

Bio-layer interferometry: méthode d'intérêt dans les procédés de fabrication et pour le contrôle des préparations hospitalières à base d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

Benjamin Delis

▶ To cite this version:

Benjamin Delis. Bio-layer interferometry : méthode d'intérêt dans les procédés de fabrication et pour le contrôle des préparations hospitalières à base d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01264904

HAL Id: dumas-01264904 https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01264904

Submitted on 29 Jan 2016

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.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : 2016

N°9

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 04 décembre 2015

Par Benjamin DELIS

Né le 14 mai 1989 à Talence (Gironde)

BIO-LAYER INTERFEROMETRY : METHODE D'INTERET DANS LES PROCEDES DE FABRICATION ET POUR LE CONTROLE DES PREPARATIONS HOSPITALIERES A BASE D'ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES

Directeur de thèse M. le Professeur A. Nicolas

Jury

M. le Docteur L. GrislainProfesseurPrésidentM. A. VonarburgIngénieur applicationMembre du juryM A. AranyosCommercialMembre du jury

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Luc Grislain

Pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Veuillez recevoir ici toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Alain Nicolas

Pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Pour vos nombreuses relectures, votre disponibilité et votre patience.

Pour l'investissement dont vous avez fait preuve et la pertinence de vos commentaires.

Veuillez recevoir mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur Arnaud Vonarburg

Pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Pour avoir accepté le projet et votre disponibilité.

Pour la confiance que vous m'avez accordé

A Monsieur Attila Aranyos

Pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Pour avoir accepté le projet, sans vous ces travaux n'auraient jamais vu le jour.

A mes parents

Pour votre infini patience.

Pour la confiance et le soutien que vous m'avez toujours apporté.

Finalement l'enfant terrible c'est bien assagis !

A Alexandre

Il y aurait tellement à dire...

Merci d'être mon dentiste, et merci pour tous ce que je ne peux écrire ici.

A vous les gars (Nicolas, Benoit, Pierre-Valentin)

On a passé de bien belles années. Et ce n'est pas fini !

Tant qu'il y aura du saucisson et de la bière on aura toujours une occasion de se voir.

Ne changez rien vous êtes parfait comme ça.

Au laboratoire de contrôle du CHU de Nancy

Pour cette expérience enrichissante et votre patience. J'ai beaucoup appris en juste 6 mois grâce à vous.

Aux oubliés

J'ai certainement oublié des gens, qui m'ont aidé durant mon parcours.

Veuillez m'en excuser et soyez sur que je vous en suis reconnaissant.

TABLE DES MATIERES

LIST	E DES	TABLEAUX	6
LIST	e des	FIGURES	7
LIST	e des	ABREVIATIONS	9
INTR	ODUC	TION	13
I. L	.es inte	erférences lumineuses : notions d'optique physique	. 15
I.1	Inte	erférométrie	. 15
I.	1.1	Interférences lumineuses	. 15
I.	1.2	Systèmes interférométriques	. 18
II. E	Biolaye	r interferometry (BLI)	. 23
II.1	Prir	ncipe	. 23
II.2	Bio	capteurs	. 26
II	.2.1	Liaison streptavidine-biotine	. 28
II	.2.2	Liaison par amine réactive de deuxième génération (AR2G)	. 29
II.3	Cin	étiques	. 29
II	.3.1	Modèle de liaison classique 1:1	. 30
11	.3.2	Modèle de liaison bivalent 1:2	. 31
II.4	Cor	nditions opératoires générales	. 32
II	.4.1	Etape d'association	. 32
II	.4.2	Étape de dissociation	. 33
II	.4.3	Régénération des biocapteurs	. 34
II	.4.4	Points clefs	. 35
II.5	Pla	ce de la BLI par rapport aux autres méthodes	. 36
II	.5.1	Résonance plasmonique de surface	. 36
II	.5.2	Biochromatographie	. 39

III.	. Anticorps monoclonaux 40			
II	I.1	His	torique	40
II	I.2	Stru	ucture d'un anticorps	43
II	I.3	Diff	érents type d'anticorps monoclonaux	45
	III.3	8.1	Anticorps murins	46
	III.3	8.2	Anticorps chimériques	46
	III.3	8.3	Anticorps humanisés	47
	III.3	8.4	Anticorps humains	48
II	1.4	Mé	canismes d'action	49
	111.4	.1	Anticorps thérapeutiques neutralisants	49
	111.4	.2	Anticorps thérapeutiques antagonistes	50
	111.4	.3	Anticorps thérapeutiques cytolytiques	50
	111.4	.4	Anticorps thérapeutiques à action mixte antagoniste/cytolytique	50
	111.4	.5	Anticorps conjugués à un anticancéreux	50
II	I.5	Ava	antages et limites	50
	III.5	5.1	Avantages	50
	III.5	5.2	Limites	53
II	I.6	Asp	pect économique	53
	III.6	5.1	Etude de l'ANSM	53
	III.6	6.2	Etude du Leem	57
IV.	Арр	olica	tions industrielles	59
١١	V.1	Red	cherche & Développement	59
	IV.1	1.1	Identification d'une cible	59
	IV.1	1.2	Recherche de l'anticorps	59
	IV.1	1.3	Place de la biolayer interferometry	60
١١	V.2	Pro	cédés	60
	IV.2	2.1	Upstream	61

IV.2.2 Downstream
IV.2.3 Place de la biolayer interferometry 62
IV.3 Formulation
V. Contrôle des préparations hospitalières à base d'anticorps monoclonaux 65
V.1 Techniques actuelles de contrôle des préparations à base d'anticorps
monoclonaux
V.1.1 Multispec [®]
V.1.2 QC Prep+®
V.2 Biolayer interferometry : étude de l'application au contrôle des anticorps
monoclonaux
V.2.1 Matériel 70
V.2.2 Tests sur la quantification74
V.2.3 Essais d'identification de l'anticorps monoclonal 80
CONCLUSION

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Liste des biocapteurs commercialisés par ForteBio permettant une capture via un
marquage des protéines [14]
Tableau II : Liste des biocapteurs commercialisés par ForteBio permettant une capture directe des
protéines [14]
Tableau III: Liste des biocapteurs "personnalisables" commercialisés par ForteBio [14]
Tableau IV : Dissociation en fonction du k_d [13]
Tableau V : Anticorps chimériques commercialisés en France [31]
Tableau VI : Anticorps humanisés commercialisés en France [31]
Tableau VII : Anticorps humains commercialisés en France [31] 49
Tableau VIII : SMR pour les anticorps monoclonaux [31]
Tableau IX : Les 30 substances actives les plus vendues à l'hôpital en valeur [40]
Tableau X: Prix des anticorps monoclonaux en fonction de leur forme pharmaceutique [31]
Tableau XI : Utilisation de la BLI en industrie (données fournies par ForteBio)
Tableau XII: Pourcentage de reconnaissance des anticorps dans les trois bibliothèques sur 15
échantillons en utilisant le calcul de corrélation par dérivée première. [48]
Tableau XIII : Pourcentage de reconnaissance des anticorps dans la bibliothèque C sur 15
échantillons selon les différents modes de calcul de corrélation.[48]
Tableau XIV : Pourcentage de reconnaissance et de corrélation de recherche en bibliothèque pour les
excipients seuls (n=1) ou en mélange (n=10) contenus dans les quatre spécialités (Mabthera®,
Herceptin®, Vectibix® et Avastin®)[48]
Tableau XV : Anticorps utilisés pour les tests
Tableau XVI : Dosages de deux préparations de rituximab 76
Tableau XVII : Résultats des différents dosages sur l'Octet QK ^e avec le biocapteur Protéine A 77
Tableau XVIII : Résultats des différents dosages sur l'Octet QK ^e avec le biocapteur Protéine G 78
Tableau XIX : Résultats en fonction de l'opérateur et du protocole appliqué 79
Tableau XX: Comparaison des résultats obtenus avant et après régénération du biocapteur protéine A
Tableau XXI : Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur protéine A
Tableau XXII: Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur protéine G
Tableau XXIII: Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur protéine L
Tableau XXIV : Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur α-Fab-CH1
Tableau XXV : Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur α-lgG Fc (AHC)
Tableau XXVI : Déplacement spectral après 120 s (nm) 88
Tableau XXVII : Pentes à l'origine pour la phase d'association en nm/sec
Tableau XXVIII : pente à l'origine et valeur terminale pour la phase d'association 89
Tableau XXIX : Valeurs caractéristiques de la dissociation avec le biocapteur Fab-CH1 92
Tableau XXX : Valeurs caractéristiques de la dissociation avec le biocapteur α-lgG Fc (AHC)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du montage de Thomas Young [3]	. 15
Figure 2 : Schéma mathématique du montage de Thomas Young [3]	. 16
Figure 3 : Schéma mathématique des miroirs de Fresnel [7]	. 19
Figure 4 : Schéma du système interférométrique à lames à faces parallèles [2]	. 19
Figure 5 : Schéma du système interférométrique à coin d'air [2]	. 20
Figure 6: Schéma de l'interféromètre de Michelson [8]	. 21
Figure 7 : Image interférentielle en lumière blanche [10]	. 22
Figure 8 : Bulles de savon [11]	. 23
Figure 9: Représentation d'un biocapteur [12]	. 23
Figure 10: Parcours interne de la lumière [12]	. 24
Figure 11: Interférence pour chaque longueur d'onde [12]	. 24
Figure 12: Parcours de la lumière réfléchie en présence de molécules fixées sur le biocapteur [12]	. 25
Figure 13 : Décalage du profil interférométrique [12]	. 25
Figure 14: Couplage via la liaison streptavidine-biotine[12]	. 29
Figure 15: Couplage via la liaison AR2G [13]	. 29
Figure 16 : Schéma association bivalente [12]	. 31
Figure 17 : Courbes association/dissociation après régénération pour un même biocapteur avec	: un
même ligand [13]	. 35
Figure 18 : Différentes parties du Biacore [15]	. 37
Figure 19 : Sensorgramme obtenu en RPS	. 38
Figure 20 : Principe de la chromatographie d'affinité [18]	. 39
Figure 21: Production d'anticorps monoclonaux selon Milstein & Köhler [23]	. 42
Figure 22: Structure d'un anticorps [25]	. 43
Figure 23 : Représentation 3D d'un anticorps [26]	. 44
Figure 24: Différentes classes d'anticorps [27]	. 45
Figure 25: Différences entre chaque classe d'anticorps monoclonaux [28]	. 46
Figure 26 : Classification pharmacologique des 173 biomédicaments commercialisés en France au	ı 31
mai 2014 [39]	. 57
Figure 27: Chiffre d'affaires total des biomédicaments par classe pharmaceutique en CMA (Cui	mul
Mobile Annuel) de 05/2010 à 05/2014 [39]	. 58
Figure 28 : Chiffre d'affaires total des biomédicaments par classe pharmaceutique en pourcentage) de
mai 2013 à mai 2014 [39]	. 58
Figure 29: Schéma d'un procédé de fabrication d'anticorps monoclonal [43]	. 60
Figure 30: Spectres des anticorps en UV : bevacizumab (bleu), rituximab (noir), trastuzumab (marro	on),
panitumumab (vert), cetuximab (rouge) [48]	. 67
Figure 31 : Spectre des anticorps en IR et domaines spectraux de la bibliothèque finale : bevacizun	nab
(bleu), rituximab (noir), trastuzumab (marron), panitumumab (vert), cetuximab (rouge) [48]	. 67

Figure 32 : Système BLItz 1 [55]	71
Figure 33 : Système BLItz 2 [55]	71
Figure 34 : Système BLItz 3 [55]	71
Figure 35 : Système BLItz 4 [55]	71
Figure 36 : BLItz software [55]	72
Figure 37 : Octet QKe [56]	73
Figure 38 : Octet Software [56]	73
Figure 39: Sensorgrammes de la gamme étalon de Rituximab (40 à 240 μg/mL)	75
Figure 40 : Courbe d'étalonnage du rituximab	75
Figure 41: Courbe d'étalonnage du rituximab (capteur protéine A)	76
Figure 42 : Courbe d'étalonnage du rituximab (capteur protéine G)	77
Figure 43 : Association avec le biocapteur protéine A	83
Figure 44 : Association avec le biocapteur protéine G	84
Figure 45: Association avec le biocapteur protéine L	85
Figure 46 : Association avec le biocapteur α-Fab-CH1	86
Figure 47: Association avec le biocapteur α-IgG Fc (AHC)	87
Figure 48: Dissociation avec le biocapteur protéine L	91
Figure 49 : Dissociation avec le biocapteur protéine A	91
Figure 50 : Dissociation avec le biocapteur protéine G	91
Figure 51: Dissociation avec le biocapteur Fab-CH1	92
Figure 52 : Dissociation avec le biocapteur α-IgG Fc (AHC)	93

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
- AHQ : anti human quantification
- AMC: Affinity monolith chromatography
- AMQ : anti murine quantification
- ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
- APS : aminopropylsilane
- AR2G : amine réactive de deuxième génération
- BLI : biolayer interferometry
- C5 : facteur du 5 complément
- CCD : charge coupled device
- CD : cluster de différenciation
- **CDR** : Complementary Determining Regions
- CH : région constante chaines lourdes
- CHO : cellules ovariennes de hamster
- CL : région constante chaines légères
- CLHP : chromatographie liquide haute performance
- CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
- DAD : diode array detector
- EDC : 1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide
- EDMA: éthylèneglycoldiméthacrylate
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
- Fab : fragment antigen binding
- FAB2G : anti human FAB-CH1 de seconde génération
- Fc : fragment constant
- FCyR : récepteur gamma de la région Fc

FGFR2 : Fibroblast Growth Factor Receptor 2

- FIA : flow injection analysis
- FL : flacon
- GMA : méthacrylate de glycidyle
- GP369 : glycoprotéine 369
- GPIIb/IIIa : glycoprotéine IIb/IIIa
- GST : glutathion-S-transférase
- HAMA : Human Anti Mouse Antibodies
- HAS : Haute Autorité de Santé
- HAT : hypoxanthine, aminoptérine et thymidine
- HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
- HGPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosytransférase
- Ig : immunoglobuline
- IgA : immunoglobuline de classe A
- IgD : immunoglobuline de classe D
- IgE : immunoglobuline de classe E
- IgG : immunoglobuline de classe G
- IgM : immunoglobuline de classe M
- IL12 : interleukine 12
- $IL1\beta$: Interleukine-1 beta
- IL23 : interleukine 23
- IL2R : récepteur à l'interleukine 2
- IL6R : récepteur à l'interleukine 6
- IMAC: immobilized metal ion affinity
- IR : infrarouge
- ka : constante d'association
- kd : constante de dissociation

LB: lymphocyte B

- LED : light-emitting diode
- NHS : N-hydroxysulfosuccinimide
- NK : natural killer
- NTA : acide nitrotriacétique
- PUI : pharmacie à usage intérieur
- R&D : recherche et développement
- RANK-L: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand
- RPS : résonance plasmonique de surface
- RU : unité de résonance
- SMR : Service Médical Rendu
- TNF-α: tumor necrosis factor alpha
- UCD : unités communes de dispensation
- UCPC : unité centralisée de préparation des cytotoxiques
- UV : ultraviolet
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
- VH : région variable chaines lourdes
- VL : région variable chaines légères
- VRS: virus respiratoire syncytial

Bio-layer interferometry : méthode d'intérêt dans les procédés de fabrication et pour le contrôle des préparations hospitalières à base d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

INTRODUCTION

L'étude des interactions protéine/protéine et plus particulièrement des interactions antigène-anticorps est devenue incontournable dans le monde de la santé. Que cela soit dans le cadre de la recherche fondamentale dans le but de valider des hypothèses d'interaction, dans la recherche, le développement et la production d'anticorps monoclonaux en milieu industriel, dans le diagnostic avec la recherche d'antigène ou d'anticorps dans le sang, ou encore dans le suivi de l'observance d'un traitement et/ou de son efficacité. A tous les stades, ces interactions sont étudiées. Il en découle un grand nombre de méthodes sur le marché [1]. On distingue les méthodes avec marqueurs comme l'électrochimioluminescence fonctionnant généralement avec le ruthénium comme marqueur luminescent, la radio-immuno précipitation qui utilise un radiomarqueur dont la nature varie en fonction des besoins, et bien entendu le chef de file des méthodes avec marqueur, l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) fonctionnant avec un conjugué enzymatique. En opposition, des méthodes dites sans marqueur existent comme la résonance plasmonique de surface (RPS), la biolayer interferometry (BLI) ou encore la biochromatographie. Malgré la très grande banalisation de l'étude des anticorps sous leurs formes diverses, il reste un domaine qui pose encore problème. Il s'agit du contrôle qualité des préparations hospitalières d'anticorps monoclonaux. Même si ce contrôle demeure à l'heure actuelle facultatif dans le cadre des préparations magistrales, de nombreux hôpitaux contrôlent les préparations d'anticancéreux et par conséquent se retrouvent confrontés à des préparations d'anticorps monoclonaux. Les méthodes actuelles telles que la FIA (flow injection analysis) couplée aux spectroscopies UV, Raman ou Infrarouge ne sont pas adaptées à l'identification des anticorps. La biolayer interferometry (BLI), méthode développée par les fondateurs de Forte Bio, une biologiste et un physicien, est récemment arrivée sur le marché et semble prometteuse.

Dans ce document nous rappellerons dans un premier temps des notions de physique optique sur les interférences lumineuses qui sont la base du fonctionnement de la BLI et qui permettront de mieux appréhender la partie suivante présentant la technique elle-même. Une partie sur les anticorps monoclonaux montrera l'enjeu stratégique de ces médicaments et l'engouement qu'il en résulte. L'application de cette technique au cours du processus industriel d'obtention des

anticorps monoclonaux précédera la présentation des essais menés au CHRU de Nancy dans le but de valider la possible utilisation de la BLI comme technique de routine pour le contrôle des préparations hospitalières.

I. Les interférences lumineuses : notions d'optique physique

I.1 Interférométrie

I.1.1 Interférences lumineuses

On obtient une interférence lumineuse lorsque la superposition de deux ondes ou plus conduit à une intensité lumineuse qui est différente de la somme des intensités de chacune des ondes lumineuses prise séparément [2].

Ce phénomène fut mis en évidence par Thomas Young, physicien et mathématicien anglais, au début du XIX^{ème} siècle grâce à l'expérience décrite figure 1.



Figure 1 : Schéma du montage de Thomas Young [3]

Une source lumineuse S située à une grande distance éclaire un écran muni d'un trou qui joue le rôle de source ponctuelle émettant des ondes sphériques. Ces ondes lumineuses atteignent un second écran placé lui aussi à une grande distance. Cet écran est percé de deux trous S1 et S2 qui se comportent comme deux sources ponctuelles éclairées par les mêmes plans d'ondes incidentes. Les deux plans d'ondes issus de ces deux sources forment un petit angle entre eux. Cela conduit à une zone de l'espace où il y a superposition et crée le champ d'interférences des deux faisceaux. Il est ainsi observable sur l'écran de contrôle une succession de franges sombres et claires [4].

Les franges sombres correspondent à des interférences destructives et les franges claires/brillantes à des interférences constructives.



Figure 2 : Schéma mathématique du montage de Thomas Young [3]

avec :

a : distance séparant S1 et S2

D : distance séparant le plan S1S2 de l'écran P (là où on observe les franges)

 $\boldsymbol{\theta}$: angle des rayons issus des deux sources mesuré par rapport à l'axe de symétrie

δ: différence de chemin optique (aussi appelé différence de marche) entre les deux rayons issus de S1 et de S2

On obtient :

$$\sin \theta = \frac{\delta}{a}$$
$$\tan \theta = \frac{y}{D}$$

En P, δ vaut après approximation des petits angles (D>>a) [3]:

$$\delta = a \frac{y}{D}$$

y : ordonnée sur l'écran

- Si δ = kλ, il y a interférence constructive et on observe des franges brillantes pour tout k ϵ Z et y = kλ^D/_a. La distance entre 2 franges brillantes est appelée interfrange i ; i = λ^D/_a
- Si $\delta = \frac{(2k+1)\lambda}{2}$, il y a interférence destructive et on observe des franges sombres et $y = (2k+1)\lambda \frac{D}{2a}$. La distance entre 2 franges sombres est encore égale à : $i = \lambda \frac{D}{a}$

L'interfrange correspond de façon générale à la distance entre 2 franges sombres ou 2 franges brillantes.

Cependant aussi simple que paraisse ce montage, il est indispensable que les ondes remplissent certaines conditions pour observer ce phénomène [5] :

- elles doivent avoir la même longueur d'onde, donc être monochromatiques,
- elles doivent avoir la même direction de propagation ou sensiblement,
- elles doivent avoir la même direction de vibration afin que les grandeurs vectorielles puissent être pratiquement considérées comme portées par un même axe et s'ajouter algébriquement, donc la même polarisation,
- elles doivent être cohérentes.

Cette notion de cohérence comprend deux composantes : une cohérence spatiale et une cohérence temporelle [6].

I.1.1.1 Cohérence spatiale

La cohérence spatiale dépend de l'étendue de la source. Si la source lumineuse était réduite à la dimension d'une particule, la figure interférentielle obtenue serait trop petite. On ne pourrait pas la voir car l'intensité lumineuse serait trop faible. De même, si la dimension de la source devenait trop grande, on obtiendrait un brouillage des franges. Il faut donc que la dimension de la source soit assez grande pour avoir une intensité lumineuse suffisante, mais pas trop grande afin d'éviter de diminuer le contraste jusqu'à un éclairement uniforme.

I.1.1.2 Cohérence temporelle

Lorsqu'on veut faire interférer deux sources, il faut que la différence de phase entre ces deux sources soit indépendante du temps pour pouvoir observer des

interférences. De plus, il faut que les trains d'ondes qu'on veut faire interférer aient été émis en même temps. Ces conditions caractérisent la cohérence temporelle du système.

En pratique, pour être sûr de réaliser la cohérence temporelle, on utilise la même source et on fait interférer 2 ondes provenant de cette source en procédant à une division de l'onde initiale en deux soit par division du front d'onde, soit par division d'amplitude.

I.1.2 Systèmes interférométriques

Nous nous attacherons dans cette partie à présenter les principaux systèmes interférométriques et les bases de physique nécessaires à leur compréhension. Il ne s'agit en aucun cas d'un recueil exhaustif de tous les systèmes interférométriques existants.

I.1.2.1 Interférométrie par division du front d'onde en deux faisceaux

Il existe un dispositif mettant en jeu le phénomène de diffraction (dispositif de Young) et d'autres dispositifs mettant en jeu les phénomènes de réflexion (miroir de Fresnel, miroir de Lloyd) ou de réfraction (biprisme de Fresnel, bilentille de Meslin) ; ces derniers ne seront pas abordés ici. Le but est pour chacun de ces dispositifs d'introduire une différence de marche δ entre les deux faisceaux pour créer un champ d'interférences.

• Expérience de Young

Décrite précédemment, elle constitue le premier système interférométrique mis au point, les variations d'intensité sont décrites par l'équation suivante [2]:

$$I(x) = I_0 \left[\cos \frac{\pi x a}{D \lambda} \right]^2$$

• Miroirs de Fresnel

Le montage est le suivant (figure 3) : deux miroirs plans ont une arête commune, l'un faisant un petit angle par rapport à l'autre. Le front d'onde sphérique émis par la source primaire est divisé en deux lors de l'incidence sur les deux miroirs. Chaque partie de l'onde se réfléchit sur l'un des miroirs et les deux faisceaux se recomposent

à grande distance. La superposition de ces deux fronts donne sur l'écran de contrôle des franges d'interférences.



Figure 3 : Schéma mathématique des miroirs de Fresnel [7]

Dans ce système l'intensité des franges est définie par l'équation suivante [2] :

$$I(x) = I_0 \left[\cos \frac{\pi x 2b \sin \alpha}{(c+f)\lambda} \right]^2$$

Comme précédemment les interférences constructives et destructives se retrouvent respectivement pour $\delta = k\lambda$ et $\delta = \frac{(2k+1)\lambda}{2}$.

I.1.2.2 Interférométrie par division d'amplitude du faisceau

Le principe consiste à faire passer le faisceau lumineux dans une lame qui laisse passer un certain pourcentage de lumière et réfléchit le reste au niveau de chaque face. Nous disposons ainsi de deux fronts d'ondes secondaires, réfléchis ou transmis, obtenus à partir du même front d'onde incident, que nous pouvons faire interférer dans une région de notre choix au moyen de miroirs par exemple.

• Lame à faces parallèles (figure 4)



Figure 4 : Schéma du système interférométrique à lames à faces parallèles [2]

La lame d'épaisseur D et d'indice n reçoit un faisceau de lumière incident (a), il y a division de l'amplitude du faisceau par réflexion partielle sur la face d'entrée (b), puis division partielle sur la face de sortie (c). Une nouvelle division a lieu sur la face d'entrée dans le sens verre => air (d). Il y a finalement superposition des deux ondes (1) et (2) qui donnent des franges d'interférence.

Dans ce système l'intensité des franges est définie par l'équation suivante [2] :

$$I(x) = I_0 \left[\cos \frac{\pi 2Dn + \frac{\lambda}{2}}{\lambda} \right]^2$$

La différence de marche entre les deux faisceaux est : $\delta = 2 \text{ Dn} + \frac{\lambda}{2}$

Les interférences constructives se retrouvent pour $2Dn = (2k + 1)\frac{\lambda}{2}$ et les interférences destructives pour $2Dn = k\lambda$.

• Coin d'air (figure 5)



Figure 5 : Schéma du système interférométrique à coin d'air [2]

Un coin d'air est constitué par deux lames de verre de microscope faisant entre elles un angle α (petit). Quand la distance X augmente, la différence de marche entre les rayons (1) et (2) augmente et la superposition des deux faisceaux donne des franges d'égale épaisseur localisées sur la lame supérieure.

Dans ce système l'intensité des franges est définie par l'équation suivante [2] :

$$I(x) = I_0 \left[\cos \frac{\pi 2x \tan \alpha}{\lambda} + \frac{\pi}{2} \right]^2$$

La différence de marche entre les deux faisceaux est : $\delta = 2x \tan \alpha + \frac{\lambda}{2}$.

Les interférences constructives se retrouvent pour $2x \tan \propto = (2k+1)\frac{\lambda}{2}$ et les interférences destructives pour $2x \tan \propto = k\lambda$.

- Novable Mirror Source Beam Compensator Detector Sodium Fringes
- Interféromètre de Michelson (figure 6)

La lame semi-réfléchissante (beam splitter) est une lame séparatrice permettant de diviser l'onde en deux. Ces deux ondes vont se réfléchir sur deux miroirs, un fixe et un mobile, et retournent vers la lame séparatrice. Une partie de l'onde venant du miroir fixe est transmise à travers la lame séparatrice vers le détecteur, une partie de l'onde venant du miroir mobile est réfléchie par la lame séparatrice vers le détecteur. Les deux ondes sont alors recombinées et on peut observer des interférences. Il faut remarquer que dans ce dispositif l'un des faisceaux traverse trois fois la lame séparatrice, alors que l'autre seulement une fois; d'où l'utilisation d'une lame compensatrice (compensator) dans ce dispositif. Elle permet aux deux faisceaux de traverser la même épaisseur de verre. Suivant la position des miroirs, chacun des faisceaux va parcourir un trajet différent avant la superposition. Cette différence de marche entraîne une différence de phase entre les ondes lumineuses, qui selon sa valeur, conduira à une intensité importante ou faible donnant lieu à l'observation d'anneaux ou de franges en fonction de la position des miroirs. Ce dispositif est équivalent à une lame d'air à faces parallèles ou en coin selon la position des miroirs [9].

Figure 6: Schéma de l'interféromètre de Michelson [8]

Dans ce système l'intensité des franges est définie par l'équation suivante [2] :

$$I(x) = 4A^2 \cos^2\left(\pi \frac{2D}{\lambda}\right)$$

La différence de marche entre les deux faisceaux est : $\delta = 2D = 2(x_1 - x_2)$.

D est la différence de distance des deux miroirs fixe et mobile par rapport à la lame séparatrice, x₁ et x₂ sont les distances de chacun des miroirs par rapport à la lame.

Les interférences constructives se retrouvent pour $\delta = k\lambda$ et les destructives pour $\delta = (k + \frac{1}{2})\lambda$.

I.1.2.3 Interférences en lumière blanche

Il a précédemment été défini que pour obtenir des interférences, il fallait que les ondes qui interfèrent soient monochromatiques mais cela ne veut pas dire qu'il est impossible d'effectuer des interférences lumineuses avec de la lumière blanche qui contient toutes les longueurs d'onde de 400 à 800 nm.

En effet le système précédent (interféromètre de Michelson) fonctionne aussi avec de la lumière blanche. Chaque longueur d'onde composant le spectre de la lumière blanche donne sur l'écran sa propre figure d'interférences. Si on analyse le blanc d'ordre supérieur au spectroscope, on constate que toutes les longueurs d'onde comprises entre 400 nm et 800 nm ne sont pas présentes. Il en manque quelquesunes, celles qui vérifient la relation, $\delta = \frac{(2k+1)\lambda}{2}$ sont « éteintes » par interférence destructive. Il en résulte une alternance régulière de franges sombres et de franges brillantes (figure 7). Deux franges consécutives sont espacées d'un interfrange proportionnel à la longueur d'onde. Par ailleurs, les ondes de longueurs d'onde différentes n'interfèrent pas : leurs figures d'interférences se superposent.



Figure 7 : Image interférentielle en lumière blanche [10]

Figure 8 : Bulles de savon [11]



Il faut considérer que chacune des longueurs d'onde du spectre visible constitue un système de franges qui se superposent. Tant que la différence de marche est inférieure à la longueur d'onde de cohérence de la source, le champ apparaît sous forme de franges colorées appelées franges en lumière blanche. Quand la différence de marche augmente les teintes palissent, on

dit qu'elles sont délavées de blanc, cette teinte porte le nom de blanc d'ordre supérieur. Ce phénomène peut être facilement observé grâce aux bulles de savon (figure 8) dont les variations de couleurs à leur surface sont dues aux interférences lumineuses de la lumière blanche [10].

II. Biolayer interferometry (BLI)

II.1 Principe

Figure 9: Représentation d'un biocapteur [12]



La biolayer interferometry a été décrite pour la première fois en 2005 et développée par ForteBio [12]. ForteBio a été fondé en 2004 et le premier Octet, utilisant la BLI est sorti en 2005 Cette technique repose comme son nom l'indique sur le principe de l'interférométrie lumière blanche en précédemment décrit pour suivre les caractéristiques d'une liaison protéine protéine, généralement antigène-anticorps.

Le système interférométrique ressemble à une lame à faces parallèles.

La figure 9 montre une vue générale, puis un zoom sur la partie terminale d'un biocapteur. Ce biocapteur constitue la base de cette technique. Une coque base plastique renferme la fibre optique permettant à la lumière de le traverser. Il est

recouvert à son extrémité d'une matrice biocompatible qui va permettre l'immobilisation de molécules d'intérêt.

Figure 10: Parcours interne de la lumière [12]



Le fonctionnement en lui-même est relativement simple. La lumière blanche provenant d'une LED (light-emitting diode) est dirigée par la fibre optique vers le bas du biocapteur (figure 10) où se trouvent deux interfaces séparées par une mince couche: une couche biocompatible (ligand/analyte) sur la surface de la pointe représentée par la couche verte et une couche de référence interne représentée par la couche bleue [13]. Chacune des couches va réfléchir la lumière. Les deux lumières réfléchies proviennent de la même source de lumière blanche, elles contiennent les mêmes longueurs d'onde du spectre visible et les faisceaux

réfléchis vont donner des interférences constructives ou destructives à différentes longueurs d'onde. Ces deux faisceaux sont enregistrés grâce à un capteur CCD (charge coupled device). Lorsque les longueurs d'onde identiques de chaque faisceau sont analysées ensemble, une figure d'interférences apparait.

Dans l'exemple représenté sur la figure 11, les deux ondes de lumière rouge donnent des interférences constructives complètes, ce qui entraîne un doublement de l'amplitude.



Figure 11: Interférence pour chaque longueur d'onde [12]

Les deux ondes lumineuses vertes donnent des interférences constructives partielles, ce qui entraîne une amplitude plus petite que celle du canal rouge. Les deux ondes lumineuses bleues violettes donnent une interférence destructive

complète, il en résulte une amplitude nulle. En représentant les amplitudes observées en fonction des longueurs d'ondes, un profil interférométrique peut être obtenu. Cela constitue la base des mesures en biolayer interferometry (BLI).

Lorsque les molécules se lient à la surface du biocapteur, la longueur du trajet de la réflexion (celle réfléchie par l'interface entre la surface et la solution) augmente tandis que celle de l'autre réflexion reste la même (figure 12).



Figure 12: Parcours de la lumière réfléchie en présence de molécules fixées sur le biocapteur [12]

Cela modifie les modèles d'interférences pour toutes les longueurs d'onde et le nouveau profil interférométrique se trouve décalé vers la droite du profil d'origine (figure 13).



Figure 13 : Décalage du profil interférométrique [12]

Cette construction optique permet la surveillance en temps réel des événements de liaison moléculaire qui se produisent sur la surface du biocapteur. Plus les molécules se fixent à la surface (augmentation de l'épaisseur), plus le profil interférométrique est déplacé vers la droite (déplacement des longueurs d'onde mesurée en nm). A l'inverse, si les molécules se dissocient de la surface, le profil interférométrique est décalé vers la gauche par rapport à sa position initiale. Lorsque ce décalage est mesuré sur une durée donnée, une courbe d'association/dissociation est obtenue.

II.2 Biocapteurs

Les biocapteurs ou biosenseurs constituent l'élément clef. L'extrémité de chaque biocapteur est revêtue d'une matrice biocompatible à base de silice qui minimise la liaison non spécifique à la surface. On peut considérer qu'il y a deux grands types de biocapteurs selon le mode de fixation sur la matrice.

Le premier type est constitué par les biocapteurs fournis par Fortebio (tableaux I et II). Ils permettent la capture directe des ligands d'intérêt avec une liaison hautement spécifique.

Tableau I : Liste des biocapteurs commercialisés par ForteBio permettant une capture via un marquage des
protéines [14]

	Anticorps de haute affinité pour la Glutathion-S-transférase (GST). Permet la
GST - Anti-GST	quantification directe et rapide des biomolécules marquées par la GST ainsi
	que l'analyse cinétique rapide.
HIS1K - Anti-Penta-	Anticorps pour capturer des protéines recombinantes possédant le marqueur
HIS	polyhistidine (His-tag). Pour la quantification ou l'analyse cinétique.
	Revêtue d'un anticorps monoclonal anti-His. Pour la capture et la détection
HIS2 - Anti-HIS	directe des protéines recombinantes possédant le marqueur polyhistidine (His-
	tag) pour des mesures de quantification
	Nickel fixé sur de l'acide nitrotriacétique (NTA) a une forte affinité avec les
NTA - Ni-NTA	protéines marqué par des histidines (His-tag) recombinantes. Permet des
	mesures cinétiques et la quantification.

Tableau II : Liste des biocapteurs commercialisés par ForteBio permettant une capture directe des protéines [14]

Biocapteur	Description		
AHC - Anti-Human Fc Capture	Permet l'immobilisation d'IgG humaine ou d'autres protéines contenant une partie Fc humaine en se liant à la région Fc humaine. Les applications cinétiques comprennent le screening des protéines et des anticorps, la caractérisation de l'affinité (ka, kd, KD) et le tri des épitopes.		
AHQ - Anti-Human IgG Quantitation	Se lie spécifiquement à la partie Fc des IgG humaines et d'autres protéines contenant une région Fc humaine. Les applications comprennent le développement de lignées cellulaires, la sélection des clones, l'optimisation des processus et la surveillance de la production.		
AMC - Anti-Mouse Fc Capture	Se lie à la partie Fc des IgG1, IgG2a, IgG2b. Les applications comprennent l'analyse cinétique des interactions anticorps-antigène (k_a , k_d , K_D)		
AMQ - Anti-Murine IgG Quantitation	Se lie spécifiquement à la partie Fv (ab')2 des IgG de souris et de rat. Les applications comprennent la quantification des IgG dans le développement de lignées cellulaires, la sélection des clones, l'optimisation des processus et la surveillance de la production.		
APS - Aminopropylsilane	Adsorption des protéines et des fractions membranaires grâce à des fragments hydrophobes. Les applications cinétiques comprennent le dépistage cinétique et la caractérisation de l'affinité (ka, kd, KD).		
FAB2G - Anti-Human Fab-CH1 2nd Generation	Se lie spécifiquement au domaine CH1 de l'IgG humaine. Aucune liaison de chaînes légères libres. Permet la quantification et la caractérisation des cinétiques des Fab et IgG humaine.		
FAB - Anti-Human Fab-CH1	Se lie spécifiquement au domaine CH1 de l'IgG humaine. Applications pour la quantification et la caractérisation des cinétiques de Fab et IgG humaine. Aucune liaison de chaînes légères libres		
Protéine A	Se lie avec une haute affinité pour la région Fc des IgG humaines. Se lie avec une affinité modérée à de nombreux sous-types des IgG de souris et de lapin. Les applications comprennent la quantification des IgG dans le développement de lignée cellulaire, la sélection de clones, l'optimisation des processus et la surveillance de la production.		
Protéine G	Se lie avec une haute affinité à la région Fc des IgG de souris, de rat, de chèvre et de bovins. Se lie avec une affinité modérée à de nombreux sous-types d'IgG humaine. Les applications comprennent la quantification des IgG dans le développement de lignée cellulaire, la sélection de clones, l'optimisation des processus et la surveillance de la production.		
Protéine L	Se lie avec une affinité élevée à la plupart des immunoglobulines à chaîne légère kappa de souris, de rat et d'humain. Ne se lie pas avec les IgG de chèvre, de bovin, de lapin et de mouton. Les applications incluent la quantification de fragments Fab et des IgG dans une culture à base de sérum.		

Les seconds sont les biocapteurs qui peuvent être qualifiés de personnalisables (tableau III) :

- soit par utilisation de liaison streptavidine-biotine,
- soit par utilisation d'amine réactive de deuxième génération (AR2G).

Tableau III: Liste des biocapteurs "personnalisables" commercialisés par ForteBio [14]

	Biocapteurs revêtus de streptavidine pour l'immobilisation d'anticorps, des
SA - Streptavidin	protéines, des peptides, ou des acides nucléiques biotinylés pour des applications
	cinétiques telles que des analyses de liaison, la recherche d'affinité, la validation, le
	tri des épitopes et la caractérisation des cinétique (k_a , k_d , K_D).
SAX - High	Biocapteurs revêtus de streptavidine spécifiquement développés pour des
Precision	applications dans la découverte de médicaments et le contrôle qualité avec des
Streptavidin	exigences strictes en matière de précision de dosage et de robustesse. Testés
	pour répondre à un coefficient de variation (CV) < 4 %.
	Biocapteurs revêtus d'ultra haute densité en streptavidine pour l'immobilisation de
SSA - Super	protéines, de peptides, d'acides nucléiques et de petites molécules.
Streptavidin	Spécifiquement conçus et développés pour le criblage de petits fragments et
	l'analyse de petites molécules
AR2G - Amine	La surface est fonctionnalisée par des groupements carboxylate permettant le
Reactive 2nd	couplage covalent des protéines par EDC/NHS. Les applications cinétiques
Generation	comprennent le dépistage d'anticorps et des protéines, la caractérisation de
	l'affinité (ka, kd, KD).

II.2.1 Liaison streptavidine-biotine

La streptavidine est une protéine tétramérique de 52800 Da purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*. La biotine ou vitamine B8 est une vitamine hydrosoluble également appelée vitamine H ou B7. Ces deux molécules présentent une forte affinité l'une pour l'autre. La constante d'affinité du complexe biotine-streptavidine est de l'ordre de 10⁻¹⁵ mol/L, ce qui en fait l'une des plus fortes interactions non-covalentes connues dans le monde du vivant.

Le principe de couplage est relativement simple (figure 14). Il suffit de mettre en contact un capteur contenant sur sa matrice de la streptavidine avec une protéine préalablement biotinylée (ici un anticorps).



Figure 14: Couplage via la liaison streptavidine-biotine[12]

Le procédé de couplage biotine-streptavidine crée une liaison extrêmement stable à la surface du biocapteur. La biotinylation est simple à réaliser [13] et n'est pas agressive pour les protéines car réalisée à pH neutre.

II.2.2 Liaison par amine réactive de deuxième génération (AR2G)

L'immobilisation de protéines sur les biocapteurs de type AR2G est réalisée par formation d'une liaison covalente entre une amine réactive sur la protéine d'intérêt et le carboxyle terminal à la surface du biocapteur. L'immobilisation est effectuée en plusieurs étapes (figure 15).



Figure 15: Couplage via la liaison AR2G [13]

- <u>Etape 1</u>: Les biocapteurs sont fournis avec une surface recouverte de groupes acide carboxylique qui sont activés par réaction avec du EDC (1éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide) et du sulfo-NHS (Nhydroxysulfosuccinimide) pour générer des esters NHS hautement réactifs.
- <u>Etape 2</u> : Les esters réagissent rapidement avec les amines primaires de la biomolécule pour former des liaisons amides hautement stables.
- Etape 3 : L'excès de sulfo-NHS esters est inactivé en utilisant l'éthanolamine.

II.3 Cinétiques

La biolayer interferometry permet l'étude cinétique des liaisons protéiques du type anti-anticorps/anticorps ou anticorps/antigène. Il est donc nécessaire de faire un rappel rapide de deux types de liaison d'intérêt : le modèle de liaison classique 1:1 et le modèle de liaison bivalent 1:2. Nous n'aborderons pas le cas de sites de fixation hétérogènes aussi appelé modèle de liaison 2:1, ni le cas où le transfert de masse au niveau du biocapteur constitue une étape limitante de la cinétique.

II.3.1 Modèle de liaison classique 1:1

Il s'agit de la liaison entre un ligand immobilisé à la surface du biocapteur et un analyte (protéine) en solution, via un seul site de liaison sur chaque partenaire. Il s'agit donc d'une interaction bimoléculaire. L'association et la dissociation sont décrites par un modèle exponentiel. L'analyte se lie de la même façon sur chaque ligand immobilisé. La courbe d'association suit un profil de liaison hyperbolique caractéristique, avec une augmentation exponentielle du signal suivie par une stabilisation (équilibre entre l'association et la dissociation des deux partenaires). L'équation caractéristique de l'association pour ce modèle est la suivante [13] :

$$y = R_{max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a[Analyte]}} \left(1 - e^{-(k_a[Analyte] + k_d)t}\right)$$

R_{max} : capacité maximale de fixation sur le biocapteur

kd : constante de dissociation

ka : constante d'association

t: temps

[Analyte] : concentration du composé d'intérêt dans la solution analysée

La courbe de dissociation suit une décroissance exponentielle pour finalement revenir à l'état initial. L'équation caractéristique de la dissociation pour ce modèle est la suivante :

$$y_0 = R_{max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a[Analyte]}} \left(1 - e^{-(k_a[Analyte] + k_d)t_0}\right)$$

$$y = y_0 e^{-k_d(t-t_0)}$$

30

 y_0 : taux de liaison au temps t₀

to : temps marquant la transition association/dissociation

II.3.2 Modèle de liaison bivalent 1:2

Ce modèle est caractéristique de la liaison des anticorps qui présentent deux sites affins identiques (figure 16).



Figure 16 : Schéma association bivalente [12]

Les paramètres cinétiques calculés pour les deux interactions sont (ka1, ka2, kd1, kd2,

$$A+B \xrightarrow[k_{a1}]{k_{d1}} AB \longrightarrow AB+B \xrightarrow[k_{a2}]{k_{d2}} AB_2$$

K₁, K₂).

Ce modèle suppose une distance limitée entre deux sites de liaison adjacents à la surface du biocapteur, l'analyte bivalent peut former un complexe ponté.

Trois équations sont utilisées pour adapter les courbes d'analyte bivalent. La première équation décrit l'association de A et de B, la seconde décrit l'association de AB à B, et la troisième décrit la dissociation du complexe AB2. Nous obtenons le système suivant :

$$\frac{dB}{dt} = -(2k_{a1} * [A] * B - k_{d1} * AB) - (k_{a2}AB * B - 2k_{d2}AB_2)$$
$$\frac{dAB}{dt} = -(2k_{a1} * [A] * B - k_{d1} * AB) - (k_{a2}AB * B - 2k_{d2}AB_2)$$

$$\frac{dB}{dt} = (k_{a2}AB * B - 2k_{d2}AB_2)$$

II.4 Conditions opératoires générales

L'étude cinétique en lui-même comprend 4 grandes parties : établissement de la ligne de base, suivi de l'étape d'association, puis de l'étape de dissociation et éventuellement de la régénération des biocapteurs.

La ligne de base doit être établie avant toute analyse. Elle va permettre d'évaluer la dérive causée par la liaison non spécifique ou l'effet du tampon. Une ligne de base est effectuée dans le tampon qui correspond si possible à celui utilisé pour les étapes d'association et de dissociation. Le passage à une solution tampon différente peut créer des effets de matrice en raison de la liaison non spécifique des composants du nouveau tampon, ou au changement de conformation du ligand. De plus, le changement de surface pour les biocapteurs entraine une modification significative de l'indice de réfraction dont il faut impérativement tenir compte. La BLI n'est pas sensible à cet indice. Les sauts de signaux peuvent être due à un changement de tampon . Une ligne de base instable aura un impact sur la mesure de la phase de dissociation, en particulier si la dérive de la ligne de base est élevée par rapport à la vitesse de dissociation ou si elle a une tendance non linéaire. La dérive de la ligne de base a également un impact sur la capacité maximale de fixation Rmax.

II.4.1 Etape d'association

Dans l'étape d'association, l'interaction entre l'analyte et le ligand immobilisé est mesurée. Si cela est réalisé à des fins prospectives ou pour des analyses qualitatives, la mesure des courbes de liaison pour une seule concentration de l'analyte est souvent suffisante. Toutefois, lorsque des données cinétiques fiables et précises (analyse robuste) sont requises, une série de dilutions d'au moins quatre concentrations de l'analyte doit être mesurée. Idéalement la gamme de concentration doit être comprise entre 10 K_D jusqu'à environ 0,1 K_D et comporter 4 ou 5 points. La valeur de K_D est définie comme la molarité en analyte à l'équilibre qui occupe 50% des sites de liaison disponibles sur la surface de biocapteur. La gamme assurera une fixation allant d'environ 90% de Rmax jusqu'à la limite basse de détection.

L'étape d'association doit être effectuée suffisamment longtemps pour voir apparaitre la courbure dans les tracés de données, mais pas jusqu'à ce que les courbes s'aplatissent se stabilisent ou arrivent à l'équilibre. En général, une durée de cinq à dix minutes est recommandée. Pour les molécules de liaison rapide, un temps d'association de 1 à 2 minutes est généralement suffisant.

II.4.2 Étape de dissociation

Dans l'étape de dissociation, le biocapteur est plongé dans une solution tampon qui ne contient pas l'analyte. Le complexe lié sur la surface des biocapteurs se dissocie naturellement. Il est recommandé que l'étape de dissociation soit exécutée dans le même puits de microplaque que celui utilisé pour effectuer la ligne de base pour chaque échantillon. L'exécution de ces deux étapes dans le même puits peut permettre la correction d'artefacts due à des différences de tampon avec l'analyte. Volume et forme sont censés être les mêmes quels que soient les puits

L'étape de dissociation doit être effectuée suffisamment longtemps pour observer la dissociation des complexes. Le temps de dissociation dépend de l'affinité de l'interaction. Pour une affinité élevée, il peut être difficile d'analyser la courbe de dissociation mesurée si le temps est trop court. Idéalement, au moins 5% du complexe devrait être dissocié pour avoir une analyse robuste. Le tableau IV donne une idée des temps de dissociation nécessaires en fonction de la valeur de k_d. Il apparait clairement que pour certaines valeurs la réalisation de l'étude devient impossible.

k d	Pourcentage de dissociation	Temps pour une	Temps pour une
	par seconde	dissociation de 50%	dissociation de 5%
1	100	0,69 seconde	0.05 s
0,1	10	6,93 secondes	0.51 s
1.10 ⁻²	1	69,3 minutes	5.13 s
1.10 ⁻³	0,1	11,5 minutes	51.3 s
1.10-4	0,01	1,93 heure	8 m 33 s
1.10 ⁻⁵	0,001	19,25 heures	1 h 25 m
1.10 ⁻⁶	0,0001	8 jours	14 h 15 m

Tableau IV : Dissociation en fonction du kd[13]

II.4.3 Régénération des biocapteurs

Beaucoup de biocapteurs sont régénérables. Dans certains cas, notamment dans les recherches prospectives, il est avantageux économiquement de doser plusieurs échantillons en utilisant le même biocapteur revêtu dont le coût moyen d'achat est d'environ 4 €. Cela permet de minimiser le coût biocapteur/manipulation. Pour les applications cinétiques, les biocapteurs streptavidine et AR2G peuvent être régénérés jusqu'au niveau du ligand immobilisé par dissociation totale du complexe ligand/analyte dans des conditions perturbantes. Il s'agit de libérer l'analyte lié de façon efficace sans affecter l'activité du ligand, les conditions perturbant la liaison ligand/analyte dépendent des protéines impliquées dans cette liaison. De même, la capacité à conserver une activité après régénération varie considérablement d'un ligand à l'autre [13].

Il existe différents modes d'interaction entre les différentes paires ligand-analyte : hydrophobe, forces de van der Waals, et la liaison ionique. Une connaissance de la nature des protéines impliquées et du type de forces non covalentes dominant l'interaction est importante dans l'élaboration d'un protocole de régénération efficace.

La plupart des interactions anticorps-protéine peuvent être rompues par de courtes séries d'incubations dans un tampon à bas pH (pH 1-4), tel que de la glycine 10 mM (pH 1,5 à 2,0), suivies par une neutralisation dans du tampon analytique (pH 6-7). Cependant, si la surface du biocapteur n'est pas efficacement régénérée avec un tampon de faible pH, d'autres conditions peuvent être testées telles que de fortes concentrations de sel, de détergent, ou un tampon à pH élevé.

Pour qu'une régénération soit réussie, les conditions suivantes doivent être remplies :

- la chimie de surface du biocapteur doit être stable dans les conditions de régénération,
- le ligand immobilisé doit être stable dans les conditions de régénération et conserver une activité sur plusieurs cycles de régénération,
- le complexe protéique ligand-analyte doit se dissocier complètement pendant la régénération.
Le nombre de cycles de régénération auxquels peut résister un ligand et l'efficacité de la régénération dépendent aussi grandement des protéines formant le complexe. Des ligands peuvent être régénérés à raison de dix cycles ou plus, tandis que d'autres tolèrent beaucoup moins de cycles ou ne peuvent pas être régénérés du tout.

En général, plusieurs courtes expositions à la régénération ont plus de succès qu'une seule longue. Typiquement 3 à 5 cycles sont effectués, chacun constitué de 5 secondes d'incubation dans le tampon de régénération, suivie par 5 secondes d'incubation dans le tampon de l'analyte (neutralisation).

La figure 17 montre la différence entre une régénération réussie (B) où le biocapteur conserve une affinité identique malgré les nombreuses régénérations et une autre série (A) où cela est un échec puisque le signal ne cesse de diminuer.





II.4.4 Points clefs

Les points clefs qu'il faudra garder à l'esprit lors d'un test cinétique concernent :

- le tampon utilisé pour l'hydratation des biocapteurs et la dissociation doit correspondre à celui de l'échantillon contenant l'analyte aussi étroitement que possible,
- la sélection de la concentration en ligand ne doit pas saturer le biocapteur, mais fournir un signal fort. Idéalement, pour un anticorps de 150 kDa, le signal doit atteindre environ 1,0 nm après 10 minutes,

- l'exécution d'une série de dilutions contenant 3 ou 4 points en partant de 10 fois le K_D. Les mêmes puits tampons doivent être utilisés pour la ligne de base et la dissociation,
- l'exécution d'un contrôle négatif constitué de tampon uniquement,
- l'obtention de la stabilité de la ligne de base avant de passer à l'étape d'association,
- l'exécution d'un test à 30 °C est recommandée pour des résultats optimaux, puisque la liaison au capteur biologique est sensible aux fluctuations de température. En travaillant à quelques degrés au-dessus de la température ambiante, une température constante peut être maintenue tout au long de l'essai.

II.5 Place de la BLI par rapport aux autres méthodes

En se limitant aux techniques sans marqueur, les seules autres techniques existantes à l'heure actuelle sont la résonance plasmonique de surface (RPS) et la biochromatographie.

II.5.1 Résonance plasmonique de surface

Nous présenterons cette technique via la description du principal appareillage utilisé à l'heure actuelle, le Biacore[®] 3000 (GE Healthcare's) [15]. Le Biacore[®] est constitué



de 3 parties comme le montre la figure 18.

Figure 18 : Différentes parties du Biacore [15]

II.5.1.1 La puce ou « sensor chip »

La puce ou « sensor chip » est constituée d'une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or, elle-même recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé. Sur cette dernière couche est couplée de façon covalente la première molécule impliquée dans la réaction que l'on désire étudier. Après interaction, cette surface pourra être régénérée avec un tampon acide, basique ou salin. Le couplage peut se faire par les groupements amines, par les sucres ou par les groupements thiols selon des procédés de chimie classique. Le couplage peut également se faire par capture via un fragment Fc ou une biotine ou un tag (His, GST..) présents sur la molécule à immobiliser. Il existe également des « sensor chips » hydrophobes permettant de fixer des lipoprotéines, des liposomes, des préparations membranaires et des « sensor chips » ne comportant qu'une pellicule d'or et autorisant des chimies d'immobilisation à façon.

II.5.1.2 La microplaque fluidique

Elle permet le contrôle du volume d'injection (2 à 350 μ L) ainsi que le débit d'injections (1 à 100 μ L/min) des réactifs ou du tampon à la surface de la puce.

II.5.1.3 L'unité optique

Le Biacore[®] utilise le phénomène de résonance plasmonique de surface (RPS) pour détecter les interactions biomoléculaires. Une lumière polarisée envoyée sur un prisme en contact direct avec la lamelle de verre de la surface du « sensor chip » est totalement réfléchie. Le phénomène de résonance lié à la présence de la feuille d'or sur le « sensor chip » se caractérise par une diminution de l'intensité de la lumière réfléchie à un certain angle (angle de résonance).

Quand les molécules se fixent à la surface du biocapteur, l'indice de réfraction du milieu change. Ce changement entraine un décalage de l'angle de résonance. L'enregistrement en continu de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. La réponse est proportionnelle à la masse des molécules qui se lient au ligand immobilisé sur la surface du biocapteur. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Sa représentation au cours du temps est un sensorgramme (figure 19).

Cette méthode d'analyse permet de calculer les vitesses d'association et de dissociation et d'en déduire les constantes d'affinité caractéristiques de l'interaction. On peut également calculer des concentrations puisque pour une interaction donnée, l'intensité du signal est fonction de la concentration de la molécule injectée. Cette concentration peut être déterminée en utilisant une gamme étalon.



Figure 19 : Sensorgramme obtenu en RPS

II.5.1.4 Eudes comparatives BLI vs RPS

Il est difficile de trouver dans la littérature des études comparatives. Cependant Yasmina N. Abdiche & al. ont mené deux études comparatives entre l'Octet[®] (Forte Bio), le Biacore 3000[®] (GE Healthcare's) et le ProteOn XPR36[®] (Bio-Rad Laboratories) qui sont deux techniques fonctionnant sur le principe de la RPS [16] [17].

La première étude menée en 2008 [16] a consisté à comparer les performances de ces trois appareils pour déterminer la cinétique et l'affinité d'une liaison entre l'anticorps monoclonal murin appelé "4901" et son antigène, le peptide apparenté au gène de la calcitonine-(CGRP). Il en ressort que l'Octet[®] donne les résultats aussi satisfaisants que ceux obtenus par RPS. Cependant l'Octet[®] fait preuve d'un manque de sensibilité pour les petits peptides qui ne sont pas détectés. Le principal avantage de la BLI est qu'elle est non destructive ; il est donc possible de récupérer l'échantillon à la fin de la manipulation. De plus, le fonctionnement sans microfluidique mais juste par immersion de l'extrémité du biocapteur dans le milieu permet la détermination de cinétique sur des temps importants ce qui ne peut être réalisé en RPS qu'au prix d'un système de recirculation complexe. Ils concluent sur

le fait que l'Octet[®] est un excellent complément au Biacore[®] qui reste donc la méthode de référence pour eux.

La secondé étude menée en 2009 [17] consiste à explorer des liaisons compétitives à l'aide de ces trois appareillages. Il en ressort globalement les mêmes comparaisons. Le choix entre RPS et BLI repose sur la sensibilité supérieure de la SPR contre la facilité d'usage et la non destruction des échantillons offerte par la BLI. Il en ressort aussi une plus grande flexibilité de l'Octet[®] par rapport à ses deux concurrents.

II.5.2 Biochromatographie

II.5.2.1 Principe de la biochromatographie

La biochromatographie est une chromatographie liquide reposant sur le principe de la chromatographie d'affinité [18].

La figure 20 rappelle le principe de ce type de chromatographie. Un échantillon est injecté, les molécules les plus affines se fixent sur le support tandis que les autres sont éluées. Viennent ensuite l'élution de l'analyte d'intérêt, puis la régénération du support.



Figure 20 : Principe de la chromatographie d'affinité [18]

La biochromatographie est souvent nommé AMC pour « Affinity monolith chromatography ». Le terme « monolith » vient du fait que le support se compose d'un lit continu (et non de particules) présentant une perméabilité accrue rendant possible l'utilisation de basse pression. Les principaux monolithes sont constitués des copolymères de méthacrylate de glycidyle (GMA) et d'éthylèneglycoldiméthacrylate (EDMA).

De nombreux agents de liaison ont été employés dans l'AMC, telles que des anticorps, des enzymes, des protéines, des ions métalliques. Les applications sont nombreuses : chromatographie de bioaffinité, chromatographie d'immuno-affinité, immuno-extraction, chromatographie IMAC (immobilized metal ion affinity), séparations chirales et des études de bio-interactions [18].

II.5.2.2 Technologies disponibles sur le marché

Agilent technologies [19] propose deux colonnes ayant le même spectre d'utilisation que celui visé par la BLI. Il s'agit des colonnes Agilent Bio-Monolith Protein A and Protein G [20]. Ces colonnes vont permettre de déterminer le titre en anticorps monoclonal.

III. Anticorps monoclonaux

Nous nous attacherons dans cette partie à présenter les anticorps monoclonaux à visée thérapeutique, ceux à visée diagnostic ne seront pas traités dans cette thèse.

Nous pouvons en préambule donner une définition générale d'un anticorps monoclonal : « Un anticorps monoclonal est une population homogène d'anticorps issus d'un «seul et unique» clone de cellules B » [21].

III.1 Historique

L'histoire de la production des anticorps monoclonaux débute en 1975 grâce aux travaux de César Milstein (immunologiste allemand) et Georges Köhler (biochimiste britannique). Ils mettent au point une méthode permettant la production d'anticorps monoclonaux par un hybridome résultant de la fusion entre une cellule cancéreuse (immortelle) issue d'un myélome murin et un lymphocyte B (produisant des anticorps) murin [22]. Cette découverte leur valut le prix Nobel de médecine en 1984.

Comme le montre la figure 21, la production d'anticorps monoclonaux se déroule en deux grandes étapes : une étape *in vivo* et une étape *in vitro* [23].

L'antigène contre lequel on désire mettre au point l'anticorps est injecté à l'animal (ici une souris). Cela entraine une réponse immunitaire avec production d'anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène injecté. Les cellules lymphoïdes de la rate ou

des ganglions lymphatiques sont prélevées et on isole les lymphocytes B produisant l'anticorps d'intérêt.

Les lymphocytes B sont ensuite fusionnés en présence de polyéthylèneglycol avec des cellules myélomateuses murines présentant une déficience en hypoxanthineguanine phosphoribosytransférase (HGPRT). Le mélange de cellules lymphocytes B et cellules myélomateuses est cultivé sur un milieu sélectif HAT (hypoxanthine, aminoptérine et thymidine). Dans ces conditions seules les cellules issues de cette fusion peuvent survivre. En effet, les lymphocytes B ont une courte durée de vie et sont incapables de se multiplier *in vitro*, et les cellules myélomateuses sont dans l'incapacité de produire des nucléotides en milieu HAT car dans ce type de milieu la voie *de novo* est bloquée (étant des cellules HGPRT elles ne peuvent utiliser la voie de récupération). Donc les cellules myélomateuses n'ayant pas fusionné meurent. Au bout de quelques jours en culture, il ne reste plus que les cellules ayant fusionné.



Figure 21: Production d'anticorps monoclonaux selon Milstein & Köhler [23]

L'hybridome est cultivé dans des flacons de culture de tissu et l'anticorps est sécrété dans le milieu. Il en résulte donc habituellement de très faibles concentrations (1-20 µg/mL) alors que la production par injection dans la cavité péritonéale d'une souris donne des concentrations de 1-10 mg/mL environ. L'anticorps peut être ensuite purifié par chromatographie du liquide d'ascite. Cependant ce type de technique n'est pas adaptable lors d'un scale-up en industrie pharmaceutique ; des techniques de croissance *in vitro* des cellules d'hybridomes à de très hautes densités ont été développées [24].

Les hybridomes ainsi sélectionnés ont alors à la fois la capacité de se multiplier indéfiniment *via* leur partie myélome et la capacité de sécréter des anticorps avec leur origine lymphocyte B. Du fait qu'ils proviennent d'un seul lymphocyte B, tous les anticorps produits seront des copies de l'anticorps d'origine. On les appelle ainsi

anticorps monoclonaux, par opposition aux anticorps polyclonaux constitués d'un mélange d'anticorps avec des spécificités variées.

III.2 Structure d'un anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la super famille des immunoglobulines.

Comme le montre la figure 22, chaque anticorps est composé de 4 chaînes : 2 chaînes légères et 2 chaînes lourdes, étant identiques deux à deux, et reliées par des ponts disulfures pour former une structure spatiale qui est similaire à un Y. Les anticorps ont deux fonctions de base, celle de reconnaître et celle de se lier à des antigènes.



Figure 22: Structure d'un anticorps [25]

Les régions variables des chaînes légères et lourdes sont juxtaposées pour former le site de liaison de l'antigène ; par conséquent, il existe deux sites de liaison par anticorps. Au sein de la structure des chaînes d'immunoglobulines, les structures répétées de 110 acides aminés sont appelées domaines. Les chaînes légères ont un domaine dans la région variable (VL) et un dans la région constante (CL). Les chaînes lourdes ont un domaine dans la région variable (VL) et un dans la région constante (CL). Les la région constante (CH), en fonction de la classe de l'immunoglobuline. Les domaines CH1 et CH2 contiennent une zone connue comme la zone charnière qui confère la flexibilité et permet un couplage spatial adaptable (figure 23).

Dans les régions variables des chaînes légères et lourdes, on retrouve 3 segments hypervariables contenant 10 acides aminés juxtaposés formant le site de liaison de l'antigène, appelé CDR (Complementary Determining Regions) 1, 2 et 3. Le plus variable de tous est CDR3. Ces structures forment des boucles à la surface de l'anticorps permettant l'interaction avec les antigènes.



Figure 23 : Représentation 3D d'un anticorps [26]

La région variable constitue le paratope qui reconnait l'épitope de l'antigène. L'anticorps contient donc deux grandes parties : Fab pour « fragment antigen binding » qui est comme son nom l'indique la partie permettant la liaison de l'antigène et une partie constante Fc. Le fragment F(ab')2 est la réunion des deux fragment Fab par un pont disulfure. Ces différentes régions dépendent de l'enzyme réalisant l'hydrolyse : la papaïne conduit à la formation de deux fragments Fab et d'un fragment Fc alors que l'hydrolyse par la pepsine conduit à la formation d'un seul fragment F(ab')2, où les deux fragments Fab restent liés par deux ponts disulfures et le fragment Fc est scindé en plusieurs peptides.

Les chaînes légères ont une part variable responsable de la spécificité ainsi qu'une région constante qui diffère selon que l'on ait une chaîne légère κ ou λ . De même, les chaînes lourdes ont également une région variable et une région constante, ce qui permettra de déterminer la classe ou isotype d'immunoglobuline (lg): γ , μ , α , δ et ϵ , qui formeront respectivement les IgG, IgM, IgA, IgD et IgE.

Il existe en plus des sous classes : les IgA sont réparties en IgA1 et IgA2, et les IgG sont divisées en quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les propriétés de l'anticorps dépendent de chaque classe et sous-classe. Une fois sécrétés, les anticorps sont des monomères, à l'exception des IgA qui forment des dimères, et des IgM, qui forment des pentamères (figure 24).



Figure 24: Différentes classes d'anticorps [27]

III.3 Différents type d'anticorps monoclonaux

Il existe à l'heure actuelle 4 grandes classes d'anticorps monoclonaux :

- murins,
- chimériques,
- humanisés,
- humains.

Comme le montre la figure 25, ils différent par le pourcentage de leurs origines humaine et murine. Les parties oranges représentent les origines murines et les parties vertes les origines humaines [28].



Figure 25: Différences entre chaque classe d'anticorps monoclonaux [28]

III.3.1 Anticorps murins

Les travaux de Kohler et Milstein permirent la production des premiers anticorps monoclonaux murins. En 1986, le premier anticorps monoclonal est approuvé par la FDA : le muromomab (Orthoclone®). Il s'agissait d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'antigène CD3 des lymphocytes T humains utilisé dans le traitement des épisodes de rejet aigu en transplantation d'organes. Il fut retiré du marché en 2011 [29].

L'utilisation de ces anticorps monoclonaux murins ayant montré leurs limites, des améliorations sont rapidement devenues une nécessité pour leur utilisation *in vivo* chez l'homme. En effet, l'introduction d'anticorps murins chez l'homme induit l'apparition d'anticorps appelés HAMA («Human Anti Mouse Antibodies»). Il résulte de ce phénomène appelé xéno-immunisation non seulement une diminution de l'efficacité (action neutralisante), mais aussi l'apparition d'effets indésirables dus à la formation de ces complexes immuns. Ainsi, des réactions allergiques allant dans de rares cas jusqu'à des chocs anaphylactiques furent rapportées [30]. De plus, ce type d'anticorps possède une affinité imparfaite pour les antigènes humains (faible fixation de ces Ac sur les récepteurs Fc humains), ce qui conduit à des propriétés effectrices non optimales. Les médicaments issus d'un anticorps murin possèdent le suffixe – momab. En France le seul anticorps monoclonal murin disponible est l'ibritumomab (ZEVALIN[®]) : il est dirigé contre les CD20 et est utilisé dans les lymphomes.

III.3.2 Anticorps chimériques

Les anticorps chimériques sont humains à 66 %. Ils sont produits en fusionnant des gènes codant les régions variables d'un anticorps murin et les régions constantes

d'une immunoglobuline humaine. Ces chimères peuvent interagir avec les marqueurs portés par les cellules humaines et conservent une spécificité et une affinité équivalentes à celles de l'anticorps murin parental. L'une des conséquences de ces modifications est une cytotoxicité accrue due à une interaction de meilleure affinité avec les récepteurs FcyR présents sur les cellules effectrices des patients.

La chimérisation permet d'améliorer le profil de tolérance en limitant le risque de xéno-immunisation. Cependant, ces anticorps comportent toujours une partie non négligeable de protéines murines (33 % environ), ce qui reste suffisant pour pouvoir induire une réponse immune humaine anti-souris. Les médicaments issus d'un anticorps chimérique possèdent le suffixe –ximab. Le tableau 4 répertorie les anticorps chimériques commercialisés en France actuellement.

Nom	Nom commercial	Cible	Indication
Abciximab	Reopro®	GPIIb/IIIa	Syndromes coronariens
Rituximab	Mabthera®	CD20	Lymphome non hodgkinien
Basiliximab	Simulect®	IL2R	Prévention du rejet de greffe rénale
Infliximab	Remicade®	TNF-α	Maladie de Crohn
Cetuximab	Erbitux®	EGFR	Cancer colorectal
Brentuximab vedotine	Adcetris®	CD30	Lymphome hodgkinien

Tableau V : Anticorps chimériques commercialisés en France [31]

III.3.3 Anticorps humanisés

Dans le but d'augmenter la part humaine des anticorps monoclonaux, des progrès supplémentaires ont été réalisés. Les CDRs («Complementarity-Determining Regions», région hypervariable) d'une IgG humaine furent substituer par ceux de l'anticorps monoclonal de souris, conférant ainsi à l'IgG humaine la spécificité de l'anticorps murin parental. Ces résultats ont été obtenus dans les années 1988-1991 [32]. Ces anticorps contiennent seulement les régions hypervariables d'origine murine qui sont en contact étroit avec l'antigène.

Les réponses immunes anti-souris (HAMA) sont moindres qu'avec les anticorps chimériques dont ils sont dérivés (7% par rapport à 20 à 40%), de fait ils sont

humains à 90%. Il faut en revanche noter que l'affinité des anticorps humanisés n'est pas toujours aussi élevée que celle de l'anticorps d'origine, ce qui peut entraîner une baisse d'efficacité. Les médicaments issus d'un anticorps humanisé possèdent le suffixe –zumab. Le tableau VI répertorie les anticorps humanisés commercialisés en France actuellement.

Nom	Nom commercial	Cible	Indication
Trastuzumab	Herceptin [®]	HER-2	Cancer du sein
Palivizumab	Synagis®	VRS	Prévention infection à virus respiratoire syncitial
Gemtuzumab ozogamicine	Mylotarg®	CD33	Leucémie aigüe myéloïde
Alemtuzumab	Campath®	CD52	Leucémie lymphoïde chronique
Omalizumab	Xolair®	lgE	Asthme
Bevacizumab	Avastin [®]	VEGF	Cancer colorectal
Natalizumab	Tysabri®	intégrine $\alpha 4$	Sclérose en plaques
Ranibizumab	Lucentis®	VEGF	Dégénérescence maculaire
Eculizumab	Soliris®	C5	Hémoglobinurie paroxystique nocturne
Certolizumab pegol	Cimzia®	TNF-α	Maladie de Crohn
Tocilizumab	Roactemra®	IL6R	Arthrite rhumatoïde

Tableau VI : Anticorps humanisés commercialisés en France [31]

III.3.4 Anticorps humains

Comme leur nom l'indique, ces anticorps sont 100% humains et ont donc un profil de tolérance supérieur par rapport aux autres catégories. Ils sont dits invisibles ou « transparents » pour le système immunitaire des patients et évitent les réactions immunitaires observées dans le cas des anticorps murins, chimériques et humanisés.

Ces anticorps peuvent être obtenus selon trois méthodes différentes : le «phage display», les souris transgéniques et la technique des lymphocytes B humains. La majorité des anticorps humains existant sur le marché sont issus du « phage display » et des souris transgéniques. Les médicaments issus d'un anticorps humain possèdent le suffixe –umab. Le tableau VII répertorie les anticorps humains commercialisés en France actuellement.

Nom	Nom commercial	Cible	Indication
Adalimumab	Humira®	TNF-α	Arthrite rhumatoïde
Panitumumab	Vectibix®	EGFR	Cancer colorectal
Ofatumumab	Arzerra®	CD20	Leucémie lymphocytique chronique
Ustekinumab	Stelara®	IL12 & IL23	Psoriasis
Canakinumab	llaris®	IL1β	Syndrome Muckle-Wells
Golimumab	Simponi®	TNF-α	Arthrite rhumatoïde, arthrite psoriatique et spondylarthrite ankylosante
Denosumab	Prolia®	RANK-L	Ostéoporose
Belimumab	Benlystat®	stimulateur LB	Lupus erythémateux systémique
Ipilimumab	Yervoy®	CTLA-4	Mélanome avancé

Tableau VII : Anticorps humains commercialisés en France [31]

III.4 Mécanismes d'action

Les anticorps monoclonaux peuvent agir de façon différente.

III.4.1 Anticorps thérapeutiques neutralisants

Si l'anticorps se lie à l'antigène avec suffisamment d'affinité et que l'épitope reconnu concerne un site critique dans la fonction de l'antigène-cible, l'anticorps exerce une action de neutralisation. Cette neutralisation concerne des cibles antigéniques solubles. On retrouve dans cette catégorie le palivizumab, le bevacizumab, l'omalizumab, l'eculizumab, le canakinumab, l'ustékinumab, le denosumab et le ranibizumab.

III.4.2 Anticorps thérapeutiques antagonistes

Ils ciblent un récepteur membranaire bloquant ainsi la liaison de son ou de ses ligands ou son fonctionnement. On trouve les sous classes suivantes :

- anticorps anti-récepteur de cytokines (basiliximab, tocilizumab, cétuximab, panitumumab, trastuzumab),
- anticorps anti-intégrines (abciximab, natalizumab),
- anticorps interférant dans les synapses immunologiques (ipilimumab, bélimumab, certolizumab pégol).

III.4.3 Anticorps thérapeutiques cytolytiques

La fixation de l'anticorps sur l'antigène membranaire peut avoir un effet cytotoxique sur la cellule cible. L'effet cytolytique peut résulter de la capacité de l'anticorps à activer la voie du complément jusqu'au complexe d'attaque membranaire. Il peut aussi recruter les cellules cytotoxiques/phagocytaires qui sont porteuses de FCγR (cellules NK, macrophage, polynucléaire), c'est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ou ADCC). On retrouve dans cette catégorie (alemtuzumab, rituximab, ofatumumab et ibritumomab).

III.4.4 Anticorps thérapeutiques à action mixte antagoniste/cytolytique

Comme son nom l'indique cette catégorie est capable d'agir selon les deux modes précédemment décrits. On retrouve dans cette catégorie l'infliximab, l'adalimumab et le golimumab.

III.4.5 Anticorps conjugués à un anticancéreux

Dans cette dernière catégorie, l'anticorps permet une vectorisation très précise d'un agent antinéoplasique. Cela permet d'utiliser un agent très toxique mais avec une grande spécificité sur les cellules atteintes. On retrouve dans cette catégorie le gemtuzumab ozogamicin et le brentuximab vedotine.

III.5 Avantages et limites

III.5.1 Avantages

Le Service Médical Rendu (SMR) d'une thérapeutique constitue un critère qui prend en compte plusieurs aspects :

- d'une part la gravité de la pathologie pour laquelle le médicament est indiqué,
- d'autre part des données propres au médicament lui-même dans une indication donnée :
 - o efficacité et effets indésirables,
 - place dans la stratégie thérapeutique (notamment au regard des autres thérapies disponibles) et existence d'alternatives thérapeutiques,
 - o intérêt pour la santé publique.

Plusieurs niveaux de SMR ont été définis :

- SMR majeur ou important,
- SMR modéré ou faible, mais justifiant cependant le remboursement,
- SMR insuffisant pour justifier une prise en charge par la collectivité.

Le SMR d'un médicament est mesuré à un moment donné. Il peut évoluer dans le temps et son évaluation se modifier. Cette évaluation est réalisée par la Commission de la transparence qui est une instance scientifique de la Haute Autorité de Santé (HAS) composée de 20 membres titulaires, médecins, pharmaciens ou spécialistes en méthodologie et épidémiologie. Elle comprend des médecins hospitaliers et des médecins libéraux, spécialistes et généralistes [33].

Le Tableau VIII correspond au SMR de tous les anticorps monoclonaux commercialisés en France. Ces données sont issues du Thériaque [31].

On constate que pour la grande majorité de ces médicaments le SMR est important. Cela n'a rien de surprenant puisque leur mise sur le marché a permis de révolutionner les thérapeutiques.

Le principal avantage des anticorps monoclonaux est de permettre une thérapie ciblée du fait de leur grande spécificité (dirigée contre un marqueur spécifique) mais aussi d'engendrer une activation du système immunitaire par recrutement du complément notamment. Il en découle une toxicité moindre par rapport aux chimiothérapies conventionnelles (non-spécifiques) - en oncologie par exemple - et une diminution des effets secondaires [34].

DCI	Nom commercial	SMR	DCI	Nom commercial	SMR
	Anticorps cl	himérique		Anticorps hur	manisés
Abciximab	Reopro [®]		Bevacizumab	Avastin [®]	Important
Rituximab	Rituxan [®]	Important	Natalizumab	Tysabri [®]	Important
Basiliximab	Simulect [®]	Important	Ranibizumab	Lucentis [®]	Important
Infliximab	Remicade [®]	Important mais insuffisant pour polyarthrite rhumatoïde	Certolizumab pegol	Cimzia [®]	Important mais modéré pour rhumatisme psoriasique
Cetuximab	Erbitux [®]	Important	Alemtuzumab	$Campath^{\mathbb{R}}$	ATU
Brentuximab védotine	Adcetris [®]	Important	Omalizumab	Xolair [®]	En 2010 important, puis en 2015 modéré
Anticorps humains			Trastuzumab	Herceptin [®]	Important
Ipilimumab	Yervoy [®]	En 2011 important, puis en 2014 modéré	Palivizumab	Synagis [®]	En 2002 modéré, puis en 2007 faible
Denosumab	Prolia [®]	Important mais insuffisant pour pertes osseuses	Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg [®]	ATU
Belimumab	Benlystat [®]	Important	Eculizumab	Soliris [®]	Important
Adalimumab	Humira [®]	Important	Tocilizumab	Actemra [®]	Important
Panitumumab	Vectibix®	Important			
Ofatumumab	Arzerra [®]	Important			
Ustekinumab	Stelara [®]	Important mais modéré pour rhumatisme psoriasique			
Canakinumab	llaris [®]	Important			
Golimumab	Simponi [®]	Important			

Tableau VIII : SMR pour les anticorps monoclonaux [31]

III.5.2 Limites

Cependant les anticorps présentent un certain nombre de limites. Tout d'abord, il est très rare de trouver des antigènes véritablement spécifiques d'une maladie qui soient suffisamment exprimés sur la surface cellulaire et avec des propriétés appropriées pour être efficacement ciblés par des anticorps monoclonaux [35]. La formule « Gène de la maladie = target = guérison» parait relativement simpliste. Les anticorps ayant un succès en thérapie sont généralement ciblés contre une molécule exprimée de façon significative et avec une certaine spécificité opérationnelle pour atteindre un bénéfice clinique avec des effets secondaires tolérables [36].

Il est également à noter que, contrairement à d'autres traitements, l'utilisation des anticorps monoclonaux est limitée aux seules pathologies dont les causes précises ont été identifiées. La moindre mutation sur le marqueur cible peut provoquer une perte d'affinité de l'anticorps pour sa cible, voire l'apparition de résistance [37]. Le coût élevé de ces thérapies constituent un frein à leur très large expansion [38].

III.6 Aspect économique

Pour mettre en avant l'impact économique majeur et grandissant des anticorps monoclonaux nous allons nous baser sur deux études. La première menée par le Leem (Les entreprises du médicament) intitulée « Biomédicaments en France état des lieux en 2014 »[39] ainsi que sur une étude réalisée par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) nommée « Analyse des ventes de médicaments en France en 2013 » [40].

III.6.1 Etude de l'ANSM

Cette étude porte sur la vente des médicaments dans leur ensemble en France [40]. Elle présente dans un premier temps les résultats de l'officine, puis ceux de l'hôpital.

Le marché du médicament en France représente un chiffre d'affaires de 26,8 milliards d'euros. Pour un total de 2 800 substances actives et 11 000 spécialités en 2013, 20,6 milliards correspondent aux ventes en officines et 6,2 milliards aux hôpitaux.

Nous allons maintenant nous intéresser à la place des anticorps monoclonaux dans cet immense marché.

III.6.1.1 En ville

Pour le marché officinal, aucun anticorps ne fait partie des trente substances les plus vendues en termes de quantité. Le médicament le plus écoulé est sans surprise le paracétamol. Cependant si on s'intéresse aux 30 substances les plus vendues en terme de valeurs (elles représentent 5,6 milliards à elles seules) on trouve à la première place le paracétamol, mais en deuxième et troisième position respectivement le ranibizumab (Lucentis[®]) et l'adalimumab (Humira[®]). Ces trois molécules représentent 5,9 % de part de marché. Il aurait été intéressant d'avoir une valeur chiffrée de ces ventes mais on voit déjà que ces trois médicaments représentent plus de 300 millions de chiffre d'affaires en ville.

III.6.1.2 En hôpital

Comme le montre le tableau IX, les anticorps trustent les premières places dans les 30 molécules les plus vendues en termes de valeur avec pas moins de 8 molécules dont 6 dans les 12 premières. Ces 30 molécules représentent 56% du chiffre d'affaires cumulé soit environ 3,5 milliards d'euros et les 12 premières environ 1,4 milliards d'euros. Il en ressort que les anticorps monoclonaux, que cela soit en ville ou à l'hôpital, constituent une part importante du chiffre d'affaires des médicaments vendus en France et qui ne cesse de grandir.

Tableau IX : Les 30 substances actives les plus vendues à l'hôpital en valeur [40]

	Rang	Subtsance active	Classe ATC	Part du marchê 2013 cumulêe
	1	Bēvacizumab	Antinëoplasique	Los 2 promiters
Τ	2	Facteur VIII de coagulation	Facteur de la coagulation sanguine	Les 5 premieres:
Π	3	Infliximab	Immunosuppresseur	10,170
	4	Trastuzumab	Antinëoplasique	Los Compitent
	5	Rituximab	Antinëoplasique	28.196
٦	6	Immunoglobulines humaines polyvalentes	Immunoglobuline	20,00
	7	Pémétrexed	Antinëoplasique	Los O promiôsos
	8	Lênalidomide	Immunosuppresseur	34.8%
	9	Eculizumab	Immunosuppresseur	54,070
	10	Cētuximab	Antinëoplasique	Los 12 promiôros.
		Bortezomib	Antinëoplasique	30,00%
L	12	Natalizumab	Immunosuppresseur	55,576
	13	Bosentan	Antihypertenseur pulmonaire	Los IS promiéros
	14	Darbēpoētine alfa	Préparation antianémique	43.696
	15	Caspofungine	Antimycosique à usage systêmique	40,070
	16	Eptacog alfa (activē)	Facteur de la coagulation sanguine	Los IQ promièros
	17	Chlorure de sodium	Additif pour solution intraveineuse	470%
	18	Rzacitidine	Antinëoplasique	41,070
	19	Oxygéne	Gaz médical	
	20	Associations (solutions pour nutrition parentērale)	Solution pour nutrition parenterale	Les 21 premières: 50,1%
	21	Tênofovir disoproxil et emtricitabine	Antiviral	
	22	18F-fludēoxyglucose	Produit radio-pharmaceutique	
	23	Imiglucërase	Rutre médic. des voies digestives et du métabolisme	Les 24 premières: 52,3%
	24	Voriconazole	Antimycosique à usage systêmique	
	25	Immunoglobulines humaines polyvalentes	Immunoglobuline	
	26	Darunavir	Antiviral	Les 27 premières:
	27	Alfa I antitrypsine	Antifibronolytique	34,370
	28	Alglucosidase alfa	Enzyme	1
	29	Paracétamol	Antalgique	Les 30 premieres:
	30	Tocilizumab	Immunosuppresseur	50,270

Le tableau X donne à titre indicatif le prix des anticorps monoclonaux actuellement vendus en France. Les données répertoriées sont entièrement issues du Thériaque (UCD : unités communes de dispensation) [31].

Dénomination Commune Internationale (DCI)	Nom commercial	Présentation	Dosage	Prix UCD (euros)	Prix officine (euros)
		Anticorps chi	mérique		
Abciximab	Reopro				
Rituximab	Mabthera	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	100 MG/10 ML 500 MG/50 ML	263,67 1318,35	
Basiliximab	Simulect	POUDRE POUR SOLUTION INJECTABLE/ PERFUSION	20 MG/5 ML 10 MG/2,5 ML		
Infliximab	Remicade	POUDRE POUR SOL A DILUER POUR	100 MG	434,4	

Tableau X: Prix des anticorps monoclonaux en fonction de leur forme pharmaceutique [31]

		PERFUSION			
Cetuximab	Erbitux	SOLUTION POUR PERFUSION	5 MG/ML (FLACON 100 ML) 5 MG/ML (FLACON 20 ML)	823,921 167,784	
Brentuximab védotine	Adcetris	POUDRE POUR SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	50 MG	3150	
		Anticorps hu	ımanisé		
Trastuzumah	hercentin	SOLUTION INJECTABLE EN FLACON	600 MG/5 ML	1476,39	
		POUDRE POUR SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	150 MG	536,868	
Palivizumab	Synagis	POUDRE ET SOLVANT POUR SOLUTION INJECTABLE	100 MG/1 ML 50 MG/1 ML	765,63 461,07	
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	LYOPHILISAT SOLUBLE POUR PERFUSION	5 MG	ATU	
Alemtuzumab	Campath	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	30 MG/ML	ATU	
Omalizumab	Xolair	SOLUTION INJECTABLE	150 MG/1 ML 75 MG/0,5 ML		439,01 223,3
Bevacizumab	Avastin	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	25 MG/ML (FLACON 16 ML) 25 MG/ML	913,748	
			(FLACON 4 ML)	248,311	
Natalizumab	Tysabri	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	300 MG/15 ML	1724,94	
Ranibizumab	Lucentis	SOLUTION INJECTABLE	10 M G/ML FLACON 0,23 ML 10 MG/ML Seringue		738,69
Eculizumab	Soliris	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	300 MG/30 ML	4350	
Certolizumab pegol	Cimzia	SOLUTION INJECTABLE	200 MG/ML (Seringue 1 ML)	813,22	
		SERINGUE PRE- REMPLIE	162 MG/0,9 ML		990,67
Tocilizumab	Roactemra	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	20 MG/ML FL 1 ML FL 20 ML FL 4 ML	333,04 666,08 133,216	
		Anticorps h	umains		
Adalimumab	Humira	SOLUTION INJECTABLE	40 MG/0,8 ML	417,005	1038,52
Panitumumab	Vectibix	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	20 MG/ML (FLACON 20 ML)	1462 365,5	
Ofatumumab	Arzerra	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	1000MG/50 ML 100 MG/5 ML	en cours UCD	
Ustekinumab	Stelara	SERINGUE PRE- REMPLIE	45 MG/0,5 ML 90 MG/1 ML	2747,36 2747,36	2935,23
Canakinumab	Ilaris	POUDRE POUR	150MG		11361,17

		SOLUTION INJECTABLE			
Colimumoh	Simponi	SERINGUE PRE- REMPLIE	100 MG/1 ML 50 MG/0,5 ML	828	934,39
Goimumab	Simponi	STYLO PRE-REMPLI	100 MG/1 ML 50 MG/0,5 ML	828	934,39
Denosumab	Prolia	SOLUTION INJECTABLE	120 MG/1,7 ML		314,65
Belimumab	Benlystat	POUDRE POUR SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	120 MG		
Ipilimumab	Yervoy	SOLUTION A DILUER POUR PERFUSION	5 MG/ML (10 ML) (40 ML)	3500 14000	

III.6.2 Etude du Leem

Cette étude n'est pas spécifique des anticorps monoclonaux car elle concerne les biomédicaments en général. On dénombrait en France au 31 mai 2014, 173 biomédicaments commercialisés.

Comme le montre la figure 26 les anticorps monoclonaux représentent 17% du total de ces biomédicaments avec 26 médicaments. On estime que 45 % sont destinés à la cancérologie, 6 % en pneumologie, 5 % en gastroentérologie et 5 % en dermatologie [41].



Figure 26 : Classification pharmacologique des 173 biomédicaments commercialisés en France au 31 mai 2014 [39]

826 biomédicaments sont en développement en 2013, dont une part très importante est représentée par les anticorps monoclonaux avec 338 molécules.

Si l'on s'intéresse au chiffre d'affaires des biomédicaments par classe thérapeutique, les anticorps monoclonaux représentent seulement 17 % du marché mais

correspondent au chiffre d'affaires le plus élevé (2,8 milliards d'euros), soit une hausse de +8 % par rapport à 2013 (figure 27).



Figure 27: Chiffre d'affaires total des biomédicaments par classe pharmaceutique en CMA (Cumul Mobile Annuel) de 05/2010 à 05/2014 [39]

En France, dans la période de mai 2013 à mai 2014, le chiffre d'affaires total des biomédicaments est supérieur à 5,5 milliards d'euros. Ce chiffre d'affaires se partage de façon égale entre la ville (2,9 milliards) et l'hôpital (2,6 milliards), les anticorps monoclonaux ayant 51 % de cette part de marché (figure 28).



Figure 28 : Chiffre d'affaires total des biomédicaments par classe pharmaceutique en pourcentage de mai 2013 à mai 2014 [39]

En résumé avec 26 molécules, soit 17% du total des biomédicaments, les anticorps monoclonaux sont les molécules sur lesquelles la recherche est la plus importante et surtout ils représentent à eux seuls la moitié du chiffre d'affaires total des biomédicaments entre mai 2013 et mai 2014 avec 2,8 milliards d'euros.

IV. Applications industrielles

La biolayer interferometry est à la base une technique destinée à la production industrielle mais aussi aux laboratoires de recherche. Nous avions pour volonté de présenter dans cette partie les diverses applications que l'on pouvait rencontrer au sein de l'industrie pharmaceutique. Cependant il est difficile, voire même dans la grande majorité des cas impossible, d'obtenir des informations sur les procédés ou techniques utilisés pour la mise au point de ces médicaments. Nous allons donc présenter de façon générale le cycle de vie permettant la mise sur le marché d'un anticorps monoclonal, de l'identification de la cible jusqu'à la forme commerciale. Cela permettra de mettre en avant l'utilisation de la biolayer interferometry aux étapes clef de la conception des anticorps monoclonaux.

Le cycle permettant l'arrivée d'un médicament sur le marché peut être segmenté en trois grandes étapes : la partie recherche et développement, la partie procédé et enfin la partie formulation.

IV.1 Recherche & Développement

IV.1.1 Identification d'une cible

Comme nous l'avons dit précédemment les anticorps monoclonaux sont dirigés contre un seul marqueur. Il est donc nécessaire d'identifier une cible « caractéristique » d'une pathologie. Le marqueur doit être le plus spécifique possible de la maladie pour éviter tout dommage sur les tissus ou autres effecteurs sains du corps humain. C'est une étape longue qui est généralement le fruit du travail d'entités publiques qui lors de recherches sur telle ou telle pathologie mettent en avant l'expression de marqueurs particuliers ou leur surexpression.

IV.1.2 Recherche de l'anticorps

Les techniques utilisées pour produire un anticorps sont dépendantes du type d'anticorps que l'on désire produire. Il s'agit de l'étape de screening conduisant à la sélection de l'hybridome. Il va falloir choisir celui qui produit l'anticorps répondant le mieux aux attentes et cela nécessite généralement des études d'affinité.

IV.1.3 Place de la biolayer interferometry

La biolayer interferometry peut être utilisée au niveau de la R&D comme le montre l'étude effectuée par Bai et al. [42] où les auteurs ont généré des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine de liaison du ligand extracellulaire de FGFR2. Les analyses réalisées sur l'Octet QK[®] ont révélé une liaison spécifique d'un anticorps très puissant appelé GP369 à FGFR2 - IIIb. La BLI est ici utilisée pour étudier l'affinité des anticorps.

IV.2 Procédés

Le procédé peut être scindé en deux parties : l'upstream et le downstream. Comme le montre la figure 29 cela correspond à une longue succession d'opérations.



Figure 29: Schéma d'un procédé de fabrication d'anticorps monoclonal [43]

IV.2.1 Upstream

L'upstream est la partie qui consiste à produire l'anticorps. Elle s'arrête juste avant la purification.

Il débute par la préparation du milieu de culture qui doit permettre d'atteindre une concentration cellulaire optimale à inoculer dans le bioréacteur servant à la production. L'échantillon de quelques cellules subit une croissance cellulaire qui s'opère par des passages successifs dans des contenants de taille de plus en plus importante. La durée moyenne de cette étape est de 4 à 5 jours. Les cellules utilisées pour la production des anticorps peuvent provenir de différentes origines : cellules ovariennes de hamster (CHO), cellules de souris (NS0, Sp2/0 Myélome) ou encore des cellules humaines (PerC6).

Ce milieu de culture ayant subi une amplification (croissance cellulaire) peut alors être placéedans le bioréacteur final pouvant être à usage unique (poches en plastiques pour des volumes inférieurs à 10 L) ou des cuves inox ayant des capacités allant jusqu'à 2000 L. La production demande un pilotage très précis de nombreux paramètres : le CO₂ dissous, l'oxygène dissous, la température, le pH via l'utilisation de sondes de mesure et de dispositifs d'échantillonnage permettant de réaliser des contrôles divers : concentration en substrat, en biomasse, densité d'ensemencement cellulaire. Après 1 à 3 jours de réaction, la production du lot prend fin.

L'étape suivante est appelée « clarification primaire ». Elle consiste en la séparation entre l'anticorps, les cellules et les déchets. Il y a alors deux cas possibles :

- la protéine d'intérêt est restée à l'intérieur de la cellule (expression intracellulaire). Ce cas est le moins favorable, mais le plus fréquent. Il faut alors récupérer la biomasse et éliminer le milieu de culture, puis procéder à la lyse des cellules par sonification, congélation/décongélation ou bien par contraintes mécaniques,
- soit la protéine a été sécrétée (expression extracellulaire). Il faut alors récupérer le milieu de culture et non la biomasse. C'est le cas des cellules CHO d'ovaires de hamster qui sont très utilisées en production d'anticorps monoclonaux.

Ainsi quelle que soit l'expression intra ou extracellulaire, des opérations de centrifugation et de filtration permettant d'isoler l'anticorps sont nécessaires. Une filtration tangentielle est souvent ajoutée pour concentrer le filtrat avant de passer à l'étape suivante.

IV.2.2 Downstream

Cette partie a pour objectif de réaliser une purification complète de la biomolécule. On y trouve principalement des étapes de chromatographie.

La purification démarre par une étape de chromatographie d'affinité où la protéine est retenue sur le support. Après cette première étape chromatographique le taux de pureté avoisine les 90 %. Vient alors une étape de filtration tangentielle facultative mais qui permet de réduire le volume à éluer. On retrouve généralement ensuite une chromatographie échangeuse d'ions. A l'issue de cette chromatographie, les protéines non recherchées, les sels ou d'éventuels résidus sont éliminés. Le taux de pureté peut alors être évalué à 99 %.

La dernière purification est appelée « polishing ». C'est une étape dite de chromatographie hydrophobe, destinée à éliminer des impuretés à l'état de traces comme des substances étroitement apparentées à la protéine cible (polymères, fragments et autres formes mal repliées).

Enfin, une filtration stérilisante conduit à un produit dont la pureté tend vers les 100 %. Le but étant de s'assurer de l'absence de produits dangereux et d'une conformité à une qualité pharmaceutique.

IV.2.3 Place de la biolayer interferometry

La BLI n'est pas une technique de premier plan au niveau de la production et de la purification de l'anticorps. Cependant elle intervient à des moments clefs de ces procédés. Elle va permettre au cours de l'upstream de suivre la quantité de protéines d'intérêt sécrétée. Legmann et coll. [44] ont mené une étude prédictive sur un modèle réduit de production d'anticorps monoclonal par des cellules ovariennes de hamster (CHO). La BLI peut aussi être utilisée pour quantifier l'anticorps brut à la fin du downstream, cependant aucune information n'est présente dans la littérature.

IV.3 Formulation

Cette étape fait appel aux compétences dans le domaine de la galénique. Les anticorps monoclonaux se trouvent sous forme de solution, de poudre ou de lyophilisat. Ces produits étant destinés à la voie parentérale, ils doivent être préparés selon des conditions d'asepsie strictes au niveau des zones d'air contrôlé.

Le tableau XI est un document fournis par Fortebio regroupant les différents secteurs et l'utilisation qui est faite de la BLI.

Quantification des protéines et anticorps								
Secteur	R	&D		Upstream		Do	wnstrem	Principe actif purifié en vrac
Domaine	Découverte d'ant Screening d'hyt	de protéine & icorps- pridome ou phage	Culture c	ellulaire	Culture cellulaire (scale up)	Purification	Analyse des impuretés	Contrôle qualité
Utilisation	Dépistage Vérifier la quantification pour 1) Le taux de dépistage ou d'affinité 2) Des tests fonctionnels pour comparer l'activité	 Sélectionner les clones de mammifères sur la base des titres transitoires en bioréacteurs Connaitre la concentration avant purification par CLHP à petite échelle pour une caractérisation plus poussée et des études <i>in vivo</i> 	Optimiser et déterminer les meilleures conditions de croissance, y compris les facteurs de croissance, vecteurs, etc	Sélectionner des clones de mammifères sur la base de l'expression (1-300 µg/L)	Sélectionner le clone qui sera utilisé pour les études cliniques (1-10 g/L)	Mesurer la quantité de Ab / protéines aux différentes étapes de purification	Mesurer des traces d' ADN , HCP, ou les niveaux de protéine A résiduels	Quantifier pour déterminer la puissance de la molécule de médicament

V. Contrôle des préparations hospitalières à base d'anticorps monoclonaux

Nous allons nous concentrer uniquement sur les formes reconstituées avant injection aux patients, c'est-à-dire les solutions à diluer, les poudres pour solutions injectables et les lyophilisats pour solutions injectables. Cela concerne majoritairement les anticorps monoclonaux utilisés en oncologie. Ils sont classés dans l'hôpital avec les médicaments cytotoxiques et répondent donc à des normes particulières. Du fait de leur dangerosité, ces médicaments ont un circuit distinct des autres médicaments hospitaliers : stockage dans une pièce spécifique, préparation dans des locaux prévus à cet effet (unité centralisée de préparation des cytotoxiques [UCPC]) selon les Bonnes Pratiques de Préparation [45] et les Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière [46], avec une traçabilité des prescriptions et des préparations.

Nous allons faire le point sur le contrôle des anticorps monoclonaux à l'hôpital et voir les évolutions possibles notamment grâce à l'utilisation de la BLI.

V.1 Techniques actuelles de contrôle des préparations à base d'anticorps monoclonaux

Le contrôle analytique post-fabrication des préparations de cytotoxiques se fait par le biais de différentes techniques. L'analyse de la littérature [47 - 50] montre qu'il existe actuellement, en France, 4 façons d'effectuer le contrôle. Trois d'entre elles découlent d'une méthode basée sur le principe du flow injection analysis (FIA). Il s'agit de la technique usuellement nommé FIA-DAD, du Multispec[®] et du QC Prep+[®]. La 4^{ème} utilise le Raman (RXN1 analyser[®]). Toutes ces techniques sont basées sur du contrôle physico-chimique. Il est important de rappeler que ces contrôles s'effectuent entre la préparation et la délivrance, ils doivent donc être effectués rapidement. On estime qu'un échantillon doit pouvoir être contrôlé en 3 à 5 minutes maximum ce qui réduit considérablement le nombre de techniques pouvant être utilisées.

Seules deux techniques principales sont actuellement mises en œuvre pour le contrôle des anticorps monoclonaux : il s'agit du Multispec [48] et du QcPrep+ [50].

V.1.1 Multispec[®]

Le Multispec[®] (arrêt de commercialisation en 2011) repose sur un système d'analyse en flux (FIA) couplé à un spectrophotomètre UV-visible fonctionnant en tandem avec un spectrophotomètre IR-TF (987 à 3000 cm⁻¹). Le prologiciel comporte deux modules : « Multispec[®] Analyse » qui permet l'acquisition et « Multispec[®] Librairie et Quantification » qui permet le traitement de l'information. Ce système existe dans un nombre important de laboratoires de PUI (au moins 18 [51]) et son application au contrôle des préparations cytotoxiques est largement répandue dans la littérature [48] [52] [53].

Le Multispec[®] a fait l'objet d'une étude poussée dans le domaine du contrôle des anticorps monoclonaux par Bazin et al. [48]. Il est théoriquement possible grâce à l'infrarouge d'identifier une protéine. Cependant les solutions soumises au contrôle se trouvent dans du NaCl 0,9 % ou dans du glucose 5 %, donc dans un vecteur aqueux qui entraîne de grandes interférences en IR et empêche donc toute identification directe.

Comme le montrent les figures 30 et 31, que ce soit en UV ou en IR, il n'y a pas de réelles différences entre les spectres obtenus pour le bevacizumab, le rituximab, le trastuzumab, le panitumumab et le cetuximab, même au niveau des zones de contrôle spécifiques en IR (zones encadrées). L'étude vise à comparer trois bibliothèques de spectres IR différentes pour l'identification des anticorps monoclonaux. La première est celle fournie avec l'appareil, la seconde est issue des gammes d'étalonnage réalisées à partir des spécialités et la troisième est une bibliothèque dans laquelle les bandes de reconnaissance ont été choisies de façon discriminante.



Figure 30: Spectres des anticorps en UV : bevacizumab (bleu), rituximab (noir), trastuzumab (marron), panitumumab (vert), cetuximab (rouge) [48]



Figure 31 : Spectre des anticorps en IR et domaines spectraux de la bibliothèque finale : bevacizumab (bleu), rituximab (noir), trastuzumab (marron), panitumumab (vert), cetuximab (rouge) [48]

L'utilisation des spectres de dérivée première avec les bibliothèques A et B ne fournit pas d'identification significative au contraire de la bibliothèque C qui permet une identification dans 90±15% des cas (tableau XII). Cependant cela reste insuffisant. De façon surprenante, la comparaison directe des spectres obtenus aux spectres de référence permet d'obtenir 100% d'identification (tableau XIII)

 Tableau XII: Pourcentage de reconnaissance des anticorps dans les trois bibliothèques sur 15 échantillons en utilisant le calcul de corrélation par dérivée première. [48]

	Pourcentage de reconnaissance correcte par calcul en dérivée première				
Anticorps	Bibliothèque A (%)	Bibliothèque B (%)	Bibliothèque C (%)		
Bevacizumab	100	0	93		
Cetuximab	0	100	100		
Panitumumab	0	0	100		
Rituximab	0	0	60		
Trastuzumab	53	100	96		

 Tableau XIII : Pourcentage de reconnaissance des anticorps dans la bibliothèque C sur 15 échantillons selon les différents modes de calcul de corrélation.[48]

Anticorps	Corrélation directe (%)	Dérivée première (%)	Différences de dérivées secondes (%)	Combinaison des trois modes de corrélation (%)
Bevacizumab	100	93	100	73
Cetuximab	100	100	100	100
Panitumumab	100	100	100	100
Rituximab	100	60	0	93
Trastuzumab	100	96	80	100

Les auteurs ont par la suite effectué une identification avec un pool d'excipients caractéristique de chaque spécialité. Comme le montre le tableau XIV les pools d'excipients permettent de reconnaître la spécialité en cause malgré une corrélation spectrale en infrarouge variant de 60,1 à 87,9 %.

Tableau XIV : Pourcentage de reconnaissance et de corrélation de recherche en bibliothèque pour les excipients seuls (n=1) ou en mélange (n=10) contenus dans les quatre spécialités (Mabthera®, Herceptin®, Vectibix® et Avastin®)[48]

Anticorps	Excipients	% de reconnaissance Moyenne ± SD	$\%$ de corrélation Moyenne $\pm{\rm SD}$
Herceptin®	Tréhalose	100	27,7
	Histidine/Histidine HCl	100	59,4
	Polysorbate 20	100	50,85
	Mélange des 3 excipients	83,3±40,8	60,1±8,3
Mabthera®	Citrate de sodium	100	90,6
	Polysorbate 80	0 (Herceptin®)	74,2
	Mélange des 2 excipients	100±0,00	77,8±5,1
Avastin®	Tréhalose	100	62,1
	Polysorbate 20	0 (Herceptin®)	50,9
	Mélange des 2 excipients	83,3±40,8	57,5±6,4
Vectibix [®]	Acétate de sodium	100	87,9

En conclusion, il s'agit d'une technique efficace qui permet la quantification par UV à 285 nm et l'identification des anticorps par IR. Actuellement, elle permet de contrôler : alemtuzumab, bévacizumab, cétuximab, gemtuzumab, ozogamycin, panitumumab, rituximab et trastuzumab. Cependant cette identification repose plus sur la

reconnaissance des excipients de formulation que sur la reconnaissance du principe actif (anticorps monoclonal) ce qui reste problématique à l'heure de l'arrivée sur le marché des biosimilaires.

V.1.2 QC Prep+®

L'équipement QcPrep+ analyser[®] (C.E.C.A, F-95590 Presles) repose sur la FIA associée à la spectrophotométrie UV-visible et à la spectrophotométrie Raman. La source UV-visible est une lampe au deutérium haute luminosité (180–1100 nm) et le détecteur est de type CCD (180 à 405 nm). La source Raman est un laser de 785 nm avec un détecteur CCD (800 à 1050 nm). Le prologiciel de pilotage comprend trois modules : « QC Analyses » permettant l'acquisition, « QL Analyst » module d'étalonnage et de librairie spectrale et enfin « QS Validation » permettant le suivi de production. Cette méthode est la dernière arrivée sur le marché ; elle représente l'évolution du Multispec[®]. Ici contrairement au Multispec[®], le Raman ne fonctionne pas en tandem avec l'UV/visible. Le recours au Raman a uniquement lieu quand l'UV/Visible ne permet pas d'identifier le composé. Le couplage des deux méthodes permet à la fois de résoudre le problème des molécules sans spectre Raman et de s'affranchir des limites de l'IR rencontrées en milieu aqueux [50].

Appareil apparu récemment sur le marché, il y a encore peu de références dans la littérature. Mais après contact avec le fabricant, celui-ci assure qu'il est capable d'identifier les anticorps monoclonaux de la même façon que le Multispec[®].

V.2 Biolayer interferometry : étude de l'application au contrôle des anticorps monoclonaux.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les techniques actuelles du contrôle des anticorps monoclonaux en milieu hospitalier est basée sur la formulation des spécialités ce qui à terme avec l'arrivée sur le marché des biosimilaires sera problématique. La biolayer interferometry permet l'obtention d'une réponse directement fournie par l'interaction de l'anticorps monoclonal avec un biocapteur. Après contact avec Fortebio, fabricant de ces appareillages, nous avons pu obtenir le prêt de deux appareils : un BLItz et un Octet QK^e.

Nous allons à présent décrire l'étude réalisée ayant pour but de positionner l'utilisation de la biolayer interferometry pour l'identification et le dosage d'anticorps monoclonaux en routine.

V.2.1 Matériel

V.2.1.1 Réactifs

Les différents biocapteurs utilisés ont été : Protéine A (liant la partie Fc), Protéine G (liant la partie Fc), Protéine L (liant la partie VL), Anti-human Fab-CH1 (liant la partie VH) (Fab-CH1) et Anti-human IgG Fc (liant la partie Fc) (AHC).

Les différents anticorps utilisés pour les tests sont répertoriés tableau XV.

DCI	Nom commercial	Laboratoire	Dosage	Prix du flacon (€)	Туре
Cetuximab	Erbitux®	Merck Serono	5 mg/mL	823,921	Chimérique
Rituximab	Mabthera [®]	Roche	10 mg/mL	263,67	Chimérique
Brentuximab vedotine	Adcetris®	Takeda Pharma A/S	5 mg/mL	3 150	Chimérique
Eculizumab	Soliris®	Alexion Pharma	10 mg/mL	4 350	Humanisé

Tableau XV : Anticorps utilisés pour les tests

Solvant : dans toutes les expériences, NaCl 0,9 % sera le seul solvant utilisé.

V.2.1.2 Appareils

V.2.1.2.1 Description du système BLItz

Le BLItz (figure 32) est un appareil relativement compact (17,4 cm x 15,3 cm x 22,2 cm pour un poids de 3,3 kg). La source optique est une LED émettant de la lumière blanche. Son fonctionnement est relativement simple. Il s'agit dans un premier temps de déposer à l'aide d'une pipette une goutte d'environ 4 μ L de l'échantillon que l'on désire tester au niveau de la pièce noire (figures 33 et 34) qui est en fait un puits (amovible) dans lequel la détermination sera effectuée.




Figure 32 : Système BLItz 1 [55]

Figure 33 : Système BLItz 2 [55]



Figure 34 : Système BLItz 3 [55]

Après avoir déposé la goutte, il faut mettre en place le biocapteur désiré en évitant de mettre les doigts au niveau de l'extrémité basale qui est la partie qui sera plongée dans la solution à tester (figure 35), puis lancer l'analyse sur l'ordinateur fonctionnant en tandem avec le BLItz.



Figure 35 : Système BLItz 4 [55]

L'acquisition, l'exploitation et l'analyse des données sont effectuées grâce au logiciel BLItz® Pro (figure 36) qui guide l'utilisateur, réduisant ainsi considérablement le temps passé sur la configuration expérimentale et l'examen des données.



Figure 36 : BLItz software [55]

Les principales fonctionnalités sont les suivantes :

- afficher en temps réel les données pour la visualisation immédiate des événements de liaison,
- effectuer l'analyse cinétique des interactions de liaison biomoléculaire, pour déterminer les constantes d'association k_a, de dissociation k_d et d'affinité K_D,
- effectuer la quantification rapide en utilisant des courbes étalons générées sur le système BLItz,
- les données acquises peuvent être extraites,
- les utilisateurs peuvent générer des rapports complets,
- toutes les expériences conçues dans le logiciel Blitz Pro[®] peuvent être sauvegardées pour une utilisation future.

Cet appareil constitue l'entrée de gamme : 1 seule détermination à la fois, pas de possibilité d'étudier la dissociation sur le même puits car il est nécessaire de changer l'échantillon utilisé pour l'association par une solution tampon pour permettre la dissociation.

Le prix de de l'appareil est d'environ 20000€ et le coût du test correspond au prix du sensor utilisé pour le test.

V.2.1.2.2 Description sur système Octet QKe

Cet appareil est plus volumineux (47 x 43 x 53 cm pour un poids de 23 kg) (figure 37). La source optique est une LED émettant de la lumière blanche.

Le prix de de l'appareil est d'environ 110000€ et le coût du test correspond au prix du sensor utilisé pour le test.



Figure 37 : Octet QKe [56]

Les capacités de cet appareil sont supérieures. Il fonctionne avec une plaque de 96 puits et peut effectuer jusqu'à 8 analyses simultanées (8 biocapteurs en parallèle). Les modalités de travail sont les mêmes que précédemment décrites, cependant le volume d'échantillon nécessaire est de 100 µL au lieu de 4 µL. Par contre, ce volume est réutilisable, car non pipeté, ni contaminé par le biosensor

La principale différence entre les deux appareils se situe au niveau des études cinétiques. Les courbes association/dissociation peuvent être réalisées en une seule fois, contrairement au système BLItz.

Le logiciel d'acquisition est lui aussi différent : il s'agit du Data acquisition software (figure 38). Il a des fonctionnalités supérieures dues aux capacités de l'appareil avec lequel il fonctionne en tandem.



Figure 38 : Octet Software [56]

V.2.2 Tests sur la quantification

V.2.2.1 Notions importantes

Il faut dans un premier temps prendre connaissance de la gamme de concentration dans laquelle ces deux appareils fonctionnent. En effet, le Blitz effectue des dosages pour des concentrations comprises entre 0,5 μ g/mL et 1250 μ g/mL et l'Octet entre 0.1–700 μ g/mL [57].

Cela est très important du fait des concentrations thérapeutiques des anticorps monoclonaux. Par exemple, pour le Rituximab, anticorps le plus utilisé, l'intervalle thérapeutique est de 1 à 4 mg/mL soit en considérant 150 000 g/mol comme masse moléculaire moyenne, un intervalle de 6 à 24 µM ce qui est largement supérieure à la gamme d'analyse de l'appareillage. Il faudra donc préalablement diluer au 20^{ème} (V/V) pour le système Blitz et au 50^{ème} (V/V) pour l'Octet tous les échantillons testés, même si cette dilution n'est pas nécessaire elle est réalisée du fait de la quantité limitée d'échantillons à disposition.

V.2.2.2 Quantification sur le système BLItz

La quantification n'a été réalisée que sur le Rituximab. Une gamme étalon a été réalisée à partir de la spécialité (10 mg/mL). La première dilution de cette spécialité a été réalisée au 20^{eme} (V/V) afin d'obtenir une solution mère à 500 µg/mL. Puis des dilutions ont été effectuées pour obtenir la gamme suivante : 0, 40, 90, 140, 190 et 240 µg/mL.

Le biocapteur utilisé a été celui où la protéine A est immobilisée. Du fait de son affinité pour les IgG, il est largement utilisé pour la quantification des anticorps monoclonaux. De plus, ce biocapteur est régénérable.

Les sensorgrammes obtenus (figure 39) représentent l'évolution de la liaison au cours du temps.



Figure 39: Sensorgrammes de la gamme étalon de Rituximab (40 à 240 µg/mL)

A partir des sensorgrammes, le logiciel permet d'établir une courbe d'étalonnage (figure 40).



Figure 40 : Courbe d'étalonnage du rituximab

On trouve en plus sur cette figure deux points rouges qui correspondent aux deux échantillons inconnus testés. Ces deux échantillons sont des prélèvements faits sur des préparations destinées à être injectées à des patients. Dans une optique de validation de la délivrance à \pm 15 % de la valeur cible, ces deux préparations auraient été jugées conformes (tableau XVI).

Echantillon	Concentration observée (µg/mL) Dilution au 1/20	Concentration réelle (µg/mL)	Concentration attendue (µg/ml)	Ecart relatif (%)
1	102,5	2 050	2 000	+ 2,5 %
2	115,8	2 316	2 066	+ 12,1 %

Tableau XVI : Dosages de deux préparations de rituximab

V.2.2.3 Quantification sur le système Octet QK^e

La quantification n'a été réalisée que sur le Rituximab. Une gamme étalon a été réalisée à partir de la spécialité (10 mg/mL). La première dilution de cette spécialité a été réalisée au 50^{eme} (V/V) afin d'obtenir une solution mère à 200 µg/mL. Des dilutions successives ont été réalisées pour obtenir la gamme suivante : 0, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 et 200 µg/mL.

Deux types de biocapteurs ont été utilisés : protéine A et protéine G (Liaison spécifique avec les IgG de mammifères).

V.2.2.3.1 Résultats obtenus pour la protéine A

Sur la figure 41 les points en bleu correspondent à la gamme d'étalonnage et en rouge aux échantillons.



Figure 41: Courbe d'étalonnage du rituximab (capteur protéine A)

Sur les tests avec les biocapteurs protéine A, on constate pour les échantillons 3 et 6 des écarts relatifs très importants, vraisemblablement dus à une erreur de dilution de la part de l'opérateur (facteur 2). Les valeurs sans et avec correction sont dans les normes de libération fixées à l'hôpital (± 15 %) (Tableau XVII).

Tableau XVII : Résultats des différents dosages sur l'Octet QK^e avec le biocapteur Protéine A Les résultats marqués d'un astérisque ont été corrigés en supposant une erreur de manipulation d'un facteur 2 lors des dilutions

Echantillon	Concentration calculée (µg/mL)	Concentration attendue (µg/mL)	Ecart relatif (%)
1	1 923	2 000	- 3,8
2	1 949	2 066	- 5,6
3	1 685 (3370*)	3 083	- 45,3 (+ 9,3*)
4	2 049	2 200	- 6,9
5	2 177	2 400	- 9,3
6	1 802 (3604*)	3 500	- 48,5 (+ 3,0*)

V.2.2.3.1 <u>Résultats obtenus pour la protéine G</u>

Sur la figure 42 les points en bleu correspondent à la gamme d'étalonnage et en rouge aux échantillons.





Les tests avec les biocapteurs protéine A et protéine G ont été effectués avec les mêmes échantillons mais à un jour d'intervalle. On constate comme pour le biocapteur protéine A pour les échantillons 3 et 6 des écarts relatifs très importants, vraisemblablement dus à une erreur de dilution de la part de l'opérateur (facteur 2). Les valeurs sans et avec correction sont dans les normes de libération fixées à l'hôpital (± 15 %) (tableau XVIII).

Echantillon	Concentration calculée (µg/mL)	Concentration attendue (µg/mL)	Ecart relatif (%)
1	1 986	2 000	- 0,7
2	1 993	2 066	- 3,5
3	1 689 (3278*)	3 083	- 45,2 (+ 6,3*)
4	2 126	2 200	- 3,4
5	2 344	2 400	- 2,3
6	1 856 (3712*)	3 500	- 46,9 (+ 6,1*)

Tableau XVIII : Résultats des différents dosages sur l'Octet QK^e avec le biocapteur Protéine G. Les résultats marqués d'un astérisque ont été corrigés en supposant une erreur de manipulation d'un facteur 2 lors des dilutions

Il faut aussi préciser qu'après avoir rentré dans le logiciel la gamme d'étalonnage comme référence, chaque point a été repassé et une superposition parfaite a été obtenue que ce soit pour le biocapteur A ou G. Ceci atteste de la robustesse de la mesure et laisse penser que les écarts relatifs observés peuvent être imputés aux imprécisions des différentes étapes de préparation de l'anticorps par les préparateurs mais aussi aux imprécisions dues à l'opérateur ayant effectué les dilutions pour les gammes et les échantillons.

V.2.2.3.2 Influence de l'opérateur

Dans le but d'étudier les biais pouvant être introduits par la façon de manipuler de l'opérateur ainsi que par le protocole de dilution choisi, nous avons procédé à des tests complémentaires. Deux opérateurs différents ont réalisé des gammes d'étalonnage et la dilution des échantillons selon deux modes opératoires différents :

- le premier protocole consiste à préparer une gamme de 1 à 5 mg/ mL à partir de la spécialité puis à diluer chacune de ces solutions au 50^{ème} V/V (Exp.1).
- le second consiste à préparer directement une solution à 100 µg/ mL puis à effectuer des dilutions successives jusqu'à 20 µg/mL (Exp.2)

Dans les deux cas, la gamme étalon va de 20 μ g/ mL à 100 μ g/ mL. Les échantillons sont quant à eux dilués au 50^{ème} (V/V).

Il ressort de cette analyse (tableau XIX) qu'une variabilité est observée en fonction de l'opérateur et du protocole appliqué.

	Opérateur 1		Opérateur 2		Concentration
Echantillon	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	attendue
	Conc	entration c	alculée (µg	J/mL)	(µg/mL)
1	2 604	2 817	2 836	2 887	2 600
	(+ 0,2 %)	(+ 8,3 %)	(+ 9,1 %)	(+ 11,0 %)	2 000
2	2 998	3 254	3 294	3 315	3 070
2	(-2,3 %)	(+ 6,0 %)	(+ 7,3 %)	(+ 8,0 %)	0 01 0
3	2 002	2 142	2 150	2 247	2 000
Ũ	(+ 0,1 %)	(+ 7,1 %)	(+ 7,5 %)	(+ 12,4 %)	2 000
4	2 270	2 440	2 449	2 526	2 200
	(+ 3,2 %)	(+ 10,9 %)	(+ 11,3 %)	(+ 14,8 %)	~ ~
5	2 315	2 490	2 501	2 574	2 200
	(+ 5,2 %)	(+ 13,2 %)	(+ 13,7 %)	(+ 17,0 %)	~ ~
6	2 552	2 758	2 775	2 830	2 400
	(+6,3 %)	(+ 14,9 %)	(+ 15,6 %)	(+ 17,9 %)	

Tableau XIX : Résultats en fonction de l'opérateur et du protocole appliqué

L'opérateur 1 était la personne de ForteBio plus expérimentée car rodée à ce type de manipulation et à l'utilisation de l'appareil. Les résultats de l'opérateur 2 sont systématiquement supérieurs et 3 non-conformités ont été constatées (> 15 %). L'expérience 1 donne des résultats plus proches de ceux attendus que l'expérience 2. Cela vient probablement du fait que la gamme étalon est réalisée de la même façon que les échantillons, c'est-à-dire préparation dans un premier temps d'une solution comprise entre 1 et 5 mg/ mL puis dilution au 50^{ème} (V/V). Ainsi les biais introduits par le protocole sont minimisés. Ces tests ont été effectués avec l'Octet QK^e.

V.2.2.3.3 Effets de la régénération des biocapteurs sur la quantification

Le biocapteur Protéine A est régénérable et nous avons étudié l'influence de la régénération sur la reproductibilité des analyses.

Le protocole de régénération consiste à effectuer 5 cycles successifs, chacun comportant une incubation de 5 secondes dans le tampon de régénération (glycine

10 mM) suivie d'une incubation de 5 secondes dans le solvant de l'analyte (NaCl 0,9 %).

5 des 6 échantillons précédents ont été analysés avec des biocapteurs protéine A régénérés à 2 reprises. La détermination des concentrations a été effectuée en utilisant la courbe d'étalonnage du rituximab réalisée lors du premier dosage (première utilisation du biocapteur protéine A). Les résultats sont regroupés dans le tableau XX.

Echantillon	Concentration calculée (μg/mL) après 2 régénérations	Concentration calculée (µg/mL) biocapteur neuf	Concentration attendue (µg/mL)	Pourcentage de variation entre les deux mesures
1	2 038	1 923	2 000	+ 6,0 %
2	1 949	1 949	2 066	0,0 %
4	2 059	2 049	2 200	+0,5 %
5	2 266	2 177	2 400	+ 4,1 %
6	1 855 (*)	1 802 (*)	3 500	+ 2,9 %

 Tableau XX: Comparaison des résultats obtenus avant et après régénération du biocapteur protéine A

 (*) Erreur de dilution

L'écart observé entre les mesures effectuées est globalement positif (5 cas sur 6) avec un maximum de 6,0 %. On peut émettre l'hypothèse que le protocole de régénération ne conduit peut être pas à une dissociation totale de l'anticorps. Cet écart de 6,0% reste problématique dans une perspective de libération de la préparation hospitalière à \pm 15%. Il serait donc nécessaire d'optimiser le protocole de régénération dans une future étude.

V.2.3 Essais d'identification de l'anticorps monoclonal

Les différents anticorps réagissant avec les biocapteurs de même nature, leur identification peut être envisagée cinétique à partir ďun profil (association/dissociation) différent et caractéristique d'un anticorps donné. Pour cette étude nous disposons de 4 anticorps monoclonaux : le rituximab, l'eculizumab, le brentuximab vedotine et le cetuximab. Ils seront testés avec 5 biocapteurs différents : Protéine A (liant la partie Fc), Protéine G (liant la partie Fc), Protéine L (liant la partie VL), Anti-human Fab-CH1 (liant la partie VH) (Fab-CH1) et Antihuman IgG Fc (liant la partie Fc) (AHC).

Les constantes d'association, de dissociation et d'affinité ne seront pas déterminées, faute de temps et de réactifs, car ces mesures nécessitent de tester plusieurs concentrations pour chaque anticorps.

Nous allons étudier le caractère discriminant de l'étape d'association, puis celle de l'étape de dissociation à concentration unique. Ces tests ont été exécutés sur l'Octet QK^e avec des solutions en anticorps monoclonaux à la concentration de 333 µg/mL.

Les paramètres qui seront déterminés pour l'étape d'association sont :

- le déplacement spectral au bout de 120 s d'interaction
- la pente à l'origine mesurée en nm/s entre 0 et 2,5 s à l'exception de l'interaction avec le biocapteur Fab CH1 pour lequel la mesure est effectuée entre 0 et 5 s.
- Le modèle mathématique avec l'équation de la courbe

Les paramètres qui seront déterminés pour l'étape de dissociation sont :

- le déplacement spectral au bout de 300 s d'incubation,
- la pente à l'origine mesurée en nm/s entre 0 et 10 s.

Pour la modélisation mathématique de l'étape d'association nous sommes partis de l'équation générale :

$$y = R_{max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a[Analyte]}} \left(1 - e^{-(k_a[Analyte] + k_d)t}\right)$$

Pouvant être simplifiée :

$$y = A(1 + e^{-k_{obs}t})$$

Avec

$$k_a[Analyte] + k_d = k_{obs}$$

$$R_{max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a [Analyte]}} = A$$

A pouvant être considéré comme le déplacement spectral maximal observé pour un temps infini à une concentration en analyte donné.

k_{obs} : constante cinétique régissant l'étape d'association pour une concentration en analyte donné.

Du fait du nombre réduit d'expériences il nous était impossible de déterminer les constantes du modèle cinétique (k_d, k_a et K_D). Nous avons donc récupéré 14 couples déplacement spectral (y) temps (t) à partir des graphiques, par lecture manuelle. Et nous avons par Matlab[®] déterminé les trois inconnues de nos équations : y_o, A et k_{obs}.

Matlab[®] est un logiciel permettant la résolution numérique de systèmes mathématiques complexes ou n'ayant pas de solution analytique. Le programme codé utilise la fonction « fmincon » fonction intrinsèque du programme utilisant une méthode de type quasi newton le L-BFGS. Cette fonction a pour but de minimiser fonction mathématique. En l'occurrence ici il s'agit de la fonction « ecart » :

$$ecart = \left(\frac{Val_{exp} - Val_{theo}}{Val_{theo}}\right)^{2}$$

Val exp : valeurs expérimentales

VAI theo : valeurs théoriques

Pour cela fmincon fait varier les valeurs des deux constantes (k_{obs} et A) jusqu'à obtenir les conditions les plus satisfaisantes.

Il est aussi déterminé un R² qui est le coefficient de corrélation au carré entre le modèle expérimental et théorique.

V.2.3.1 Identification par l'étape d'association

Cette étape consiste à déterminer le biocapteur le plus apte à différencier les différents anticorps. Pour chaque biocapteur, les courbes d'association sont présentées (figures 43 à 47) associées aux tableaux (tableaux XXI à XXV) présentant les valeurs caractéristiques (déplacement spectral et pente), puis d'une exploitation globale de ces résultats est effectuée par comparaison.





Figure 43 : Association avec le biocapteur protéine A

DCI	Déplacement spectral à 120 s (nm)	Pente à l'origine (nm/sec)	Equation de la courbe
Cetuximab	5,22 (3)	0,400	$y = 5,068(1 - e^{-0,099t})$ R ² =0,982
Rituximab	5,33 (2)	0,132	$y = 5,854(1 - e^{-0,027t})$ R ² =0,990
Brentuximab vedotine	5,66 (1)	0,400	$y = 5,387(1 - e^{-0,086t})$ R ² =0,991
Eculizumab	4,33 (4)	0,132	$y = 4,551(1 - e^{-0.03t})$ R ² =0,998

Tableau XXI : Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur protéine A





Figure 44 : Association avec le biocapteur protéine G

DCI	Déplacement spectral à 120 s (nm)	Pente à l'origine (nm/sec)	Equation de la courbe
Cetuximab	4,88	0,400	$y = 4,625(1 - e^{-0,108t})$ R ² =0,982
Rituximab	4,55	0,132	$y = 4,894(1 - e^{-0,033t})$ R ² =0,978
Brentuximab vedotine	5,00	0,400	$y = 4,720(1 - e^{-0,104t})$ R ² =0,982
Eculizumab	4,11	0,114	$y = 4,325(1 - e^{-0,031t})$ R ² =0,994



Figure 45: Association avec le biocapteur protéine L

DCI	Déplacement spectral à 120 s (nm)	Pente à l'origine (nm/sec)	Equation de la courbe
Cetuximab	6,80	0,240	$y = 7,056(1 - e^{-0.053t})$ R ² =0,957
Rituximab	6,05	0,120	$y = 7,051(1 - e^{-0,022t})$ R ² =0,985
Brentuximab vedotine	6,70	0,240	$y = 6,832(1 - e^{-0.053t})$ R ² =0,969
Eculizumab	5,55	0,080	$y = 7,772(1 - e^{-0.013t})$ R ² =0,984

Tableau XXIII: Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur protéine L

V.2.3.1.4. Biocapteur Fab-CH1



Figure 46 : Association avec le biocapteur α-Fab-CH1

DCI	Déplacement spectral à 120 s (nm)	Pente à l'origine (nm/sec)	Equation de la courbe
Cetuximab	2,22	0,088	$y = 2,307(1 - e^{-0,026t})$ R ² =0,996
Rituximab	2,05	0,044	$y = 2,112(1 - e^{-0,027t})$ R ² =0,995
Brentuximab vedotine	2,77	0,088	$y = 2,636(1 - e^{-0.040t})$ R ² =0,988
Eculizumab	0,66	0,011	$y = 1,291(1 - e^{-0,007})$ R ² =0,980

Tableau XXIV : Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur α-Fab-CH1

V.2.3.1.5. Biocapteur α-IgG Fc (AHC)



Figure 47: Association avec le biocapteur α-lgG Fc (AHC)

DCI	Déplacement spectral à 120 s (nm)	Pente à l'origine (nm/sec)	Equation de la courbe
Cetuximab	1,31	0,516	$y = 1,357(1 - e^{-0,115t})$ R ² =0,974
Rituximab	1,27	0,301	$y = 1,248(1 - e^{-0,101t})$ R ² =0,986
Brentuximab vedotine	1,56	0,516	$y = 1,582(1 - e^{-0,115t})$ R ² =0,963
Eculizumab	0,92	0,172	$y = 0.919(1 - e^{-0.079t})$ R ² =0.981

Tableau XXV : Valeurs caractéristiques de l'association avec le biocapteur α -IgG Fc (AHC)

V.2.3.1.2 Exploitation des résultats

• Valeur terminale

L'ordre du déplacement spectral (quantité d'anticorps liée) est croissant de l'éculizimab, au rituximab, au cetuximab puis au brentuximab. Cet ordre est modifié pour le ligand Protéine L pour lequel l'ordre entre brentuximab et cetuximab est

inversé et pour le ligand proteine A ou les cetuximab et rituximab est inversé (tableau XXVI)

DCI	Protéine A	Protéine G	Protéine L	Fab-CH1	α-lgG Fc (AHC)
Cetuximab	5,22 (3)	4,88 (2)	6,80 (1)	2,22 (2)	1,31 (2)
Rituximab	5,33 (2)	4,55 (3)	6,05 (3)	2,05 (3)	1,27 (3)
Brentuximab vedotine	5,66 (1)	5,00 (1)	6,70 (2)	2,77 (1)	1,56 (1)
Eculizumab	4,33 (4)	4,11 (4)	5,55 (4)	0,66 (4)	0,92 (4)

Tableau XXVI : Déplacement spectral après 120 s (nm)

La liaison est beaucoup plus importante pour les capteurs protéines A, G et L par rapport aux capteurs Fab-CH1 et α -IgG Fc (AHC), cette différence pouvant s'expliquer par le fait que les trois premiers capteurs ont une haute affinité pour le Fc humain.

Dans les autres cas, il y a un anticorps ou fragment d'Acs, qui vont créer un encombrement stérique plus rapide que sur les Proteine A, L et G. L'eculizumab, anticorps humanisé, est très peu lié (déplacement spectral < 1 nm) par le ligand Fab-CH1. Cela peut être expliqué par le fait que c'est le seul anticorps humanisé testé. Cependant ce capteur se lie spécifiquement au domaine CH1 de l'IgG humaine il devrait donc avoir une affinité identique, voire supérieure aux autres. Il est aussi important de remarquer que l'éculizumab est l'anticorps le moins affin pour les différents biocapteurs testés. Il y a aussi peut-être un problème d'accessibilité au CH1

Si l'on considère une différenciation possible pour une valeur d'écart de 5% des valeurs maximales obtenues pour chaque biocapteur lors de ces tests, aucun capteur ne permet une différenciation des 4 anticorps sur ce critère, ce qui semble logique, car l'aspect cinétique n'est pas pris en compte par ce paramètre.

• Pente à l'origine

La pente à l'origine rend compte de la vitesse d'association des anticorps aux biocapteurs.

La paire cetuximab/brentuximab n'est pas différenciée avec certitude pour l'utilisation des capteurs protéine A, protéine G, protéine L, Fab-CH1 et α-IgG Fc (AHC). Alors que la paire rituximab/eculizumab n'est pas différenciée avec certitude pour l'utilisation des capteurs protéine A, protéine G.

DCI	Protéine A	Protéine G	Protéine L	Fab-CH1	α-lgG Fc (AHC)	
Cetuximab	0,400	0,400	0,240	0,044	0,516	
Rituximab	0,132	0,132	0,120	0,044	0,301	
Brentuximab vedotine	0,400	0,400	0,240	0,088	0,516	
Eculizumab	0,132	0,132	0,080	0,011	0,172	

Tableau XXVII : Pentes à l'origine pour la phase d'association en nm/sec

Les valeurs de pente à l'origine plus importantes pour les protéines A et G par rapport à la protéine L sont probablement dues à la haute affinité des capteurs A et G. Le capteur Fab CH1 présente la cinétique initiale la plus lente alors que le capteur AHC présente la cinétique initiale la plus rapide. Le capteur Fab- CH1 est le seul à cibler est le domaine CH1 au contraire des 4 autres capteurs qui ciblent la partie Fc, quant au capteur AHC ciblant de façon spécifique les Fc humains, son affinité initiale est meilleure que celle des capteurs A, G et L qui ciblent les Fc de nombreuses espèces.

une différenciation possible pour une valeur d'écart de 5% des valeurs maximales obtenues pour chaque biocapteur

En associant les deux précédents paramètres et en une différenciation possible pour une valeur d'écart de 5% des valeurs maximales obtenues pour chaque biocapteur. On constate que les biocapteurs α-IgG Fc (AHC) et Fab-CH1 permettent une différenciation des anticorps. (tableau XXVIII)

DCI	Protéine A	Protéine G	Protéine L	Fab-CH1	α-lgG Fc (AHC)
Cetuximab	0,400 nm/sec	0,400 nm/sec	0,240 nm/sec	0,088 nm/sec	0,516 nm/sec
	5,22 nm	4,88 nm	6,80 nm	2,22 nm	3,66 nm

Tableau XXVIII : pente à l'origine et valeur terminale pour la phase d'association

Rituximab	0,132 nm/sec	0,132 nm/sec	0,120 nm/sec	0,044 nm/sec	0,301 nm/sec
	5,33 nm	4,55 nm	6,05 nm	2,05 nm	3,55 nm
Brentuximab	0,400 nm/sec	0,400 nm/sec	0,240 nm/sec	0,088 nm/sec	0,516 nm/sec
vedotine	5,66 nm	5,00 nm	6,70 (nm	2,77 nm	4,35 nm
Eculizumab	0,132 nm/sec	0,132 nm/sec	0,080 nm/sec	0,011 nm/sec	0,172 nm/sec
	4,33 nm	4,11 nm	5,55 nm	0,66 nm	2,58 nm

Modélisation mathématique

Si l'on considère une différenciation possible pour une valeur d'écart de 5% des valeurs maximales obtenues pour chaque biocapteur. Le k_{obs} n'est pas discriminant. En effet pour les biocapteurs protéine A, L, G et AHC on constante que les k_{obs} du brentuximab vedotine et du cétuximab sont quasi identique. Pour le biocapteur α-Fab-CH1 il s'agit du cétuximab et rituximab qui présente des k_{obs} similaires. Ces observations concordent avec celles faites pour les pentes à l'origine. Cela étant logique puisque les valeurs de pente à l'origine dépendent principalement du k_{obs}.

Les constations faites pour la valeur du déplacement spectral à 120 sec peuvent être refaite pour la valeur pour un temps infini. Puisque les mêmes paires critiques sont observées.

V.2.3.2 Identification par l'étape de dissociation

Pour l'étape de dissociation seule le déplacement spectral à 300nm et la pente à l'origine ont été établi. Mais pas la modélisation, il est pourtant possible à partir de l'équation de dissociation suivante d'établir un modèle cinétique :

$$y = y_o e^{-k_d t}$$

Cependant, nous n'avons pas réussi à modéliser numériquement cette étape. Du fait que les courbes de dissociation partant de zéro pour atteindre des valeurs négatives.

En effet, le logiciel soustrait directement la valeur terminale de l'étape d'association correspondant ici à y₀. Il est alors impossible de modéliser puisque la fonction y est strictement positive. Il est nécessaire de connaitre la valeur de référence pour passer des valeurs relatives à des valeurs absolues. Ou alors de prendre pour un même biocapteur la valeur A obtenue lors de la phase d'association. Mais on s'aperçoit que

le switch de longueur d'onde est plus important lors de l'étape de dissociation que lors de l'étape d'association.

Principalement deux raisons peuvent expliquer cela : soit les concentrations de travail en association et dissociation étaient différentes (les résultats provenant de deux tests bien distincts et non d'un même test), soit les modèles d'association sont trop approximatifs du fait du faible nombre de points et de la lecture manuelle des valeurs.

V.2.3.2.1 Biocapteurs protéine A, L & G

Comme le montrent les figures 49, 50 et 51, il n'y a aucune différence dans la cinétique de dissociation de ces 4 anticorps monoclonaux avec les biocapteurs protéine A, L et G ce qui traduit une liaison forte puisque le déplacement spectral après 120 s est voisin de 0, confirmant ainsi les observations faites lors de l'étude de l'association.









Figure 48: Dissociation avec le biocapteur protéine L

Figure 50 : Dissociation avec le biocapteur protéine G

V.2.3.2.2 Biocapteur Fab-CH1

La différenciation des 4 anticorps lors de l'étape de dissociation avec le biocapteur Fab-CH1 est nettement plus significative que celle obtenue avec la courbe d'association (figure 51).



Figure 51: Dissociation avec le biocapteur Fab-CH1

Aucune dissociation n'est observée avec l'éculizumab ce qui n'est pas surprenant puisque l'association avait fourni un signal très faible (< 1 nm). La dissociation observée pour les 3 autres anticorps est nettement différenciée et croissante dans l'ordre brentuximab, cetuximab et rituximab. La paire rituximab/cetuximab qui était peu différenciée (ka du même ordre de grandeur) lors de l'association l'est lors de la dissociation (kd nettement différents). Cela est confirmé par les valeurs de pente à l'origine et les valeurs terminales (tableau XXX).

DCI	Déplacement spectral à 300 s (nm)	Pente à l'origine (nm/sec)		
Cetuximab	- 2,60	- 0,013		
Rituximab	- 3,57	- 0,040		
Brentuximab vedotine	- 0,67	- 0,001		
Eculizumab	0	0		

Tableau XXIX : Valeurs caractéristiques de la dissociation avec le biocapteur Fab-CH1

Le capteur Fab-CH1 serait intéressant pour suivre la courbe association/dissociation. En effet en reprenant comme valeurs minimales d'écart 5% des valeurs maximales obtenues pour chaque biocapteur, le biocapteur Fab-CH1 permet de différencier les 4 anticorps monoclonaux testés.

V.2.3.2.3 Biocapteur α-IgG Fc (AHC)

La dissociation avec le biocapteur α -IgG Fc (AHC) n'est pas aussi satisfaisante que celle observée avec le capteur Fab-CH1 (figure 52).



Figure 52 : Dissociation avec le biocapteur α -IgG Fc (AHC)

En effet le brentuximab et cetuximab possède là même pente à l'origine. (Tableau XXXI).

DCI	Déplacement spectral à 300 s (nm)	Pente à l'origine (nm/sec)		
Cetuximab	- 1,53	- 0,023		
Rituximab	- 2,27	- 0,046		
Brentuximab vedotine	-1,30	- 0,023		
Eculizumab	- 1,77	- 0,040		

Tableau XXX : Valeurs	caractéristiques (de la di	ssociation	avec le	biocapteur	a-lgG Fc	(AHC)

CONCLUSION

L'utilisation de la Biolayer Interferometry pour la quantification et l'identification des anticorps monoclonaux dans les préparations hospitalières est très encourageante et constitue une avancée prometteuse.

La technique est développée depuis plusieurs années, et elle est utilisée largement par l'industrie pharmaceutique pour les contrôles en cours de production pour suivre la concentration des anticorps monoclonaux lors des étapes de purification (communication personnelle de ForteBio).

L'appareillage est simple d'utilisation et le nombre de capteurs développés est satisfaisant.

La quantification du rituximab a été réalisée dans différentes préparations hospitalières en utilisant le capteur protéine A. La quantification est effectuée par rapport à une courbe d'étalonnage, l'échantillon est dilué avant dosage dans le solvant approprié correspondant à la préparation hospitalière (dans ce cas NaCl 0,9%). La réponse est obtenue en 2 minutes (dilution + mesure). La méthode a été testée pour différents paramètres : répétabilité, praticabilité, effet de la régénération du capteur.

Le même capteur aurait pu être utilisé pour le dosage des 3 autres anticorps monoclonaux (cetuximab, eculizumab et brentuximab vedotine) car le capteur protéine A donne une réponse satisfaisante pour l'étape d'association avec ces 3 autres molécules.

L'identification de l'anticorps est plus problématique. L'exploitation de la courbe d'association est insuffisante. Il est nécessaire d'exploiter également les informations de la courbe de dissociation. Ces 2 courbes doivent pouvoir être exploitées simultanément et l'utilisation de l'appareil de type Octet est alors à privilégier.

La détermination préalable des constantes d'affinité aurait peut-être contribué à améliorer la discrimination entre les anticorps testés, mais elle n'a pu être réalisée lors de ces travaux préliminaires.

Une autre alternative consisterait à créer des biocapteurs spécifiques de chaque anticorps à partir de capteurs « nus » sur lesquels on fixerait par liaison streptavidine/biotine le marqueur désiré dans la mesure où il serait disponible commercialement.

Les travaux préliminaires menés dans cette thèse constituent une première approche de la quantification des anticorps monoclonaux à l'aide d'une technique novatrice et commercialement disponible.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. Wadhwa, I. Knezevic, H.-N. Kang, et R. Thorpe, « Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility », *Biologicals*.
- [2] C. Baillet, « TP Interférences- ENCPB / RNChimie 2006. » [En ligne]. Disponible sur : http://eduscol.education.fr/rnchimie/phys/baillet/06/tp_interf.pdf. [Consulté le: 17-juill-2015]
- [3] « Fiche 1 à destination des enseignants : les interferences lumineuses.pdf. » [En ligne]. Disponible sur : http://spcfa.ac-creteil.fr/IMG/pdf/TS_4_les_interferences-lumineuses.pdf. [Consulté le: 17-juill-2015]
- [4] « Généralités. Conditions d'interférences-Conditions d'interférences. » [En ligne]. Disponible sur: http://uel.unisciel.fr/physique/interf/interf_ch01/co/apprendre_ch1_07.html. [Consulté le: 17-juill-2015].
- [5] « Interférence/Interférences lumineuses Wikiversité. » [En ligne]. Disponible sur: https://fr.wikiversity.org/wiki/Interf%C3%A9rence/Interf%C3%A9rences_lumineu

ses. [Consulté le: 17-juill-2015].

- [6] K. D. Moller, *Cours d'Optique. : Simulations et Exercices avec Maple®, Matlab®, Mathematica®, Mathcad*®, Pap/Cdr. Paris: Springer Editions, 2012.
- [7] « Interférences. » [En ligne]. Disponible sur: http://melusine.eu.org/syracuse/mluque/fresnel/augustin/interference.html. [Consulté le: 24-août-2015].
- [8] « Michelson Interferometer. » [En ligne]. Disponible sur: http://hyperphysics.phyastr.gsu.edu/hbase/phyopt/michel.html. [Consulté le: 24-août-2015].
- [9] I. Romdhane, « La cohérence de la lumière et les interférences lumineuses : raisonnements des étudiants et difficultés d'ordre historique. » [En ligne]. Disponible sur : https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00483266/document. [Consulté le: 17-juill-2015]
- [10] « Interférences : Fondamentaux Cas de la lumière blanche. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.optiqueingenieur.org/fr/cours/OPI_fr_M02_C04/co/Contenu_18.html. [Consulté le: 17juill-2015].
- [11] « bulles de savons Recherche Google. » [En ligne]. Disponible sur: https://www.google.fr/search?q=bulles+de+savons&source=lnms&tbm=isch&sa =X&ved=0CAcQ_AUoAWoVChMIj4Gui_TkxwIVwn0aCh2tvQbr&biw=1366&bih= 635. [Consulté le: 07-sept-2015].
- [12] « ForteBio Interactions :: Spring 2012. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.fortebio.com/interactions/Spring_2012/page5.html. [Consulté le: 17juill-2015].
- [13] « ForteBio_App_Note_14.pdf. » [En ligne]. Disponible sur: http://csbi.mit.edu/instrumentation/ForteBio_App_Note_14.pdf. [Consulté le: 18juill-2015].
- [14] « ForteBio :: Dip and Read[™] Biosensors and Assays. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.fortebio.com/biosensor-types.html. [Consulté le: 07-sept-2015].
- [15] PAIB2, « Principe du Biacore », 18-sept-2013. [En ligne]. Disponible sur: http://www6.val-de-loire.inra.fr/paib/Presentation/Laboratoires/Interactions-Moleculaires/Principe-du-Biacore. [Consulté le: 07-sept-2015].

- [16] Y. N. Abdiche, D. S. Malashock, A. Pinkerton, et J. Pons, « Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors », *Anal. Biochem.*, vol. 386, nº 2, p. 172-180, mars 2009.
- [17] Y. Abdiche, D. Malashock, A. Pinkerton, et J. Pons, « Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet », Anal. Biochem., vol. 377, nº 2, p. 209-217, juin 2008.
- [18] E. L. Pfaunmiller, M. L. Paulemond, C. M. Dupper, et D. S. Hage, « Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, n° 7, p. 2133-2145, nov. 2012.
- [19] « Agilent | Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.agilent.com/home. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [20] « Biocolumns Affinity Brochure LR.pdf. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.agilent.com/cs/library/brochures/Biocolumns%20Affinity%20Brochure %20LR.pdf. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [21] « UE Immunologie : Les anticorps monoclonaux et protéines de fusion thérapeutiques-Pr Renato Monteiro. » [En ligne]. Disponible sur: http://coursl3bichat2012-2013.weebly.com/uploads/9/6/0/7/9607940/06_-_roneo_-_immuno.pdf. [Consulté le: 25-août-2015].
- [22] G. Köhler et C. Milstein, « Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity », *Nature*, vol. 256, nº 5517, p. 495-497, août 1975.
- [23] « Production des anticorps monoclonaux-V. I. Mistretta , E. Cavalier , J. Collette , J.P. Chapelle. » .
- [24] W. F. A. COMPANY, J. Owen, J. Punt, et S. Stranford, *Immunologie 7e édition:* Le cours de Janis Kuby avec questions de révision, 7e édition. Paris: Dunod, 2014.
- [25] « Les lymphocytes B Cours Pharmacie. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-lymphocytes-b.html. [Consulté le: 25-août-2015].
- [26] M.-P. Lefranc, V. Giudicelli, P. Duroux, J. Jabado-Michaloud, G. Folch, S. Aouinti, E. Carillon, H. Duvergey, A. Houles, T. Paysan-Lafosse, S. Hadi-Saljoqi, S. Sasorith, G. Lefranc, et S. Kossida, « IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R) 25 years on », *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, n° D1, p. D413-D422, janv. 2015.
- [27] « Multiple Choice Questions on Immunology ~ MCQ Biology Learning Biology through MCQs. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.mcqbiology.com/2013/02/multiple-choice-questions-onimmunology.html#.Ve70TPSGSZM. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [28] C. Bardet et J. Cook-Moreau, « Les anticorps monoclonaux : apprenons à les connaître », *Actual. Pharm.*, vol. 52, nº 530, p. 18-22, nov. 2013.
- [29] A. B. Cosimi, R. C. Burton, R. B. Colvin, G. Goldstein, F. L. Delmonico, M. P. LaQuaglia, N. Tolkoff-Rubin, R. H. Rubin, J. T. Herrin, et P. S. Russell, « Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody », *Transplantation*, vol. 32, nº 6, p. 535-539, déc. 1981.
- [30] R. O. Dillman, J. C. Beauregard, S. E. Halpern, et M. Clutter, « Toxicities and side effects associated with intravenous infusions of murine monoclonal antibodies », *J. Biol. Response Mod.*, vol. 5, nº 1, p. 73-84, févr. 1986.
- [31] « Thériaque. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.theriaque.org/apps/contenu/accueil.php. [Consulté le: 04-août-2015].
- [32] L. Riechmann, M. Clark, H. Waldmann, et G. Winter, « Reshaping human antibodies for therapy », *Nature*, vol. 332, nº 6162, p. 323-327, mars 1988.

- [33] Haute autorité de santé (HAS) « Poids économique des SMRi definition_smr.pdf. » [En ligne]. Disponible sur : http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/definition_smr.pdf. [Consulté le: 04août-2015]
- [35] J.Taoufik « -Les-anticorps-monoclonaux-thérapeutique.pdf. » [En ligne]. Disponible sur : http://pharmacie.ma/uploads/pdfs/pr-jamal-taoufik-les-anticorpsmonoclonaux-kenitra.pdf. [Consulté le: 04-août-2015]
- [36] G. Hale, « Therapeutic antibodies Delivering the promise? », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, n° 5-6, p. 633-639, août 2006.
- [37] K. Bouzid, N. Bedairia, et M. Marty, « Anticorps monoclonaux thérapeutiques en cancérologie », *Pathol. Biol.*, vol. 60, nº 4, p. 223-228, août 2012.
- [38] J. Buxeraud, « Les anticorps monoclonaux sont des thérapeutiques particulièrement ciblées », *Actual. Pharm.*, vol. 52, nº 530, p. 17, nov. 2013.
- [39] « Biomédicaments-etat-des-lieux-2014.pdf. » En ligne] .Disponible sur : http://www.leem.org/sites/default/files/Biom%C3%A9dicaments-etat-des-lieux-2014.pdf. [Consulté le: 04-août-2015]
- [40] ANSM « Analyse des ventes de medicaments en France en 2013 -3df7b99f8f4c9ee634a6a9b094624341.pdf.» [En ligne]. Disponible sur : . http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/3df7b99f8f4c9ee6 34a6a9b094624341.pdf. [Consulté le: 04-août-2015]
- [41] LEEM « Bientôt des anticorps monoclonaux (AcMo) pour toutes les maladies ? | LEEM - Les entreprises du médicament. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.leem.org/article/bientot-des-anticorps-monoclonaux-acmo-pourtoutes-les-maladies. [Consulté le: 01-août-2015].
- [42] A. Bai, K. Meetze, N. Y. Vo, S. Kollipara, E. K. Mazsa, W. M. Winston, S. Weiler, L. L. Poling, T. Chen, N. S. Ismail, J. Jiang, L. Lerner, J. Gyuris, et Z. Weng, «GP369, an FGFR2-IIIb–Specific Antibody, Exhibits Potent Antitumor Activity against Human Cancers Driven by Activated FGFR2 Signaling », *Cancer Res.*, vol. 70, nº 19, p. 7630-7639, oct. 2010.
- [43] « Culture cellulaire : Trois étapes clés pour produire des protéines thérapeutiques - Industrie Pharmaceutique. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.industrie.com/pharma/culture-cellulaire-trois-etapes-cles-pourproduire-des-proteines-therapeutiques,39248. [Consulté le: 12-août-2015].
- [44] R. Legmann, H. B. Schreyer, R. G. Combs, E. L. McCormick, A. P. Russo, et S. T. Rodgers, « A predictive high-throughput scale-down model of monoclonal antibody production in CHO cells », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 104, nº 6, p. 1107-1120, décembre 2009.
- [45] « Bonnes pratiques de préparation. Arrêté du 3 décembre 2007. » [En ligne].Disponible sur : http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/bo0707.pdf. [Consulté le: 10-août-2015]
- [46] « Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière. Arrêté du 22 juin 2001. » [En ligne]. Disponible sur :http://nosobase.chulyon.fr/Reglementation/2001/Rapport/bpph.pdf [Consulté le: 10-août-2015]

- [47] B. Delis, J. Vigneron, N. Sobalak, H. Zenier, et A. Nicolas, « Contrôle analytique des préparations cytotoxiques : bilan de 7 ans d'activité et perspectives », *Pharm. Hosp. Clin.*, vol. 50, nº 2, p. 233-242, juin 2015.
- [48] C. Bazin, V. Vieillard, A. Astier, et M. Paul, « Contrôle rapide et fiable des préparations de chimiothérapies à base d'anticorps monoclonaux à l'aide de l'automate Multispec® », *Ann. Pharm. Fr.*, vol. 68, nº 3, p. 163-177, mai 2010.
- [49] P. Bourget, A. Amin, A. Moriceau, B. Cassard, F. Vidal, et R. Clement, « La Spectroscopie Raman (SR): un nouvel outil adapté au contrôle de qualité analytique des préparations injectables en milieu de soins. Comparaison de la SR aux techniques CLHP et UV/visible-IRTF appliquée à la classe des anthracyclines en cancérologie », *Pathol. Biol.*, vol. 60, nº 6, p. 369-379, déc. 2012.
- [50] S. He, N. Vantard, J. Bonnet-Gonnet, V. Schwiertz, F. Ranchon, C. Alloux, et al. "La spectrophotométrie UV couplée à la spectroscopie Raman pour l'identification et le dosage pré-libératoire des préparations de médicaments anticancéreux de la classe des anthracyclines", Congrès SFPO, Mandelieu-la-Napoule, France (17 et 18 octobre 2013).Disponible sur : http://congres-2013.sfpo.com/wp-content/themes/twentythirteen/images/posters/p122.pdf. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [51]F. Couder, L. Habert, C. Bousquet, R. Respaud, V. André, J.F. Tournamille, *et al.*"Analyse des résultats de dosages analytiques de chimiothérapie obtenus par différents centres français", Congrès SFPO Mandelieu-la-Napoule, France (13 et 14 octobre 2011); Disponible sur : http://sfpo.com/wpcontent/uploads/2012/11/LivreCongresSFPO2011.pdf. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [52] M. Jobard, C. Lepage, K. Sejean, et B. Bonan, « Validation du dosage des préparations de bendamustine par l'automate Multispec® », *Pharm. Hosp. Clin.*, vol. 48, nº 4, p. 258, décembre 2013.
- [53] C. Bazin, C. Astier, M. Paul "Contrôle systématique des préparations de chimiothérapie : bilan à 6 mois de l'utilisation en routine de l'automate Multispec", Congrès SFPO Mandelieu-la-Napoule, France (15 et 16 octobre 2009). Disponible sur : http://sfpo.com/squelettes/pdf/LivreCongresSFPO2009Ex.pdf. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [54] C. Bazin, V. Vieillard, A. Astier, et M. Paul, « Implementation of real-time identification analysis and quantification of chemotherapies preparations with a Multispec® analyser », *Ann. Pharm. Fr.*, vol. 72, nº 1, p. 33-40, janv. 2014.
- [55] « BLItz Label-Free Protein Assays | ForteBio. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.blitzmenow.com/index.html. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [56] « Pall ForteBio :: Octet Systems. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.fortebio.com/octet-platform.html. [Consulté le: 08-sept-2015].
- [57] « BLItz Drop Read Done | ForteBio. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.blitzmenow.com/compare_blitz.html. [Consulté le: 08-sept-2015].

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.

DELIS Benjamin

Bio-layer interferometry : méthode d'intérêt dans les procédés de fabrication et pour le contrôle des préparations hospitalières à base d'anticorps monoclonaux thérapeutiques.

TH.D. Pharmacie : Bordeaux/2016 ; N° 9

Résumé

La biolayer interferometry (BLI) est une technique basée sur le phénomène physique d'interférence lumineuse appliquée aux biocouches formées par des interactions protéiques. Cette technique relativement récente apparue au cours des années 2000 vient concurrencer des méthodes comme la résonance plasmonique de surface ou la biochromatographie. L'intérêt de cette technique repose sur une mesure simple d'un déplacement spectral qui permet de suivre les étapes d'association et de dissociation d'interactions bimoléculaires. Elle permet notamment de suivre des interactions antigène/anticorps monoclonaux grâce à des biocapteurs prêts à l'emploi.

Ces thérapies se démocratisant représentent à l'heure actuelle une part importante du marché et ont une place de choix dans l'arsenal thérapie, et plus particulièrement en oncologie. Cela a conduit à une augmentation des préparations hospitalières d'anticorps monoclonaux et a mis en évidence les carences des techniques actuelles dans le contrôle de ces préparations. Les essaies préliminaires menées sur la BLI pour son utilisation en technique de routine pour le contrôle des préparations se sont révélés satisfaisant notamment ceux menés avec le biocapteur Fab-CH1. Et devrons être approfondis dans le futur pour en faire une méthode de référence.

Bio-layer interferometry: method of interest in manufacturing processes and for the control of hospital preparations based on therapeutic monoclonal antibodies.

Mots clés

Biolayer interferometry, anticorps monoclonaux, préparations hospitalières, analyse qualitative et quantitative

Keywords

Biolayer interferometry, monoclonal antibodies, hospital preparations, quantification and identification

U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques Université de Bordeaux 146 rue Léo Saignat 33 076 Bordeaux