hyphe. Ils ont un diamètre typique de 2 à 18µm.

Dans les technologies de fermentation traditionnelle, les champignons filamenteux sont utilisés comme des producteurs d'un rang important de métabolites primaires comme les acides organiques (citrique, fumarique et acides gras,...). Ils sont aussi utilisés dans la production de métabolites secondaires, comme les médicaments suivants: pénicilline, céphalosporine, dérivés de l'ergot de seigle, taxol,.... Il existe aussi d'autres utilisations mentionnées dans la littérature, telles que les traitements des sols et la production d'enzymes,...^[62]

Plusieurs champignons filamenteux sont des producteurs naturels par excellence des enzymes extracellulaires et sont donc des candidats potentiels pour assurer la production de protéines recombinantes. Des organismes des genres *Aspergillus* et *Trichoderma* sont notables dans leurs capacités de produire et sécréter des quantités élevées de protéines. En effet, l'*Aspergillus niger* est capable de produire 25 à 30 g/L de glucoamylase et il a été reporté que *Trichoderma reesi* produit 100g/L de protéines extracellulaires. La haute productivité des champignons filamenteux est reliée en partie à leur capacité de croissance à des taux élevés ainsi qu'à leurs densités élevées en utilisant des substrats de faibles coûts et des fermenteurs relativement simples.^[62]

Ce système présente, tout de même, des inconvénients dont : la fréquence de transformation basse, les défauts morphologiques potentiels et enfin les modifications dues aux protéases ou au pH bas. S'ajoute à cela, une faible production des protéines hétérologues comparativement aux protéines homologues.^[62]

Les connaissances physiologiques et biochimiques détaillées sont disponibles sur beaucoup de hôtes et sur les différentes techniques moléculaires, y compris le séquençage du génome et la stratégie d'annotation des gènes. Ceci contribue aux efforts d'optimisation de l'expression et de la sécrétion des protéines recombinantes dans ce système de production. En effet, les voies de glycosylation des champignons présentent plus de similitudes avec celles des mammifères que celles des levures. D'autre part, les champignons, surtout les *Aspergillus*, ont démontré leur capacité de réaliser des modifications post-traductionnelles de façon à obtenir des protéines eucaryotes correctement repliées. Les travaux continuent à explorer ce système de production afin de mettre au point des molécules cliniquement utilisables.^[62]

3.5.2. Les levures :

Saccaromyces cerevisiae représente la première levure à être utilisée dans la production d'une protéine thérapeutique. Plusieurs biomolécules commercialisées ont été produites par ce système. Plusieurs paramètres intrinsèques orientent le choix vers ce type d'hôte. En effet, la stabilité du système d'expression et la facilité de culture ainsi que les avancées de l'ingénierie rendent leur utilisation attractive. La production des chaînes lourdes des fragments d'anticorps dans ce système représente un procédé industriel bien établi assurant ainsi la production de quantités suffisantes. Ces quantités peuvent être supérieures à 100 mg/L dans le cas de chaînes lourdes des fragments d'Ac de lamas. De plus, du fait de l'aglycosylation particulière des fragments, il n'y a pas d'influence de l'hyper-mannosylation caractéristique de cette levure.^[60]

Malgré toutes ces avancées et ces avantages, la production efficace des Acm et des fragments d'Ac dans cette levure peuvent être compromis par le mauvais repliement et le transfert inefficace au niveau du réticulum endoplasmique.^[60]

Le milieu de culture dit « fed-batch » (limitée en glucose) est généralement utilisé pour cette levure qui présente un métabolisme mixte oxydatif et fermentatif qui peut

donner naissance à des métabolites toxiques. Le changement du mode de fermentation est déclenché par l'appauvrissement en oxygène du milieu et par une élévation des concentrations en carbone. La limitation du glucose est donc une stratégie valable afin d'éviter le phénomène de fermentation.^[60]

Contrairement à *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, elle, préfère pour sa croissance le milieu aérobie au milieu de fermentation. Ceci permet une culture pas cher mais à des densités cellulaires élevées, sans risque d'accumulation d'éthanol. La possibilité d'utiliser des procédés du type « mixed feed fed batch », où deux substrats sont alimentés au même temps, facilite la croissance de la biomasse en raison de la hausse du rendement sur le second substrat. Ceci conduit à une réduction de la consommation de l'oxygène et une production réduite de la chaleur, rendant ainsi la méthode plus intéressante que l'utilisation des cellules mammifères. Il est important de souligner que deux fragments d'anticorps sont produits par ce système : le Nanobody® ALX0061 (anti récepteur à l'IL6) et Nanobody® ALX00171 (anti-VRS).^[60]

4. Comparaison des coûts des différentes techniques de production d'Acm :

Comparison of cost per gram estimates for given production rates

Expression system	Cost of goods per gram (\$/g)	
	100 kg/year	1000 kg/year
CHO cells	300–3000 ^a	–
Transgenic goat	105 ^a	36 ^a
Transgenic corn	50 ^b	14 ^b

^a Source: Young et al. [64].

^b Source: Mison and Curling [66].

Tableau 1: Comparaison du cout estimé des différentes techniques de production d'anticorps. S.S. Farid / J. Chromatogr. B 848 (2007) 8–18.

D'après ce tableau, si la production annuelle est de 100 kg, le coût (matière première + main d'œuvre) estimé de la production d'un anticorps dans des animaux transgéniques (chèvre) est de 105 \$/gramme d'Acm. Si la production est augmentée à 1000kg/an le coût se réduit à 36 \$/gramme.

DONNEES STRUCTURALES

5. Donnée structurales :

5.1. La structure d'un anticorps monoclonal prototype

Les anticorps sont des Immunoglobulines (Ig) non-membranaires produites par les lymphocytes B. Ils sont dits monoclonaux car ils proviennent du même clone de lymphocytes contrairement aux Ac polyclonaux qui, eux, sont issus de plusieurs clones. Il en existe un équivalent membranaire produit par les Lymphocytes T appelés TCR (T Cell Receptor).

Il a été démontré par S. Tonegawa, en 1976, que l'ADN codant pour les immunoglobulines est issu d'un réarrangement évoluant au cours de la vie de l'individu afin de pouvoir s'adapter aux différents antigènes rencontrés d'où la grande hétérogénéité des Ac.

De nature glyco-protéinique, les Acm sont composées de deux chaînes polypeptidiques lourdes de 50kDa chacune (soit environ 450 acides aminés (aa)) et de deux chaînes légères de 25 kDa chacune (soit environ 220 aa). Les chaînes lourdes sont composées de 3 domaines constants (CH1, CH2 et CH3), d'un domaine variable (VH) et d'une région charnière qui se situe entre les domaines CH1 et CH2. Les chaînes légères, elles, se constituent d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL). Un anticorps donné comporte 2 chaînes lourdes identiques et 2 chaînes légères identiques. Il paraît important de rappeler les acronymes suivants : CH (Heavy Chain), CL (Light Chain), VH (Variable Heavy), VL (Variable Light).

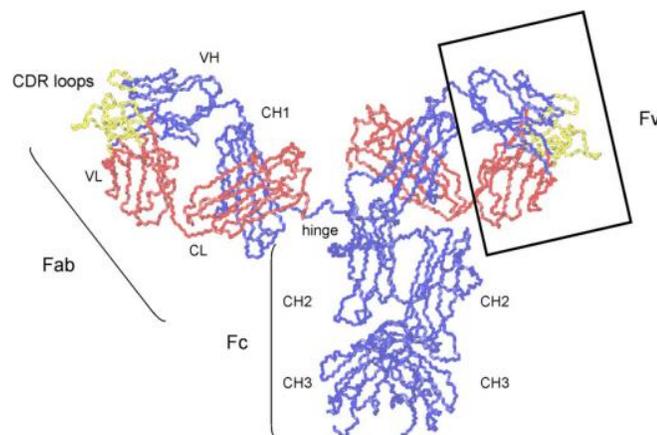


Figure 6: La structure en domaines d'une immunoglobuline. ^[90]

Les déterminants antigéniques d'une Ig peuvent induire la production d'Ac anti-Ig. En fonction de l'appartenance de ces déterminants, peuvent être définis : l'isotypie, l'allotypie et l'idiotypie.

L'isotypie est caractérisée par la présence de déterminants antigéniques identiques pour tous les individus d'une même espèce. Ces déterminants sont présents dans les chaînes lourdes qui, elles, existent sous 5 formes : γ , α , μ , ϵ et δ et définissent donc les 5 isotypes d'anticorps : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD.

D'autre part, le nombre différent d'aa et l'appariement caractéristique assuré par les ponts disulfures permettent de définir les différentes sous-classes d'Ac à savoir 4 sous-classes pour les IgG (1, 2, 3 et 4) et 2 sous-classes pour les IgA (1 et 2). Les chaînes légères, elles, existent sous 2 formes: k et λ . Un Acm, il faut le rappeler, ne comporte qu'un seul type de chaînes légères soit k ou λ .^[44]

L'allotypie est définie, *quant-à-elle*, comme la présence de déterminants antigéniques chez des individus de la même espèce mais génétiquement différents.

L'idiotypie, elle, n'est rien que la présence d'un déterminant antigénique provenant d'un seul clone.

La figure 7 illustre de manière synthétique la différence entre ces 3 notions.

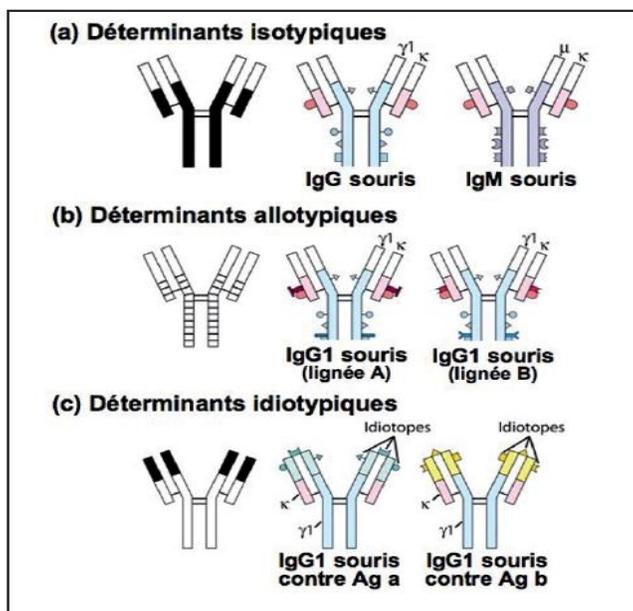


Figure 7: schéma illustrant les phénomènes d'isotypie, d'allotypie et d'idiotypie.^[34]

Les Ac sont des molécules dites bi-fonctionnelles. Elles ont la capacité, d'une part, de lier les Antigènes (Ag) en les fixant sur les régions « Fab » (Fragment antigen binding). Elles recrutent, d'autre part, les cellules du système immunitaire en les activant par fixation sur la région Fc (Fragment cristallisable).

La région charnière hydrophile et flexible relie ces 2 entités. Elle facilite les mouvements de torsion tridimensionnelle de l'Ac afin de faciliter la fixation de l'Ag quelle que soit sa localisation spatiale. Elle permet donc à la fois une flexibilité du Fab et une flexibilité-torsion du Fab/Fc.

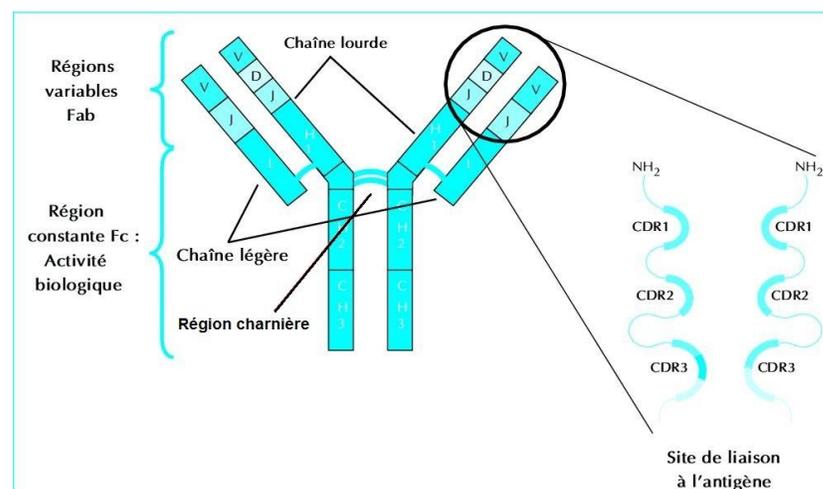


Figure 8: composition d'un anticorps monoclonal. Adaptée du schéma : Médecine thérapeutique, volume 10, numéro 1, Janvier-Février 2004, 39-46.^[3]

Le Fab comporte six domaines hypervariables appelés CDR (Complementarity Determining Regions). Ces régions représentent le paratope qui n'est rien que la partie de l'anticorps qui reconnaît l'antigène (épitope). Elle confère aux Ac une grande hétérogénéité et donc la capacité de fixer des Ag variés. Les acides aminés (aa) impliqués dans cette interaction sont d'un nombre de 6 à 20 aa. Les interactions mise en jeu sont de types Van der Waals, électrostatiques, hydrophobes et hydrogènes.^[56]

Pour toute optimisation des propriétés fixatrices des Ac, des mutations au niveau des régions CDR ou des régions charpentes (inter-CDR) peuvent être introduites. Ceci influence de manière directe l'affinité des Ac et donc leur cinétique de fixation.^[56]

Les Fragments Fab sont connus par leur relative résistance à la protéolyse comparativement au fragment Fc et à la région charnière. Environ 30% des IgGs humaines circulantes sont glycosylées dans la région Fab.^[56]

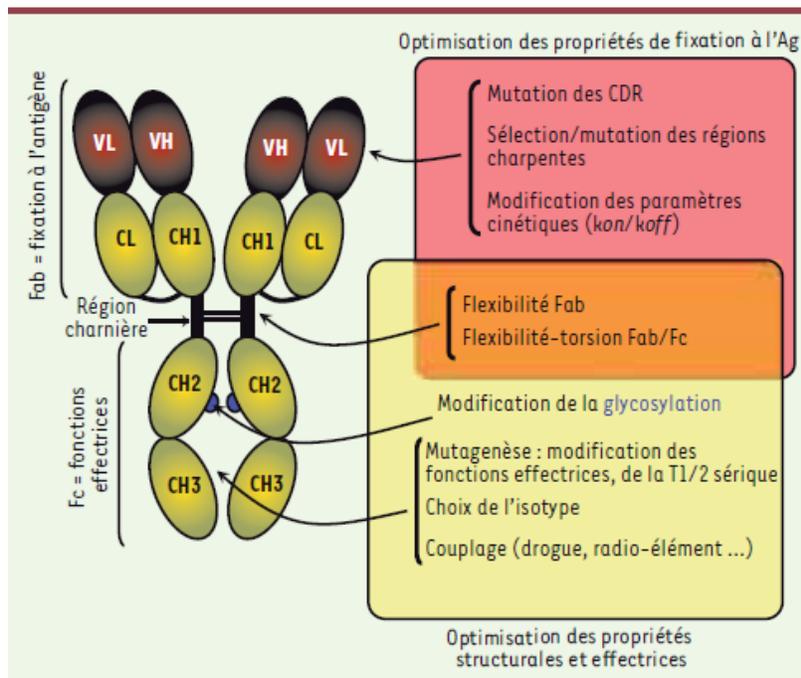


Figure 1. Les anticorps sur le métier de l'ingénierie moléculaire. La sélection des CDR (complementarity determining regions), des régions charpentes des domaines VH et VL, l'optimisation des paramètres cinétiques d'interaction permettent d'optimiser la fixation de l'Ac à l'Ag. Le choix de l'isotype, les modifications de la région charnière et des séquences clés impliquées dans les fonctions effectrices, les modifications du profil de glycosylation ou encore le couplage à différents agents cytotoxiques ou stabilisateurs permettent l'optimisation des propriétés effectrices de l'anticorps.

Figure 9: optimisation des propriétés structurales et effectrices par l'ingénierie moléculaire.^[8]

La région Fc appartient à la région constante et comporte une séquence identique en acides aminés pour une classe donnée d'Ac. Comme dit précédemment, elle est impliquée dans les fonctions effectrices à travers 2 voies. Elle permet, d'une part, l'activation de la voie classique du complément en recrutant C1q avec développement du Complexe d'Attaque Membranaire (CAM) et la lyse des cellules visées. Elle provoque, d'autre part, une ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) par sa fixation au récepteur FcγR exprimé par les macrophages, les neutrophiles, les monocytes et les Natural Killer (NK). Cette voie se manifeste à la fois par l'activation des NK et des mastocytes ainsi qu'une phagocytose des complexes Ag-Ac. (voir la partie : 5.3.3. L'ingénierie des fonctions effectrices: interaction du Fc avec le FcγR et C1q).

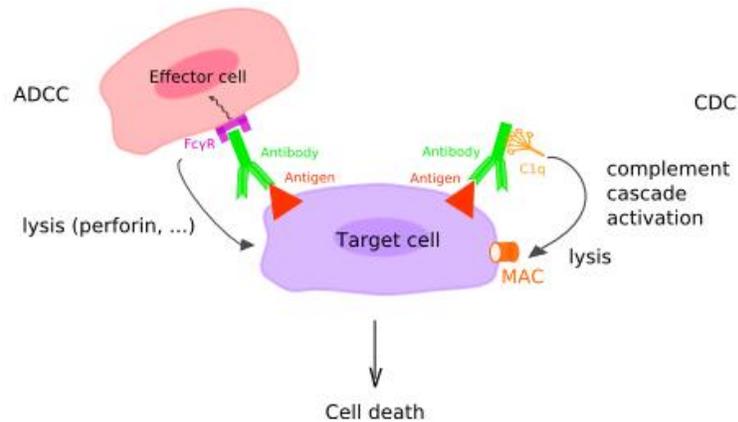


Figure 10: l'activité ADCC et CDC d'un Ac.^[52]

Ces interactions avec les cellules de l'immunité ont été illustrées lors d'une étude *in vitro* du mécanisme d'action du Rituximab sur des lymphocytes B normaux et tumoraux. Le Rituximab, Ac anti-CD20, provoque une déplétion des lymphocytes B en présence des mononuclées mais en l'absence de celles-ci la déplétion est moins importante. L'activation du complément est donc, à elle seule, insuffisante et nécessite le recrutement des cellules immunitaires grâce à l'intervention des anticorps.

La région CH2 du fragment Fc porte un domaine de N-glycosylation qui influence de manière directe les fonctions effectrices. Selon que le sucre soit présent ou absent et suivant le type de sucre, ces fonctions pourraient être augmentées ou diminuées. Ce site est responsable de la production d'anticorps neutralisants des Ac à cause de l'hétérogénéité de glycosylation inter-espèces d'où l'importance du système de production qui définit le profil de glycosylation de l'Ac.

Les différents profils de glycosylation et leurs influences sur les fonctions vont être illustrés dans le détail un peu plus tard dans ce travail (voir la partie : 5.3. Contribution de la structure à la fonction - Influence de la Fc-glycosylation sur les fonctions effectrices).

Il est à noter que la partie Fc de quelques Ac utilisés actuellement est couplée à une drogue (Ac. immunoconjugué) ou à un radioisotope. Cette méthode de couplage est généralement utilisée à des fins de diagnostic ou quand la drogue est tellement toxique qu'elle nécessite un ciblage précis vers le tissu affecté afin d'épargner les tissus sains.

Grâce à sa fixation sur le FcRn, la région Fc confère une 1/2 vie plasmatique d'une 20^{aines} de jours à l'exception des IgG3 qui, elles, ont une 1/2 vie de 7 jours seulement. Pour rappel, le FcRn, un récepteur hépatique appartenant à la famille des CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), permet de recycler les Acm. Il fixe les IgG ainsi que les albumines lors du phénomène de métabolisation endosomale et empêche donc leur dégradation.

Les anticorps monoclonaux, tout comme les autres molécules thérapeutiques, ont une DCI (Dénomination Commune Internationale) permettant leur identification. Le suffixe utilisé est « **mab** » pour « **monoclonal anti body** ». A ce préfixe viennent s'ajouter 2 syllabes. La 1^{ère} syllabe précise la source de l'anticorps. En effet, les anticorps murins sont reconnus par le suffixe « o-mab », les Acm chimériques par le suffixe « xu-mab », les Acm humanisés par « zu-mab » et enfin les Acm humains par le suffixe « u-mab ». La 2^{ème} syllabe indique la cible visée. Les exemples du Pali-vi-zumab et du Tras-tu-zumab peuvent être donnés. Dans ces deux cas, le « vi(r) » reflète la cible virale et le « tu(m) » représente, *quant-à-lui*, la cible tumorale. Le « r » et le (m) ont été supprimés pour des raisons purement phoniques. Les tableaux ci-dessous expliquent de manière synthétique les différentes syllabes utilisées dans les DCI des Acm.

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

Préfixe	Cible	Source	Suffixe
	-o(s)- Os	-u- Homme	
	-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	-e- Hamster	
Variable	-co(l)- Tumeur colique		-mab
	-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	

Tableau 2: Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux, tenant compte de la cible potentielle.^[45]

Le développement des connaissances dans les domaines de l'ingénierie moléculaire et des systèmes de production a permis une évolution continue du concept d'Acm. Ainsi les modifications et les optimisations apportées sur les Acm murins développés au cours des années 80 ont permis un passage progressif vers la mise au point d'Acm entièrement humains et le développement des fragments d'anticorps et des protéines de fusions.

5.2. Anticorps monoclonaux et molécules dérivés

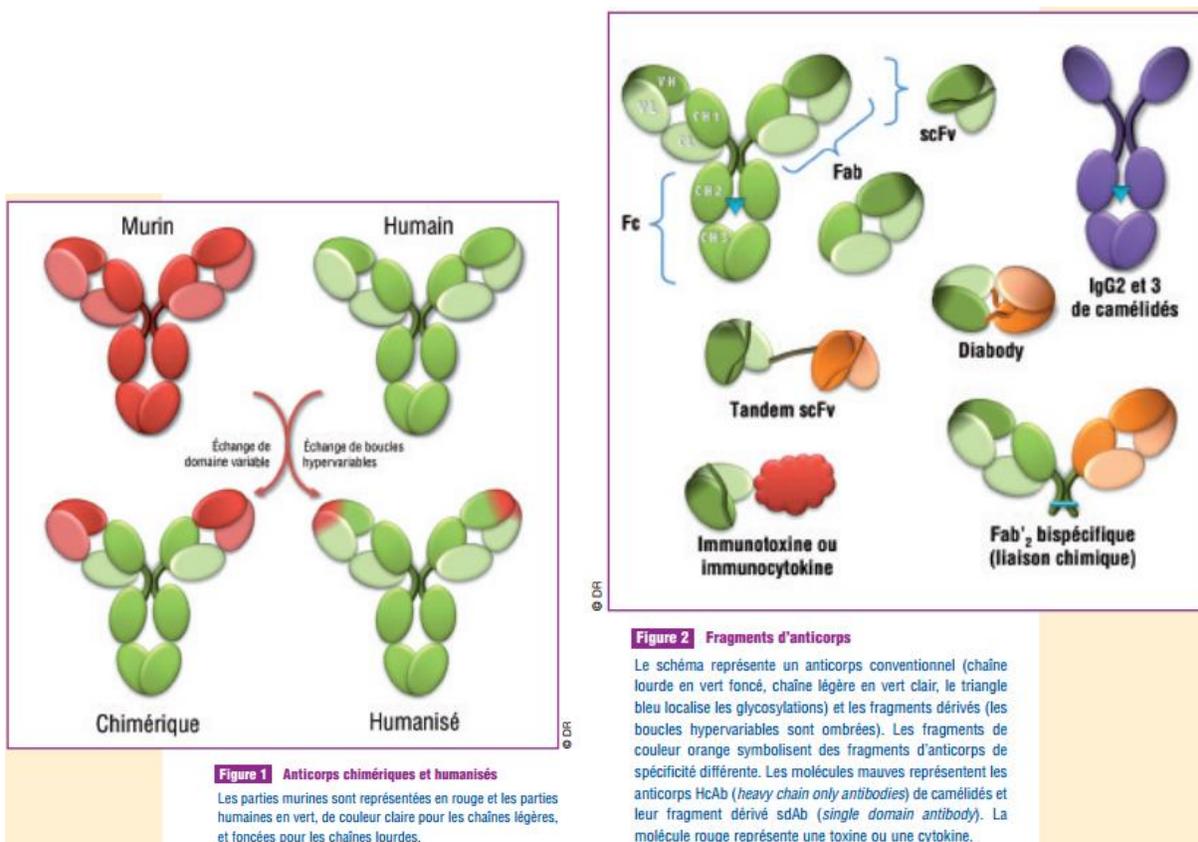


Figure 11: Schéma illustratif des 4 types d'Acm et de leurs dérivés.^[71]

5.2.1. Anticorps murins

Grâce à la technologie de l'hybridome exploitée par Köhler et Milstein, la production des Anticorps murins est devenue possible. Cette découverte a permis la mise sur le marché en 1986 de l'Orthoclone OKT3® ou Muromomab (anti CD3). Le suffixe momab peut être décomposé en 2 parties : mo (**m**ouse) pour murin et mab (**m**ono**cl**onal **ant**ibody) pour anticorps monoclonal. Cet anticorps murin est utilisé pour

les rejets de greffe d'organes. Chez l'homme, il présente une $\frac{1}{2}$ vie de (moins de 20 heures) courte comparativement à celle des anticorps humains pour lesquelles elle peut atteindre environ 20 jours.

Depuis, 6 autres anticorps murins ont été développés dont 2 à des fins de diagnostiques et 1 chimérique rat/souris, le Catumaxomab ou Removab® commercialisé depuis 2009 et indiqué dans l'ascite maligne. Ceci représente une nouveauté car pour la première fois un anticorps comportant des parties issues de rat est approuvé.

Les indications principales attribuées aux autres anticorps murins actuellement sur le marché sont essentiellement: le cancer du côlon et le lymphome non Hodgkinien.

En plus d'une $\frac{1}{2}$ vie courte, ces anticorps sont caractérisés par un faible recrutement des effecteurs cellulaires et par une forte immunogénicité d'où leurs utilisation en flash thérapeutique. En effet, dans 53% des cas, les patients produisent des anticorps anti-souris ou HAMA qui, eux, neutralisent l'anticorps utilisé.

Les contraintes mentionnées précédemment ne les ont pas empêchés de gagner une place considérable dans les tests de diagnostic. Il faut rappeler aussi que ce premier type d'anticorps a contribué à la production d'anticorps chimériques, humanisés puis intégralement humains.

5.2.2. Anticorps chimériques

Les anticorps chimériques, mis en place à partir de 1984, sont produits grâce à la fusion du gène codant pour les régions constantes d'un AcM humain avec le gène de la région variable d'un AcM murin. Ces anticorps ont la capacité de reconnaître un Ag donné avec la même affinité que l'AcM murin correspondant. En plus de la fonction de reconnaissance assurée par la région variable murine, ils ont la capacité d'induction d'une CDC ou d'une ADCC par fixation du fragment Fc à son récepteur FcγR. L'affinité avec ce dernier est améliorée comparativement au fragment Fc d'un AcM murin.

Comme décrit dans le tableau 1, le suffixe utilisé pour permettre la distinction de cette famille d'anticorps est le suffixe « xi ». Ces AcM sont humains à 75% et la région variable murine ne représentant que 25% d'où l'amélioration du profil de tolérance

comparativement aux Ac murins. De plus, l'immunogénicité est diminuée car les épitopes immunogéniques des IgGs sont majoritairement situés dans les régions CH2 et CH3 qui, elles, sont humaines. Néanmoins, la formation des HAMA dans 20 à 40% des cas restent statistiquement importantes d'où la mise en place des Acm humanisés puis humains.

5.2.3. Anticorps humanisés

En 1986, une équipe de recherche a réussi à greffer les régions CDR d'un Acm murins sur une des charpentes d'un Acm humain tout en conservant l'activité de reconnaissance issue de l'Acm murin correspondant. L'activité peut, cependant, être diminuée dans certains cas. Les grandes difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre d'un tel Acm résident à la fois dans le découpage des régions CDR murines mais aussi dans le choix des domaines variables humains sur lesquels leur insertion est possible. De plus, une connaissance détaillée des séquences en acides aminés de la région hypervariable de l'Ac murin est nécessaire afin d'identifier les séquences impliquées dans la formation et la stabilité du paratope. Il est à rappeler que les régions CDR, y compris la région charpente, interagissent étroitement avec l'épitope de l'antigène. La structure du site de liaison est ainsi conservée et l'affinité est donc proche de celle de l'anticorps murin correspondant. Seules les régions hypervariables sont murines, la formation des HAMA est donc rendue faible, 7% des cas au lieu de 20 à 40% dans le cas des Acm chimériques. Le suffixe utilisé pour désigner cette famille d'Acm est le « zu ».

5.2.4. Anticorps humains

L'évolution de la biologie moléculaire et le développement de la génie génétique a rendu possible l'apparition, entre 1994 et 1999, d'anticorps monoclonaux humains biocompatibles. La technique de l'hybridome étant difficile à mettre en œuvre dans le cas de cellules humaines, d'autres techniques, précédemment détaillées, ont été introduites telles que : le « phage display » et les souris transgéniques. Le « phage display », il faut le rappeler, est fondé sur la fusion du gène d'une banque de protéines avec le gène d'une protéine de surface d'un phage. La protéine recherchée est donc exprimée à la surface du phage. Le système immunitaire des souris transgéniques est,

quant-à-lui, modifié afin qu'elles produisent des Anticorps humains une fois immunisées contre l'antigène d'intérêt.

Le suffixe donné pour désigner cette famille d'Acm est « umab ». Il est important de retenir que malgré leur caractère humain ces anticorps peuvent présenter une certaine immunogénicité. L'exemple de l'adalimumab ou Humira® (Acm anti-TNF α [Anti-tumor Necrosis Factor α]) peut être cité.

Les Acm chimériques, humanisés et humains sont difficiles à distinguer d'un point de vue clinique car ils possèdent tous les 3 une région Fc humaine.

5.2.5. Fragment d'anticorps

Les fragments d'anticorps concernés sont des fragments Fab (fragment liant l'antigène) et des scFv (single-chain Fragment variable). Ils sont caractérisés par une efficacité rapide, un volume de distribution important, une $\frac{1}{2}$ vie courte et enfin une faible immunogénicité. Ces fragments sont utilisés dans des cas où la bivalence n'est pas nécessaire mais aussi pour limiter la toxicité grâce à l'absence de la région Fc, d'où leur $\frac{1}{2}$ vie courte et l'absence des fonctions effectrices.

Le premier Fab à être approuvé est l'Abciximab (Réopro®). Il est utilisé pour traiter les thromboses lors des interventions coronariennes percutanées (pose d'un stent, angioplastie ou athérectomie). Des travaux ont été menés sur l'Acm Bévacizumab ou Avastin® (Anti-VEGF) afin d'obtenir un Fab ayant une plus forte affinité pour le VEGF. Ces modifications ont porté sur quatre acides aminés de la région CDR, donnant naissance ainsi au Ranibizumab ou Lucentis® indiqué, lui, en injection intra-oculaire dans le traitement de la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age). Le dernier Fab à être mise sur le marché est le Certolizumab pegol ou Cimzia® (anti-TNF- α), un Fab greffé de 2 molécules de PEG de 40 kDa permettant ainsi une demi-vie plasmatique plus importante.

Il faut noter que leur petite taille rend possible une exploitation dans le domaine des nanoparticules afin de permettre un meilleur ciblage des principes actifs de faibles poids moléculaires. De plus, une conjugaison avec une toxine, une cytokine ou un radio-élément est toujours possible pour une éventuelle utilisation en oncologie.

Enfin, Grâce à une efficacité rapide leur utilisation est rendue possible à des fins de neutralisation de toxines telles que la toxine botulique et la toxine de l'Anthrax.

Les systèmes de production comme E. coli les rendent économiquement plus intéressants car ces systèmes sont moins coûteux que ceux basés sur des cellules de mammifères.

5.2.6. Protéines de fusion

Les protéines de fusion sont des structures hybrides issues de l'association d'un fragment Fc avec des peptides ou des domaines extracellulaires de protéines membranaires. Le principe de cette composition se base essentiellement sur la reconnaissance et la fixation d'une cellule ou d'un ligand impliqué dans une pathologie donnée. Ce format a permis une solubilisation des récepteurs membranaires (principalement les domaines extracellulaires) de par l'absence des domaines transmembranaires lipophiles. La présence du fragment Fc induit une augmentation de la $\frac{1}{2}$ vie plasmatique de ces particules. Ceci résulte du recyclage assuré par les récepteurs FcRn.

Cette famille est identifiée par le suffixe « cept » pour « **récepteur** ».

Le nombre de protéines de fusion actuellement sur le marché reste faible comparativement aux Acm approuvés. L'Etanercept ou Enbrel® était la première protéine de fusion à être mise sur le marché en 1998. Elle comporte la partie extracellulaire du récepteur de type 2 du TNF (TNFR2) liée à un fragment Fc d'une IgG1 ayant une région charnière incomplète. Le TNFR antagonise ainsi le TNF soluble et membranaire surexprimés lors de certaines maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde.

5.3. Contribution de la structure à la fonction - domaines activateurs du complément et interface d'interaction avec les RFc et l'importance de la glycosylation :

Dès la mise en place d'Acm à usage thérapeutique, les ingénieurs se sont focalisés sur la diminution de leur caractère immunogène en les humanisant d'une part et en les produisant par des souris transgéniques d'autre part. Une fois ces techniques mises en place et des Acm commercialisés, l'ingénierie s'est penchée sur l'augmentation des fonctions effectrices, sur le contrôle de la $\frac{1}{2}$ vie (biodisponibilité améliorée), sur l'accessibilité des tissus notamment cancéreux, mais aussi sur leur stabilité physicochimique et sur leur *efficience* qui est, *elle*, traduite par une diminution des doses et des fréquences d'administration avec une meilleure efficacité et donc un moindre coût. Des progrès significatifs ont été observés ces dernières années dans le domaine du *design* des Acm. Les modifications des interactions avec le FcRn ont permis l'amélioration de leurs propriétés pharmacocinétiques et donc une diminution de leur toxicité. De plus, une diminution de leur immunogénicité a été observée grâce à la manipulation de leurs séquences protéiques et de leurs profils de glycosylation.^[62]

La fixation de l'Ag membranaire sur le paratope engendre une activation des fonctions effectrices assurées par le fragment Fc qui peut, d'une part, recruter les cellules immunitaires (macrophages, NK et mastocytes) en induisant ainsi une ADCC ou fixer, d'autre part, le C1q du complément et activer la cascade de protéolyse donnant lieu à une CDC. Les 2 phénomènes mènent à une destruction des cellules cibles (cytotoxicité).

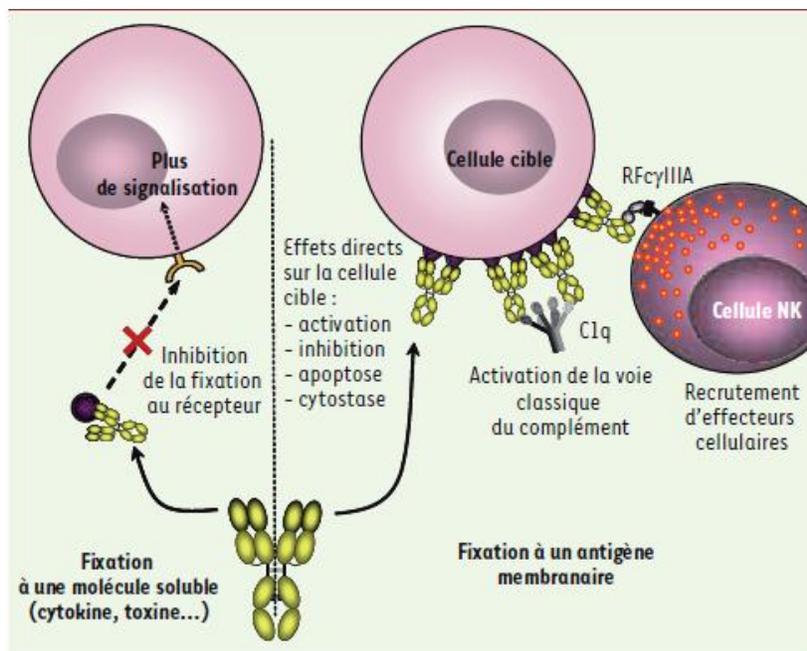


Figure 2. Les anticorps à l'assaut des anti-gènes solubles ou membranaires. L'action d'un Ac varie selon sa cible, selon que celle-ci est soluble (à gauche) ou membranaire (à droite). Dans la première situation, l'Ac empêche la fixation de l'Ag (cytokine, chimiokine, toxine...) à son récepteur présent à la surface des cellules, ce qui conduit à l'absence de toute signalisation normalement induite par cet antigène. De façon similaire, des Acm dirigés contre la protéine d'enveloppe d'un virus responsable de la fixation du virion à un récepteur cellulaire vont inhiber cette fixation et bloquer ainsi l'entrée du virus. Dans la deuxième situation, l'Ac va fixer l'Ag présent à la surface de la cellule cible, induisant ainsi soit des effets directs (activation ou inhibition de l'activation cellulaire, apoptose, cytostase) soit le recrutement et l'activation d'effecteurs cellulaires (cellules NK, monocytes,

polynucléaires neutrophiles...) ou moléculaires (activation de la voie classique du complément après fixation de la molécule C1q), sans que ces deux types d'effets soient mutuellement exclusifs.

Figure 12: Les modes d'actions des anticorps en fonction de la cible membranaire ou soluble. *Médecine/Sciences*. 2009 ; 25 : 1011-9.^[8]

5.3.1. Le choix entre les sous classes d'anticorps :

La famille des IgGs est représentée par 4 isotypes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Leurs concentrations respectives dans le sérum humain sont : 60%, 25%, 10% et 5%. L'homologie en acides aminés (aa) des régions constantes de leurs chaînes lourdes peuvent aller au delà de 95%. Ils montrent tout de même des différences dans leurs séquences en aa et dans la structure de la région charnière qui définit l'état de flexibilité de la molécule. Ainsi, la région charnière de la sous-classe IgG1 est flexible car elle comporte 15 aa et ne contient que 2 ponts disulfures entre les chaînes lourdes. Les IgG2 comportent, elles, 12 aa et 4 ponts disulfures au niveau de la région charnière. Elles sont donc moins flexibles que les IgG1. Les IgG4 ayant un nombre d'aa comparable avec les IgG2 mais une configuration différente en ponts disulfures les rendant intermédiairement flexible entre les IgG1 et les IgG2. Les IgG3, *quant-à-elles*, diffèrent des autres isotypes par la présence d'une région charnière plus longue. Elle comporte 62aa (environ 4 fois celle des IgG1) et est organisée en double hélice rigide. Malgré

une telle organisation, l'éloignement imposé des régions Fc et Fab rend la molécule beaucoup plus flexible que les autres sous-classes.

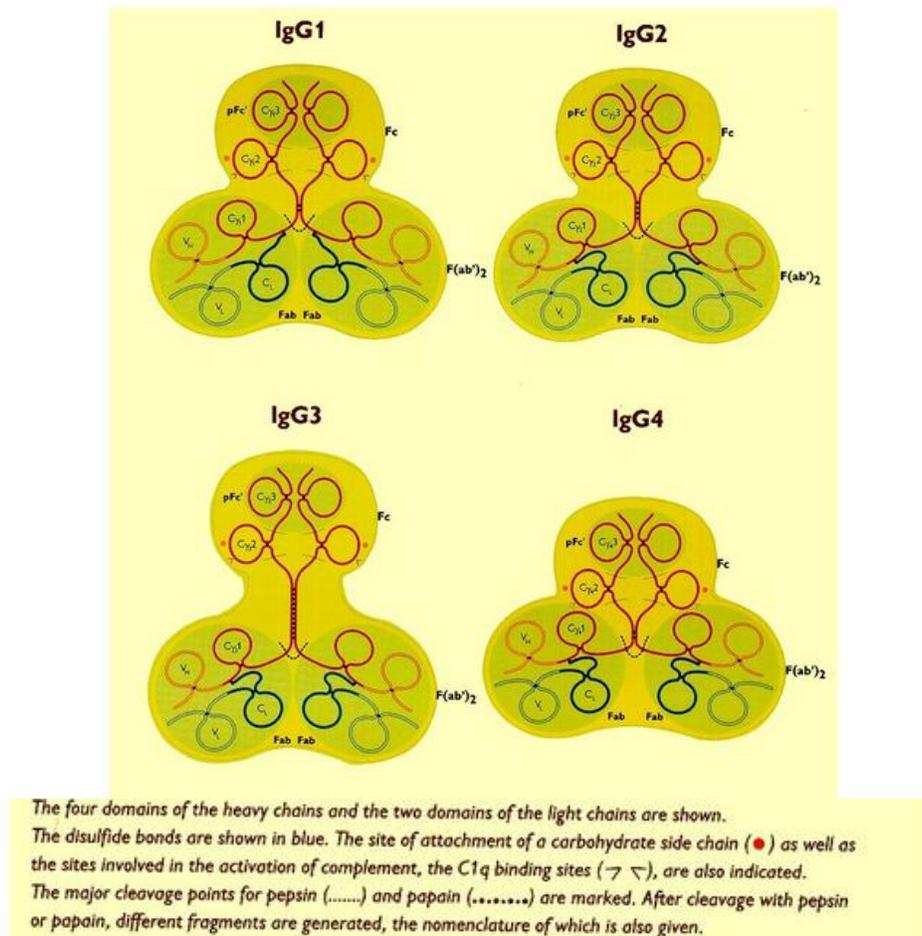


Figure 13: représentation schématisques des 4 sous classes d'IgGs.^[126]

Il existe une disparité des séquences en aa au sein même d'une sous-classe donnée. Cette divergence, il faut le rappeler, est nommée allotypie. Cette dernière conditionne le choix de développer pour une utilisation clinique un isotype ou un autre. Les déterminants allotypiques sont des épitopes polymorphiques. Les IgG3 avec leurs 13 allotypes représentent les Acm où le polymorphisme est le plus important. Il a été démontré, en revanche, que les IgG4 ne présentent aucun polymorphisme et que les IgG1 et IgG2 présentent, eux, respectivement 4 et 1 allotypes.^{[53] [54]}

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Functional form <i>in vivo</i>	Monomeric bivalent	Dimeric tetravalent ^a	Monomeric bivalent	Half-Ig monovalent
Biological role in host response	Protein antigens	Carbohydrate antigens	Protein antigens	Response to chronic stimulation, anti-inflammatory
Percentage of all IgG in humans ^b	60%	25%	10%	5%
Half-life (range in days) ^c	36.3 ± 9.2 (17.6–56.2)	37.1 ± 13.9 (22.9–62.5)	28.6 ± 10.4 (13.0–50.2)	15.6 ± 4.5 (7.1–24.7)
Allotypes ^d	4	1	13	0
FcRn ^e	+	+	+	+
Hinge length (number of amino acids)	15	12	62	12
Potential (actual) inter-heavy chain disulfide bonds in hinge region	2 (2)	4 (4) ^f	11 (11)	2 (2)
Effector functions				
C1 ^e	++	-	+++	-
FcγRI ^e	+++	-	+++	++
FcγRII ^e	+	±	+	?
FcγRIIIa/b ^e	+	-	+	±

^aHomodimers of IgG2 are tetravalent for a given antigen, but heterodimers are also expected. ^bFrom ref. 2. ^cFrom ref. 22. ^dFrom ref. 23. ^eFrom ref. 2. ^fDiscussed in ref. 12.

Tableau 3: les principales caractéristiques des 4 sous classes d'IgG.^[125]

Depuis plus de 2 décennies, les IgG4 sont connus pour leur fonctionnalité *in vitro* sous forme de « demi-anticorps » qui peuvent lier un antigène donné. Des études *in vivo* ont permis de confirmer la bi-spécificité des IgG4 et donc leur capacité de fixer des antigènes différents. Les caractéristiques citées précédemment peuvent être attribuées à la flexibilité de la région charnière chez les IgG4 en comparaison avec celle des IgG1. En effet, quand les ponts disulfures (liant deux cystéines) **inter**chaînes se rompent des ponts **intra**chaînes sont créés, donnant naissance ainsi à des demi-anticorps. De nouveaux ponts disulfures interchaînes peuvent être formés. La concentration de différents demi-anticorps IgG4 monovalents détermine la formation de nouveaux ponts disulfures entre 2 chaînes identiques ou 2 chaînes différentes donnant naissance ainsi à des anticorps bivalents mono ou bi spécifiques. Il y a donc un équilibre à maintenir afin d'assurer une homogénéité et une reproductibilité du processus de production.

Afin d'élucider le vrai mécanisme qui mène à un tel échange, une autre étude consistait à remplacer la proline de la région charnière d'une IgG1 par une sérine et à échanger la région constante CH3 par une CH3 d'une IgG4. Ces changements, effectués d'une manière concomitante, ont permis d'avoir des IgG1 modifiées bi spécifiques. Le domaine CH3 joue donc un rôle important dans l'échange des bras Fab tout comme le fait la région charnière chez les IgG4. Les auteurs de cette étude ont

réussi à démontrer que les anticorps anti-récepteur-à-l'acétylcholine induisent, quand ils s'agissent d'une IgG1, une myasthénie auto-immune expérimentale humaine et que dans le cas de l'utilisation d'une IgG4, la maladie est absente. Compte tenu de ces observations, les IgG4 peuvent être choisies pour leurs fonctions effectrices relativement basses. Les IgG4 ayant une région charnière native peuvent être utilisées quand on cherche à bénéficier de la bi-spécificité *in vivo* et/ou l'échange de la région Fab. Dans le cas contraire, les IgG4 qui comportent une région charnière modifiée empêchant cet échange sont privilégiés. [Van der Neut Kofschoten et al. 2007]

Un autre travail consistait à introduire des substitutions sur la région charnière des IgG4 permettant un rapprochement de celle des IgG1. Ils ont obtenus des IgG4 mono-spécifiques et homogènes avec une $\frac{1}{2}$ vie prolongée et une distribution tissulaire améliorée. Des observations similaires ont été mises en évidence avec l'isotype IgG2. Une étude a, en effet, réussi à démontrer la formation, *in vivo*, de dimères covalents. La survenue de ces dimères a été démontrée dans le sérum humain et les ponts disulfures ont été confirmés par des analyses biochimiques. [Reddy. M.P. et al. 2000]

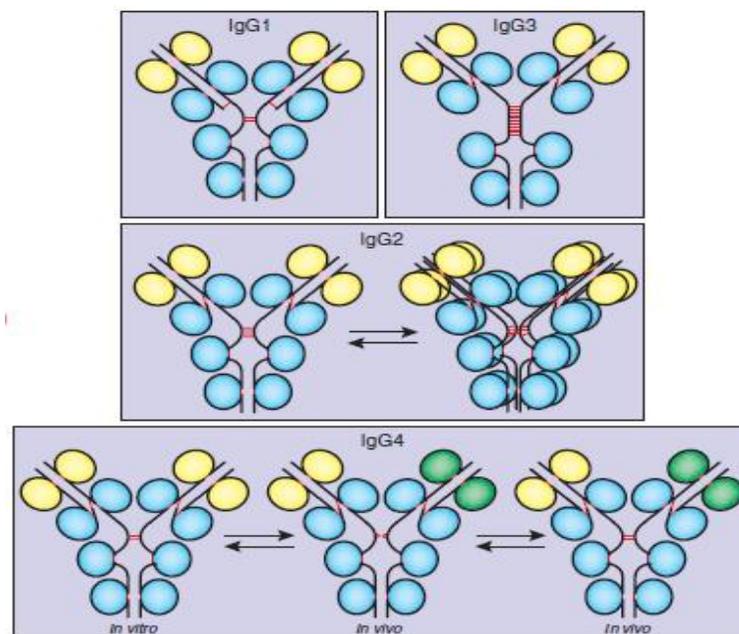


Figure 1. *In vitro* and *in vivo* behaviors of the IgG subclasses IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. Whereas IgG1 and IgG3 remain monomeric *in vivo*, IgG2 forms covalent dimers between identical or different IgG2 molecules with intermolecule disulfide bonds for which the exact structures have not been determined. *In vivo*, IgG4 is thought to be in equilibrium between the bivalent, monospecific form with normal interchain disulfide bonds (left), the half-molecule with an intra-chain disulfide bond (middle) and a mixed bivalent, bispecific form (right).

Figure 14: Le comportement *in vivo* et *in vitro* des IgG1, 2, 3 et 4. [Nature Biotechnology 25, 1369 - 1372 (2007)].

Comme illustré dans la figure 14, les IgG1 et IgG3 restent monomériques. *In vivo*, les IgG2 forment des dimères covalents entre des IgG2 identiques ou différents en utilisant des ponts disulfures intermoléculaires (la structure exacte n'a pas été déterminée). *In vivo*, les IgG4 est en équilibre entre les formes bivalentes, monospécifiques avec des ponts disulfures interchaines normaux (à gauche), et les demi-molécules avec des ponts disulfures intrachaines (milieu) et des formes bivalentes bispécifiques (à droite).

Il paraît nécessaire, ici, de mettre en avant l'importance de la sélection naturelle des différentes sous-classes d'anticorps monoclonaux. Le système immunitaire adaptatif humain est fait de façon à distinguer les antigènes du soi de ceux du non soi. Il produit les IgG4 en situation de stimulation antigénique persistante. On pense que la monovalence des IgG4 est mise en place comme un mécanisme de protection dans de rares cas de réponse par les IgG4 à des antigènes du soi (souvent responsables de désordre auto-immun). Si les IgG4 bi-fonctionnelles agissaient comme des IgG normales, elles doivent lier les récepteurs membranaires et induire une réaction de toxicité potentielle.

De plus, il a été découvert que les IgG4 permettent une inhibition des effets des auto-anticorps par un blocage stérique des IgG1, sans causer de dommage elles-mêmes. Cet effet inhibiteur s'applique aux IgG2, IgG3, IgE et aux IgM. La monovalence a été mise en évidence chez d'autres mammaliens comme le cheval.

Les IgG2, elles, sont impliquées dans des réponses immunitaires contre les sucres antigéniques membranaires des bactéries. Les dimères d'IgG2 formés dans le sérum peuvent augmenter la protection. Ceci illustre bien le rôle de la sélection naturelle des IgGs humaines et leur implication dans des tactiques différentes de défense.

Les Acm sélectionnés pour une éradication complète des cellules cancéreuses doivent être d'un isotype actif induisant une activation du complément (CDC) et une ADCC. Les IgG1 et IgG3 répondent à cette notion. Les IgG3 n'ont probablement pas été développées en clinique pour des raisons de $\frac{1}{2}$ vie courte et de polymorphisme allotypique important. De plus, la longueur de la région charnière (62 acides aminés)

augmente leur susceptibilité à la protéolyse et fait croître leur poids moléculaire. (Voir Tableau III).

En plus des isotypes « basiques » décrits précédemment, des variants ayant des fonctions effectrices mutées sont disponibles. Leur expression par des technologies recombinantes permet un large choix de fonctions effectrices selon que les fonctions des Acm d'origine soient conservées ou pas. Le tableau III décrit les fonctions effectrices assurées par les fragments Fc des différents isotypes d'Acm.

En plus des fonctions effectrices, le fragment Fc assure les fonctions de $\frac{1}{2}$ vie plasmatique d'où l'importance d'un choix parfaitement étudié dans une stratégie thérapeutique donnée. Si l'objectif est de neutraliser un antigène soluble, les fonctions effectrices sont moins importantes, le choix donc d'utiliser une IgG1, 2, 3 ou 4 est valable. Une comparaison *in vitro* ou *in vivo* permettra de rendre ce choix définitif. Si une ADCC maximale est l'effet recherché, une IgG1 non-fucosylée est recommandée. Si, en revanche, l'activité minimale est voulue une IgG2 non-glycosylée est à utiliser.^[52]

5.3.2. Fonctions $\frac{1}{2}$ vie plasmatique du Fragment Fc

Il est important de retenir que les sites de fixation des différents récepteurs (le Fc γ R, le C1q du complément et le FcRn) sont distincts mais accolés les uns aux autres. Ceci conditionne fortement les modifications à apporter à l'Acm. En effet, tout changement affectant l'une des 3 activités du fragment Fc peut engendrer des conséquences sur les autres fonctions. Ces modifications ne peuvent être assumées comme négligeables d'où la nécessité d'une étude détaillée de leurs effets.^[62]

Il existe, il faut le rappeler, 2 techniques d'ingénierie permettant la manipulation de la $\frac{1}{2}$ vie des Acm : la 1^{ère} est la modification des séquences en aa et la 2^{ème} est leur modification par fixation sur une protéine ou un peptide. La 1^{ère} catégorie étant celle qui a attiré le plus d'intérêts ces dernières années.

Le FcRn a été étudié, les premiers temps, comme étant le récepteur qui transporte les anticorps de la mère au fœtus. Il a été démontré depuis qu'il assure le maintien et la régulation de la concentration des anticorps et de l'albumine dans le sérum. C'est un système actif d'augmentation de la $\frac{1}{2}$ vie des IgGs endogènes.

Le fonctionnement du FcRn implique une pinocytose non spécifique de phase-fluide. Les IgGs sont récupérés du sang et fixés par le FcRn dans le milieu acide de l'endosome. Pendant l'exocytose de l'endosome à la surface cellulaire, les IgGs non liées à un FcRn sont catabolisées. Les expériences *in vitro* ont démontré la fixation pH dépendante des IgGs, qui à pH6.0 lient fortement le FcRn mais faiblement ou pas à pH7.4 (pH sanguin).^[55]

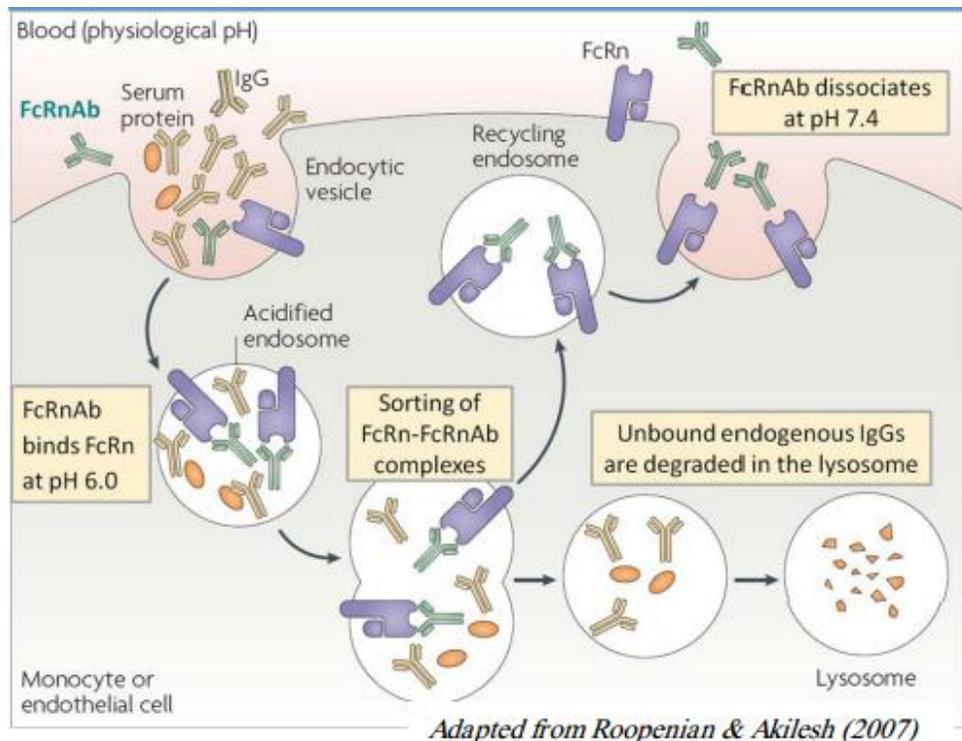


Figure 15: recyclage des Immunoglobulines par le FcRn dans les cellules. Les protéines sériques, y compris les IgGs, sont captées par les vésicules d'endocytose. L'acidification (pH 6.0) de l'endosome formé induit une fixation de l'IgG (FcRnAb) par le FcRn. Les complexes (FcRn-FcRnAb) sont ensuite recyclés et libérés dans la circulation sanguine à un pH neutre (pH 7.4). Les IgGs non fixées par le FcRn sont, elles, dégradées par le lysosome.^[124]

Si la $\frac{1}{2}$ vie améliorée est recherchée, les modifications à apporter sur les IgGs afin d'améliorer leurs fixation par le FcRn doivent permettre uniquement une fixation à un pH acide et non à un pH neutre. En effet, l'étude [Dall'Acqua et al. 2002] portant sur l'ingénierie du fragment Fc a évalué des variantes d'IgG1 humaines ayant la capacité de fixer un FcRn murin aux pH6.0 et 7.4. Il a été observé que la $\frac{1}{2}$ vie de ces variantes

était basse. La même équipe a évalué une IgG1 anti-VRS (Virus Respiratoire Syncytial) humanisé avec un fragment Fc modifié de façon à avoir une capacité de lier le FcRn humain et primate à un pH6.0 uniquement (pas de liaison à pH7.4). Les 2 études ont permis de conclure que le fragment Fc modifié augmente la $\frac{1}{2}$ vie de IgG1 comparativement à un fragment natif.^[62]

Une autre étude [Petkova SB et al. 2006] a comparé la pharmacocinétique de 3 IgG1 humaines modifiées avec leurs IgGs natives. Les IgGs modifiées comportaient : 2 IgGs (X et Y) ayant une fixation au FcRn humain augmentée et la 3^{ème} (Z) avec une capacité de fixation diminuée. L'étude a été menée chez des souris transgéniques portant un FcRn humain (absence du FcRn de primates). Les IgGs (X et Y) fixent le FcRn **humain** à pH6.0 mais pas à pH7.4, mais l'une d'entre elles (Y) lie le FcRn **murin** aux deux pH. Dans le cas de l'utilisation d'une souris transgénique (FcRn humain), ces 2 IgGs présentent une $\frac{1}{2}$ vie deux à trois fois celle des IgGs natives correspondantes. Comme attendu, l'IgG (Z), elle, présente une $\frac{1}{2}$ vie plus faible. Cependant, dans le cas où une souris normale (FcRn murin) est utilisée, les $\frac{1}{2}$ vies des IgGs (X et Y) ne présentent aucune différence statistiquement significative avec les IgGs natives. Ceci confirme les résultats de l'étude mentionnée précédemment, à savoir, les modifications apportées au fragment Fc doivent permettre une fixation au FcRn à pH6.0 mais pas au pH7.4 afin d'améliorer la $\frac{1}{2}$ vie des IgGs.^[62]

Une étude [Paul R. Hinton et al. 2006] sur les différentes modifications possibles sur les fragments Fc avait démontré que les IgG1 permettaient une fixation meilleure sur le FcRn et donne une $\frac{1}{2}$ vie longue. Néanmoins, d'autres études ont démontré que certaines modifications améliorant la fixation de l'IgG au FcRn n'amélioreraient pas forcément leurs $\frac{1}{2}$ vies. Les causes possibles de cet échec sont l'utilisation de techniques de mesures différentes ne permettant pas une étude comparative des paramètres cinétiques. De plus, une disparité des résultats pourrait être observée quand des espèces animales différentes sont utilisées pour l'analyse pharmacocinétique d'où l'importance, encore une fois, des essais *in vivo* afin de vérifier la relation fixation au FcRn – $\frac{1}{2}$ vie plasmatique.^[62]

La nature de la chaîne légère peut avoir un effet remarquable sur la fixation des IgGs au FcRn comme le démontre l'étude menée par Gurbaxani B et al. 2005. En effet,

les IgG2 associées à des chaînes légères kappa ont une affinité (hors-taux) élevée et 3 fois plus rapide que les mêmes IgG2 associées à une chaîne lambda. Ceci intervient malgré que les IgG2 λ présentent une $\frac{1}{2}$ vie plus courte que les IgG2k.^[62]

Afin d'augmenter la $\frac{1}{2}$ vie d'un AcM ou d'un fragment d'Ac, une méthode qui consiste à utiliser l'albumine comme porteur *via* des réactions covalentes ou non covalentes a été étudiée. L'albumine, il faut le rappeler, est une protéine plasmatique à $\frac{1}{2}$ vie longue. Il a été découvert en 2003 qu'elle aussi se lie au FcRn mais sur un site différent de celui des IgGs. Les études menées depuis se focalisent sur l'utilisation de cette protéine dans l'augmentation de la $\frac{1}{2}$ vie des fragments d'anticorps principalement.^[62]

Une nouvelle méthode, elle, consiste en l'utilisation de la glycosylation afin de modifier le profil pharmacocinétique des fragments d'anticorps. En effet, l'introduction d'une glycosylation N-liée au niveau du site de liaison des domaines variables des mono-chaînes diabody et l'extension au niveau C-terminal par un peptide induisent, toutes les deux, une augmentation de deux fois la $\frac{1}{2}$ vie. Néanmoins, leurs $\frac{1}{2}$ vies restent de l'ordre de quelques heures comparativement avec celle de l'albumine-fusion qui est d'un jour. Une autre étude a évalué l'effet de l'acide poly-sialique (11 ou 22kDa) sur la pharmacocinétique des fragments Fab. Il a été observé une amélioration de la pharmacocinétique et une multiplication par trois de l'absorption tumorale des acides sialiques à 11kDa. Cependant, une baisse de la sélectivité a été notée.^[62]

Au moment où la plupart des études s'intéressent au rallongement de la $\frac{1}{2}$ vie des AcM, certaines études ont cherché à mettre au point des AcM à $\frac{1}{2}$ vie réduite pour une utilisation à des fins de diagnostique. Afin de diminuer leur toxicité, il a fallu trouver un bon compromis entre la $\frac{1}{2}$ vie et les fonctions effectrices à savoir l'ADCC et la CDC. L'ingénierie qui étudie la mise en place d'AcM dont la pharmacocinétique est maîtrisable permet l'adaptation de l'AcM à une utilisation particulière. Il est à noter à ce niveau-là que les fragments d'anticorps (Fab) peuvent être utilisés dans des cas similaires à cause de leurs $\frac{1}{2}$ vies réduites pouvant aller de quelques heures à quelques jours.^[62]

5.3.3. L'ingénierie des fonctions effectrices: interaction du Fc avec le FcγR et le C1q

Les 4 isotypes des IgGs interagissent avec un groupe de récepteurs appelés FcγR. Ces derniers font partie de la superfamille des immunoglobulines et sont divisés en 3 classes : FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16). Les 2 dernières classes peuvent être subdivisées en : FcγRIIIa (un récepteur activateur), FcγRIIIb (inhibiteur), FcγRIIIc (activateur), FcγRIIIa (activateur) et FcγRIIIb (ne comportant pas de domaine intracellulaire et est unique par le fait qu'elle soit GPI-liée).

Engager l'activité des récepteurs FcγRIIIa, FcγRIIIa et FcγRIIIb est compliqué de par les voies de signalisations différentielles qu'ils impliquent mais aussi à cause de leur polymorphisme. En effet, le polymorphe FcγRIIIa-V158 lie les IgG1 dix fois mieux que le polymorphe FcγRIIIa-F158.^[62] La lettre V correspond, il faut le rappeler, à l'acide aminé Valine et la lettre F au Phénylalanine.^[65]

Lors du développement d'une IgG pour une fonction donnée, Il est important de prendre en considération non seulement l'isotype d'IgG mais aussi lequel des récepteurs serait le plus adéquat pour l'activité en question. Il faut, de plus, connaître lesquelles des cellules immunitaires expriment le récepteur concerné et les capacités de liaisons des différents polymorphes.

Si une ADCC améliorée est recherchée, il y a un consensus général sur le fait que ce sont les NK la cible principale car elles n'expriment à leurs surfaces que le FcγRIIIa. Plusieurs études ont essayé d'améliorer les interactions entre l'IgG1 et le FcγRIIIa humains.^[62]

L'étude, Shields RL et al. 2001, avait mis au point des variants d'IgG1 ayant une affinité au FcγRIIIa et une ADCC améliorée.

Une autre étude a choisi d'analyser l'affinité d'IgG1 mutées sur leurs fragments Fc avec le FcγRIIIa et l'effet observé sur l'ADCC en comparaison avec les IgG1 natives. L'ADCC a été proportionnelle à l'augmentation de l'affinité au récepteur FcγRIIIa. Le niveau d'ADCC observé est dépendant de l'expression de l'antigène à la surface de la cellule cible. Les IgG1 mutantes présentent une augmentation d'ADCC sur 4 lignes

cellulaires avec un niveau d'expression variable de l'antigène (HER2 dans le cas de cette étude). L'augmentation a même été observée chez les cellules ayant présenté un niveau faible d'expression de l'antigène. Ceci pourrait être intéressant pour les patients cancéreux ayant une faible expression d'antigène. Les Fc étudiés présentent une augmentation de la fixation au FcγRI et FcγRIIb en plus d'une affinité augmentée au FcγRIIIa. Il serait donc important de travailler sur l'amélioration de la spécificité de ces molécules.^[62]

Une autre étude, en lien avec l'étude Dall'Acqua et al. 2002, est venue analyser la combinaison, à la fois, des mutations permettant d'augmenter l'ADCC et celles permettant l'amélioration de l'affinité au FcRn. Il a été conclu que l'introduction d'une mutation améliorant l'ADCC en présence de celle améliorant l'affinité au FcRn augmenterait l'affinité au FcγRIIIa par 80 fois et l'ADCC par 100 fois. (Voir 5.3.2 Fonctions ½ Vie plasmatique du Fragment Fc).

Les auteurs d'une autre étude sont arrivés aux mêmes résultats que les études précédentes mais ils ont en conclu qu'il n'y avait aucune corrélation absolue entre l'affinité au FcγRIIIa et l'ADCC. Ils en ont rajoutés que les modifications apportées n'altéraient pas l'affinité au FcRn et donc n'avaient pas d'effets sur la pharmacocinétique.^[62]

Toutes les études, précédemment mentionnées, s'intéressaient principalement à la relation affinité FcγRIIIa et ADCC. Une autre étude, elle, s'est plus focalisée sur la relation entre la fixation au C1q et les fonctions CDC/ADCC. Le principe était de préparer 26 variantes d'IgG1 humaines modifiées au niveau de la région charnière de façon à jouer sur son espacement/raccourcissement et sur sa flexibilité/rigidité. Ils ont observé que la fixation au C1q et au FcγRIIIa, toutes les deux, exigeaient une rigidité intrinsèque de la partie centrale de la charnière mais la flexibilité de la partie supérieure, elle, n'avait aucune influence. Il a été conclu aussi que les ponts disulfures de la partie centrale de la région charnière étaient très importants pour la liaison au C1q et que la présence d'un seul pont suffit pour la fixation du FcγRIIIa.^[62]

Deux exemples illustrant l'utilisation d'anticorps ou de fragments d'anticorps portant un fragment Fc modifié : Le Soliris® (Eculizumab : un Acm humanisé anti-C5) et

Orencia® (Abatacept : fragment Fc de fusion du CTLA4). Leurs fragments Fc ont été modifiés de façon à réduire les fonctions effectrices et leur immunogénicité. Cette dernière n'est pas plus importante que celle présentée par les autres anticorps déjà approuvés. L'Eculizumab, approuvé pour l'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN), possède une chaîne lourde composée d'un fragment CH1 d'une IgG2 et d'une charnière fusionnée à un CH2 et CH3 d'une IgG4. Grâce à ces modifications, cet Acn ne lie pas le FcγR et n'active pas le complément (Voir tableau III). Lors de sa mise sur le marché, des anticorps anti-Eculizumab ont été détectés dans 2% des cas uniquement (3 patients sur 196). Un autre anticorps anti-CD200 composé d'un Fc chimérique IgG2/IgG4 a prouvé que le fragment Fc modifié diminue l'intensité de l'ADCC.

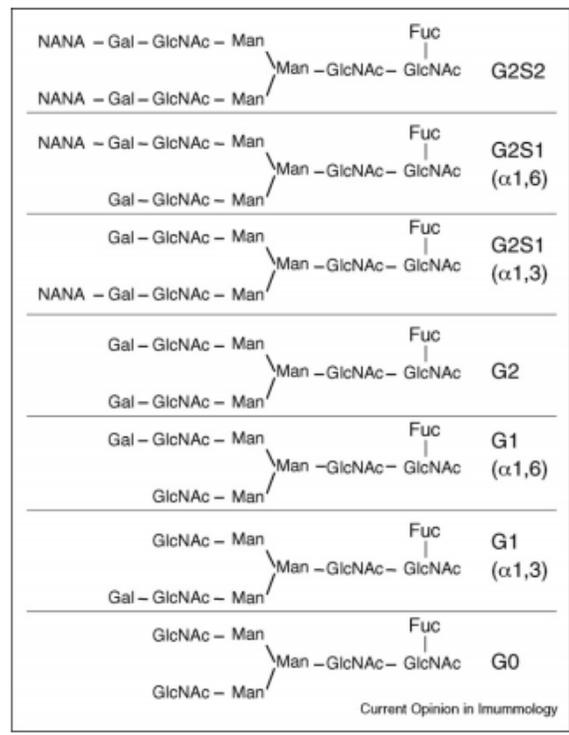
L'Abatacept, lui, a une charnière dans laquelle deux résidus cystéine ont été modifiés en sérine dont une O-glycosylée. Une proline a été, elle aussi, modifiée en sérine. Le résultat obtenu est que l'abatacept n'active pas l'ADCC et la CDC. De plus, tout comme l'Eculizumab, son immunogénicité est de l'ordre de 2.8 à 3%. Il est à rappeler que ces chiffres rentrent dans le même ordre que les autres anticorps déjà mis sur le marché.^[62]

5.3.4. Influence de la Fc-glycosylation sur les fonctions effectrices :

Les IgGs contiennent des N-glycosylations hétérogènes sur la région CH2 du fragment Fc. Leur hétérogénéité est due à la présence de sucres terminaux différents et varie selon les espèces et les systèmes d'expression. Ces glycanes tirent leur importance de leurs capacités à influencer la fixation de l'IgG sur le FcγR et sur le C1q. Les sucres terminaux (acide sialique, Fucose, N-AcétyleGlucosamine et Mannose) influence la liaison IgG-FcγRIIIa et donc l'ADCC. Le résidu galactose terminal, lui, affecte la fixation de l'IgG sur le C1q et influence donc la CDC. La présence ou l'absence d'un sucre influence les interactions hydrophobes et hydrophiles impliquées dans la liaison IgG-Fc.^[56]

La majorité des N-glycanes sont des structures complexes bi-antennes avec une grande hétérogénéité. Ils présentent une région structurale commune, comportant 2 N-acétyle-glucosamine, liée à une Asparagine du fragment Fc par une liaison amide et 3

résidus mannose. En plus de cette structure de base, les chaînes glycanes contiennent des sucres tels que le Galactose (Gal), acide sialique (NANA : N-Acetylneuraminic Acid), N-acétyl-Glucosamine (GlcNAc), Mannose (Man) et Fucose (Fuc). La partie glycanes du fragment Fc d'une IgG humaine est composée de la structure commune fucosylée avec une hétérogénéité due à la galactosylation et à la sialylation. Environ 10% de ces glycanes ne contiennent pas de résidus Fucose. Cette hétérogénéité des sucres terminaux a des conséquences fonctionnelles car elle a un effet sur la fixation des IgGs avec les FcγR et le C1q. De plus, elle varie d'une espèce à une autre et est dépendante de l'âge, du sexe et de l'état de santé de l'individu. La galactosylation chez l'humain, par exemple, diminue avec l'âge et les patients atteints de maladie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde ont une galactosylation moins importante que les individus en bonne santé.^[56]

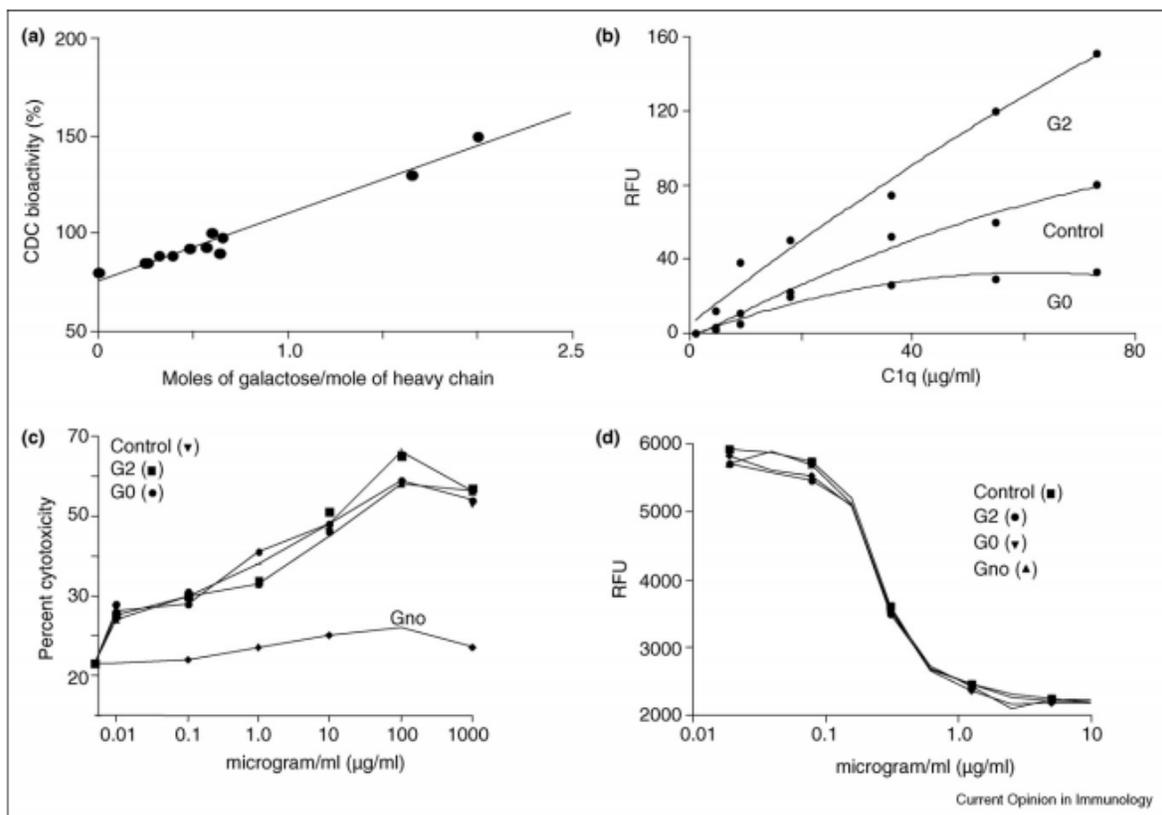


Structure of major N-glycans found in human IgG. The majority of glycans found in the Fc of human IgG are shown. These glycans are complex biantennary structures with heterogeneity because of terminal galactose and/or sialic acid residues (NANA, N-acetylneuraminic acid; Gal, galactose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; Man, mannose; Fuc, fucose). About 10% of these glycans may not contain core Fuc residue (not shown) [G0: no Gal; G1: one Gal on either α1,6-branch or α1,3-branch; G2: two Gal; G2S1: two Gal and one NANA on either α1,6-branch or α1,3-branch; G2S2: two Gal and two NANA].

Figure 16: Structure de la majorité de N-Glycanes rencontrées dans les IgGs humaines. Current Opinion in Immunology 2008, 20:471–478.

5.3.4.1. Les résidus Galactose terminaux affecte la CDC :

Seulement 10% des IgGs sériques humaines sont sialylés au niveau de leur région Fc. Les IgGs recombinantes produites dans des cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO) sont, *quant-à-elles*, sialylés dans 5% des cas uniquement. Donc la plupart des IgGs contiennent des terminaisons sans ou avec 1 ou 2 galactoses (G0, 1 ou 2) dans leurs antennes (Figure 16). La présence du Gal terminal affecte la CDC mais pas l'ADCC. En effet, les tests sur le Rituxan® (rituximab) ont permis de conclure qu'une augmentation du nombre de résidus Gal augmenterait la CDC. Cependant, cette augmentation n'a aucun effet sur l'ADCC comme cela a été conclu avec une étude sur l'ADCC. Le Gal terminal n'a aucune influence sur la fixation de l'IgG sur le FcγRIIIa et il n'affecte pas la reconnaissance anticorps-antigène. La figure 17 illustre ce qu'a été précédemment mentionné.^[56]



Increase in terminal Gal content increases CDC activity (a) and C1q binding (b) of rIgGs but does not affect ADCC activity (c) and antigen binding (d). G2, G0, and/or Gno (no glycans) glycoforms of Rituxan and/or Herceptin were prepared by *in vitro* glycosylation methods. These glycoforms along with control antibody samples (untreated) were subjected to CDC (Rituxan glycoforms), C1q binding (Rituxan glycoforms), ADCC (Herceptin glycoforms), and antigen binding to HER2-ECD (Herceptin glycoforms). Rituxan is a chimeric antibody against CD20 and elicits CDC activity but shows very little ADCC activity. Herceptin is a humanized antibody against HER2-neu antigen and elicits ADCC activity but no CDC activity.

Figure 17: l'influence des sucres terminaux du fragment Fc sur l'activité effectrice des IgGs. Current Opinion in Immunology 2008, 20:471–478.

5.3.4.2. Les résidus GlcNAc terminaux affecte la CDC :

Les glycoprotéines sériques contenant des résidus GlcNAc se fixent sur le récepteur au mannose ce qui réduit leur $\frac{1}{2}$ vie plasmatique. Néanmoins, beaucoup d'IgGs recombinantes, contenant des résidus GlcNAc terminaux, présentent une $\frac{1}{2}$ vie plus importante que celle des glycoprotéines contenant les mêmes résidus. La présence de ces résidus n'affecte donc pas la pharmacocinétique des IgGs. Cependant, ils ont la capacité *in vitro* d'activer la voie alternative du complément. Une augmentation du contenu en GlcNAc et donc une diminution du contenu en Gal diminue la capacité de fixation au C1q et réduit donc la CDC.^[56]

5.3.4.3. L'absence des Fucose augmente l'activité ADCC des IgG :

Les résidus Fuc sont α 1-6 liés avec les GlcNAc de la structure commune de base (Figure 16). La biosynthèse de ces structures fucosylées est assurée par une enzyme appelée: α 1,6-fucosyltransférase. Dans plus de 80% des IgGs sériques et plus de 90% des IgGs recombinantes produites dans des CHO, les Fc sont fucosylées. L'absence du fucose de la structure de base accroît significativement l'ADCC car il y a un accroissement de l'affinité au Fc γ RIIIa. Plusieurs stratégies ont été développées afin de réduire la fucosylation et d'accroître donc l'ADCC. Parmi ces méthodes, il y a la production de lignes cellulaires chez lesquelles l'expression de l'enzyme α -1,6-fucosyltransférase est réduite ou annulée. D'autres stratégies consistent en un blocage du gène responsable de cette enzyme ou par une surexpression d'une enzyme qui ajoute des résidus GlcNAc terminaux. Il a été démontré, à ce propos, que l'ajout de GlcNAc réduirait leurs contenus en fucose. L'amélioration de l'affinité des glycanes peu ou non fucosylés au Fc γ RIIIa est indépendante de la sous classe d'IgG et engendre donc une amélioration des activités d'ADCC.^[56]

5.3.4.4. La sialylation affecte les fonctions effectrices :

Une augmentation du contenu en acide sialique terminal peut améliorer la $\frac{1}{2}$ vie sérique de beaucoup de glycoprotéines. Une telle augmentation chez les IgGs recombinantes provoquerait une diminution de l'activité ADCC. L'acide sialique en quantité importante affecte négativement la fixation de l'IgG au récepteur Fc γ RIIIa. De plus, ceci pourrait empêcher la fixation sur les antigènes de surface.^[56]

5.3.4.5. L'effet d'une structure chargée en Man sur l'activité ADCC :

Les IgGs humaines contiennent très peu de quantités de Man5GlcNAc2. Des structures contenant des quantités supérieures de Mannose (6, 7, 8 et 9) sont présentes dans les IgGs de la poule mais absentes ou peu présentes chez l'humain. Dans les IgGs recombinantes, leur quantité varie selon la ligne cellulaire et selon le lot. La présence d'une telle structure permet la fixation sur un récepteur au Mannose et réduirait donc la $\frac{1}{2}$ vie plasmatique. De plus, il a été démontré que les IgGs contenant une structure se finissant par un résidu Man terminal sont rapidement éliminées du sérum comparativement aux IgGs portant des glycanes. Il est quand même important de noter que l'étude MillWard et al. 2008 avait démontré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les $\frac{1}{2}$ vies plasmatiques des IgGs enrichis en Man et de celles enrichies en glycanes autres que le Man. Cette influence est donc variable d'un anticorps à un autre.^[56]

En plus de l'influence sur la $\frac{1}{2}$ vie plasmatique de l'IgG. L'étude menée par Zhou et al. 2008 a démontré que les IgGs recombinantes ayant des quantités importantes de Man présentent une activité ADCC améliorée. En effet, tout comme dans le cas de l'absence des fucoses, il y a une augmentation de l'affinité au récepteur FcγRIIIa. De plus, les fragments Fc des IgGs comportant des quantités considérables de Man ne sont pas fucosylés. Il ne peut donc pas être conclu si l'amélioration de l'affinité au FcγRIIIa et de l'ADCC est due aux structures enrichis en Man ou à l'absence de fucose. Dans la même étude, il a été démontré que ces structures lient le C1q avec une affinité moindre et réduisent l'activité CDC. L'influence donc des structures enrichis en Man sur les IgGs s'observe à 3 niveaux :

- La réduction de la $\frac{1}{2}$ vie plasmatique des IgGs, à cause de leur affinité pour le récepteur hépatique au Man.
- L'amélioration de l'affinité au récepteur FcγRIIIa et de l'ADCC, qui peut être due à l'absence de fucose.
- La réduction de l'affinité au C1q et de l'activité CDC, probablement à cause de l'absence des résidus Gal terminaux.

5.3.4.6. Les interactions hydrophobes et hydrophiles entre les sucres terminaux et les acides aminés du fragment Fc :

L'impact des sucres terminaux sur les fonctions des anticorps peut être dû aux interactions hydrophobes et hydrophiles entre les acides aminés et les sucres comme le confirment les analyses structurales des fragments d'IgGs humaines par cristallographie aux rayons-X, Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et Microcalorimétrie.^[56]

Des glycoformes d'une IgG1 humaine (Figure 18) ont été cristallisés avec des fragments modifiés de la protéine A. Ils contiennent deux structures saccharidiques fucosylées identiques liées à un Asn297 de chaque chaîne lourde. Ils ont été résolus à 1.65, 2.3 et 2.45Å.^[56]

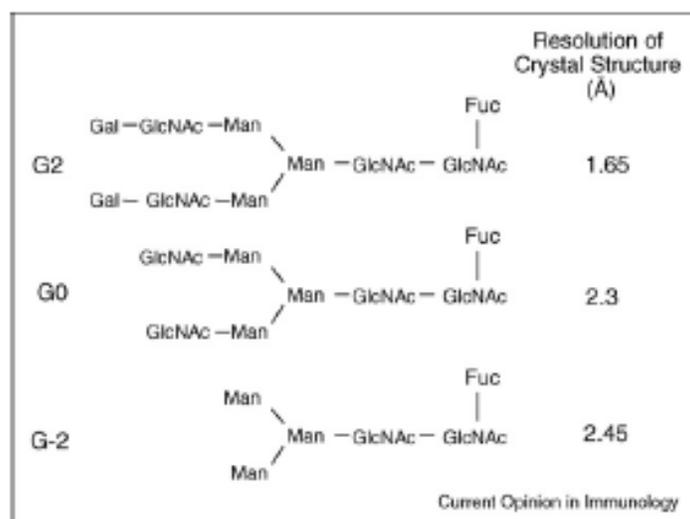


Figure 18: l'influence des sucres terminaux sur les fonctions effectrices. T Shantha Raju. *Current Opinion in Immunology* 2008, 20:471–478.^[56]

Au niveau des structures cristallines, les résidus saccharidiques α 1,6-liés des glycoformes G2, G0 et G-2 présentent un facteur de température (facteur de Debye-Waller) faible et sont bien résolus. Cependant, les résidus α 1,3 sont faiblement résolus et présentent un facteur de température important. Il semble que les résidus ayant un facteur de température important présentent plusieurs conformations. Ceci est le cas des α 1,3-liés Gal et GlcNAc du G2 glycoforme et du fucose lié au GlcNAc. Un total de 6 liaisons hydrogènes entre les sucres et les aa ont été observés chez le glycoforme G2 tandis que les G0 et G2 n'en présentent que 2 seulement. A cause de l'absence des

résidus Gal des branches $\alpha 1,6$, le stretch entre les résidus 244 et 247 est faiblement déstabilisé dans le glycoforme G0. Une molécule d'eau occupe un espace proche de celui où se logeait le Gal. Elle relie l'oxygène du carbonyl de la Pro244 à la Thr 260, induisant ainsi une énergie stabilisatrice. Les glycoformes G-2 présentent des propriétés similaires à celles des G0 de par l'absence des résidus Gal et GlcNAc.^[56]

La réduction de la taille des structures saccharidiques semble affecter la structure tertiaire des fragments Fc. Il y a, en effet, une perte de résolution dans la structure obtenue par rayon X et une augmentation uniforme du facteur de température.

Une étude comparative des glycoformes de fragments Fc utilisant la microcalorimétrie différentielle à balayage suggère une enthalpie plus faible pour la G0 relativement à celle de la G2. Ceci pourrait être dû à la perte des interactions hydrophiles entre les saccharides et les aa des fragments CH2. Ce type d'interactions entre les Gal et les aa doivent jouer un rôle important dans l'amélioration de l'affinité des anticorps galactosylés au C1q. Cependant, il n'y a aucune donnée valable sur les structures cristallines des anticorps contenant des acides sialiques. Il n'est donc pas possible de lier la réduction de la résistance de ce type d'anticorps aux protéases avec les éventuelles interactions entre l'acide sialique et les aa.^[56]

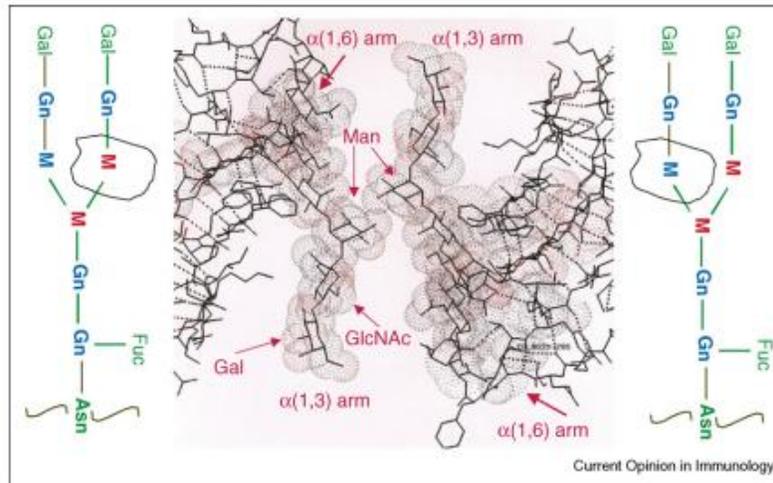
Les acides sialiques sont chargés négativement et sont plus volumineux que les la plupart des monosaccharides. Par conséquent, les résidus sialiques peuvent former des interactions de types ioniques, hydrophobes et hydrophiles avec les aa tout en imposant une contrainte spatiale à cause de leur gros volume. Leur charge et leur volume peut donc affecter la conformation des fragments Fc et les fonctions effectrices de l'anticorps.^[56]

5.3.4.7. Interactions saccharides-saccharides :

Les résidus saccharidiques des monomères Fc sont très peu en contact entre eux à l'exception des 2 résidus Man au niveau de la branche $\alpha 1,3$ des 2 oligosaccharides. Cette interaction est de type hydrophobe. La cristallographie aux rayons X démontre bien que les branches $\alpha 1,3$ parcourent la même distance qui est de 0.83Å quand les résidus GlcNAc sont comparés entre les deux formes G2 et G0. Les informations obtenue par RMN valident les données obtenues par rayons X. Il y a donc bien une interaction de type hydrophobe entre les résidus Man au niveau des branches

α 1,3. Cette interaction semble être nécessaire pour maintenir une conformation appropriée du fragment Fc afin que les IgGs puissent exprimer leurs activités ADCC et CDC. En l'absence de ces interactions hydrophobes, la région CH2 du fragment Fc présente un petit renflement qui, lui, augmente le volume hydrodynamique et donc altère leurs conformations. Ce renflement est observé par la mesure du coefficient de sédimentation des fragments Fc glycosylés et déglycosylés. Ce réarrangement structural doit être responsable de la perte des activités ADCC/CDC avec une sensibilité augmentée des IgGs déglycosylés aux protéases. En plus des résultats de cristallographie aux rayons X et de la RMN, la microcalorimétrie différentielle est venue mettre en évidence les différences significatives des domaines CH2 et CH3 entre les IgGs glycosylées et celles déglycosylées, en terme de stabilité. L'énergie de stabilisation des domaines CH2 déglycosylés est réduite, suggérant que la déglycosylation les rende moins structurés et plus sensibles aux protéases.^[56]

Les études structurales des fragments fucosylés ou non-fucosylés révèlent que l'ensemble des conformations de ces glycoformes sont similaires à l'exception du mode d'hydratation autour de la Tyr296, ainsi qu'une différence de la carte de densité en électrons aux alentours des résidus Asp280 et Asn297. Ces différences mineures des conformations des fragments Fc entre les IgGs fucosylées et non-fucosylées n'expliquent pas l'affinité améliorée des Acn non-fucosylés au récepteur Fc γ R11a. L'explication pourrait être apportée par une étude sur le récepteur Fc γ R11a qui comporte une glycosylation au niveau de l'Asn162 qui a un impact direct sur la fixation des anticorps. La grande affinité entre les anticorps non-fucosylés et les récepteurs Fc γ R11a résulte des interactions productives entre le résidu saccharide du récepteur et la région du fragment Fc qui est accessible en l'absence du résidu fucose. Etant donné que le résidu fucose ne présente pas d'interactions hydrophobes ni hydrophiles et est très flexible, sa présence semble encombrer de manière stérique l'interaction Fc-Fc γ R11a.^[56]



Carbohydrate-carbohydrate interactions between the two Man residues present in $\alpha(1,3)$ -branches of two Fc glycans of IgGs. The two core Man residues in the $\alpha(1,3)$ -branch of each glycan interact via hydrophobic (carbohydrate-carbohydrate) interactions. This interaction seems to be important for maintaining antibody stability and effector function.

Figure 19: les interactions impliquées dans la stabilité et les fonctions effectrices des anticorps. *Current Opinion in Immunology* 2008, 20:471–478.^[56]

Les études des cristaux et des solutions démontrent que les variations mineures, en raison de l'hétérogénéité des sucres terminaux, affectent la conformation des fragments Fc. Ces changements de conformation des fragments Fc influence les fonctions et la stabilité des anticorps.^[56]

Il est aussi important de souligner que du fait de l'hétérogénéité des glycosylation entre les espèces, les lignes cellulaires et les lots fabriqués, il semble être important de surveiller de manière étroite le profil de glycosylation durant la production.^[56]

**LES CIBLES ET MODES D' ACTIONS
DES ACM THERAPEUTIQUES ET DE
LEURS DERIVES**

6. Les cibles et modes d'actions des Acm thérapeutiques et de leurs dérivés :

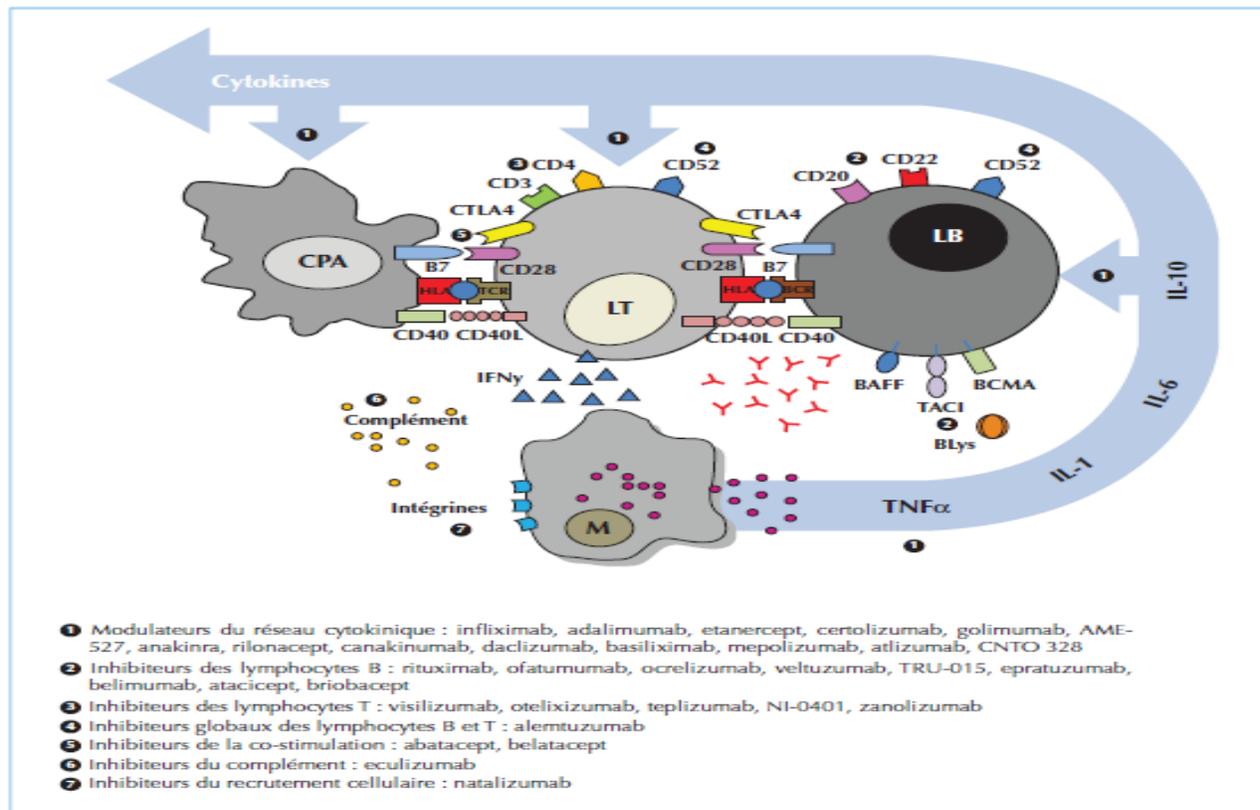


Figure 20: Principales cibles des biothérapies immunologiques.^[48]

6.1. Neutralisation de l'interaction ligand soluble-récepteur

6.1.1. Cytokines solubles : Exemple des TNF- α

Les cytokines forment un réseau de médiateurs protéiques servant à réguler le fonctionnement du système immunitaire. Leur implication dans des maladies auto-immunes rend leur modulation très intéressante. Il est, néanmoins, difficile de réaliser cette approche à cause de la complexité de ce réseau. Une des stratégies ayant été développée est l'inhibition des cytokines.^[48]

Le TNF- α , il faut le rappeler, est un composant majeur dans la cascade des cytokines pro-inflammatoires qui induisent des maladies rhumatismales. Il est produit essentiellement par des macrophages et des monocytes activés et active, lui-même, les ostéoclastes, les chondrocytes, les fibroblastes synoviaux et les macrophages. Il induit une cascade de cytokines inflammatoires et stimule la prolifération cellulaire. Des taux

élevés de TNF- α ont été observés au niveau des synoviales dans plusieurs types d'arthrites.^[69]

L'utilisation d'inhibiteurs de TNF- α représente une avancée thérapeutique majeure dans le domaine des maladies auto-immunes. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de TNF- α a rendu possible la prise en charge des rhumatismes inflammatoires chroniques tels que la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, l'arthrite juvénile idiopathique et le rhumatisme psoriasique.^[48]

Deux méthodes de modulation du TNF- α ont été développées à ce jour. La première consiste en l'utilisation d'anticorps anti-TNF- α . Plusieurs anticorps ont été mis sur le marché depuis 1998 : l'infliximab (Remicade®), l'Adalimumab (Humira®), le certolizumab PEGol (Cimzia®) et le Golimumab (Simponi®). La deuxième méthode implique l'intervention du récepteur soluble du TNF- α comme l'Etanercept (Enbrel®) commercialisé depuis 1998.^{[48] [68]}

6.1.1.1 L'utilisation d'anticorps anti-TNF- α :

L'Infliximab est le premier médicament biologique de cette classe à être approuvé (en 1998) dans la maladie de Crohn. En 2002, il a été approuvé dans le traitement de l'Arthrite Rhumatoïde. Cette molécule est une IgG1 chimérique composée de région Fab murine liée à une région constante kappa d'une IgG1 humaine produite dans une culture CHO. L'Adalimumab est, *quant-à-lui*, produit dans des cellules CHO mais composé de régions variables humaines manipulées par la méthode de phage display. Le Golimumab, le dernier des inhibiteurs du TNF à être mis sur le marché, est une IgG1 kappa produite sous multiples glycoformes dans des hybridomes de cellules murines.

Contrairement aux autres anticorps complets, le Certolizumab est un fragment Fab d'une IgG4 humanisée. Il est produit dans une culture cellulaire d'E. Coli puis liée chimiquement *via* un groupe maléimide avec un PEG. Cette modification diminue le métabolisme de la molécule et augmente sa $\frac{1}{2}$ plasmatique.^{[76] [77]}

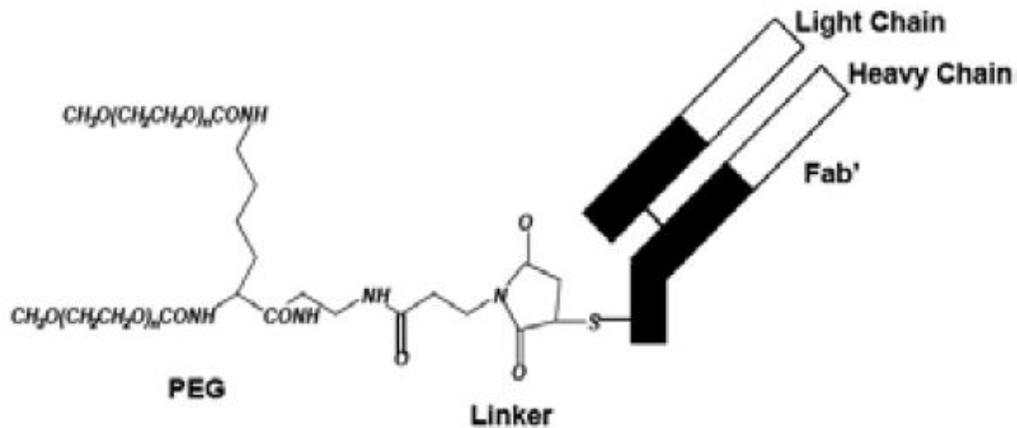
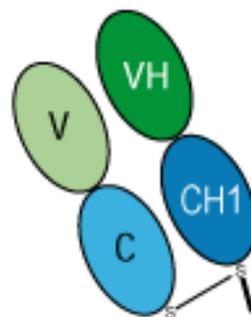


Figure 21: structure de la molécule de Certolizumab pegol.^[77]

Le Certolizumab est composé d'une chaîne lourde (humaine-murine) liée par un pont disulfure à une chaîne légère (humaine-murine).



Fab'

Figure 22: représentation des chaînes lourdes et légères liées par un pont disulfure du Certolizumab. Citing IMGT/mAb-DB : Poiron, C. et al., JOBIM 2010. Paper 13 (2010).

Le Certolizumab pegol est indiqué chez l'adulte dans la polyarthrite rhumatoïde sévère active, le psoriasis articulaire, la spondylarthrite ankylosante et la maladie de Crohn. Il est à préciser que cette dernière indication n'a pas été retenue par l'EMA. Les bénéfices de cette molécule dans le traitement de la maladie de Crohn n'étant pas supérieurs aux risques.^{[78] [79]}

6.1.1.2. L'utilisation du récepteur soluble TNFR

Deux types de récepteurs distincts de TNF existent naturellement sous forme de molécules monomériques sur les surfaces cellulaires et sous forme soluble. Le premier type est une protéine de 55kD (p55) et le deuxième présente un poids moléculaire de 75 kD.

L'activité biologique du TNF est dépendante de sa fixation au récepteur TNFR. Des monomères de la portion extracellulaire des TNFR sont naturellement clivés des surfaces cellulaires et sont appelés sTNFR (solubles). Les sTNFR fixent avec une grande affinité les TNF circulants et agissent comme un antagoniste naturel aux TNF empêchant ainsi la fixation de ces derniers sur les récepteurs cellulaires.^[72]

L'Etanercept (Enbrel®) est une protéine de fusion administrée par voie sous cutanée. Elle contient le fragment Fc d'une IgG1 humaine et 2 domaines extracellulaires du récepteur soluble p75. Il est produit par la technologie de l'ADN recombinant dans des CHO.^{[48] [72]}

L'Etanercept, une protéine qui consiste en un dimère de 2 fois 467 acides aminés. Parmi les 467 acides aminés, 235 d'entre eux représentent la proportion extracellulaire du récepteur soluble TNFR. Les 232 acides aminés restants forment le domaine Fc de l'immunoglobuline IgG1 y compris les régions : charnière, CH2 et CH3.^[75]

Cette protéine de 150kDa a représenté des ventes globales de 7.9 milliard de Dollars US. Un chiffre supérieur à celui des autres IgGs couronnées de succès.^[75]

La structure dimérique de l'Etanercept augmente son affinité et fournit une inhibition compétitive plus importante que les récepteurs monomériques solubles. De plus, l'utilisation d'une région Fc d'une IgG1 lui confère une $\frac{1}{2}$ plasmatique plus longue en comparaison avec les récepteurs solubles.^[72]

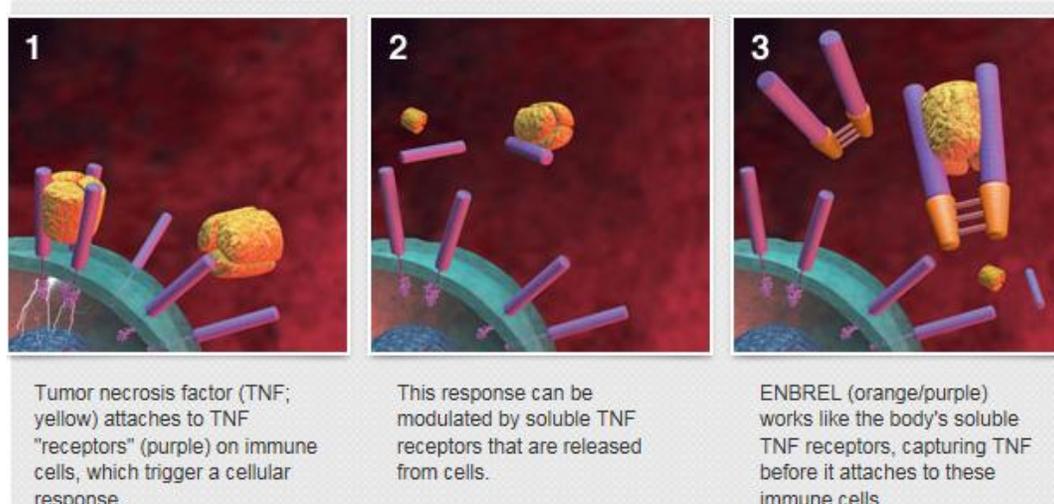


Figure 23: mécanisme d'action de l'Etanercept (Embrel®).^[73]

L'Etanercept module indirectement les réponses biologiques induites ou régulées par le TNF. Il influence, en effet, l'expression des molécules d'adhésion E-Sélectine et dans une moindre mesure les molécules d'adhésion intercellulaires 1 (ICAM-1) et la production de la matrice métallo-protéinase MM3, des interleukines IL1 et IL6.^[72]

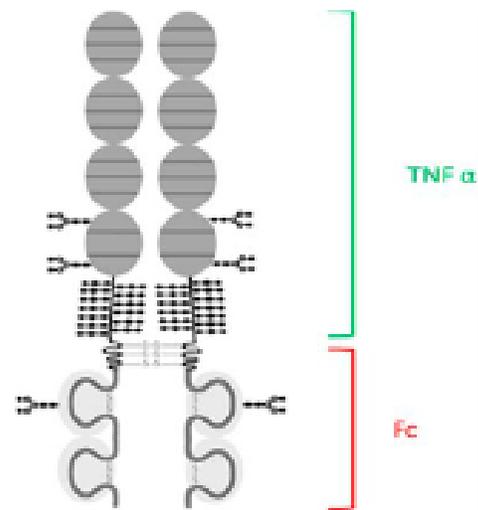


Figure 24: diagramme d'une illustration schématique de la structure de glycosylation de l'Etanercept.^[75]

En plus d'avoir des N-Glycosylations au niveau des régions CH2 du fragment Fc, l'Etanercept a plusieurs glycosylations N-liées et O-liées dans la région sTNFR qui, elle, représente un tiers du poids moléculaire global de la molécule.^[75]

6.1.2. Immunoglobulines solubles : Ac anti IgE-Fc

L'asthme est une maladie chronique des voies aériennes se traduisant par une inflammation des bronches en lien avec le mécanisme immunologique qui fait intervenir les immunoglobulines IgE.^[39]

La réaction allergique de l'asthme extrinsèque se traduit par 2 étapes. Tout d'abord, l'étape de sensibilisation où l'organisme entre en contact pour la première fois avec l'allergène. Une production massive d'IgE est donc déclenchée. Ces derniers se fixent sur les mastocytes et les éosinophiles au niveau pulmonaire. La 2^{ème} étape consiste en l'activation suivie d'une crise d'asthme. Lors de cette étape, l'organisme entre en contact pour la 2^{ème} fois avec l'allergène qui se fixe aux IgE et entraîne une libération massive d'histamine, de leucotriènes, de prostaglandines, de composant du complément et de cytokines. La libération de ces éléments provoque une bronchoconstriction et une inflammation menant à une crise d'asthme.^[84]

Bien qu'il existe des thérapies pour l'asthme (B2 mimétiques, anti-leucotriènes,...), les patients atteints d'asthme sévère n'ont pas un contrôle complet de la maladie. Ils présentent donc une qualité de vie altérée et un risque élevé d'exacerbation avec des conséquences pouvant être fatales. Il a donc été nécessaire de développer des traitements innovants tels que l'Omalizumab.^[39]

Omalizumab ou Xolair® est un anticorps monoclonal anti-IgE utilisé chez les patients de 12 ans et plus. Il est indiqué dans les cas d'asthme persistant modéré à sévère avec une réaction dermique positive ou une réactivité *in vitro* à un aéro-allergène perpétuel et ayant des symptômes non maîtrisés par les corticoïdes inhalés. Il est aussi indiqué dans le cas d'urticaire chronique idiopathique qui reste symptomatique malgré un traitement antihistaminique H1.^[80]

L'Omalizumab est un Acm humanisé. Cette IgG comporte une partie humaine (95%) et une partie murine (5%). Cet Acm neutralisant fixe la fraction Fc de l'IgE et empêche ce dernier d'activer les basophiles et les mastocytes.^[39]

L'Omalizumab forme, en fixant les IgE, des complexes biologiquement inertes qui sont rapidement éliminés par voies urinaires. Ces complexes n'activent pas le complément.^[39]

D'après des études menées sur l'asthme allergique, l'administration de l'Omalizumab fait baisser le taux sérique des IgE libres de 89 à 99%. Cette diminution est dose-dépendante. L'Omalizumab atténue les réponses aiguës et tardives après inspiration de l'allergène.^[39]

Il est bien de rappeler que la fixation de l'IgE sur son récepteur induit l'expression d'autres récepteurs similaires par un mécanisme d'autorégulation positive. L'Omalizumab, en fixant l'IgE, réduit l'expression des récepteurs FcεRI à la surface des basophiles et des mastocytes. Ces récepteurs sont internalisés et dégradés. Ce phénomène induit une diminution de la capture des IgE et prévient la libération de facteurs inflammatoires. Il y a donc une possibilité de désensibilisation des mastocytes et des basophiles qui se manifeste par une stimulation plus importante afin d'observer la réaction allergique. La diminution du taux d'IgE entraîne une réduction de l'expression du FcεRI dans les cellules dendritiques (cellules présentatrices d'allergène).^[39]

Les effets secondaires observés sous Omalizumab sont faibles à modérés. À part les réactions au niveau du site de l'injection, ces effets ne diffèrent pas beaucoup du groupe placebo. Il y a des réactions anaphylactiques qui sont observées chez 0.09% des patients. 60% de ces réactions surviennent dans les 2 heures qui suivent l'injection d'où la nécessité de surveiller le patient 2 heures après les 3 premières injections. D'autres effets indésirables sont observés : diarrhée, nausées, vomissements, rashes cutanés et épistaxis.^[39]

6.1.3. Facteurs de croissance : anti-VEGF

La famille des facteurs de croissance endothéliaux ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) contrôle l'angio-genèse normale et tumorale. Ce groupe est composé de 5 types de facteurs de croissance : le VEGFA, B, C, D et le PlGF (facteur de croissance placentaire). Le VEGFA présente, lui, 4 isoformes dont un surexprimé

dans plusieurs cas de cancers. Ces derniers ont un besoin accru en oxygène et en nutriments d'où leur état d'hyper-vascularisation.^{[81] [82]}

Les facteurs, cités précédemment, lient les trois types de récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 avec des spécificités différentes. Leur fixation déclenche une prolifération endothéliale, augmente la mobilité des cellules endothéliales et provoque la formation de nouveaux vaisseaux et la perméabilité de ceux déjà existants.^{[81] [82]}

Le Bévacicumab (Avastin®) est une IgG1 humanisée qui lie et neutralise tous les isoformes de VEGF au niveau d'un épitope différent de leurs sites de fixation au récepteur.^[81] La neutralisation de l'activité biologique du VEGF réduit l'angiogenèse tumorale et inhibe ainsi la croissance tumorale.

Cet Acm a été approuvé en 2004 pour le traitement du cancer colorectal métastatique. Il est devenu depuis un traitement standard de 1^{ère} ligne ou de 2^{ème} ligne pour les patients ayant ce cancer en combinaison avec la chimiothérapie à base de 5-fluorouracil (5-FU).^[83]

L'Aflibercept (Zaltrap®/Eylea®), lui, est une protéine de fusion composée des domaines extracellulaires d'un VEGFR1 et R2 humains liés à un fragment Fc d'une IgG humaine.^[81] L'Aflibercept agit comme un piège à ligand qui lie le VEGF-A avec une affinité plus importante que ses récepteurs natifs et fixe aussi le VEGF-B et le PlGF. L'Aflibercept inhibe la liaison des ligands endogènes à leurs récepteurs et bloque ainsi la signalisation issue de ces récepteurs. Ce blocage induit une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales et inhibe donc la croissance de nouveaux vaisseaux qui alimentent les tumeurs en oxygène et nutriments.^[31]

6.1.4. Composant du complément (C5) : anti-C5

L'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN) est une maladie acquise due à une mutation génétique des cellules souches hématopoïétiques. La mutation entraîne un déficit en deux protéines membranaires inhibitrices du complément. Il en résulte l'hémolyse observée lors d'une HPN. Les protéines en question sont le CD55 qui interagit avec les C3 et C5 convertases et le CD59 qui inhibe le Complexe d'Attaque

Membranaire (CAM). Celles-ci sont normalement intégrées à la membrane par une ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol).^[85]

L'absence de l'ancrage GPI provoque l'hémolyse qui, elle, est responsable d'une hémoglobinémie. Cette dernière entraîne une saturation des voies d'élimination de l'hémoglobine à savoir l'endocytose et la dégradation par des macrophages. Cette élimination provoque un déficit en oxyde nitrique qui se lie de façon irréversible à l'hémoglobine ce qui conduit à un dérèglement du tonus musculaire exprimé par une dysphagie, des douleurs abdominales et un dysfonctionnement érectile.^[85]

Le seul traitement curatif d'une HPN est la greffe de la moelle osseuse allogénique. Ce traitement est indiqué dans les cas d'aplasie médullaire, de complications thrombotiques répétées et des crises hémolytiques sévères récurrentes.^[85]

Depuis 2007, il existe une 2ème alternative utilisée dans la prise en charge de l'HPN qui est l'Eculizumab (Soliris®). Cet AcM est une immunoglobuline qui inhibe le facteur C5 du complément. Le facteur C5 intervenant dans les étapes effectrices terminales du complément, son inhibition n'impacte donc pas les éléments nécessaires pour l'opsonisation des microorganismes et l'élimination des complexes immuns.^[85]

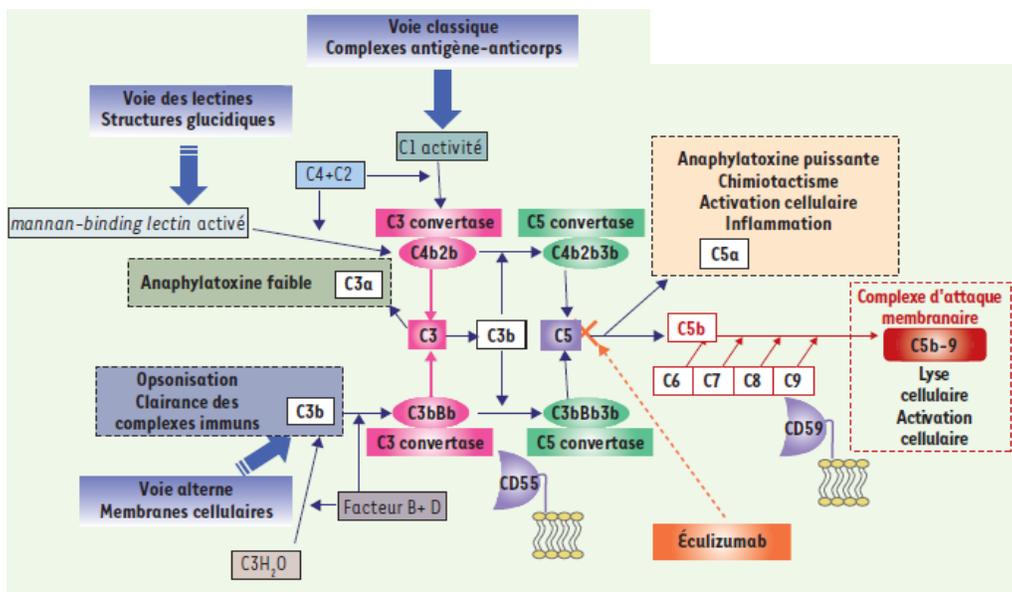


Figure 25: les voies d'activation du complément et le site d'intervention de l'Eculizumab.^[85]

6.2. Blocage de l'activation d'un récepteur :

6.2.1. Anticorps antagonistes : Anti CTLA-4

Il existe 2 voies d'activation des cellules T :

- la fixation de l'Ag présenté par des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) à travers le CMH.
- l'interaction avec des récepteurs membranaires comme le CTLA4 qui réduit l'activation ou le CD28 qui, lui, l'augmente.^[81]

L'Ipilimumab ou Yervoy® est une IgG1 kappa humaine recombinante anti-CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocytes Associated protein 4). Cet Acm, produit dans une culture cellulaire de CHO, a un poids moléculaire d'environ 148 kDa. Il a été approuvé en 2011 par la FDA pour le mélanome métastatique.^[88]

Le CTLA4 est un régulateur négatif des lymphocytes T. L'Ipilimumab fixe donc le CTLA4 et bloque son interaction avec son ligand, le CD80/86. Il a été démontré que le blocage du CTLA4 augmente l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Chez des patients ayant un mélanome, le mécanisme d'action de l'Ipilimumab est indirect et est probablement lié à une réponse à médiation lymphocytaire (T) anti tumorale.^[88]

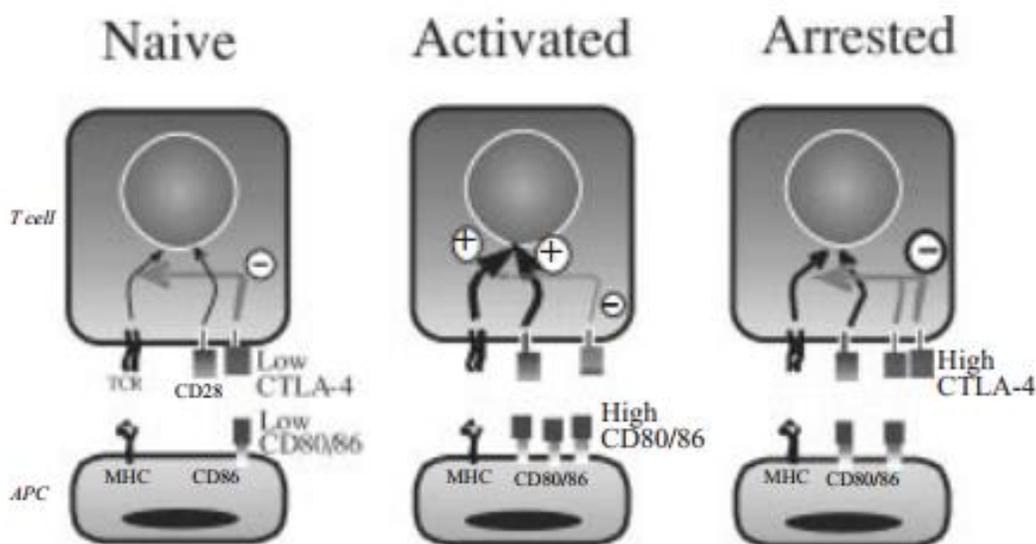


Figure 27: modèle du rôle du CTLA 4 dans la régulation des cellules T.^[89]

D'après le schéma précédent : l'activation des cellules T naïves nécessite les 2 signaux TCR et CD28. Dans des conditions de co-stimulation suboptimale, un niveau bas d'expression de CTLA4 doit inhiber l'activation des cellules T par une compétition directe avec la fixation du ligand sur CD28 et/ou en générant des signaux d'inhibition.

Dans des conditions optimales de co-stimulation, un niveau bas d'expression de CTLA4 devient un facteur limitant et l'activation complète des cellules T suit. L'expression en surface des CTLA4 augmente jusqu'à ce qu'elle puisse encore une fois rentrer en compétition avec le CD28 et donner lieu à des signaux d'inhibition pour arrêter les réponses des cellules T.^[89]

Les "Biomarqueurs": un challenge majeur pour les cliniciens est celui de savoir si les patients répondent au traitement et combien de temps reste-il avant de changer de ligne de traitement. Il n'existe actuellement ni des bio-marqueurs prédictifs de la réponse de l'Ipilimumab ni des marqueurs de son efficacité. Cependant, les recommandations actuelles sont de compléter les 4 doses d'Ipilimumab pendant les 12 semaines de la phase d'induction à moins qu'une toxicité sévère survienne. Dans le cas d'une progression confirmée à 12 semaines ou au-delà, la progression nécessite d'être confirmée au moins 4 semaines plus tard.^[67]

6.2.2. Anticorps neutralisant d'un antigène membranaire :

6.2.2.1 anti-EGFR

Les récepteurs à l'EGF sont exprimés au niveau de la surface de toutes les cellules épithéliales du corps et de manière spécifique dans les cellules épithéliales bronchiques.^[92]

L'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) est un membre de la famille des récepteurs ErbB à tyrosines kinases. Il est composé d'un domaine extracellulaire de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intra-cytoplasmique à tyrosine kinase. La fixation du ligand comme le facteur de croissance épidermique (EGF) ou le TGF- α (Transforming Growth Factor alpha) conduit à une dimérisation et une auto-phosphorylation des résidus tyrosines du récepteur qui initie un signal intracellulaire.^[91]

L'EGFR joue un rôle important dans la prolifération des cellules cancéreuses, l'inhibition de l'apoptose, la différenciation, l'adhésion et la migration. Environ 30% des cancers sur-expriment l'EGFR qui est associé au stade avancé de la maladie, à sa récurrence, à la métastase et à la faible survie.^[91]

Il existe 2 approches utilisées avec succès pour inhiber les fonctions de l'EGFR dans le traitement du cancer : la neutralisation par des anticorps monoclonaux (mab) d'une part et l'utilisation de petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase (inib) d'autre part.^[93]

Les petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase sont en compétition réversible avec l'Adénosine 5'-triphosphate pour se fixer au domaine catalytique intracellulaire de l'EGFR. Ils inhibent ainsi l'autophosphorylation et donc le signal intracellulaire. Des molécules variées de cette famille peuvent bloquer des récepteurs différents de facteur de croissance à tyrosine kinase, y compris le VEGFR.^[93]

Les anticorps monoclonaux se fixent sur le domaine extracellulaire de l'EGFR dans sa forme inactive. Ils rivalisent avec la fixation du ligand par l'occupation de la région fixatrice de ligand et bloquent ainsi l'activation de la tyrosine kinase induite par le ligand. Contrairement aux petites molécules inhibitrices de tyrosine kinases, les Acm anti-EGFR reconnaissent exclusivement l'EGFR et sont donc hautement sélectif pour ce récepteur.^[93]

Deux anticorps anti-EGFR ont été développés. Le Cétuximab (Erbitux®) est un Acm chimérique avec des régions Fv d'un anticorps anti-EGFR murin et une chaîne lourde, une chaîne légère kappa et une région constante d'une IgG1 humaine.^[91] Cet Acm se fixe sur le l'EGFR avec une affinité plus importante que celle des ligands naturels comme l'EGF et le TGF- α . La fixation du Cetuximab sur l'EGFR favorise l'internalisation du récepteur et sa dégradation ultérieure sans phosphorylation et sans activation de celui-ci. Ceci entraîne une réduction de la disponibilité de l'EGFR au niveau de la surface cellulaire empêchant ainsi l'activation des voies de signalisation du récepteur concerné.^[93]

La fixation du Cetuximab sur l'EGFR inhibe la progression du cycle cellulaire dans la phase G0/G1 et induit l'apoptose par sur-expression des protéines pro-

apoptotique (ex : caspase 3, 8 et 9) ou par l'inactivation des protéines anti-apoptotiques. Ceci induit une diminution de l'expression ou de la phosphorylation. Il a été reporté aussi que cet Acm inhibe la production des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, l'IL8 et le facteur de croissance des fibroblastes. En effet, l'inhibition de ces facteurs est associée à une diminution de la néo-angiogenèse et au développement de métastases distantes dans des modèles de cancers orthotopiques.^[93]

Panitumumab (Vectibix®) est une IgG2 humaine entière qui cible le domaine extracellulaire de l'EGFR. Cet Acm présente une affinité importante avec un taux bas de réactions allergiques ou anaphylaxiques.^[93] Le Panitumumab se lie au domaine de liaison du ligand à l'EGFR et bloque l'autophosphorylation du récepteur. La fixation de cet Acm provoque une internalisation du récepteur, un arrêt du développement cellulaire, une induction de l'apoptose et une diminution de la production de l'interleukine 8 et du facteur de croissance endothélial.

6.2.2.2 anti-CD25

L'antigène CD25 est une glycoprotéine qui représente la sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine-2.^{[95] [94]}

Le récepteur à l'IL2 est composé de 3 chaînes. L'association de ces chaînes est requise pour la fixation à haute affinité de la cytokine et est donc nécessaire pour le signal intracellulaire. Le CD25 (chaîne alpha) a été identifié comme un récepteur à haute affinité pour l'IL2. Les chaînes Béta et gamma, elles, sont partagées par des récepteurs destinés à d'autres cytokines telles que : l'IL15.^[96]

La fixation de l'IL2 avec une grande affinité semble renforcer l'association des chaînes Beta et Gamma du récepteur. Ceci induit leur phosphorylation mutuelle par la tyrosine kinase et en conséquence l'activation des cascades de signalisation. Les chaînes Beta et Gamma sont impliquées dans la transduction du signal à travers leur association avec des tyrosines kinases spécifiques. La chaîne alpha (CD25), elle, n'est

pas capable de signaler et doit probablement stabiliser la fixation du ligand sur le récepteur à IL2 à haute affinité.^[96]

L'activation des lymphocytes T induit la production et la libération rapide de la cytokine IL2. Les cellules T prolifèrent en exprimant des récepteurs ayant une grande affinité à l'IL2.^{[95] [94]}

Le récepteur à l'IL2 est exprimé dans les précurseurs myéloïdes, les oligodendrocytes et des lymphocytes T et B transformés par des virus. Ce récepteur est absent des thymocytes, des lymphocytes B et T non activés et d'autres cellules. Le récepteur en question est associé aux inflammations, aux néoplasies lymphoïdes, aux maladies auto-immunes et au rejet de greffe.^[95]

Dans le cadre de la transplantation, les anticorps monoclonaux sont utilisés afin d'opposer les lymphocytes T. Ces dernières sont activées en présence de 3 signaux illustrés dans le schéma suivant et expliqués ci-après.^[94]

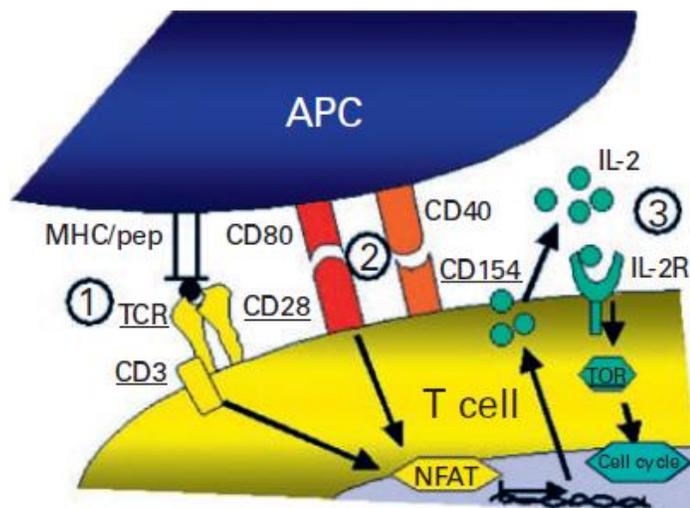


Figure 28: activation des lymphocytes T.^[94]

Le signal 1 : reconnaissance de certaines molécules CMH présentes sur les APC (Cellules Présentatrices d'Antigène). La spécificité antigénique est transmise grâce aux molécules de CMH.^[94]

Le signal 2 : est un signal de co-stimulation. En effet, la présence simultanée des signaux 1 et 2 est nécessaire à l'activation de la cellule. En l'absence du signal 1, la cellule est en anergie.^[94]

Le signal 3 : l'activation des lymphocytes T est induite par les cytokines solubles dont l'IL2 qui est un facteur principal dans ce cas.^[94]

Il existe actuellement 2 anticorps monoclonaux anti-CD25. Le Daclizumab, un anticorps humanisé et le Basiliximab, un anticorps chimérique.^[94]

Une expérience a été menée afin de clarifier le mécanisme d'action du Daclizumab. Ce dernier entraîne une atténuation de la phosphorylation de la tyrosine kinase induite par l'IL2 contrairement à l'IgG1 humaine utilisée comme témoin. Cette atténuation était indétectable lors de l'utilisation d'autres molécules d'immunoglobulines.^[96]

Une autre expérience a démontré l'atténuation de l'activité tyrosine kinase par l'IL2 associée aux chaînes bêta et gamma en présence du Daclizumab. Sachant que ces chaînes sont partagées aussi par le récepteur de l'IL15 et afin de clarifier si le Daclizumab inhibe spécifiquement la phosphorylation induite par l'IL2, des lymphocytes humains ont été stimulés par l'IL15 au lieu de l'IL2. Le Daclizumab n'avait montré aucun effet sur la phosphorylation des chaînes bêta et gamma induite par l'IL15. L'effet du Daclizumab paraît spécifique de la chaîne α du récepteur de l'IL2 du moment que la phosphorylation des chaînes β et γ n'est pas affectée par l'anticorps.^[96]

Le Daclizumab, à travers son interférence avec la fixation de l'IL2, atténue l'association et la phosphorylation des chaînes β et γ induite par l'IL2. La phosphorylation induite par l'IL2 (mais pas par l'IL15) est, en conséquence, atténuée et l'induction par l'IL2 du facteur transcription STAT5 est considérablement réduite. Le CD25 a donc un rôle important dans la formation du récepteur à l'IL2 à haute affinité.^[96]

La chaîne α , contrairement aux chaînes β et γ , ne contient pas de partie intracellulaire impliquée dans la transduction du signal. Elle optimise l'association et la phosphorylation des chaînes β et γ provoquée par la fixation de l'IL2 probablement en permettant une haute affinité de ce dernier avec le récepteur trimérique.^[96]

L'utilisation du Daclizumab dans la transplantation clinique de manière sûre et effective, doit souligner le fait que l'interférence avec l'IL 2 n'est pas suffisante pour prévenir le rejet de greffe. En effet, le « knock-out » de l'IL2 et de son récepteur en

même temps n'empêche pas le rejet chez des souris. Ceci est probablement dû à une redondance des voies de signalisation des cytokines. De plus, il existe des preuves convaincantes que l'IL2 qui a un effet pro-inflammatoire (Th1) est éventuellement important dans la modulation négative de la réponse immune. L'IL2 et la chaîne α de son récepteur sont requis pour le développement d'une tolérance.^[96]

Tableau 2. Spécificité des anticorps monoclonaux utilisés en clinique dans la transplantation d'organes.

Cellules cibles	Blocage	Cible	Exemples
Cellules T	Signal 1	Récepteur des cellules T (toutes les cellules T)	Anti-CD3 (OKT3), anti-TCR $\alpha\beta$ (T10B9.1A)
		CD4 (uniquement les cellules helper)	Anti-CD4 (OKT4)
	Signal 2	CD28-CD80/86 pathway (costimulation classique)	CTLA4-Ig (belatacept)
		CD154-CD40 pathway (costimulation classique)	Anti-CD154 (Hu5c8)
		ICAM1-LFA1 pathway (adhésion)	Anti-ICAM1 (enlimomab) Anti-LFA1 (odulimomab, efalizumab)
	Signal 3	CD25 (chaîne α du récepteur de l'interleukine-2)	Anti-CD25 (basiliximab, daclizumab)
(Déplétion)	CD52 (fonction inconnue)	Anti-CD52 (alemtuzumab)	
Cellules B		CD20	Anti-CD20 (rituximab)
Facteurs solubles		TNF- α	Anti-TNF- α (infliximab)

Tableau 4: spécificité des Acm utilisés dans la transplantation d'organes.^[94]

6.2.2.3 anti-GPIIb/GPIIIa

L'Abciximab (Reopro®) est un fragment Fab d'un anticorps monoclonal chimérique humain-murin. Ce fragment fixe le récepteur des GlycoProtéines (GP) IIb/IIIa des plaquettes activées et inhibe l'agrégation plaquettaire en empêchant la liaison du fibrinogène, du facteur de Willebrand et d'autres molécules aux récepteurs GPIIb/IIIa. Reopro® lie aussi le récepteur de la vitronectine des plaquettes et des cellules endothéliales.^[101]

Les propriétés pro-coagulantes des plaquettes et les propriétés prolifératives des parois épithéliales des vaisseaux et muscles lisses sont médiées par le récepteur de la vitronectine. Abciximab, grâce à sa double spécificité, empêche la formation brusque de thrombine suite à l'activation des plaquettes de façon plus efficace que les agents inhibant uniquement le récepteur GPIIb/IIIa.^[101]

6.2.2.4 anti-RANK/RANKL

Les jeunes adultes ayant une bonne santé présentent un équilibre entre l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes. La nouvelle substance osseuse vient, en effet, remplacer l'ancienne substance qui est résorbée. Dans le cas de l'ostéoporose, un déséquilibre est observé et est exprimé par la perte de masse osseuse et la destruction de sa microarchitecture.^[102]

Les ostéoclastes, leurs précurseurs et les cellules T expriment le RANK (**R**eceptor **A**ctivator of **N**uclear factor **k**B) qui est un récepteur membranaire du RANKL (**R**eceptor **A**ctivator of **N**uclear factor **k**B **L**igand) et qui a une fonction régulatrice. Ce récepteur fait partie de la famille des TNF.^[102]

Le RANK-L (Ligand) est, lui, une protéine transmembranaire nécessaire aux fonctions et au cycle de vie des ostéoclastes. Il inhibe l'apoptose de ces cellules et induit la résorption osseuse et la diminution de la densité et de la masse osseuse.^[102]

L'interaction entre le RANK et le RANKL est essentielle pour l'évolution des précurseurs en ostéoclastes mais aussi pour l'activation et la prolifération des ostéoclastes matures.^[102]

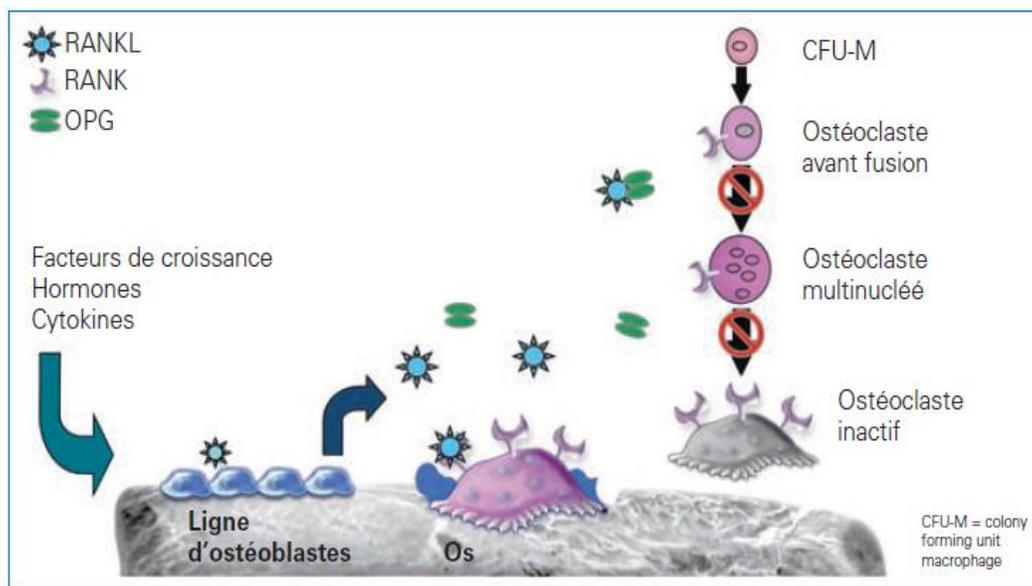


Figure 29: le concept RANK/RANKL/OPG.^[102]

Un autre facteur intervient dans cette interaction : l'ostéoprétégérine (OPG). C'est une protéine soluble sans segment transmembranaire, sécrétée par les ostéoblastes. Ce facteur inhibe l'interaction entre le RANK et le RANKL. L'OPG sert de

récepteur de captage du RANKL et diminue donc la durée de vie des ostéoclastes en inhibant le RANKL. Il faut préciser que l'OPG se fixe sur les autres représentants de la famille des TNF. Il n'est donc pas spécifique.^[102]

Comme illustré sur la figure 29, le RANKL est le médiateur principal pour la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes. La maturation des pré-ostéoclastes au stade précédant leur fusion qui les transforme en ostéoclastes poly nucléés et finalement en ostéoclastes activés, est initiée lorsque le RANKL se lie au RANK. L'OPG est formé par les ostéoblastes, tout comme le RANKL. L'OPG agit comme récepteur soluble qui capte le RANKL, neutralisant ainsi son action, ce qui inhibe la formation et l'activation des ostéoclastes et raccourcit la survie des ostéoclastes préexistants.^[102]

Le Denosumab (Xgeva®/Prolia®) est une IgG2 humaine anti-RANKL qui lie fortement le RANKL et inhibe ainsi la réaction avec le RANK. Cet Acm inhibe de manière spécifique l'activité du RANKL car elle ne se fixe pas sur les autres membres de la famille des TNF.^[102] Il empêche ainsi la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes et inhibe ainsi la résorption osseuse.

6.3. Induction d'apoptose : anti-CD 20

Le Rituximab est devenu un pilier dans le traitement d'une large variété d'affections malignes à cellules B. Plusieurs études *in vitro* ont démontré qu'il a une grande capacité d'induire une CDC de plusieurs lignes cellulaires B.^[103]

L'expression des molécules inhibitrices du complément CD55 et CD59 sur les cellules malignes B est corrélée avec la lyse observée *in vitro*. Afin de vérifier l'activité anti-tumorale du Rituximab qui se traduit par une CDC, cet Acm a été ajouté à un fluide extravasculaire dans lequel la concentration en composants du complément est plus faible que dans le plasma. La CDC a été, toute de même, observée d'où la suggestion que la CDC doit contribuer à l'activité anti-tumorale du Rituximab dans les compartiments intra et extravasculaire.^[103]

La CDC peut induire la mort des cellules ciblées par le Rituximab. Cette activité est considérée comme le mécanisme d'action principal dans certains modèles animaux.

Beaucoup de données suggèrent le fait que la CDC intervienne chez des patients traités par le Rituximab. Les points les moins claires sont le degré de contribution de ce mécanisme dans la réponse anti-tumorale et si cet Acm est actif contre les cellules qui sont en dehors du compartiment intra-vasculaire. De manière globale, l'évidence de la bonne contribution de la CDC à l'efficacité clinique du Rituximab était assez importante pour encourager le développement de nouvelles générations d'anti-CD20 ayant une capacité renforcée de fixer le complément.^[103]

L'évidence la plus convaincante que l'ADCC est mécaniquement impliquée dans la réponse clinique du Rituximab vient des études démontrant l'association entre le polymorphisme du CD16 (FcyRIIIa) et la réponse clinique du Rituximab. En effet, les homozygotes présentant 2 valines (VV) en position 158 ont une affinité plus importante pour les IgG1 que les CD16 avec une phénylalanine (VF ou FF) dans cette position. Les patients présentant un lymphome folliculaire avec un génotype VV présentent une meilleure réponse clinique au Rituximab comparativement au 2ème phénotype. Une autre étude pointe l'interaction avec le FcyRIIIa.^[103]

Ces études soulignent l'importance de l'interaction Fc-FcyR pour les effets anti-tumoraux du Rituximab et suggèrent que l'ADCC soit le mécanisme majoritaire. Elles définissent les NK, les principales cellules à exprimer le CD16, comme des contributeurs clés à l'activité anti-tumorale des Acm. Il est néanmoins important de signaler que toutes les données traitant ces polymorphismes ne sont pas pertinentes.^[103]

L'interaction entre le fragment Fc et le CD16 contribue à l'activité anti-tumorale du Rituximab, d'après certaines études. L'interprétation la plus pertinente de ces observations est que les NK induisent une ADCC des cellules ciblées par le Rituximab. En effet, les NK activées en présence du Rituximab produisent l'INF γ qui, lui, peut avoir un effet anti-tumoral direct sur les cellules malignes ou peut activer d'autres cellules effectrices comme les granulocytes (FcyR affin à l'INF γ) qui contribue à l'ADCC.^[103]

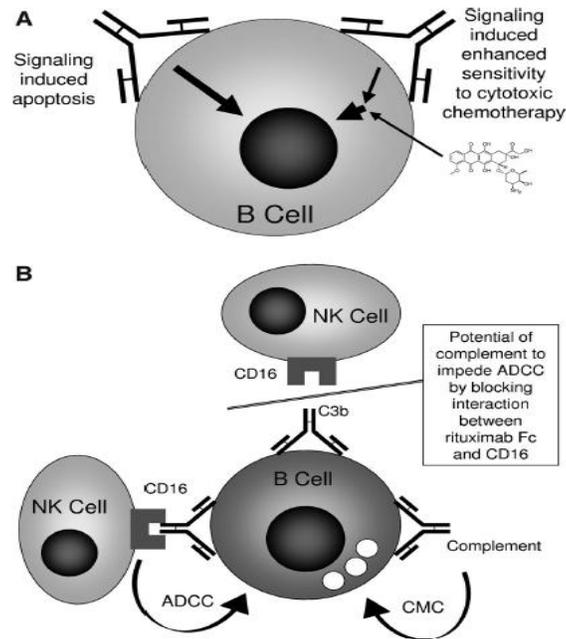


Figure 30: mécanisme d'action du Rituximab (A : signal direct. B : CDC et ADCC avec un potentiel antagonisme entre ces 2 mécanismes).^[103]

Le complément peut impacter directement l'activation des cellules B. Le C3 a été démontré comme ayant un effet inhibiteur direct sur les fonctions des NK. L'épuration des corps apoptotiques par le complément peut freiner le développement d'une réponse immune ce qui expliquerait la corrélation entre le polymorphisme du C1q et la durée de réponse du Rituximab. Une rémission a, en effet, été observée chez les sujets présentant un polymorphe associé à un niveau de C1q plus bas et une activité biologique C1q moins importante.^[103]

L'activation des NK et l'ADCC induite par le Rituximab sont inhibés par le C3b du complément. L'épitope qui fixe le C3b au Fc de l'IgG est très proche de l'épitope qui fixe le Fc au CD16. Ainsi la fixation du complément empêche la fixation du Rituximab sur le CD16 et inhibe l'ADCC induite. Le complément peut donc avoir des effets positifs ou négatifs sur la thérapie. Il existe des preuves que tous les anti-CD20 ne sont pas semblables. La classe I (Rituximab) et la classe II (Tositumomab), diffèrent dans leurs façons de fixer le CD20. Comparée à la classe I, il paraît que la classe II donne lieu à moins de mouvement du récepteur CD20 dans les radeaux lipidiques, augmente le signal de mort cellulaire induite, diminue la CDC et augmente l'ADCC.^[103]

6.4. Induction d'une immuno-modulation par blocage de molécules membranaires

6.4.1. anti-CD52

L'Alemtuzumab ou Mabcampath® est une IgG1 humanisée qui cible le CD52, une protéine de surface GPI-liée. Le CD52 est exprimé sur les lymphocytes T et B, les cellules NK, les cellules dendritiques et la plupart des monocytes. Il est, en revanche, absent des précurseurs hématopoïétiques.^[104]

La fonction naturelle du CD52 dans les cellules immunitaires n'est pas encore complètement claire. Il a été, cependant, démontré que la fixation du CD52 active les lymphocytes T par un mécanisme similaire à l'activation du récepteur T. Ce dernier est, en effet, activé par la phosphorylation intracellulaire par une tyrosine. De plus, il a été démontré que le CD52 peut servir de molécule co-stimulatrice impliquée dans l'induction des lymphocytes régulateurs CD4+.^[104]

Le traitement par Alemtuzumab induit une réduction très rapide et quasi complète des cellules portant le CD52 de la circulation sanguine. Le mécanisme d'action impliqué est l'ADCC. Cet Acm est indiqué dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique à cellules B à cause de son effet de réduction. Après l'immunosuppression observée, les monocytes reviennent à leur taux normal au bout de 3 mois tandis que les lymphocytes B, eux, ré-augmentent à un taux de 124% de leur niveau avant le traitement. Le nombre de lymphocytes T se rétablit, *quant-à-lui*, plus lentement. La déplétion des CD4+ dure 61 mois en moyenne et celle des CD8+ 30 mois.^[104]

En s'appuyant sur les observations faites sur un modèle transgénique murin d'un CD52-humain, la déplétion cellulaire est induite par une ADCC impliquant les neutrophiles et les cellules NK.^[104]

Le traitement utilisant l'Alemtuzumab ne résulte pas uniquement de la déplétion des cellules périphériques mais plutôt d'un répertoire asymétrique de cellules immunitaires. Il a été, en effet, observé une augmentation rapide des cellules B suivi d'un enrichissement en cellules T régulatrices alors que le nombre de cellules T effectrices, lui, reste encore réduit.^[104]

En se basant sur l'effet de déplétion des cellules auto-immunes, Alemtuzumab a été utilisé chez un certain nombre de patients présentant une sclérose multiple. Le principe étant que la régénération du répertoire des cellules T suivi par une déplétion des lymphocytes doit réduire la réponse auto-immune. Il a été conclu que la suppression de l'activité inflammatoire dans la sclérose multiple démontre une efficacité sur l'invalidité quand l'administration est faite au début de la maladie.^[104]

6.4.2. Anti-CCR4

L'ATL (Adult T-cell Leukemia-Lymphoma) est une maladie traduite par des lymphocytes T malins périphériques induits par le virus T-lymphotropique humain de type I (HTLV-1). Le pronostic est mauvais comparativement aux autres lymphomes non-hodgkiniens agressifs.^[105]

Les cellules infectées par l'HTLV-1 expriment la protéine virale Tax qui a des fonctions cellulaires variées incluant : l'activation du NFκB et l'inhibition des fonctions du P53. Tax est considérée comme un élément clé dans l'oncogenèse dans les stades avancés de l'ATL car elle est capable d'immortaliser les lymphocytes T *in vitro* et rend oncogéniques les souris transgéniques exprimant Tax. Il est important de noter que Tax est une cible des lymphocytes T de l'hôte et que l'inhibition de l'expression de Tax permet aux cellules infectées par l'HTLV-1 de survivre dans l'hôte. Des études ont démontré que Tax n'est pas nécessairement importante pour le développement de l'ATL à des stades reculés de l'oncogenèse.^[105]

Une analyse basée sur les bio-puces d'ADN a été réalisée afin de comparer l'hybridation génomique d'ATL aigue. Un sous-groupe distinct a été reporté. Il présente un lymphome à cellules T ayant un déséquilibre lymphatique similaire à l'ATL. Les cellules tumorales de ce groupe montrent des propriétés histo-pathologiques avec une expression fréquente de la chémokine CCR4 (CC chemokine Receptor 4) qui est caractéristique du phénotype ATL. Les patients ont un pronostique aussi pauvre que celui de ceux atteints d'ATL.^[105]

Les patients atteints d'ATL présentent des signes cliniques tels que les lympho-adénopathie, les lésions de la peau, l'hépto-splénomégalie, les leucocytoses...etc. Parmi les récepteurs exprimés par les cellules ATL, il y a : CD3, CD4, CD25, CCR4 et le FOXP3.^[105]

Le CCR4 est un récepteur couplé à une protéine G transmembranaire. Il est exprimé par les cellules Th2, par les cellules T régulatrices et par les cellules tumorales de la plupart des patients atteints d'une ATL.^[105]

Le Mogamulizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible le CCR4.^[25] Il est utilisé dans le traitement des rechutes et des formes résistantes d'ATL au Japon. Grâce à la défucosylation de la région Fc, cet IgG1 augmente nettement l'ADCC en augmentant l'affinité au FcR présents sur les cellules effectrices.^[105]

6.5. Cibles cellulaires: blocage de fonction - mort cellulaire par ADCC

6.5.1. anti-Intégrine alpha 4

Les intégrines est une famille de récepteurs glyco-protéiniques transmembranaires. Elles ont comme fonction : l'adhésion cellulaire et la connexion des environnements intra et extra cellulaires. Les intégrines sont formées de 2 sous unités α et β qui forment en s'associant des hétéro-dimères. Ces protéines jouent un rôle important dans l'assemblage du cytosquelette et dans la modulation des signaux qui contrôle les fonctions cellulaires telles que : l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation. La sous-unité $\alpha 4$ est fortement exprimée à la surface de tous les leucocytes à l'exception des neutrophiles.^{[108][109]}

Natalizumab ou Tysabri® est un Acm humanisé approuvé pour le traitement des rechutes des scléroses multiples pour lesquelles son efficacité a été démontrée. Son premier mécanisme d'action est considéré comme la résultante du blocage des chaines- $\alpha 4$ des intégrines.^[107]

Le Natalizumab est un inhibiteur sélectif des sous unités $\alpha 4$ des intégrines humaines. Il inhibe l'interaction entre cette molécule et son récepteur le VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) et d'autres molécules (ostéopontine et un variant de

la fibronectine). Cet Acm bloque aussi l'interaction entre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ avec la molécule MadCAM-1 (Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1). L'inhibition de ces interactions empêche la migration des leucocytes vers le tissu inflammatoire.^[109]

Le VCAM1 n'est pas exprimé par les cellules cérébrales en temps normal. En cas de SEP (Sclérose En Plaque), l'expression de celui-ci est stimulée au niveau du site inflammatoire. Le blocage donc des interactions entre les intégrines, le VCAM1, l'ostéopontine et les autres récepteurs empêche le passage des leucocytes vers le tissu inflammatoire.^[109]

Les études ont démontré que suite à l'utilisation du Natalizumab, une suppression significative et durable de l'expression des intégrines dans la plupart des cellules du système immunitaire. Ceci est accompagné d'un changement des proportions relatives des cellules NK, monocytes, lymphocytes B et des cellules CD34+ (cellules souches hématopoïétiques).^[107]

Une augmentation faible mais significative des cellules souches hématopoïétiques a été observée. Ce résultat est cohérent avec une étude réalisée sur des souris où en l'absence d'intégrine- $\alpha 4$, le nombre de cellules pro-génitrices a augmenté.^[107]

Les lymphocytes B sont de plus en plus reconnus pour leur implication dans la pathogenèse des scléroses multiples. Il a été démontré que Natalizumab augmente de manière disproportionnée les cellules B et les pré-B. Il est important de savoir que les cellules B contiennent plus d'intégrine- $\alpha 4$ que les cellules T et doivent donc avoir une grande capacité d'accéder au système nerveux central. Le changement phénotypique des cellules B doit impacter la constitution immunitaire. Il a, en effet, été observé que la fluorescence faible des intégrines sur les cellules CD20+ peut nuire à leur longue demi-vie, à leur activation et à leurs capacités à migrer. La contribution de l'augmentation des cellules B reste peu claire.^[107]

Le traitement par Natalizumab influence de manière directe les monocytes qui sont l'une des cellules inflammatoires importantes impliquées dans la sclérose multiple. Ces cellules migrent plus efficacement à travers la barrière hémato-encéphalique comparativement aux B et aux T. Elles expriment, en plus, de manière plus importante

des métallo-protéases chez les patients atteints que chez les témoins. Le niveau d'expression des intégrines $\alpha 4$ est plus important que celui des cellules B et T et leur blocage dans des modèles animaux ayant une moelle épinière endommagée a montré un bénéfice. L'étude réalisée a démontré une diminution du nombre de monocytes après 6 mois de traitement au Natalizumab et la diminution persiste au moins pendant 12 mois. Le mécanisme de ce changement n'est pas complètement clair mais ceci pourrait être dû, entre autres, à l'apoptose ou à la différenciation d'autres types cellulaires.^[107]

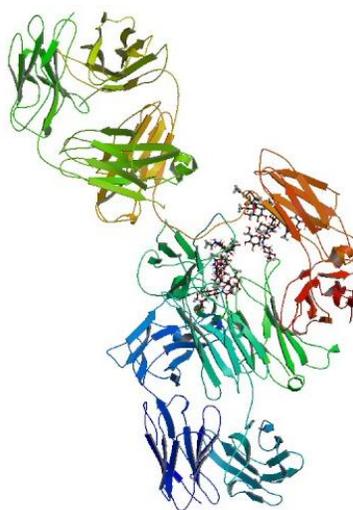
Il n'a pas eu de changements significatifs des proportions de CD4+ et CD8+ mais la proportion des cellules exprimant fortement l'intégrine- $\alpha 4$ a diminué dans les 2 sous familles. Natalizumab ciblant le CD49d (une unité des intégrine- $\alpha 4$), une diminution des CD29 (une unité des B-intégrine) n'est pas nécessairement prédite. La diminution des CD29 a été observée suite à l'élimination des intégrine- $\alpha 4$ dans des modèles murins. Il y a donc une possibilité de coordination entre ces molécules. Les intégrine- $\alpha 4$ sont considérées comme le premier responsable de la capacité de migration des cellules. Les intégrines-B, elles, contrôlent le passage des cellules T inflammatoires dans le système nerveux central pendant l'auto-immunité. Des études ont démontré que l'induction des Treg ne semble pas être un contributeur significatif au mécanisme d'action thérapeutique du Natalizumab.^[107]

6.5.2. anti-Protéine F

Le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) est un virus à ARN monocaténaire de la famille des Paramyxoviridae. Le VRS est un pathogène pédiatrique majeur qui provoque un nombre estimable à travers le monde de 33 millions de cas par an d'infections aiguës des voies respiratoires basses. VRS est aussi considéré comme un pathogène important des personnes âgées et des populations immunodéprimées. L'infection respiratoire est plus sérieuse lors de la primo-infection infantile mais la réinfection est courante au cours de la vie. Certains enfants présentent un risque plus élevé à cause de la prématurité et des maladies cardio-pulmonaires sous-jacentes.^[110]

Palivizumab (Synagis®) est un anticorps monoclonal humanisé (humain-murine) dirigé contre la protéine F présente sur la surface externe du VRS.^[111] Les CDR murines représentent 5% de l'anticorps, les 95% restantes sont humaines.^[112] Cet Ig réduit l'activité virale, la transmission intercellulaire du virus et bloque la fusion des cellules infectées. Par la fixation de l'épitope du VRS, cet IgG1 prévient l'invasion virale des cellules des voies aériennes de l'hôte. Il a été démontré que l'injection mensuelle à une dose de 15mg/kg chez l'enfant induit un maintien des concentrations sériques au dessus de 40 mcg/ml, un niveau pour lequel 99% de réduction de l'incidence d'infections pulmonaires à VRS a été observée chez des modèles animaux.^[111] La demi-vie de cet anticorps allant de 18 à 21 jours, il a été démontré que l'injection mensuelle suffit donc pour maintenir des concentrations protectrices. Le choix de l'isotype IgG1 a donc été effectué afin de permettre une administration mensuelle durant la saison du VRS.^{[111][112]}

Palivizumab est une forme d'immunisation passive spécifique au VRS. Il est administré en série d'injections intramusculaires de 5 mois à des enfants durant la saison VRS. Ce médicament est efficace contre les sous-types A et B.^[111]



Source : <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00110> consulté le 16 Novembre 2014.

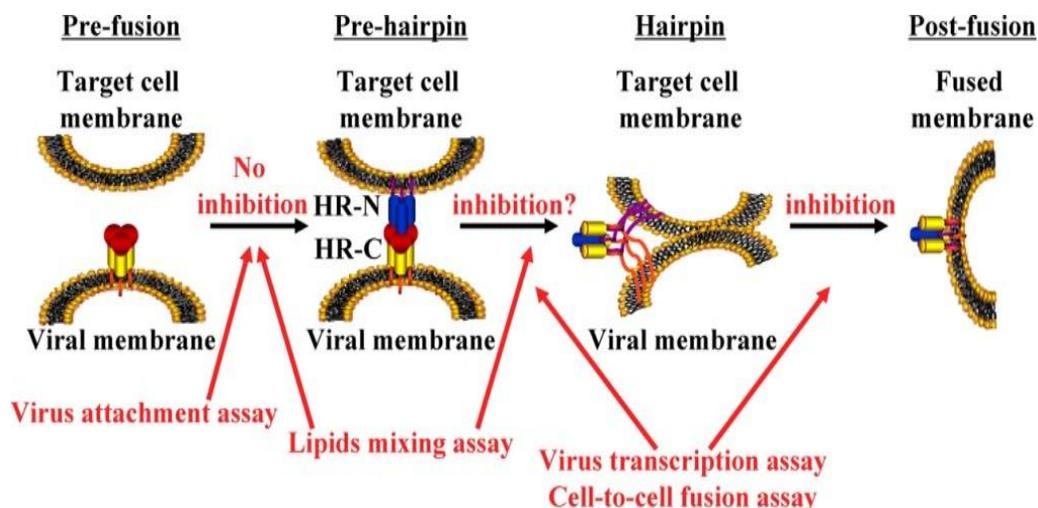


Figure 31: modèle proposé pour le mécanisme d'action du Palivizumab et motavizumab.^[113]

Le schéma ci-dessus expose la progression du changement de conformation de la protéine F. L'essai de transcription et l'essai de fusion cellulaire montre que le Palivizumab inhibe la fusion au niveau des transitions : de la conformation pré-épingle (prehairpin) à la conformation épingle (hairpin) et de la conformation épingle à la conformation post-fusion.^[113]

6.5.3. anti-EpCAM

EpCAM est une glycoprotéine transmembranaire d'adhésion spécifique aux cellules épithéliales. Elle est impliquée dans d'autres processus comme la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Cette molécule est exprimée chez la majorité des patients présentant un cancer épithélial tel que le cancer gastrique, ovarien, colorectal,... Il a été démontré qu'elle stimule la croissance tumorale et son expression dans les cellules souches cancéreuses. Les carcinomes à EpCAM continuent à exprimer l'EpCAM même dans des conditions métastatiques telles que la dissémination dans la cavité péritonéale. Un certain nombre de cellules normales expriment aussi cette molécule mais dans les régions basolatérales. Elles sont cependant exprimés dans toutes les surfaces cellulaires des cellules tumorales.^[106]

Catumaxomab (Removab®) est une IgG complète composée d'une chaîne légère k d'une souris, d'une chaîne légère λ d'un rat, d'une chaîne lourde d'une IgG2

d'une souris et d'une chaîne lourde d'une IgG2 d'un rat. Cet anticorps monoclonal trifonctionnel est caractérisé par sa capacité de fixer 3 cellules différentes qui sont donc les cellules tumorales, les lymphocytes T et les cellules accessoires (macrophages, cellules dendritiques et les NK). En plus de sa capacité à fixer l'EpCAM et le récepteur CD3 humain (lymphocytes T), la région hybride Fc offre un 3ème site fonctionnel qui fixe préférentiellement les récepteurs activateurs FcγR I, II et III présents sur les cellules accessoires. Son activité anti-tumorale résulte de la lyse (perforine/granzyme) induite par les lymphocytes T, l'ADCC et la phagocytose *via* l'activation des cellules accessoires.^[106]

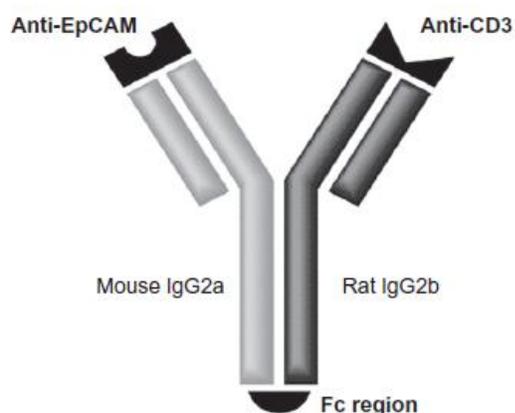


Figure 32: structure du Catumaxomab.^[106]

L'induction d'une sécrétion de cytokines (exemple : TNF- α et INF- γ) par les lymphocytes T soutient l'activité anti-tumorale. Le Catumaxomab est le premier anticorps monoclonal trispécifique et le premier médicament dans le monde à être approuvé spécifiquement pour le traitement de l'ascite malin chez les patients atteints d'un carcinome à EpCAM où les thérapies standards ne sont pas disponibles ou ne sont plus applicables. Des études cliniques sont actuellement en cours pour d'autres indications (cancer de l'estomac et des ovaires).^[106]

En plus d'avoir un effet cytotoxique direct, Catumaxomab peut induire une immunité anti-tumorale démontrée dans des modèles murins et chez des patients atteints d'un carcinome péritonéal. Dans les modèles murins, l'anticorps trispécifique anti-EpCAM humain et anti CD3 murin a protégé la souris contre une deuxième tumeur. Une grande corrélation a été observée entre l'induction d'une réponse immune et la survie. Cette protection est dépendante de la présence du fragment Fc chimérique. La

survie était, en effet, réduite lors de l'utilisation d'un fragment F(ab')₂. Chez les patients atteints de carcinome péritonéal, une stimulation des CD4+/CD8+ anti-tumorale a été réalisée puis une re-stimulation a été effectuée 4 semaines plus tard. L'induction des cellules CD4+/CD8+ indique la spécificité de l'immunité anti-tumorale.^[106]

6.6. Vectorisation d'une drogue :

6.6.1. Anticorps immunoconjugués : exemple de Trastuzumab emtansine ou Kadcyra®

L'HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) ou ErbB2 est un récepteur membranaire à tyrosine kinase qui fait partie du réseau de transduction de signal impliqué dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Chez l'adulte sain, l'HER2 est exprimé à un taux relativement faible dans les tissus épithéliaux normaux. Il est, cependant, surexprimé dans environ 20% des tumeurs chez des patients atteints d'un cancer du sein. L'HER2, il faut le rappeler, est associé à une croissance agressive et de mauvais résultats cliniques.^[114]

Trastuzumab ou Herceptin® est un anticorps monoclonal humanisé qui cible le sous domaine IV de la région extracellulaire de l'HER2. Il est indiqué dans le traitement des cancers du sein et des adénocarcinomes gastriques métastatiques ou gastro-œsophagiens sur-exprimant, tous les deux, l'HER2. Le mécanisme d'action doit inclure un ou plusieurs des processus suivants : l'interférence avec les voies de transduction de signal, le clivage du domaine extracellulaire, l'inhibition de la réparation de l'ADN, la diminution de l'angiogenèse, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de l'ADCC.^[114]

Même si le Trastuzumab offre des bénéfices substantiels pour les patients porteurs de cancers du sein Her2+, il y a une proportion de patients atteints de tumeurs qui ne répondent pas à cet AcM et des cas de rechute après un traitement initial. Une alternative à la « thérapie ciblée » et/ou à la chimiothérapie est l'utilisation d'anticorps-immunoconjugués qui sont créés par la liaison chimique d'un agent cytotoxique et d'un anticorps monoclonal spécifique à une tumeur.^[114]

Trastuzumab emtansine (T-DM1) ou Kadcyła® est un anticorps monoclonal immunoconjugué composé de 3 portions : le Trastuzumab, un liant non réductible et un agent cytotoxique le DM1. Ce dernier, qui inhibe la polymérisation des microtubules, est un dérivé d'un agent anti-tumoral puissant : maytansine. T-DM1 comporte un Trastuzumab lié à « de 0 à 8 » molécules de DM1.^[114]

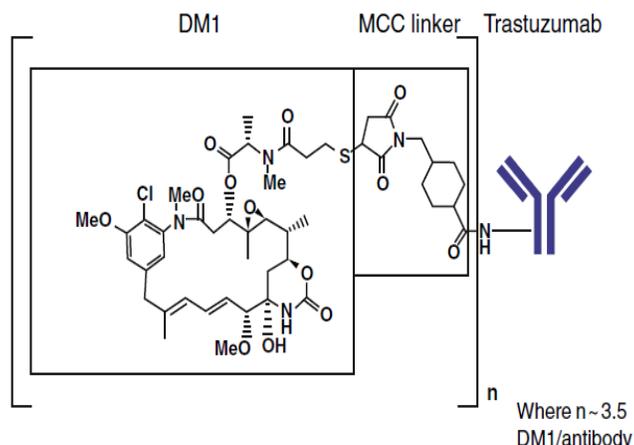


Figure 33: la structure du Trastuzumab emtansine ou Kadcyła®.^[114]

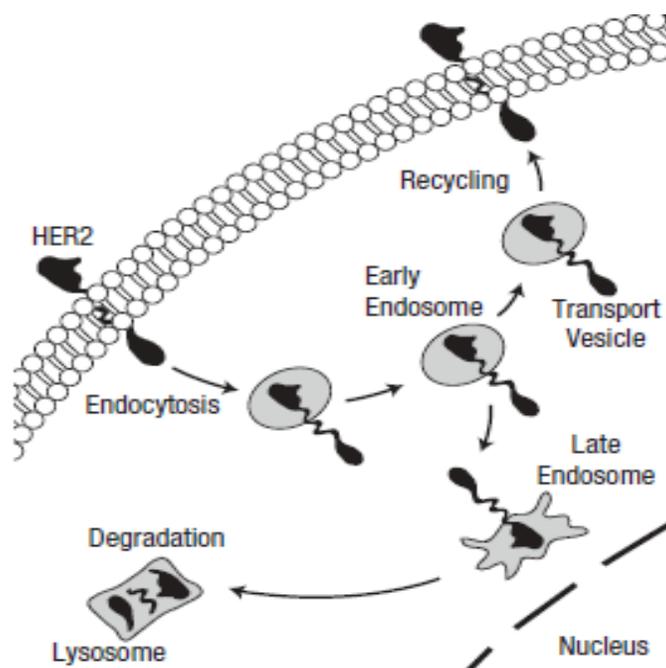


Figure 34: internalisation et recyclage du récepteur Her2.^[115]

Le T-DM1, en plus, de se fixer sur l'HER2 avec une affinité égale à celle du Trastuzumab, il maintient l'activité anti-tumorale du Trastuzumab. Il existe une hypothèse selon laquelle lors de la fixation du T-DM1 sur le récepteur Her2, une

proportion de ces récepteurs est internalisée puis recyclée ou dégradée. La forme active du DM1 est donc libérée du lysosome à l'intérieur du cytoplasme après la dégradation de l'anticorps. Il en résulte une inhibition de l'assemblage des microtubules et donc une mort cellulaire.^[115]

La sélection d'un liant est critique. Il doit, en effet, présenter un grand degré de stabilité dans la circulation et permet une libération efficace de l'agent cytotoxique une fois à l'intérieur de la cellule tumorale. Les liants utilisés en thérapie cancéreuse englobe les liants clivables en présence de protéase ou sensibles au pH.^[115]

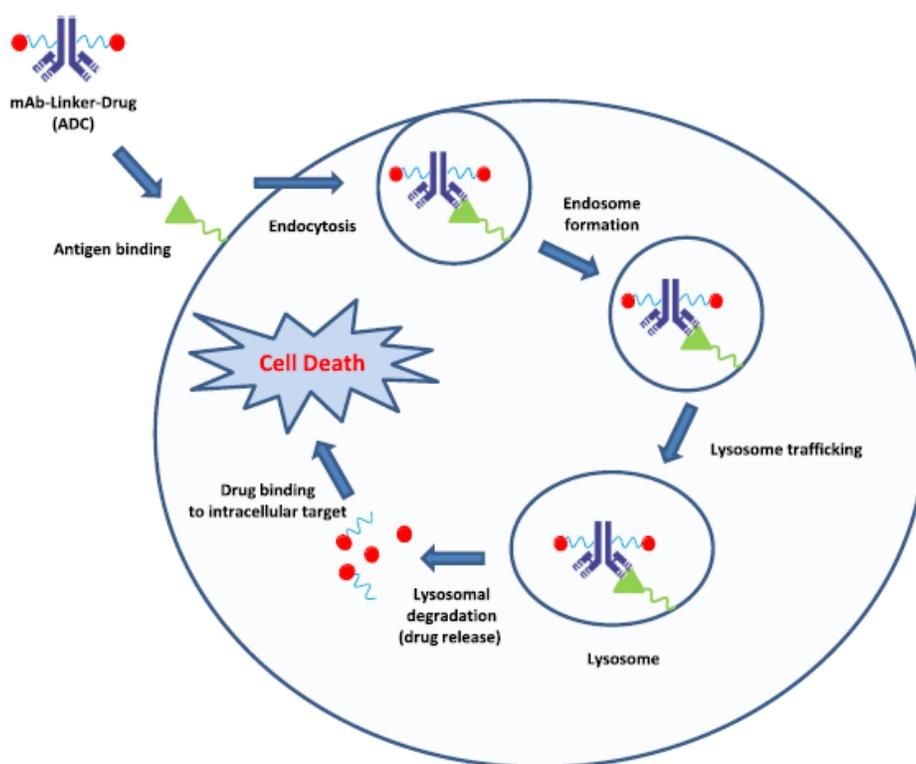


Figure 35: le mécanisme d'action et l'activité biologique d'Acm immunoconjugué.^[127]

Les toxicités précliniques et cliniques du Trastuzumab et de la maytansine (le composé mère du DM1) ont été largement caractérisées. Le Trastuzumab présente ainsi une cardiotoxicité et une embryotoxicité précédemment identifiées à des fréquences basses. La maytansine, elle, présente des effets indésirables sur le foie, la moelle osseuse, les organes lymphoïdes, le tractus gastro-intestinal et le système nerveux central et périphérique.^[114]

6.6.2. Anticorps associé à un radioactif: exemple de Capromab ou ProstaScint®

Le cancer de la prostate est le plus commun chez l'homme. Pour les patients présentant un cancer de la prostate localisé, un des traitements standards est l'irradiation par un faisceau externe. Plusieurs études ont démontré qu'il existe une relation entre la dose de l'irradiation et la réponse. Il y a eu un développement technologique ces dernières années, notamment la modulation de l'intensité de la radiothérapie et le guidage par l'image avec une localisation de la prostate, qui ont permis d'épargner la vessie et le rectum. Il en résulte que des doses élevées d'irradiation peuvent être administrées avec une toxicité acceptable.^[116]

Pour le traitement par irradiation, une tomographie est réalisée afin de délimiter la prostate. Cette technique ne permet pas de visualiser le cancer au niveau de la glande. Dans le cancer primaire et métastatique, il existe une « up-regulation » d'antigènes membranaires spécifiques à la prostate. Le scan à l'Indium-111-capromab pentetide (ProstaScint®) utilise un anticorps monoclonal murin associé à ¹¹¹In afin de détecter la présence de cancer au niveau de la prostate.^[116]

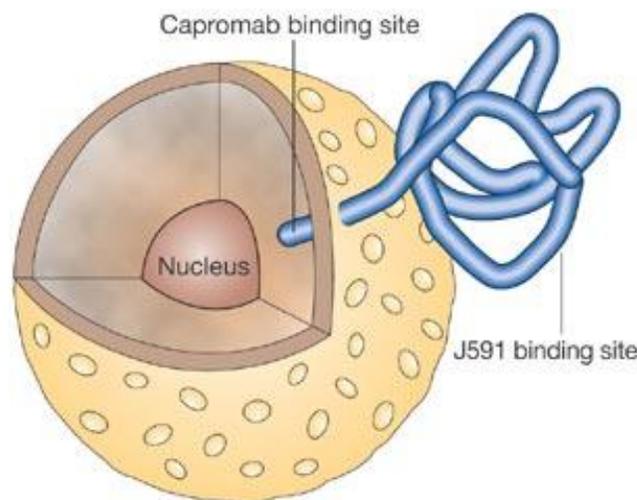


Figure 36: l'antigène spécifique à la prostate et l'épitope du capromab.^[118]

Cet anticorps cible un antigène membranaire spécifique à la prostate (PSMA). Ce dernier est une glycoprotéine membranaire fortement associée au cancer de la prostate et à des métastases associées. A cause de son ancrage à la membrane,

PSMA était supposé être une cible d'imagerie fixe mais des études, utilisant des techniques sensibles, ont réussi à démontrer que le PSMA était détecté dans le sang et le sérum des patients atteints de cancer de la prostate tout comme les autres sujets. Il est important de souligner le fait que de nombreuses études ont démontré que le capromab identifie le cancer de la prostate et ses métastases.

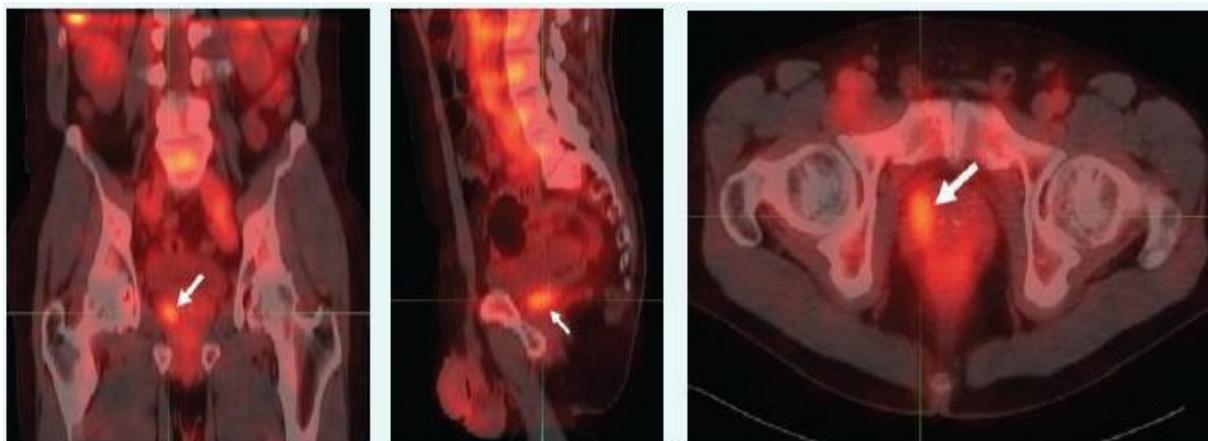


Figure 37: images fusionnées de SPECT (Single-Photon Emission Computed Tomography) /CT d'un plan, axial, sagittal et coronal.^[117]

Une étude a déjà mis en évidence la corrélation entre cette technique et des biopsies de la prostate. En utilisant l'Indium-111-capromab, le ratio prostate/muscle d'une intensité de signal supérieur à 3:1 a été considéré comme indicateur de la présence d'un cancer. Les résultats obtenus de précision, de spécificité et de sensibilité ont permis de conclure que cette technique pourrait être utilisée pour concevoir un volume d'impulsion. En effet, l'association des 2 techniques, la tomographie et le 111In-capromab, permet de localiser les lésions intra-prostatiques, des doses élevées d'irradiations peuvent être délivrées à la région ayant un signal d'imagerie intense afin de booster l'activité thérapeutique. L'administration concomitante d'une dose radioactive et d'un anticorps associé à un radioactif doit apporter une amélioration thérapeutique et limiter la toxicité associée à un traitement de la prostate entière à des doses élevées.^[116]

LA SURVEILLANCE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

7. LA SURVEILLANCE DES ANTICORPS MONOCLONAUX:

7.1. SURVEILLANCE DES ANTI-TNF- α :

En rhumatologie, les patients bénéficient depuis plus d'une dizaine d'années de bio-médicaments. Ces thérapies présentent une variabilité interpersonnelle mais aussi intra-personnelle au cours du temps. Plusieurs mécanismes expliquent ce phénomène :

- La physiopathologie variable d'un individu à un autre impliquant des voies différentes.
- La fluctuation inter et intra-individuelle de la concentration sérique efficace du biomédicament. Ceci peut être dû à :
 - ✓ un développement d'anticorps anti-anticorps.
 - ✓ l'augmentation de la clairance de l'anticorps soit en lien (ou sans lien) avec le développement d'Anticorps Anti-Anticorps (ADA: Anti-Drug Antibodies).^[120]

La physiologie, la génétique de l'individu, le taux d'inflammation, la physiopathologie et l'association avec d'autres médicaments peuvent donc interférer avec la variabilité interindividuelle. La pharmacocinétique n'est donc pas le seul facteur expliquant la variabilité interindividuelle.^[120]

L'utilisation d'outils de suivi biologique pourrait contribuer à une évaluation de l'efficacité et à l'adaptation du traitement. Les outils actuellement à disposition pour les anticorps anti-TNF sont : le dosage sérique du bio-médicament, lui-même, et des anticorps anti-anticorps.^{[120] [76]}

Un suivi thérapeutique pharmacologique des anti-TNF- α est judicieux. Il permet, en effet, une meilleure compréhension des situations d'échec de traitement, de réponse insuffisante et de réaction secondaire. Cet outil est à développer davantage.^[120]

Cette classe de médicament présente un challenge unique pour leur quantification dans le sérum en comparaison avec les molécules chimiques traditionnelles. Il est, en effet, plus facile d'isoler une petite molécule chimique d'un mélange comportant des protéines en effectuant une précipitation, extraction ou une chromatographie. L'Acm ne fait pas seulement parti du mélange protéinique mais il est structurellement similaire aux IgGs natives présentes dans le sérum. La première

génération des essais développés afin de mesurer les Acm et les ADA était basée sur les dosages radio-immunologiques, la phase solide, les doubles antigènes et les dosages immuno-enzymatiques. D'autres méthodes de quantification ont été développées telles que :

- l'utilisation de lignes cellulaires qui ont un gène rapporteur sensible au TNF.
- le test de mobilité en phase liquide (chromatographie par exclusion de taille) pour la mesure des anti-TNF (infliximab et adalimumab) et les ADA.
- la protéomique utilisant des peptides tryptique et la spectrométrie de masse.^[76]

Il existe une relation entre la concentration résiduelle de l'anti-TNF- α (Etanercept, Adalimumab et Infliximab) et la réponse clinique. En effet, plus la concentration résiduelle est importante, meilleure est la réponse clinique et plus faible est l'activité de la maladie. Des travaux doivent, néanmoins, être menés afin de définir les concentrations seuils de manière précise afin de permettre une meilleure interprétation de l'exposition individuelle des patients à l'anti-TNF- α .^[120]

Quelque que soit le taux d'humanisation des anticorps monoclonaux, le phénomène de développement d'ADA est observé. L'immunisation induit une baisse de la $\frac{1}{2}$ vie des Acm, une diminution de la réponse thérapeutique et des réactions immuno-allergiques.^[120]

Comme l'application des anti-TNF- α s'élargie et d'autres classes de bio-médicaments rejoignent la révolution thérapeutique des maladies inflammatoires chroniques, l'élucidation des mécanismes d'action des bio-médicaments et le suivi thérapeutique par des tests de laboratoires vont devenir de plus en plus important. Ceci contribuera certainement à des économies en termes de coût mais aussi en termes de décision par les cliniciens. Ces derniers pourront donc effectuer des choix guidé au lieu d'ajuster les doses ou de « switcher » les traitements de manière empirique. De plus, ceci pourrait contribuer à améliorer la qualité de vie et les soins apportés aux patients tout en augmentant les taux de succès thérapeutiques.^[76]

7.2. SURVEILLANCE THERAPEUTIQUE DU RITUXIMAB :

La surveillance biologique de cet anticorps implique plusieurs paramètres : la pharmacocinétique, les lymphocytes B, les xéno-anticorps, les facteurs d'activation des cellules B (TNF) et les auto-anticorps.^[119]

7.2.1. Pharmacocinétique du Rituximab :

Le dosage du Rituximab permet d'adapter la dose et le rythme aux variations de concentration chez un malade donné au cours du temps. Suite à la mesure des concentrations avant et après chaque injection, la courbe de décroissance peut être tracée.^[119]

Les patients atteints d'un lymphome reçoivent quatre perfusions hebdomadaires de 375mg/m², la $\frac{1}{2}$ du Rituximab est de 3.2 jours en moyenne après la 1^{ère} perfusion et devient 8.6 jours en moyenne après la 4^{ème} perfusion. La clairance, elle, diminue entre la 1^{ère} perfusion et la 4^{ème} perfusion. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, 1 injection tous les 14 jours est réalisée. La $\frac{1}{2}$ vie est, dans ce cas, estimée à 20 jours en moyenne. La $\frac{1}{2}$ vie du Rituximab est donc dépendante : des quantités administrées, de l'intervalle de temps séparant les perfusions et des vitesses de diffusion et d'élimination du produit.^[119]

Malgré la différence de clairance entre l'homme et la femme, l'efficacité du Rituximab est la même, il n'y a donc pas besoin d'adapter son administration en fonction du sexe.^[119]

7.2.2. Les lymphocytes B :

Suite à l'administration du Rituximab, les lymphocytes B (LB) disparaissent puis réapparaissent 1 mois à 3 ans plus tard pour enfin retrouver leur distribution pathologique de départ.^[119]

Les expressions relatives de CD38 et de l'IgD de membrane permettent de classer les LB matures en 6 classes (B mature 1, 2, 3, 4, 5 et mémoire). La distribution de ces LB peut parfois être un argument diagnostique. Dans le cas de maladies auto-immunes, une surveillance des LB mémoire (cas de la polyarthrite rhumatoïde) et des LB matures et activés est un signe de rechute.^[119]

Une étude des tissus à démontré une purge chez les primates des organes lymphoïdes secondaires de leurs LB. Cette observation a été confirmée chez des patients présentant des organes lésés par auto-immunité (la synoviale dans le cas de la PR). Une analyse pareille peut être réalisée par biopsie ou par les techniques d'imagerie montrant les cellules tumorales dans les ganglions.^[119]

7.2.3. Les xéno-anticorps :

La présence d'un segment murin dans le Rituximab induit le développement d'ADA. Ces derniers peuvent induire une maladie sérique.^[119]

7.2.4. les facteurs d'activation des cellules B (TNF)

Une résistance au Rituximab a été observée suite à la production du BAFF (B-Cell Activating Factor) qui fait parti de la famille des TNF.^[119]

7.2.5. les auto-anticorps :

Lors d'une PR, les Facteurs Rhumatoïdes (FR) et les anticorps anti-cyclic citrullinated peptides (CCP) présentent des variations en présence du Rituximab. Les auto-anticorps ont peu d'intérêt comme bio-marqueurs à cause des variations peu sensibles. Les FR diminuent mais celui des Ac anti-CCP ne varie pas ou peu en présence du Rituximab. Les FR étant insensibles au Rituximab et en plus secrétés tout au long de la vie, ils ne sont donc pas considéré comme des vrais auto-Ac. Il faut savoir que le 4/5 des PR, qui ne répondent pas au Rituximab, est séronégatif.^[119]

7.3. SURVEILLANCE THERAPEUTIQUE DES ANTI-EGFR :

Comme indiqué précédemment, 2 stratégies de traitement avec des inhibiteurs de l'EGFR ont été développées : les petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase et les anticorps monoclonaux.^[121]

Les anticorps monoclonaux, des médicaments onéreux et potentiellement toxiques, sont dans le cas de certains cancers (cancer colorectal métastatique) efficaces chez une proportion faible de patients. Il est donc important d'identifier les

facteurs spécifiques permettant de définir les patients pouvant bénéficier du traitement aux Acm anti-EGFR.^[121]

La mutation KRAS a été identifiée comme un facteur prédictif majeur de résistance au Cetuximab ou au Panitumumab. Il a été démontré à travers les données cliniques et à travers plusieurs études que les patients présentant des mutations KRAS ne répondent pas aux Acm anti-EGFR et ne montre aucun bénéfice de survie suite à ce traitement.^[121]

Le rôle de la mutation KRAS comme bio-marqueur prédictif a été évalué lors d'une étude cohorte qui a inclus 30 patients. La mutation était présente chez 13 patients. Aucune des tumeurs mutantes n'a répondu au Cetuximab. Parmi les patients répondeurs, aucun ne présentait la mutation KRAS. D'autre part, la mutation était présente chez 68.4% des patients non-répondeurs. La survie globale des patients ayant un « wild type » KRAS est plus importante que celle des patients mutants. D'autres études ont confirmés ces données.^[121]

EVOLUTION ECONOMIQUE DU MARCHE DES ACM

8. EVOLUTION ECONOMIQUE DU MARCHÉ DES ACM :

Durant les dernières décennies, le marché biotechnologique est devenu une composante importante du marché pharmaceutique global, comptant ainsi 40% de ses ventes.^[60]

Le chiffre d'affaire du marché biotechnologique a été estimé en 2012 à environ 100-120 milliard de Dollars US par an. Ce chiffre représente plus que 200 protéines recombinantes déjà sur le marché et devrait atteindre les 170 Milliards de Dollars US en 2014. Ce chiffre d'affaire exceptionnellement élevé revient à la commercialisation des Acm et des fragments d'anticorps qui représentent actuellement la classe de produits biotechnologiques ayant la croissance la plus rapide. En effet, la production des Acm entiers représente l'activité biotechnologique la plus importante avec plusieurs produits atteignant le stade de blockbuster comme : Avastin®, Herceptin®, Remicade®, Rituxan®, Humira® et Erbitux®.^[60]

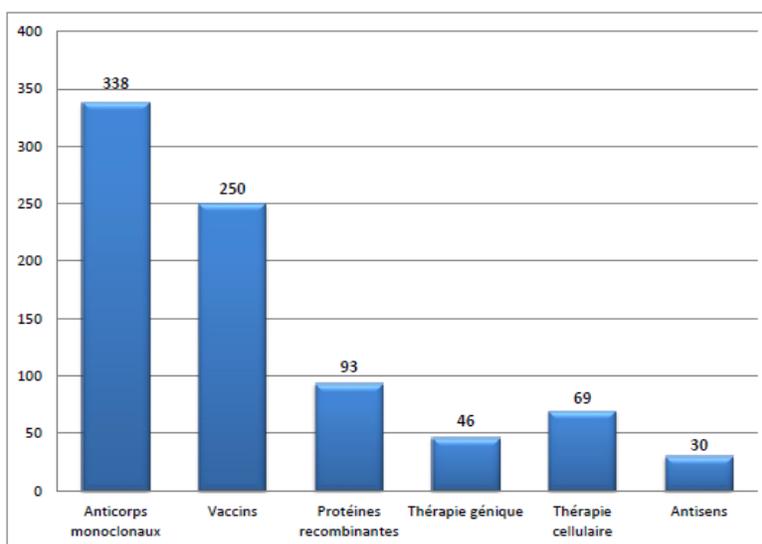


Figure 38: bio-médicaments en développement d'après PhRMA Biotechnology 2013.^[128]

Les bio-médicaments en développement en 2013 sont au nombre de 826. Ce nombre est pratiquement similaire à celui de 2011 (812 produits). Ceci traduit une dynamique constante de recherche dans les domaines des vaccins, des anticorps monoclonaux et des protéines thérapeutiques.^[128]

Le succès des anticorps monoclonaux thérapeutiques et la génération d'une valeur dans le marché pharmaceutique est due à la nature robuste et flexible des molécules d'immunoglobulines, aux avancées dans les domaines de la biologie moléculaire, de la génétique, de l'ingénierie des protéines et la biologie cellulaire et enfin des sciences appliquées de la biotechnologie et de l'industrie pharmaceutique.^[122]

Le marché pharmaceutique mondial était de 597\$ en 2010. Les petites molécules sont majoritaires avec 75% de part. Les Acm thérapeutiques représentent 7% et les protéines recombinantes, elles, 10%. En 2010, 9 Acm ont obtenu le statut de blockbuster (médicament générant plus de 1 milliard de \$ US). Les ventes combinées de 25 Acm activement commercialisés était de 42 milliards de \$ US dont 75% générées uniquement des ventes de 5 Acm : Bevacizumab (Avastin®) 16%; Rituximab (Rituxan®) 16%; Adalimumab (Humira®) 15%; Infliximab (Remicade®) 15% et Trastuzumab (Herceptin®) 13%. Il y a 3 anticorps qui n'ont pas été inclus dans cette étude : le Gemtuzumab Ozogamicin et l'Efalizumab car retirés du marché pour leurs balance bénéfique/risque et le Daclizumab pour des raisons commerciales au moment de l'étude. Les protéines thérapeutiques, elles aussi, ne sont pas prises en compte dans cette étude.^[122] D'autres produits ne sont pas mentionnés à cause de leur récente commercialisation et l'absence de données.

Brand	2010 sales (\$ m)	Market (%)
Avastin	6973	16.02
MabThera/Rituxan	6859	15.76
Humira	6548	15.04
Remicade	6520	14.98
Herceptin	5859	13.46
Lucentis	3106	7.14
Erbix	1791	4.12
Tysabri	1230	2.83
Synagis	1038	2.38
Xolair	750	1.72
Soliris	541	1.24
Actemra	464	1.07
Vectibix	402	0.92
Stelara	393	0.90
Cimzia	283	0.65
Simponi	226	0.52
ReoPro*	205	0.47
Simulect*	110	0.25
Campath/MabCampath*	67	0.15
Arzerra	48	0.11
Prolia/XGEVA	41	0.09
Zevalin	29	0.07
Ilaris	26	0.06
Bexxar*	10	0.02
Removab	4.3	0.01
Total	43,523	

Sources: Company reported information, www.pipelinereview.com and EvaluatePharma, the research company (*actual or estimated, by permission). Currency conversion (EUR 1.42 USD, CHF 1.17 USD, GBP 1.62 USD).

Tableau 5: ventes des 25 Acm activement commercialisés en 2010.^[122]

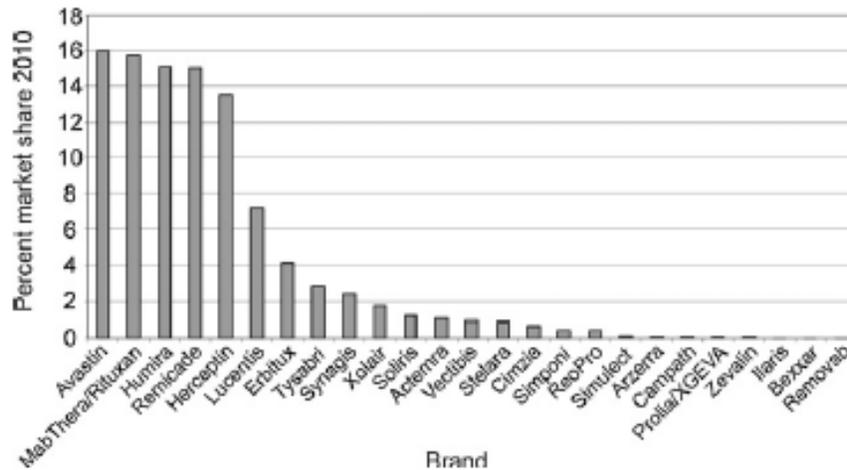


Figure 39: le marché partagé de 25 Acm activement commercialisés en fonction des ventes.^[122]

Les 5 anticorps monoclonaux les plus vendus peuvent être divisés en 2 aires thérapeutiques principales : l'oncologie et l'inflammation/désordres immuns. Dans les 20 restants, 8 sont utilisés en oncologie, 7 dans l'inflammation/auto-immunité et les 5 derniers dans d'autres indications telles que : le néo-vasculaire, les maladies infectieuses, l'hémostase et la transplantation. En 2010, l'oncologie compte plus que la moitié des ventes (50.8%) tandis que l'auto-immunité/inflammation 37.8%.^[122]

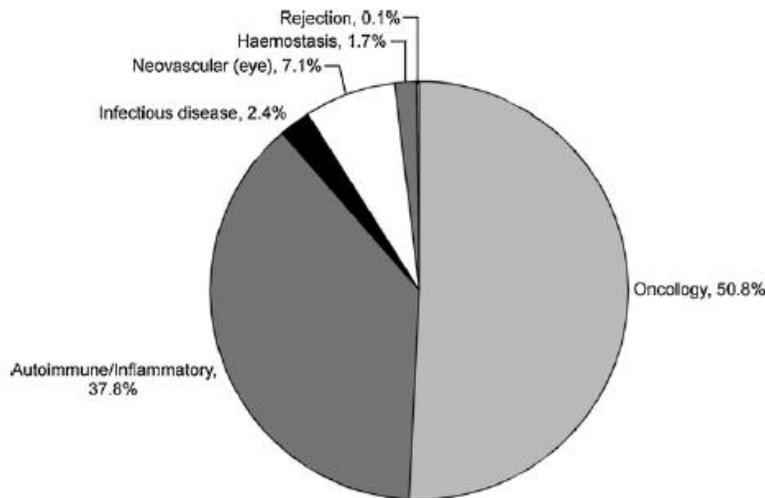


Figure 40: les ventes d'anticorps monoclonaux par aire thérapeutique en 2010.^[122]

D'un point de vue études cliniques, il existe 2 tendances différentes. En effet, les Acm murins, chimériques et humanisés représentaient une majorité des candidats

pendant les années 90s et cette tendance s'est inversée courant des années 2000s où les anticorps humains ont constitué 45% des Acm développés en clinique.^[123]

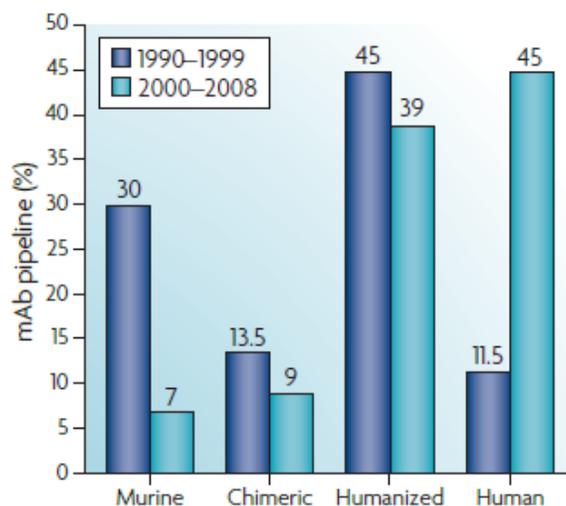


Figure 41: la proportion des 4 types d'anticorps monoclonaux en développement clinique durant les périodes 1990-1999 et 2000-2008.^[123]

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont globalement développés pour le traitement du cancer et les désordres immunologiques. Ceci est le cas aussi pour les anticorps monoclonaux humains, avec 45% étudiés pour le cancer et 28% pour les désordres immunologiques. Ces proportions sont restées équitablement constante entre 1997 et 2008. En ce qui concerne les anti-néoplasiques, 46 Acm humains étaient en phase clinique avancée en 2008. Ils présentent 15% de taux de succès. Les Acm humains immuno-modulateurs ont un taux de succès plus élevé avec leurs 33% comparativement aux antinéoplasiques ou aux anticorps humains. Les 36 Acm humains qui sont rentrés dans des études cliniques après 1996, ont été étudiés pour des indications non-traditionnelles (des maladies autres que le cancer et les désordres immunologiques). La moitié de ces traitements sont indiqués pour des maladies infectieuses (maladies nosocomiales, anthrax et infections virales chroniques). Les candidats restants ont été étudiés pour des pathologies telles que l'ostéoporose, les désordres respiratoires, la dystrophie musculaire, la maladie d'Alzheimer et la douleur.^[123]

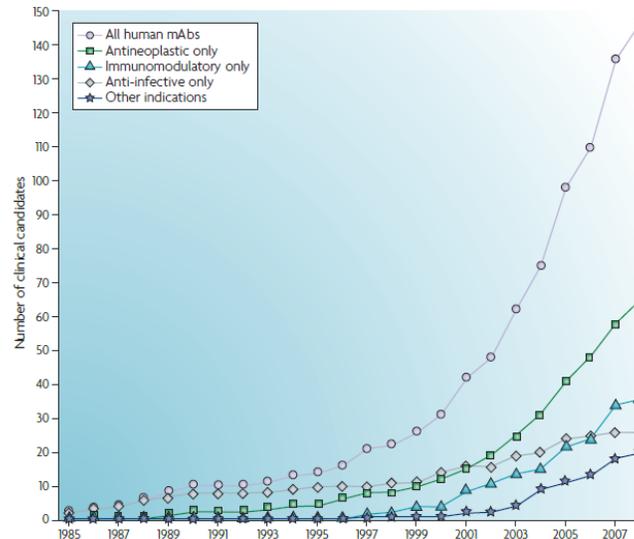


Figure 42: le nombre cumulé des Acm humains entrant en études cliniques entre 1985 et 2008.^[123]

En Juillet 2011, 164 Acm étaient en phase 3 des études cliniques. Ces anticorps peuvent être subdivisés en 55 (34%) humains, 88 (54%) humanisés, 21 (13%) chimérique et pas un seul anticorps monoclonal était murin. Cette tendance n'est pas fixe comme le prouve l'approbation du catumaxomab, un anticorps hybride rat/souris.^[122]

Brand name	INN	Company(s)	Form	Construct	Isotype	Target	Indication
Orthoclone OKT3	Muromonab-CD3	Janssen Biotech/Johnson & Johnson	Murine	IgG	IgG2a	CD3	Transplantation rejection
ReoPro	Abciximab	Eli Lilly/Johnson & Johnson	Chimeric	Fab	IgG1κ	GP1Ib/IIIa	Ischemia/angina
Rituxan/MabThera	Rituximab	Roche	Chimeric	IgG	IgG1κ	CD20	NHL, CLL, RA
Simulect	Basiliximab	Novartis/Cerimon Pharmaceuticals	Chimeric	IgG	IgG1κ	CD25	Acute organ rejection renal transplants
Synagis	Palivizumab	Abbott Laboratories/AstraZeneca/MedImmune	Humanized	IgG	IgG1κ	RSV F protein	Respiratory Syncytial Virus (RSV)
Remicade	Infliximab	Johnson & Johnson/Merck & Co./Mitsubishi Tanabe Pharma	Chimeric	IgG	IgG1κ	TNF-α	Crohn's disease, ulcerative colitis, RA ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis
Herceptin	Trastuzumab	Roche	Chimeric	IgG	IgG1κ	HER-2	Breast cancer, gastric/gastroesophageal carcinoma
Campath/MabCampath	Alemtuzumab	Sanofi/Genzyme/Bayer	Humanized	IgG	IgG1κ	CD52	B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)
Zevalin	Ibritumomab tiuxetan	Spectrum Pharmaceuticals/Bayer	Murine	111In or 90Y radio-labeled IgG	IgG1κ	CD20	Radiotherapy for NHL
Humira	Adalimumab	Abbott Laboratories	Human	IgG	IgG1κ	TNF-α	Rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, Crohn's disease, plaque psoriasis
Xolair	Omalizumab	Novartis/Roche	Humanized	IgG	IgG1κ	IgE	Asthma
Bexxar (US)	Tositumomab-iodine131	GlaxoSmithKline	Murine	Radio-labeled IgG	IgG2a	CD20	Non Hodgkin's lymphoma
Erbix	Cetuximab	Eli Lilly/Bristol-Myers Squibb/Merck Serono	Chimeric	IgG	IgG1κ	EGFR	Head and neck cancer, KRAS-ve colorectal cancer
Avastin	Bevacizumab	Roche	Humanized	IgG	IgG1κ	VEGF	Colorectal cancer, non squamous non-small-cell lung cancer, renal cell carcinoma, glioblastoma
Tysabri	Natalizumab	Biogen Idec/Elan	Humanized	IgG	IgG4κ	alpha-4 Integrin	Multiple sclerosis, Crohn's disease
Lucentis	Ranibizumab	Novartis/Roche	Humanized	Fab	IgG1κ	VEGF	Wet age-related macular degeneration, macular oedema (retinal vein occlusion)
Vectibix	Panitumumab	Amgen/Takeda Bio	Human	IgG	IgG2κ	EGFR	Metastatic colorectal carcinoma
Soliris	Eculizumab	Alexion Pharmaceuticals	Humanized	IgG	IgG2/4κ	C5	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Cimzia	Certolizumab pegol	UCB	Humanized	Pegylated Fab'	IgG1κ	TNF-α	Crohn's disease, rheumatoid arthritis
Removab (EU)	Catumaxomab	Fresenius/Trion	Murine	"Trispecific" IgG	mouse IgG2a/rat IgG2b	EpCAM and CD3	malignant ascites,(EU only)
Simponi ankylosing spondylitis	Golimumab	Johnson & Johnson/Merck & Co./Mitsubishi Tanabe Pharma	Human	IgG	IgG1κ	TNF-α	RA psoriatic arthritis
Ilaris	Canakinumab	Novartis	Human	IgG	IgG1κ	IL-1-beta	Cryopyrin-associated periodic syndromes, familial cold autoinflammatory syndrome, Muckle-Wells syndrome
Stelara	Ustekinumab	Centocor Ortho Biotech Johnson & Johnson	Human	IgG	IgG1κ	IL-12/23 p40	Plaque psoriasis
Arzerra	Ofatumumab	GlaxoSmithKline/Genmab	Human	IgG	IgG1κ	CD20	Chronic lymphocytic leukemia
Actemra RoActemra (EU)	Tocilizumab	Roche/Chugai Pharmaceutical	Humanized	IgG	IgG1κ	IL-6R	Rheumatoid Arthritis
ProliaXgeva	Denosumab	Amgen/GlaxoSmithKline/Daiichi-Sankyo/AstraZeneca	Human	IgG	IgG2	RANKL	Bone metastases from solid tumors
Benlysta (US)	Belimumab	Human Genome Sciences/GlaxoSmithKline	Human	IgG	IgG1λ	BLyS	systemic lupus erythematosus
Yervoy (US)	Ipilimumab	Bristol-Myers Squibb/Medarex	Human	IgG	IgG1κ	CTLA4	Metastatic melanoma

INN, international non-proprietary name.

Tableau 6: liste des médicaments activement commercialisés (US/EU) en Juin 2011.^[122]

Les prévisions du marché des anticorps thérapeutiques pour 2015 :

Dans un rapport datant de 2011 de l'« IMS Institute », une hausse des dépenses sur tous les médicaments (856 milliards en 2010) est attendue. Celle-ci doit atteindre le 1000 milliard de Dollars US en 2014 et 1100 milliards en 2015 soit une hausse du taux de croissance annuelle de 3 à 6%. Cependant, cette croissance doit être poussée par une hausse des dépenses sur les génériques. Ces dépenses doivent atteindre 400 à 430 milliards de Dollars US en 2015, dont 70% en dehors du marché développé (particulièrement en Chine).^[122]

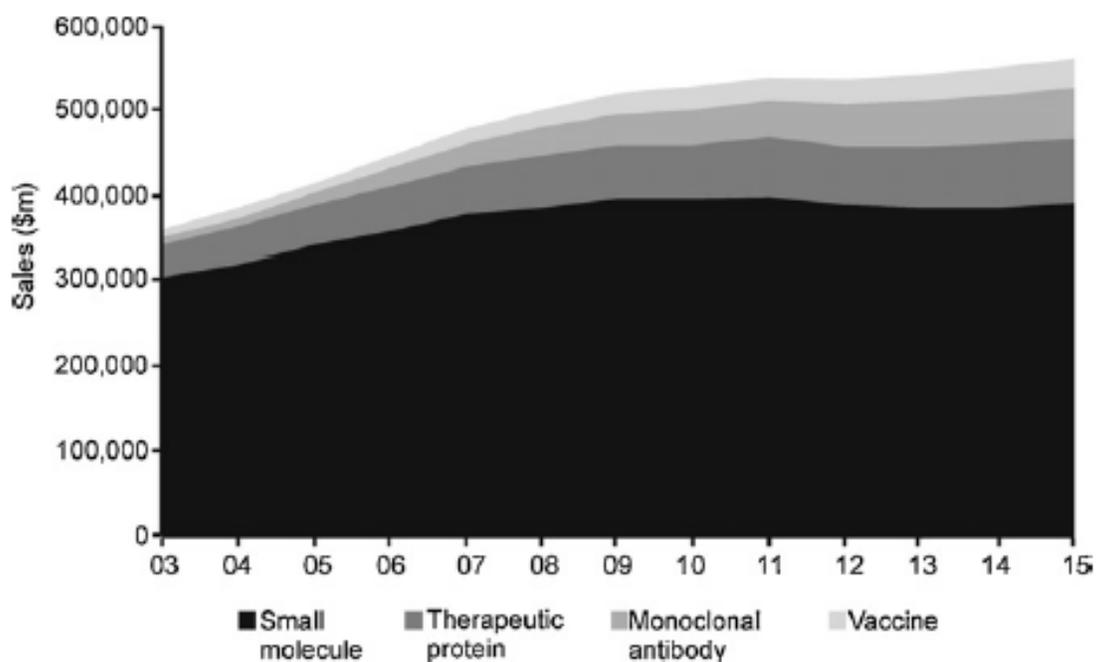


Figure 43: les ventes totales du marché pharmaceutique de prescription (milliards de \$), de 2003 à 2015.^[122]

Au moment où la croissance des autres thérapies freine à cause de l'expiration des brevets et l'absence de nouveaux traitements, les « thérapies ciblées » continuent leur croissance. Celles-ci sont définies par l'« IMS Institute » comme les thérapies traitant : l'auto-immunité, l'oncologie, la sclérose multiple, les antiviraux anti-HIV et les agents stimulant l'érythropoïèse. Concernant les 3 premières aires thérapeutiques, les Acm ont déjà un impact en 2010. Il est donc attendu que les anticorps monoclonaux dépassent les autres classes.^[122]

En se basant sur les données de ventes de 50 entreprises pharmaceutiques, qui comptent pour environ 70% des ventes annuelles, des prévisions de ventes ont été générées par type de molécules. Celles-ci sont présentées dans la table.^[122]

	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	CAGR 2009-15	CAGR 2010-15
Small molecule	396,663	396,442	400,035	388,985	386,222	387,360	390,296	(0,3)	(0,31)
Therapeutic protein	63,107	64,893	6,7725	70,036	72,327	74,232	75,429	3,0	3,05
Monoclonal antibody	36,398	40,346	44,914	49,979	54,130	58,647	62,658	9,5	9,20
Vaccine	20,937	23,807	24,438	25,917	27,302	28,769	30,159	6,3	4,84
Total	517,105	525,488	537,140	534,916	539,981	549,008	558,541	1,3	1,23

Adapted by permission from Table 4, p14 Datamonitor 2010; CAGR = compound annual growth rate.

Tableau 7: prévisions de ventes ont été générées par type de molécules.^[122]

THESE SOUTENUE PAR : Saad Charef-eddine NOUAR

TITRE :

Les anticorps monoclonaux (Acm)comme biosimilaires thérapeutiques : cibles, modes d'actions et aspects pharmaco-économiques.

CONCLUSION :

Le développement des Acm a apporté un nouvel espoir pour traiter des maladies jusqu'à là incurables ou remplacer dans certains cas des traitements présentant des effets indésirables lourds. Cette voie représente une alternative incontournable pour l'amélioration du cadre de vie des patients atteints de maladies handicapantes. La progression de cette famille de thérapeutiques a été rendu possible grâce à un développement perpétuel des techniques de production et de contrôles qui sont de plus en plus maîtrisées. Il est, en effet, à rappeler qu'un bio-médicament est défini non seulement par ses propres caractéristiques mais aussi par la maîtrise, à la fois, de son procédé de fabrication ainsi que ses essais de caractérisation structurale et fonctionnelle vis-à-vis de la cible. L'anticorps monoclonal, un même et seul concept, a donné naissance en réalité à une famille de biosimilaires thérapeutiques ayant des mécanismes d'actions similaires (ADCC/CDC/neutralisation/blocage de fonction) mais agissant sur des cibles différentes. Ces mécanismes ne sont toujours pas entièrement expliqués. Les recherches doivent donc continuer afin de les comprendre au niveau cellulaire et moléculaire et afin de mieux connaître les cascades de signalisations qui peuvent les impacter. L'objectif étant d'améliorer le ciblage de ces molécules, réduire les effets indésirables et améliorer la qualité des soins. Malgré une certaine maîtrise de cette famille et un recul d'une dizaine d'années, le suivi thérapeutique par des tests de laboratoires va devenir de plus en plus important. Les moyens de surveillance clinique sont à mettre en place pour certains Acm ou à développer davantage pour d'autres afin d'assurer un suivi thérapeutique efficace et améliorer la qualité des soins liés à l'utilisation des biomédicaments. Cette démarche permettra certainement de faire des économies en termes de coût, de diminuer les effets indésirables, mais aussi d'éviter des accidents liés à des incompatibilités et enfin améliorer la qualité de vie et les soins apportés aux patients tout en augmentant les taux de succès thérapeutiques. D'un point de vue économique, cette famille de médicaments est en plein essor et va sûrement, au vue de la croissance actuelle, prendre des parts de marchés de plus en plus considérables.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le :

LE DOYEN LE PRESIDENT DE LA THESE

Pr. Christophe RIBUOT

Pr. Emmanuel DROUET



*Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

BIBLIOGRAPHIE :

ARTICLES SCIENTIFIQUES :

- [1] Jean-Louis PRUGNAUD. Comment sécuriser les traitements par les biomédicaments ? Bull. Acad. Natle Méd., 2011, 195, no 3, 679-698.
- [2] Marina Cavazzana Calvo et Dominique Debiais. Les biomédicaments, P.U.F. « Que sais-je ? », 2011, p. 5-8.
- [3] Christophe Jamin et al. Traitement du lupus érythémateux disséminé par anticorps monoclonaux : un exemple d'immunothérapie des maladies autoimmunes. Médecine thérapeutique, volume 10, numéro 1, Janvier-Février 2004, 39-46.
- [4] Journal officiel de l'Union Européenne. L159/46. FR. 27/06/2003.
- [6] Aline Schindele. Les anticorps monoclonaux, de la production à l'utilisation en oncologie. Thèse d'exercice en Pharmacie. Faculté de Pharmacie de Nancy. 2009.
- [7] Hervé Watier. De la sérothérapie aux anticorps recombinants « nus », plus d'un siècle de succès en thérapie ciblée. Médecine/Sciences. 2009 ; 25 : 999-100.
- [8] Riad Abès, Charles-antoine Dutertre, Jean-Luc Teillaud. Les anticorps mieux les connaître pour mieux s'en servir. Médecine/Sciences. 2009 ; 25 : 1011-9.
- [9] Jean-François Haeuw, Véronique Caussanel, Alain Beck. Les immunoconjugués anticorps « armés » pour combattre le cancer. Médecine/Sciences. 2009 ; 25 : 1046-52.
- [10] Jean Sibilila. Protéine de fusion ou anticorps monoclonal, quels biomédicament choisir dans une maladie inflammatoire. Médecine/Sciences. 2009 ; 25 : 1033-8.
- [11] Céline Ortega. Ingénierie de fragments d'anticorps pour l'imagerie in vivo de cancers de la sphère génitale. Thèse de doctorat. Université Paris-Sud XI. 19/10/2012.
- [12] Dominique Bellet, Virginie Dangles-Marie. « Anticorps humanisés en thérapeutique ». Médecine/Sciences, vol. 21, n° 12, 2005, p. 1054-1062.
- [13] Arlene H. Sharpe & Gordon J. Freeman. The B7-CD28 superfamily Nature Reviews Immunology 2, 116-126 (February 2002).
- [14] Arlene H. Sharpe & Gordon J. Freeman. The B7-CD28 superfamily. Nature Reviews Immunology 2, (February 2002), 116-126.

- [15] Jean-Luc Teillaud. Les biothérapies anti-lymphocyte B : une histoire d'anticorps. Webconf du CRI (Club Rhumatismes et inflammations). Centre de Recherche des Cordeliers (CRC) INSERM UMRS 872, Université Paris Descartes et Université Pierre et Marie Curie (UPMC). Paris.
- [19] Andrew M. Scott, James P. Allison and Jedd D. Wolchok. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer immunity* (1 May 2012) Vol. 12, p. 14.
- [22] Michael P. Cancro, David P. D'Cruz, and Munther A. Khamasht. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 2009 May ; 119 (5):1066-73.
- [24] Antoniu SA. Mogamulizumab, a humanized mAb against C-C chemokine receptor 4 for the potential treatment of T-cell lymphomas and asthma. *Curr Opin Mol Ther*. 2010 Dec; 12(6):770-9.
- [25] Joshuan M. Subramaniam, Glenn Whiteside, Kate McKeage, Jamie C. Croxtall. Mogamulizumab First Global Approval. *Drugs* 2012; 72 (9): 1293-1298
- [26] L'histoire de la vaccination. Sous la direction d'Anne Marie MOULIN. © Librairie Arthème Fayard, 1996.
- [28] Sérothérapie, Historique. Etat actuel. Bibliographie par le docteur Jules HERICOURT. 1899.
- [39] F. Schleich, M. Manise, R. Louis. L'Omalizumab (Xolair®) dans le traitement de l'asthme allergique persistant sévère. *Rev Med Liège* 2009; 64 : 5-6 : 313-317.
- [40] Rituximab: mode d'action et de résistance. *Bulletin du Cancer*. Volume 94, Numéro 2, 198-202, Février 2007, Synthèse.
- [41] Gilles Paintaud, Marine Diviné, Philippe Lechat et al. Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : spécificités du développement clinique, évaluation par les agences, suivi de la tolérance à long terme. *Thérapie* 2012 Juillet - Août; 67 (4): 319-327.
- [42] V.I. Mistretta, E. Cavalier, J. Collette, J.P. Chapelle. Production des anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège* 2009; 64 : 5-6 : 248-252. (2)
- [43] Ivan Lefkovits, Benvenuto Pernis. *Immunological Methods*: v.3. Edition Academic Press Novembre 1985.

- [44] M. Moutschen, A.J. Scheen. Bases immunologiques a la compréhension du concept d'anticorps monoclonal Rev Med Liège 2009; 64 : 5-6 : 237-243.
- [45] A.J. Scheen. Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. Rev Med Liège 2009 ; 64 : 5-6 : 244-247.
- [46] A.J. Scheen. Nouvelles avancées dans l'utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique. Rev Med Liège 2009; 64 : 5-6 : 253-256.
- [48] Laurent Arnaud, Julien Haroche, Jean-Charles Piette, Zahir Amoura. Biothérapies des maladies auto-immunes: quelles perspectives? mt, vol. 15, n° 2, avril-mai-juin 2009.
- [49] Jean sibilila. Protéine de fusion ou anticorps monoclonal quel biomédicament choisir dans une maladie inflammatoire ? Médecine/Sciences 2009 ; 25 : 1033-8.
- [53] Jochen G Salfeld. Isotype selection in antibody engineering. Nature Biotechnolog Volume 25 number 12 December 2007.
- [54] Drs A.J. Meulenbroek, Dr. W.P. Zeijlemaker. Human IgG Subclasses: Useful diagnostic markers for immunocompetence. <http://ednieuw.home.xs4all.nl/IgGsubclasses/subkl.htm> CLB, 1996. Consulté le 1/10/2013.
- [55] Leonard G Presta. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. Current Opinion in Immunology 2008, 20:460–470.
- [56] T Shantha Raju. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. Current Opinion in Immunology 2008, 20:471–478.
- [57] Steven Kozlowski, Patrick Swann. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies. Advanced Drug Delivery Reviews 58 (2006) 707-722.
- [58] Elizabeth E Hood, Susan L Woodard and Michael E Horn. Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants - myths and realities. Current Opinion in Biotechnology 2002, 13:630–635.
- [59] Suzanne S. Farid. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. Journal of Chromatography B, 848 (2007) 8 - 18.

- [60] Oliver Spadiut, Simona Capone, Florian Krainer, Anton Glieder, and Christoph Herwig. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends in Biotechnology* xx (2013) 1-7.
- [61] Professeurs Marie-Paule LEFRANC, Mylène WEILL, The Duc HUA, Christelle SOURIAU et Gérard LEFRANC. Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. Last updated: 10-Jan-2013. http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/PhageDisplay/_FR/
- [62] Owen P. Ward. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 30 (2012) 1119–1139.
- [67] Grazia Graziani, Lucio Tentori, Pierluigi Navarra. Ipilimumab: A novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacological Research* 65 (2012) 9-22.
- [69] Adrian Ciurea. Les anticorps monoclonaux dans le traitement des maladies rhumatismales auto-immunes. *Curriculum Forum Med Suisse* 2008;8(10):182–186.
- [70] Bevra Hannahs Hahn, M.D. Belimumab for Systemic Lupus Erythematosus. *N ENGL J MED* 368;16 NEJM.ORG APRIL 18, 2013.
- [71] Patrick Chames, Daniel Baty. Ingénierie des anticorps monoclonaux. *BIOFUTUR* 288 • MAI 2008.
- [72] Boulos Haraoui, Vivian Bykerk. Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2007;3(1) 99–105.
- [74] Houel S et al. N- and O-glycosylation analysis of etanercept using liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry equipped with electron-transfer dissociation functionality. *Anal. Chem.*, 2014, 86 (1), pp 576–584
- [75] Alain Beck et al. Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 48, July–August 2013, Pages 81-95.
- [76] Willrich MAV, Murray DL, Snyder MR. TNF Inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res.* 2014 Sep 22.
- [77] Australian Public Assessment Report for Certolizumab pegol. Proprietary Product Name: Cimzia. Sponsor: UCB Australia Pty Ltd. AusPAR Cimzia Certolizumab pegol UCB Australia Pty Ltd PM-2008-2508-3. February 2010.

- [81] K. Bouzid, N. Bedairia, M. Marty. Anticorps monoclonaux thérapeutiques en cancérologie. *Pathologie Biologie* 60 (2012) 223-228.
- [83] H.I. Hurwitz et al. Safety and Effectiveness of Bevacizumab Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Final Results from the Avastin - Registry Investigation of Effectiveness and Safety (ARIES) Observational Cohort Study. *Clinical Oncology* 26 (2014) 323-332.
- [84] Clément BARDET, Jacques BUXERAUD, Jeanne COOK-MOREAUC. *Actualités pharmaceutiques*. 28 n° 530. Novembre 2013.
- [85] Gérard Socié, Nathalie Varoqueaux, Régis Peffault de Latour. Anticorps monoclonal anti-C5 (éculizumab) dan l'hémogloburie paroxystique nocturne. *Médecine/Sciences* 2009 ; 25 : 1126-9.
- [86] Charles Parker. Eculizumab for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 2009; 373: 759–67.
- [89] Kathy D McCoy and Graham Le Gros. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and Cell Biology* (1999) 77, 1-10.
- [90] Charlotte Magdelaine-Beuzelin et al. Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 64 (2007) 210–225.
- [91] Funakoshi T et al. Infectious complications in cancer patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* (2014).
- [92] Gérard Zalcman. Voie de l'EGFR et mécanisme d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase. *Rev Pneumol Clin* 2007; 63: 2S5-2S6.
- [93] E. Martinelli, R. De Palma, M. Orditura, F. De Vita and F. Ciardiello. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical and Experimental Immunology*, 158: 1-9.
- [94] Thomas Fehr, Rudolf P.Wüthrich. Le rôle des anticorps monoclonaux dans la transplantation d'organes. *Forum Med Suisse* 2008;8(11):204–209.
- [96] Jens Goebel, Erica Stevens, Kathy Forrest, Thomas L. Roszman. Daclizumab (Zenapax®) inhibits early interleukin-2 receptor signal transduction events. *Transplant Immunology* 8 (2000) 153-159.

- [100] Thuy Vu, Mark X. Sliwkowski, Francois X. Claret. Personalized drug combinations to overcome trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1846 (2014) 353–365.
- [102] Kurt Lippuner. Les anticorps monoclonaux dans le traitement de l'ostéoporose: bientôt déjà dans la pratique quotidienne? *Forum Med Suisse* 2008;8(12-13):229-232.
- [103] George J. Weiner. Rituximab: Mechanism of Action. *Seminars in Hematology*, Volume 47, Issue 2, April 2010, Pages 115-123.
- [104] Luisa Klotz, Sven G. Meuth, Heinz Wiendl. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in multiple sclerosis - A focus on alemtuzumab. *Clinical Immunology* (2012) 142, 25–30.
- [105] Kenji Ishitsuka, Kazuo Tamura. Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *The Lancet Oncology*, Volume 15, Issue 11, October 2014, Pages e517-e526.
- [106] Diane Seimetz, Horst Lindhofer, Carsten Bokemeyer. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM _ anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 36 (2010) 458-467.
- [107] Mario Skarica, Christopher Eckstein, Katharine A. Whartenby, Peter A. Calabresi. Novel mechanisms of immune modulation of natalizumab in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology* 235 (2011) 70–76.
- [108] Zent, Roy, Pozzi, Ambra (eds.). *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*. LLC 2010.
- [110] John T. Bates et al. Escape from neutralization by their respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology* 454-455(2014)139–144.
- [111] Dominic A. Fitzgerald. Preventing RSV bronchiolitis in vulnerable infants: The role of palivizumab. *Paediatric Respiratory Reviews* 10 (2009) 143–147.
- [112] Paul Pollack, Jessie R. Groothuis. Development and use of palivizumab (Synagis): a passive immunoprophylactic agent for RSV. *J Infect Chemother* (2002) 8:201–206.

- [113] Kelly Huang, Len Incognito, Xing Cheng, Nancy D. Ulbrandt, and Herren Wu. Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Aug. 2010, p. 8132–8140.
- [114] Kirsten Achilles Poon et al. Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DM1): Mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability. *Toxicology and Applied Pharmacology* 273 (2013) 298–313.
- [115] Howard A. Burris III, Jay Tibbitts, Scott N. Holden, Mark X. Sliwkowski, Gail D. Lewis Phillips. Trastuzumab Emtansine (T-DM1): A Novel Agent for Targeting HER2_ Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, Vol. 11, No. 5, 275-82.
- [116] WILLIAM W.WONG et al. Image-guided radiotherapy for prostate cancer: a prospective trial of concomitant boost using Indium-111-Capromab Pendetide (Prostascint) imaging. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 81, No. 4, pp. e423–e429, 2011.
- [117] D. Bruce Sodee et al. Update on Fused Capromab Pendetide Imaging of Prostate Cancer. *Clinical Prostate Cancer*, Vol. 3, No. 4, 230-238, 2005.
- [118] Neil H Bander. Technology Insight: monoclonal antibody imaging of prostate cancer. *Nature Clinical Practice Urology* (2006) 3, 216-225.
- [119] Yves Renaudineau et al. Mécanismes de l'action des anticorps monoclonaux anti-CD20 et surveillance biologique de leurs effets. *Revue du Rhumatisme* 76 (2009) 826–832.
- [120] P. GOUPILLE. Quel intérêt du dosage pour la pratique des biomédicaments et des anticorps induits ? réalités en rhumatologie # 46_Juin 2012.
- [121] Sergio Rizzo et al. Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy? *Cancer Treatment Reviews* 36S3 (2010) S56–S61.
- [122] John G. Elvin, Ruairidh G. Couston, Christopher F. van der Walle. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. *International Journal of Pharmaceutics* 440 (2013) 83-98.
- [123] Aaron L. Nelson, Eugen Dhimolea and Janice M. Reichert. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature Reviews, Drug Discovery*. Volume 9, october 2010, 767-774.

- [124] Monica Simeoni and Chao Chen. Mechanistic model for the involvement of the neonatal Fc receptor in IgG disposition. Clinical Pharmacology Modelling and Simulation, GlaxoSmithKline, London, UK.
- [125] Jochen G Salfeld. Isotype selection in antibody engineering. Nature Biotechnology. Volume 25. Number 12. December 2007.
- [127] Hervé Bouchard, Christian Viskov, Carlos Garcia-Echeverria. Antibody–drug conjugates-A new wave of cancer drugs. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24 (2014) 5357-5363.
- [128] LEEM. Comité Biotech. Biomédicaments en France état des lieux 2014. Septembre 2014.

DOCUMENTS ET SITES INTERNET:

- [5] <http://www.legifrance.gouv.fr/>.
- [16] <http://www.vidal.fr/substances/11965/abciximab/> Consulté le 28/03/2013.
- [17] <http://www.vidal.fr/Medicament/synagis-15894-pharmacodynamie.html> Consulté le 28/03/2013.
- [18] <http://www.vidal.fr/Medicament/tysabri-76090-pharmacodynamie.html> Consulté le 28/03/2013.
- [20] http://has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/201203/prolia_14122011_avis_ct10890.pdf Consulté le 28/03/2013.
- [21] http://www.chu-toulouse.fr/IMG/pdf/lupus_et_traitement_par_benlysta_r_pr_sailler.pdf consulté le 28/03/2013.
- [23] http://en.wikipedia.org/wiki/B-cell_activating_factor consulté le 28/03/2013.
- [27] <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/institut-pasteur/musees/expositions-itinerantes/emile-roux> consulté le 25/06/2013.
- [29] [http://www.news-medical.net/health/Antibody-History-\(French\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Antibody-History-(French).aspx) consulté le 02/07/2013.

- [30] <http://www.gvax.org> consulté le 02/07/2013.
- [31] Résumé des caractéristiques du produit. ZALTRAP 25mg/ml. http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/2014062712945/anx_129145_fr.pdf consulté le 20 Janvier 2015.
- [32] <http://classes.biology.ucsd.edu/old.web.classes/bicd140.WI05/lecture4.pdf> consulté le 02/07/2013.
- [33] <http://www.pasteur.fr/infosci/archives/bdj0.html> consulté le 02/07/2013.
- [34] <http://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/Landsteiner-karl.htm> consulté le 02/07/2013.
- [35] <http://www.unaab.edu.ng/attachments/antibody%20Production.pdf> consulté le 03/07/2013.
- [36] http://en.wikipedia.org/wiki/Merrill_Chase consulté le 03/07/2013.
- [37] <http://www.universalis.fr/encyclopedie/georges-barski/> consulté le 03/07/2013.
- [38] http://www.laskerfoundation.org/awards/1987_b_description_p.htm consulté le 04/07/2013.
- [47] <https://www.lilly.fr/docs/product/REOPROML.pdf> consulté le 17/09/2013.
- [50] <https://www.imgt.org/mAb-DB/index> consulté le 19/09/2013.
- [51] Communiqué de presse: http://www.sanofi.com/Images/31840_20130205_ZALTRAP_fr.pdf Consulté le 19/09/2013.
- [52] https://www.imgt.org/IMGTeducation/IMGTlexique/A/ADCC_and_CDC.html Consulté le 10/10/2013.
- [63] https://www.genoscope.cns.fr/spip/IMG/pdf/Annotation_genome_humain.pdf consulté le 07 Septembre 2014.
- [64] <https://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/identification-des-cellules-immunitaires-la-notion-de-cd-cluster-of-differentiation-2> consulté le 28 Septembre 2014.
- [65] <https://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/acideamine/acideamine.htm> consulté le 28 Septembre 2014.

- [66] https://www.dematice.org/ressources/DCEM1/pharmacologie/D1_phar_009/co/Module_mecanismes_action_medicament_23.html consulté le 28 Septembre 2014.
- [68] <https://www.imgt.org/mAb-DB/index> Consulté le 4 Octobre 2014.
- [73] <https://www.enbrel.com/RheumPro/rheumatoid-arthritis-treatment.jsp>
- [78] <https://www.cimzia.com/> consulté le 12/10/2014.
- [79] Questions and answers on recommendation for the refusal of the marketing authorisation for Cimzia. London, 19 March 2008. DOC. REF. EMEA/CHMP/145497/2008.
- [80] <https://www.xolair.com/> consulté le 12 Octobre 2014.
- [82] GUEHO Sylvain. RICHARD Nathalie. Utilisation des anti-VEGF dans le traitement local de la DMLA et autres rétinopathies. 13 février 2014 Séminaire Conseil d'Administration ANSM. www.ansm.fr
- [87] <https://www.imgt.org/mAb-DB/index> consulté le 16/10/2014.
- [88] <https://www.yervoy.com/patient.aspx> consulté le 16/10/2014. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. YERVOY® (ipilimumab) Injection, for intravenous infusion Initial U.S. Approval: 2011.
- [95] <https://www.leicabiosystems.com/fr/ihc-ish/reacifs-novocastra/anticorps-primaires/details/product/cd25-2/> consulté le 22/10/2014.
- [101] <https://www.lilly.fr/fr/medicaments/liste-medicaments/medicament-11.aspx> rubrique: Reopro® mentions légales.
- [109] Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) Tysabri, INN-natalizumab Europa. www.ema.europa.eu Téléchargé le 15 Novembre 2014.
- [126] <https://ednieuw.home.xs4all.nl/IgGsubclasses/subkl23.htm>
- [129] <https://www.regeneron.com/collaborations> consulté le 19/09/2013.

Résumé

Le développement des anticorps monoclonaux (Acm) a apporté un nouvel espoir pour traiter des maladies, jusque là incurables, ou remplacer dans certains cas des traitements présentant des effets indésirables lourds. La progression de cette famille thérapeutique a été rendu possible grâce à un développement avancé des techniques de production des molécules anticorps et des contrôles appropriés de mieux en mieux maîtrisées. L'anticorps monoclonal, par son unique concept de spécificité *vis-à-vis* de la cible, a donné naissance à une famille de biosimilaires thérapeutiques utilisant des mécanismes d'action immunologiques similaires (ADCC/CDC/neutralisation/blocage de fonction) et ciblés sur des ligands, des récepteurs ou des cellules stratégiques différents. Malgré une certaine maîtrise de cette famille et un recul d'une dizaine d'années, le suivi thérapeutique par des tests de laboratoires reste à installer pour certains Acm ou à améliorer pour d'autres afin d'assurer un suivi thérapeutique efficace et améliorer la qualité des soins liés à l'utilisation des biomédicaments. Une telle démarche conduira à des économies de santé, à la réduction des effets indésirables et des accidents par incompatibilité. Ceci doit améliorer la qualité des soins et les conditions de vie des patients tout en contribuant aux succès thérapeutiques. D'un point de vue économique, cette famille de médicaments est en plein essor et va, compte tenu de la croissance actuelle, prendre d'importantes parts de marchés.

Abstract

The development of monoclonal antibodies (mAb) brought new hope for treating incurable diseases or, in some cases, for replacing treatments with heavy side effects. The progress of this therapeutics was made possible through a constant development of production and control techniques that are increasingly mastered. The mAb option, with a single concept of target specificity, actually gave rise to a family of biosimilar therapeutics with similar mechanisms of action (ADCC / CDC / neutralization / function block) but acting on different targets. Despite some level of control of this family and with the benefit of hindsight of about a decade, therapeutic monitoring using laboratory tests have to be set up for some mAbs, or to be developed further for others, to ensure an effective therapeutic monitoring and improve the quality of care related to the use of biopharmaceuticals. This approach will certainly make savings in terms of cost, decreased side effects, prevention of accidents related to incompatibilities. These efforts must finally improve the patient quality life while increasing the rate of therapeutic success. From an economic point of view, this family of drugs is booming and will trustingly, in view of its current growth, gain significant market shares.

Mots clés:

Anticorps monoclonaux, biomédicaments, biosimilaires thérapeutiques.