

**Licence Professionnelle
Année 2006-2007**

UE2 Technologie en Biologie Cellulaire

Cultures Cellulaires

Travaux pratiques

Technologie des anticorps monoclonaux

**Cours de Sylvie Comeau
Chef de projet Phytinove
phytinove@free.fr**

Immunité : im – munus

Im : négation
Munus : charge, impôt

L'immunité désignait au départ la résistance d'un organisme vis-à-vis d'un agent infectieux.
Cette définition s'est ensuite élargie à l'ensemble des réactions tendant à **éliminer des substances étrangères**.

L'immunité peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de **reconnaître** et de **tolérer** ce qui lui appartient en propre (**le soi**) et de **reconnaître** et de **rejeter** ce qui lui est étranger (le **non soi**) : les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels il est exposé, mais aussi ses propres constituants altérés (comme des cellules tumorales).

L'immunité met en jeu deux processus apparus successivement au cours de l'évolution des espèces: **l'immunité non spécifique**, d'action immédiate, qui fait intervenir des cellules responsables de la phagocytose, et **l'immunité spécifique**, qui se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère, prélude à sa destruction ; elle garde le souvenir de la rencontre.

Chez les Vertébrés, l'immunité non spécifique et l'immunité spécifique sont étroitement intriquées.

Les protéines membranaires et le soi

Toute cellule possède un ensemble de protéines membranaires intervenant dans les communications inter-cellulaires.

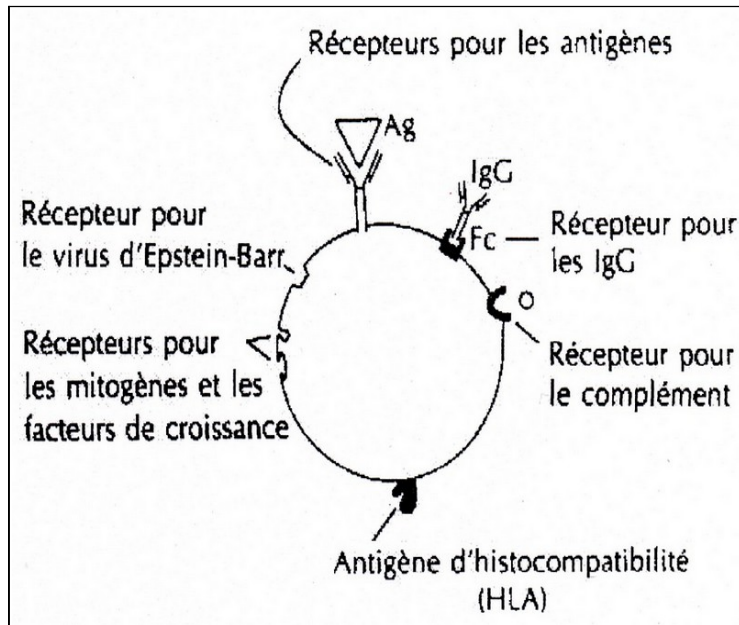
Ces molécules de surface assurent une double fonction :

- **une fonction de reconnaissance** : elles peuvent reconnaître un ligand spécifique (molécule de la matrice extracellulaire, molécule membranaire d'une autre cellule ou médiateur soluble),
- **une fonction effectrice** : pour permettre l'adhésion des cellules et/ou délivrer à la cellule reconnue des signaux qui seront captés par des enzymes membranaires ou cytosoliques et transmis au noyau pour activer ou inhiber l'expression de certains gènes.

Pour assurer ces fonctions de communication, la cellule règle l'expression de ses molécules de surface en fonction des signaux qu'elle reçoit, pour devenir plus sensible ou temporairement réfractaire au signal.

Les protéines membranaires ont été découvertes par l'étude de la fixation d'anticorps produits en immunisant la souris contre des leucocytes humains : On obtient divers anticorps reconnaissant la même protéine membranaire. Ces anticorps sont regroupés en Classes de Différenciation et les antigènes reconnus sont désignés par le préfixe CD.

L'emploi de ces anticorps permet de distinguer différentes catégories de lymphocytes.

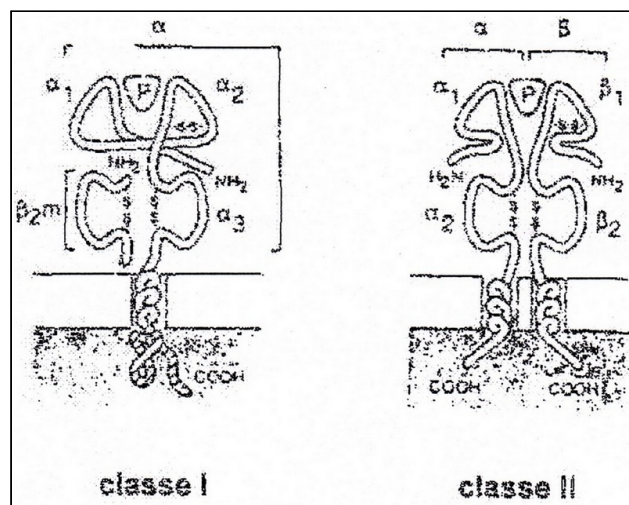


Certaines protéines membranaires constituent le soi.

Pour les réactions immunitaires, les protéines membranaires les plus importantes sont les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité ou **molécules du CMH** (anciennement HLA pour human leucocytes antigens).

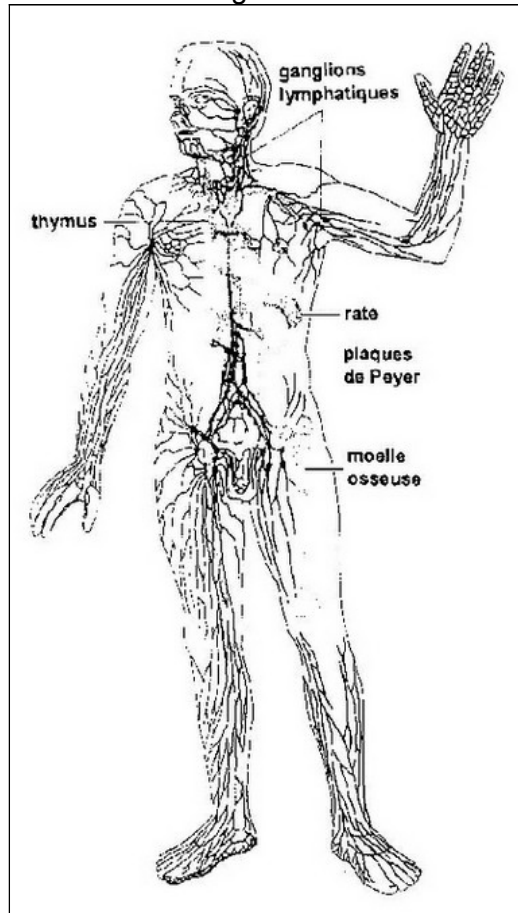
Les molécules du CMH sont codées par 2 groupes de gènes :

- **les gènes de classe I** sont les gènes A,B,C
- **les gènes de classe II** sont les gènes DP, DQ et DR

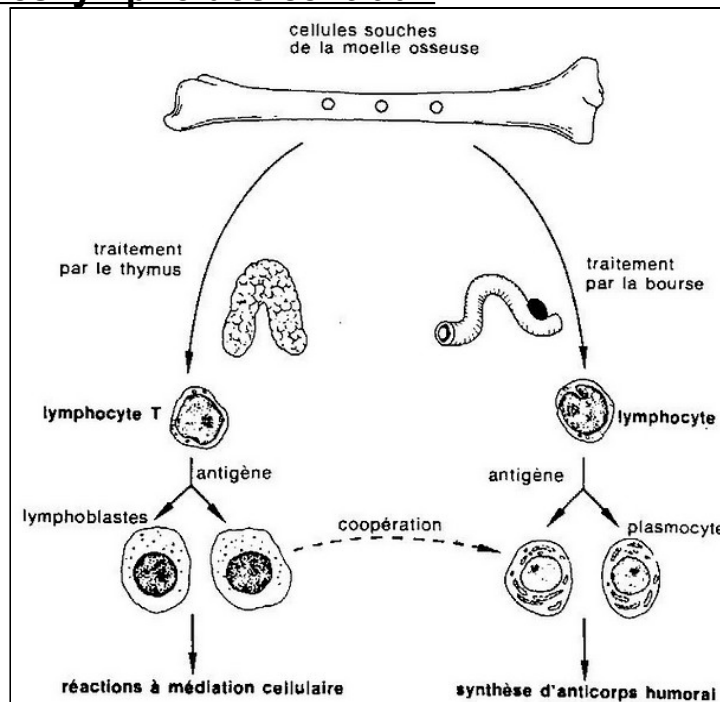


1. Le système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble complexe de cellules, d'organes et de molécules. Le système lymphoïde est composé d'organes lymphoïdes centraux, et d'organes et de tissus lymphoïdes secondaires. Il est constitué de lymphocytes, de macrophages et de cellules spécialisées dans la présentation des antigènes, localisés dans des organes et des tissus.



1. Les organes lymphoïdes centraux



Ils vont assurer la différenciation et la maturation des lymphocytes : le lymphocyte pro-T migre dans le thymus, et le lymphocyte pro-B migre dans la bourse de Fabricius.

La bourse de Fabricius est un organe primaire propre aux oiseaux. Chez l'homme (et les autres mammifères) c'est dans la moelle osseuse elle-même qu'a lieu la différenciation et la maturation des lymphocytes pro-B (B pour Bone-marrow, c'est-à-dire moelle osseuse).

Les lymphocytes T (pour Thymus) et B fonctionnels, repérables par des marqueurs leur conférant le label "T_e", "T_h" ou "B" et sélectionnés par la qualité de leurs récepteurs pour l'antigène, vont s'établir dans les organes lymphoïdes périphériques. Au cours de leur développement dans les organes lymphoïdes centraux, les lymphocytes se différencient et vont acquérir leur compétence. C'est là que seront sélectionnées les cellules utiles : celles qui possèdent la capacité de reconnaître les antigènes étrangers à l'organisme.

A l'issue de leur maturation, les lymphocytes sélectionnés sont libérés dans la circulation sanguine.

2. Les organes et tissus lymphoïdes périphériques

Ils comprennent des organes encapsulés, **les ganglions lymphatiques** et **la rate**, et des accumulations de **tissu lymphoïde** distribué principalement au niveau des muqueuses, le système immunitaire commun aux muqueuses ou **MALT** (pour **Mucosa-associated lymphoid tissue**).

Ces organes et tissus sont colonisés par les lymphocytes immunocompétents produits dans les organes centraux. Leur organisation permet les interactions de l'antigène avec les cellules.

Les organes lymphoïdes secondaires assurent une partie du renouvellement des lymphocytes au cours des divisions cellulaires qui sont déclenchées par la reconnaissance de l'antigène et ont pour but d'amplifier la réponse immunitaire une fois qu'elle a été initiée.

3. Les cellules de l'immunité

Plusieurs types cellulaires participent au développement des réactions immunitaires spécifiques : les lymphocytes, et les cellules présentatrices d'antigène.

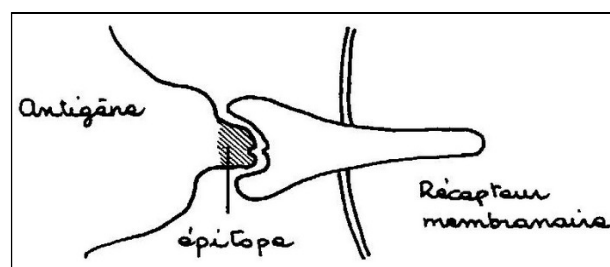
a) Les lymphocytes

Les lymphocytes sont présents dans **le sang, la lymphe** et dans tous **les organes lymphoïdes**.

Dans le sang, les lymphocytes représentent 20 à 40 % des leucocytes. Deux types principaux de lymphocytes coexistent : **les lymphocytes T** et **les lymphocytes B**. Ils ont le même aspect en microscopie optique (et la "formule leucocytaire" ne les distingue pas). Pour distinguer les différentes populations lymphocytaires, on révèle des protéines membranaires caractéristiques.

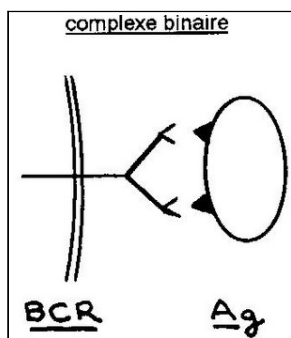
Les lymphocytes B et T sont les cellules effectrices de l'immunité spécifique. L'immunocompétence d'un lymphocyte dépend de la synthèse d'un **récepteur membranaire** capable de reconnaître spécifiquement un antigène.

Chaque lymphocyte porte **un récepteur** lui permettant d'identifier **un motif chimique** (peptidique : 8 à 15 acides aminés ou polysaccharidique : 5 à 6 sucres). Le motif de l'antigène reconnu par le récepteur s'appelle **un déterminant antigénique** ou **épitope** :



L'ensemble des récepteurs différents portés par les lymphocytes définit le répertoire immunologique d'un organisme. On estime à 10^7 le nombre de récepteurs différents.

Les lymphocytes B



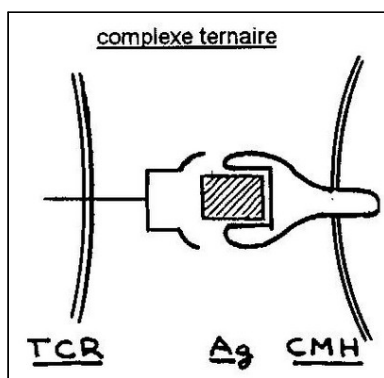
Le récepteur pour l'antigène s'appelle le BCR (B cell receptor). C'est une immunoglobuline membranaire (Igm). A la surface de chaque lymphocyte B on trouve environ 10^5 molécules de BCR. Toutes ces molécules sont identiques : chaque lymphocyte B ne synthétise qu'une seule variété d'Igm. Un lymphocyte B n'est capable de reconnaître qu'un seul épitope : chaque molécule d'Igm possède deux sites reconnaissant spécifiquement l'épitope.

Par leur BCR, les lymphocytes B reconnaissent directement les antigènes, qu'ils soient solubles et circulants dans le milieu intérieur ou qu'ils soient particuliers (parasite, bactérie, virus ou cellule). Un antigène possède le plus souvent plusieurs déterminants antigéniques différents (un antigène est une mosaïque d'épitopes) et sera donc reconnu par plusieurs lymphocytes B. Par ailleurs deux antigènes différents peuvent présenter un même épitope : un même lymphocyte B peut se fixer à deux antigènes différents si ceux-ci possèdent un même épitope.

Les lymphocytes B expriment les molécules du CMH de classe I (ce sont des cellules nucléées) et les molécules CMH de classe II, ce qui en fait **des cellules présentatrices d'antigènes**.

Les lymphocytes B possèdent également : des récepteurs CR (CR - complément receptor) pour le composant C3 du complément, et des récepteurs pour le fragment P_c des immunoglobulines G (RF_c IgG).

Les lymphocytes T



Le récepteur pour l'antigène s'appelle le **TCR** (T cell receptor). Les TCR sont constitués de deux chaînes polypeptidiques associées formant un site de reconnaissance de l'épitope.

Contrairement au lymphocyte B, le récepteur du lymphocyte T ne reconnaît que des antigènes protéiques. Ceux-ci ne sont jamais natifs : les protéines doivent être découpées en peptides qui sont ensuite associés à des molécules CMH.

On distingue deux populations principales de lymphocytes T d'après la présence de protéines membranaires spécifiques : les lymphocytes CD8 et les lymphocytes CD4.

les lymphocytes TCD8

Ce sont des lymphocytes **cytotoxiques** (lymphocytes **Tc**). Ils reconnaissent l'antigène présenté par une molécule CMH de classe I. Les antigènes présentés sont des antigènes endogènes, produits par la cellule. La reconnaissance est le premier signal d'activation. Un second signal permet l'expression du pouvoir cytotoxique du lymphocyte Tc.

les lymphocytes TCD4

Ce sont des lymphocytes **helpers ou auxiliaires** (lymphocytes **Th**). Les lymphocytes Th reconnaissent l'antigène si celui-ci leur est présenté par une molécule CMH de classe II. Les antigènes présentés sont des antigènes exogènes qui ont été endocytés par certaines cellules : les cellules présentatrices d'antigènes. Ils ont pour rôle d'activer des cellules de la réaction immunitaire : les macrophages, les lymphocytes B mais aussi les lymphocytes Tc.

Selon l'environnement dans lequel ils se trouvent, les lymphocytes Th se différencient soit en lymphocytes Th1 soit en lymphocytes Th2 :

- les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire (lymphocytes Tc),
- les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps).

les lymphocytes ni T ni B

Les lymphocytes ni T ni B sont des lymphocytes ne portant aucun des marqueurs B ou T.

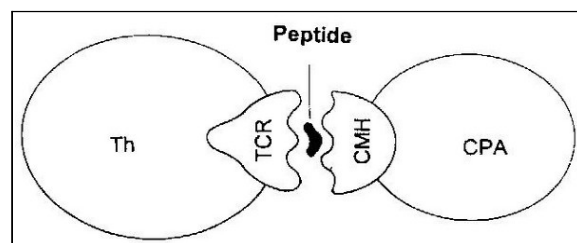
Les cellules dénommées **cellules NK** (pour Natural Killer) ont été qualifiées de cellules tueuses naturelles parce qu'elles exercent un effet cytotoxique direct sur les cellules anormales : cellules infectées par des virus ou cellules cancéreuses. Un récepteur membranaire détecte l'absence de molécules CMH de classe I à la surface des cellules cibles.

Les cellules NK expriment également des récepteurs pour le fragment Fc des IgG (R_{Fc} Ig) : des anticorps reconnaissent un antigène fixé sur la cellule-cible, permettant la fixation de la cellule NK et son activité cytotoxique : c'est la **cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante** ou **ADCC** (pour antibody-dependant cell cytotoxicity).

b) Les cellules présentatrices d'antigène

Toutes les cellules nucléées de l'organisme, exprimant les molécules CMH classe I, sont aptes à présenter l'antigène aux lymphocytes cytotoxiques (Tc). Ce ne sont pas, *stricto* sensu, des CFA mais des cellules cibles puisque la reconnaissance est la première étape de leur destruction.

Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont des cellules diverses qui ont en commun la faculté d'exprimer les molécules CMH de classe II.



Ces cellules peuvent endocyter les antigènes protéiques exogènes, les découper en peptides, les associer aux molécules CMH de classe II.

L'ensemble migre vers la membrane cytoplasmique pour être présenté aux lymphocytes T auxiliaires ou T helper (Th).

La plupart des CFA expriment également sur leur membrane des molécules d'adhésion (ICAM pour Inter cellular adhésion molécule) ou LFA3 (lymphocyte function associated).

Les principales cellules présentatrices d'antigène sont :

- **le système des phagocytes mononucléés**, comprenant les monocytes (c'est la forme circulante) et les macrophages (c'est la forme tissulaire). Les macrophages tissulaires adoptent des morphologies spécifiques de l'organe où ils ont élu domicile : les histiocytes du tissu conjonctif, les cellules de Kupffer du foie, les macrophages alvéolaires du poumon, les astrocytes du système nerveux central.

- **les cellules dendritiques** présentes dans les zones T des tissus lymphoïdes : les cellules de Langerhans de la peau captent l'antigène et le transportent par voie lymphatique vers les zones T des tissus lymphoïdes où elles se différencient en cellules dendritiques.

- **Les lymphocytes B** captent l'antigène par le récepteur BCR.

- **Les cellules dendritiques folliculaires** des ganglions lymphatiques et de la rate possèdent des récepteurs pour le fragment Fc des IgG ou pour le fragment C3 du complément. Grâce à ces récepteurs, elles peuvent fixer les complexes antigène-anticorps et présenter l'antigène aux lymphocytes B, renforçant ainsi la production d'anticorps et la pérennisant car ces antigènes peuvent persister plusieurs mois à la surface des cellules dendritiques folliculaires.

- **des cellules endothéliales ou épithéliales** qui, après stimulation, expriment les molécules CMH de classe II.

2. Les molécules de l'immunité

1. Les anticorps

Ce sont des immunoglobulines constituées de glycoprotéines comprenant quatre chaînes : deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques réunies entre elles par des ponts disulfures.

Une immunoalobuline (Ig) est un anticorps de spécificité inconnue.

Un anticorps (Ac) est une immunoglobuline de spécificité connue

Les anticorps ont deux sites de combinaison antigénique identiques- L'efficacité de la liaison est augmentée par la divalence de l'anticorps.

Une molécule d'anticorps est composée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Il y a cinq classes de chaîne lourde chacune avec des propriétés biologiques différentes, (a, d, e, c, m). En plus il existe des sous classes (IgG 1 à 4 etc.)

Les IgM sont toujours la première classe produite par la cellule préB. Les IgM s'accumulent au sein de la cellule. Par la suite les cellules B commencent à synthétiser des chaînes légères, celles-ci se combinent avec les chaînes lourdes M pour donner des IgM. De nombreuses cellules B changent finalement de classe. Chaque clone de cellule B synthétise des molécules d'anticorps avec un seul site de combinaison antigénique présent en deux exemplaires. Initialement les molécules sont insérées dans la membrane plasmique ou elles servent de récepteurs pour l'antigène.

La liaison de l'antigène à ses récepteurs active la multiplication et la maturation des cellules B (généralement avec l'aide des cellules T), soit en cellules à mémoire, soit en cellules sécrétrices d'anticorps, qui sécrètent des anticorps identiques aux anticorps liés à la membrane.

Une molécule type d'anticorps est une glycoprotéine en forme de Y avec deux sites de liaison antigénique identiques aux extrémités du Y (les régions Fab), et des sites de fixations pour le complément (C1q) et/ou différents récepteurs de surface cellulaire à la base du Y (région Fc). Chaque molécule d'anticorps est composée de 2 chaînes lourdes H, identiques et de 2 chaînes légères L identiques. Des parties des chaînes H & L forment des sites de liaisons à l'antigène et il y a cinq classes d'anticorps ayant chacun une chaîne lourde distincte. Ainsi ce sont les chaînes H qui participent à la fonction effectrice de l'anticorps, et par conséquent porte les propriétés biologiques de la classe.

Les anticorps sont des molécules biologiquement fonctionnelles.

Ils activent le complément en vue de la cytotoxicité dans l'immunité à médiation humorale ou cellulaire. Ils sont responsables de l'opsonisation, et ils participent aux mécanismes d'hypersensibilité immédiate (choc anaphylactique).

Il y a une dualité fonctionnelle : support de la fonction effectrice (activation du complément) et la fonction réceptrice [à l'antigène (Ag)]. Cette dualité fonctionnelle est sous-tendue par une dualité structurale. Or les fonctions effectrices sont beaucoup moins diverses que les fonctions réceptrices. L'analyse des gènes qui codent pour les anticorps montre qu'un petit nombre de gènes code pour les 10^8 gènes qu'il nous aurait fallu posséder pour coder tous les anticorps présents dans le système immunitaire.

Les théories de la production des anticorps par les cellules-Théorie d'Ehrlich 1900.

Avant qu'il y ait production d'anticorps, il existe des lymphocytes avec autant de récepteurs que possible. C'est une mosaïque de potentialité. Lorsque le lymphocyte est stimulé par un antigène, c'est l'antigène en question qui va être produit à titre exclusif sur la cellule.

Cette théorie est impossible car si le lymphocyte a synthétisé tous les antigènes possibles, il doit avoir 10^8 gènes codant pour des portions réceptrices d'anticorps. Or le génome humain compte 10^6 gènes.

Les théories de la production des anticorps par les cellules-Théorie de Jerne & Brunet (du lymphocyte monopotent) 1935.

Il existe des lymphocytes à des stades immatures. Tous ces lymphocytes sont différents entre eux, quant aux portions réceptrices des antigènes. Il y a amplification du nombre de récepteurs à l'antigène par augmentation du nombre de récepteurs à la surface des lymphocytes mais surtout par augmentation du nombre de lymphocytes qui entrent en division. L'antigène va échouer sur le récepteur qui porte le récepteur qui correspond à la meilleure adéquation moléculaire pour sa fixation. Il y a génération de clones de cellule identique, c'est la théorie monoclonale.

Structure des anticorps selon Porter.

La théorie des récepteurs impose qu'il y ait un seul type de récepteur dans le lymphocyte. Ce sont des glycoprotéines décrites par Porter. Porter clive les Ig à l'intérieur de la structure et l'on a trois domaines :

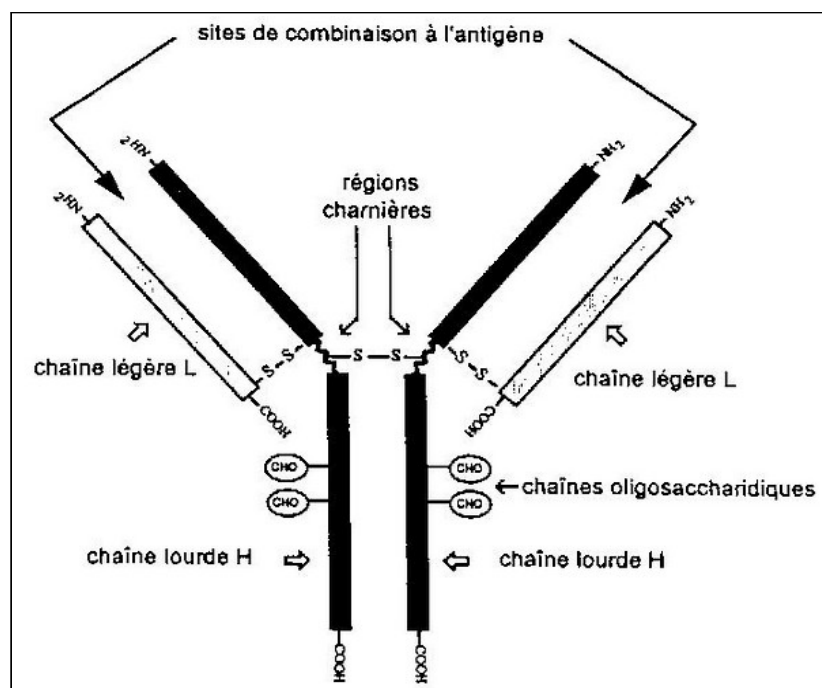
1. Le Fab, "fragment antigène binding". Il y en a deux par molécules. Il lie l'antigène.
2. Le Fc, fragment qui cristallise spontanément. Il ne lie pas de molécules. C'est le domaine de la molécule qui est responsable de la fonction effectrice.

Tous ces fragments ont une masse de 50 kD. Le clivage est réalisé par la papaïne. Les deux pôles de la dualité structurale portent une dualité fonctionnelle.

Structure des anticorps selon Hedelman

Il met en évidence deux chaînes lourdes (H) de 52 kDa soit 440 acides aminés et deux chaînes légères de 23 kDa soit 220 aa. Les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères sont identiques entre elles. Les chaînes H & L sont unies entre elles par des liaisons hydrogène et par des liaisons covalentes.

Cette architecture va être le support de la fonction des antigènes. Chaque sous-unité a une conformation globulaire. Le pôle de reconnaissance est situé à l'extrémité N terminale, le pôle effecteur à l'extrémité C-terminale.



Structure fine des anticorps

Ils y a des motifs répétés sur les deux chaînes H & L, de 110 acides aminés. Ce sont des pseudo-unités. Il y a 2 pseudo-unités sur les chaînes légères et 4 sur les chaînes lourdes. Il y a un pont bisulfure intrachaîne pour chaque pseudo-unité.

Chacune des sous-unités a une fonction indépendante des autres. Les différentes sous-unités sont reliées entre elles par des segments peptiques qui permettent la mobilité relative des pseudo-unités.

VH + VL	Pôle de reconnaissance à l'antigène
CH1 + CL	Épitope ?
CH3+CH3	Liaison récepteur Fc
CH4+CH4	IgE + IgM
CH2+CH2	Fixation au composant C1q du complément

Au sein des 6 pseudo-unités de 110 aa, des chaînes VH et VL, on a trois régions hypervariables. La position des régions hypervariables est conservée. Les zones entre les régions hypervariables sont appelées charpentes. Au niveau de l'Ig, les zones hypervariables sont situées à la surface et aussi à l'intérieur du site de liaison. Elles sont le support de la spécificité. Il y a unicité de la reconnaissance due aux 6 zones hypervariables. Les portions charpentes sont là pour positionner les régions HV et LV. Elles représentent 2 à 3 % de la molécule qui porte la spécificité de la reconnaissance à l'antigène.

1°) Les chaînes L & H sont constituées de régions constantes à l'extrémité C terminale et variables à l'extrémité N terminale. Ce sont les extrémités N terminales qui se réunissent pour constituer le site de liaison à l'antigène, et leur variabilité fournit la base structurale de la diversité des sites possible.

2°) Les chaînes L & H sont chacune constituées de 3 régions hypervariables qui forment le site de combinaison antigénique. En fait il est clair maintenant que le site de liaison n'est constitué que par 20 ou 30 aa dans la région variable de chacune des chaînes. Le site est produit par les 3 régions hypervariables qui sont séparées par les " Frameworks région ", relativement constantes.

3°) Les chaînes L et H sont repliées en domaines répétitifs homologues. La séquence constante des chaînes lourdes est trois fois plus longue que celle des chaînes légères. En fait on a trois fois la répétition de la région constante de la chaîne légère dans la chaîne lourde. Trois domaines se replient de façon indépendante pour former une unité compacte fonctionnelle.

NB : on a donc des gènes dupliqués. Cela permet de conserver l'expression du gène et empêche (à contre-sélection). Si il y a mutation, il y a conservation de la taille et du pont disulfure intracaténe. Les chaînes VH et VL proviennent de gènes qui ont dû subir une forte pression de sélection avec un grand taux de mutation.

Les chaînes lourdes des anticorps IgM et IgE ont un domaine constant supplémentaire (CH4)

2. Les interactions antigènes-anticorps

La liaison Ag/Ac

Les mesures thermodynamiques montrent que la combinaison site antigénique (ou haptène)-site anticorps est réversible et implique une énergie de liaison d'environ 34 à 65 kilojoules/mole. Ces données éliminent d'emblée des liaisons covalentes (mise en commun d'électrons périphériques entre atomes) dont l'énergie varie entre 210 et 500 kJ. mol⁻¹. La liaison antigène/anticorps fait intervenir des interactions de type : hydrogène, électrostatiques, Van der Waals, hydrophobes. Ces dernières fourniraient jusqu'à environ 50% de la force totale de liaison. Caractéristique fondamentale, toutes les forces non covalentes agissent à des distances interatomiques très faibles. Elles sont d'autant plus fortes (attraction) que la distance entre les groupes réagissants est plus courte (donc complémentarité plus étroite) jusqu'à la limite où des forces de répulsion entrent en jeu à l'approche du rayon de Van der Waals en raison de l'interpénétration des couches électroniques externes des atomes en contact.

Cette interaction est réversible : $Ag + Ac \rightleftharpoons Ag/Ac$ avec K la constante d'affinité et Kd celle de dissociation avec $Kd = 1/K$.

Notion d'antigénicité et d'immunogénicité

Toute substance qui peut provoquer une réponse immune est appelée immunogène.

Un immunogène est différent d'un antigène.

Un antigène est une substance se fixant à un anticorps. Certains antigènes ne sont pas immunogènes et doivent être fixés à une molécule porteuse (ex : les haptènes). Dans ce cas il y aura des anticorps tournés contre l'haptène et contre la molécule porteuse.

Valence, affinité et avidité

Un anticorps ne peut précipiter que des antigènes avec plusieurs sites de liaison à l'anticorps. Cela introduit les notions de valence, d'affinité et d'avidité.

La valence d'un antigène est le nombre de molécules d'anticorps pouvant se lier à une molécule d'antigène à la saturation. Cette valence est presque toujours inférieure au nombre d'épitopes de cet antigène car des conditions stériques limitent le nombre de molécules d'anticorps pouvant se lier en même temps à un antigène. La valence d'un anticorps est le nombre de site de liaisons par molécule (IgG bivalent, IgA valence de 4...)

L'affinité d'un anticorps est la mesure de la force avec laquelle un site anticorps unique se lie à un seul épitope de l'antigène. L'affinité des anticorps se conçoit comme la résultante des forces attractives et répulsives établies entre les anticorps et les épitopes homologues de l'antigène correspondant ou avec des haptènes (Steward).

L'avidité (ou affinité fonctionnelle) est la force de liaison globale d'une molécule d'anticorps pour un antigène ou une particule (fonction de l'affinité paratope/épitope et de la valence de l'anticorps). Si l'antigène est multivalent, la fixation à un deuxième épitope est favorisée par la fixation au premier.

Les notions d'isotypie, allotypie, haplotypie et idiotypie

Isotypes : Ce sont des variants moléculaires tous présents au sein de chaque individu de l'espèce ou de la lignée. Pour réaliser des Ac anti-isotypes, il faut utiliser des espèces animales étrangères (système xénogénique). Ce caractère est lié à l'espèce. La variation des isotypes se fait notamment pendant le switch de classes lors de la maturation des cellules B.

Allotypes : Ce sont des variations à l'intérieur d'une espèce mais commun à l'intérieur d'une famille, d'une souche car ils s'héritent de manière mendélienne. Variants moléculaires tous présents au sein de l'espèce ou de la lignée mais non au sein de chaque individu qui ne peut en présenter que deux au maximum. Pour réaliser des anti-allotypes, il faut être dans un système allogénique.

Haplotypes : combinaison d'isotypes des allotypes particuliers

Idiotypes : troisième niveau de diversité des Ig. Spécifiques à un Ac, ils sont issus de la recombinaison au hasard des séquences génomiques dans la maturation des cellules B. Pour réaliser des anti-idiotypes, il faut un système syngénique (vrais jumeaux, animaux de même souche). Le lapin est l'animal le plus étudié pour les allotypes.

3. Hybridation Lymphocytaire = T.P.

4. L'ingénierie des anticorps et ses applications

De l'anticorps monoclonal au recombinant

En 1975, Kohler & Milstein ont immortalisé des cellules B de souris en les fusionnant avec des cellules de myélome de souris. Cette fusion a abouti à la création de cellules appelées hybridomes capables de se multiplier à l'infini (propriété des cellules de myélome) et de sécréter dans le milieu de culture de grandes quantités d'Ig dirigés contre un seul épitope (propriété des cellules B).

Après immunisation de souris avec le ou les antigènes désirés, les fusions sont réalisées puis les lignées clonales de cellules produisant l'anticorps désiré sont sélectionnées, les anticorps ainsi produits sont dits de type monoclonal. Aucune technologie identique n'a pour le moment pu être développée chez l'homme du fait de l'absence de lignée myéломateuse humaine adaptée. Les anticorps monoclonaux murins ont été largement utilisés pour le diagnostic et la détection dans le domaine animal et végétal mais ils se sont avérés peu adéquats pour l'utilisation en thérapeutique humaine du fait de leur forte immunogénicité et de leur difficulté à pénétrer les tissus.

L'absence d'anticorps monoclonaux humains a ainsi stimulé le développement de l'ingénierie génétique des anticorps et différentes approches ont été utilisées afin de réduire l'immunogénicité des anticorps murins. Des anticorps «chimériques» comprenant des régions variables d'Ig souris et des régions constantes d'Ig humaine et des anticorps «humanisés» comprenant des CDR de souris et des FR et Fc humaines ont été réalisés. Avec l'avènement de la PCR et du fait que les séquences nucléotidiques des régions Fc, de la première FR et de la portion N-terminale sont relativement conservées pour toutes les classes d'anticorps au sein d'une même espèce animale, des amorces oligonucléotidiques consensuelles ont été et les gènes codant pour les chaînes lourdes et légères ont pu être directement isolés à partir des ADNc des cellules productrices. Ceci a alors permis de synthétiser dans différents systèmes d'expression hétérologues, c'est à dire dans des cellules non lymphocytaires, des fragments de type Fab et Fv mais également de nouvelles molécules telles que les scFv d'origine murine. Ces anticorps recombinants, plus petits que les anticorps natifs ont une immunogénicité réduite et une diffusion accrue au sein des tissus.

Un pas important dans l'ingénierie des anticorps a été franchi par l'établissement de banques combinatoires des séquences cDNA des parties variables des chaînes lourdes et légères isolées à partir de lymphocytes ou de splénocytes murins ou humains. Ces gènes peuvent être clones par combinaison aléatoire des chaînes lourdes et légères dans des vecteurs de phages filamenteux (M13 ou fd) de façon à exprimer les anticorps sous forme Fv ou scFv à la surface des phages. Les anticorps sont ensuite sélectionnés par accrochage des phages (après plusieurs cycles d'enrichissement) sur l'antigène désiré. Cette technique nommée « phage display » décrite pour la première fois en 1991 permet de sélectionner à partir d'une seule banque des anticorps recombinants ayant une forte affinité pour n'importe quel antigène. Le même principe de présentation combinatoire des antigènes peut également être réalisé à la surface des polysomes, le répertoire est dans ce cas une population d'ARNm, cette technique développée en 1997 est nommée « ribosome display ». L'affinité et la stabilité des anticorps recombinants sélectionnés peut être encore améliorée par des techniques de mutagenèse dirigée ou de mutagenèse aléatoire. Toutes ces techniques permettent de s'affranchir des lourdes étapes de production des hybridomes, de sélectionner des anticorps avec des affinités élevées qui n'existeraient pas à l'état naturel et de produire ces anticorps dans n'importe quel système hétérologue.

C'est la bactérie *E. coli* qui est la plus largement utilisée pour l'expression des anticorps du fait de sa facilité de manipulation et de multiplication. Les anticorps sont en général fusionnés avec un peptide signal d'origine procaryote afin de faciliter la formation des ponts disulfures par adressage de l'anticorps vers l'espace périplasmique. Des productions maximales de scFv de 10 % des protéines solubles totales ont pu être atteintes de cette manière. D'autres systèmes hétérologues ont également été utilisés pour l'expression des anticorps recombinants tels que les cellules de mammifères, les levures *Pichia pastoris*,

les champignons *Trichoderma reesei*, les cellules d'insectes et les plantes. Du fait de la facilité d'obtention et de production des anticorps recombinants, ils remplacent peu à peu les anticorps monoclonaux dans leurs diverses applications telles que l'immunothérapie, la détection d'antigènes, l'imagerie médicale et les procédés industriels (pour revues Filpula et Me Guire 1999, Harris 1999).

Les anticorps recombinants de type scFv

Les fragments variables simples-chaînes (scFv) sont des molécules monomériques formées des domaines VH et VL reliés entre eux par un peptide de liaison flexible. Ce pont peptidique permet d'une part l'expression équimolaire de ces deux domaines, mais d'autre part facilite également l'association et le repliement des domaines VH et VL entre eux. Les scFv, monovalents, correspondent à la structure minimale nécessaire à la reconnaissance de l'antigène.

Différents types de peptide de liaison ont été utilisés pour la construction des scFv, la séquence et le nombre d'acides aminés qui les composent ont été définies de façon à ce que leur conformation et leur longueur soient compatibles avec l'assemblage des domaines variables d'un scFv et la conservation de la structure tri-dimensionnelle du paratope. Le peptide de liaison le plus largement utilisé est composé d'une alternance d'acides aminés glycine et serine (Gly₄Ser)₃, ne possédant pas de structure tri-dimensionnelle ordonnée, il n'interfère donc pas avec le repliement du scFv.

Le premier gène chimérique codant pour un scFv a été obtenu par appariement de longs fragments d'oligonucléotides synthétiques déduits des séquences peptidiques d'anticorps monoclonaux. Ils ont par la suite été construits par isolement des séquences nucléotidiques des VH et VL par amplification par PCR.

Les anticorps recombinants de type scFv présentent de nombreuses caractéristiques avantageuses comparés aux Ig ou aux Fab et Fv. Le fait que les scFv soient monomériques et que les VH et VL soient liés de façon covalente augmente leur stabilité, jusqu'à 60 fois par rapport à celle du fragment Fv. Leur petite taille en comparaison avec les Ig entières les rend plus diffusibles, l'absence de la partie Fc les rend moins immunogènes. Enfin, il a été montré pour de nombreux scFv que leur affinité pour l'épitope est similaire à l'Ig native. Ces différentes propriétés font que ces molécules sont les plus utilisées parmi les différents anticorps recombinants lors d'applications in-situ telles que l'immunothérapie, l'immunomodulation et l'imagerie. Cependant, du fait que les scFv ne possèdent qu'un site de fixation à l'épitope, l'avidité se trouve réduite comparé aux immunoglobulines entières. Afin de palier ce problème, de nouveaux types de scFv, bi, tri ou tétravalents ont été synthétisés. En effet, la polymérisation des scFv peut-être induite sans liaison covalente en réduisant la taille du peptide flexible, ou en fusionnant les scFv avec des chaînes polypeptidiques facilitant leur dimérisation telles que les hélices amphipatiques ou les fragments CHS des Ig ou leur tétramérisation avec la streptavidine. Cette polymérisation peut être également réalisée par de façon covalente à l'aide de peptides flexibles supplémentaires reliant les scFv. Les structures ainsi formées peuvent être, selon la nature des différents scFv, mono ou bispécifiques pour la liaison à l'épitope.

5. Les protéines recombinantes

Les protéines recombinantes sont ainsi qualifiées dans la mesure où elles sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. Au sens large, un système de production adapté à la fabrication d'une protéine recombinante donnée, est un procédé biotechnologique qui s'appuie principalement sur :

- l'emploi d'un vecteur d'expression (en général un plasmide ou un virus -pour les vecteurs eucaryotes-), jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée ;
- l'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt qui lui est inséré, dans l'objectif de synthétiser la protéine recherchée ;
- une phase de production proprement dite permettant de fabriquer les volumes de protéines souhaités ;
- enfin, une séparation et extraction de la protéine du milieu de culture, suivie par une purification de celle-ci.

Au sens restreint, un système de production de protéines recombinantes est caractérisé par un couple constitué d'un vecteur d'expression et d'un hôte (cellule ou organisme).

1. Techniques mises en œuvre

Une vaste gamme de systèmes de production de protéines recombinantes c'est-à-dire, au sens restreint, de couples vecteurs-hôtes, est aujourd'hui disponible, chacun d'eux présentant des avantages et des inconvénients. Les hôtes les plus utilisés à l'heure actuelle sont incontestablement la bactérie *Escherichia coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules CHO extraites des ovaires de hamster.

E. coli : elle fût et reste encore le premier hôte utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes.

- exemples de protéines recombinantes produites : hormone de croissance humaine, insuline, chymosine, interféron- , interleukine-2...
- principaux avantages : sa génétique est très bien connue. De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont donc disponibles afin d'insérer et d'exprimer un gène étranger au sein de la bactérie. Elle est par ailleurs facile à utiliser, se prête très bien à la culture de masse en fermenteur. Enfin, les taux d'expression obtenus sont élevés, c'est-à-dire qu'elle permet de produire des quantités appréciables de protéines (jusqu'à plusieurs grammes par litre).
- principaux inconvénients : sécrétant mal les protéines, il est souvent nécessaire de "casser" la bactérie afin de récupérer la protéine (ce qui induit des problèmes de purification, ou de solubilisation et de renaturation..., quelquefois au détriment des rendements). Autre inconvénient majeur : *E. coli* n'effectue pas les modifications post-traductionnelles des protéines (en particulier la glycosylation, la carboxylation, etc.), qui constituent souvent une condition sine qua non d'activité de la protéine. Enfin *E. coli* étant une entérobactérie, il est donc nécessaire de s'assurer de l'absence d'endotoxines dans les protéines purifiées.

Saccharomyces cerevisiae : il s'agit de la levure de boulanger, utilisée depuis des millénaires dans l'alimentation humaine.

- exemples de protéines recombinantes produites : antigène de surface du virus de l'hépatite B, insuline, hirudine...
- principaux avantages : son matériel génétique est simple et elle ne présente aucune toxicité. Bons vecteurs d'expression disponibles aujourd'hui. Les taux d'expression des protéines sont relativement bons (de l'ordre de la centaine de milligrammes par litre). La levure est capable de fabriquer des protéines complexes et de réaliser des modifications post-traductionnelles (glycosylations simples, carboxylations, acylations...)
- principaux inconvénients : les protéines synthétisées sont souvent obtenues à l'intérieur du cytoplasme et nécessitent de casser la cellule afin de les récupérer. La sécrétion est possible, mais en général au détriment des rendements : elle fonctionne bien pour des petits polypeptides tels que l'insuline, mais beaucoup moins bien pour de grandes protéines.

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary)

- exemples de protéines recombinantes produites : antigène du virus de l'hépatite B, hormone de croissance humaine, cytokines, érythropoïétine, facteurs de coagulation...
- principaux avantages : méthode déjà employée dans la production d'un vaccin contre l'hépatite B, les cellules CHO se prêtent très bien à la culture de masse en bioréacteur. Un avantage discriminant de ces cellules réside dans leur capacité à synthétiser des protéines complexes de poids moléculaire élevé. Certains vecteurs d'expression (BPV -Bovine Papilloma Virus-, SV40...) permettent d'introduire et de faire exprimer des gènes humains.
- principaux inconvénients : rendements faibles (de l'ordre de 10 milligrammes par litre au maximum. En outre les cellules CHO s'avèrent fragiles et leur culture plus onéreuse.

D'autres systèmes de production, c'est-à-dire d'autres couples hôtes-vecteurs, se développent également aujourd'hui. Les hôtes sont principalement :

D'autres bactéries : *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*... A leur actif, celles-ci possèdent des capacités de sécrétion supérieures à *E. coli*. Cependant leur génétique est moins connue, et le niveau de production de protéines est inférieur à celui obtenu avec *E. coli*.

D'autres levures et champignons filamenteux : *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus niger* ou *spp...* des cellules d'insectes (*Spodoptera frugiperda*), utilisant des vecteurs d'expression développés à partir du Baculovirus. Ces cellules sont capables de sécréter la protéine recombinante et d'effectuer les opérations post-traductionnelles. Par ailleurs il est possible également d'utiliser des larves de vers à soie vivants.

Une autre voie consiste aujourd'hui à utiliser des bioréacteurs vivants en tant que système de production de protéines recombinantes, c'est-à-dire des plantes et animaux vivants, transgéniques : différentes techniques sont employées afin de transférer un gène d'intérêt dans le patrimoine génétique d'une plante : vecteurs bactériens, injection de cellules embryonnaires totipotentes, biolistique, électroporation du protoplaste. La mise au point de plantes transgéniques à partir de végétaux comme le tabac, le colza ou encore la pomme de terre, permet de produire une variété de protéines recombinantes précieuses (molecular farming) : interféron, interleukine, facteur VIII de la coagulation, hirudine... Dans ce domaine, restent principalement à résoudre les problèmes de niveau d'expression des protéines (rendements faibles), ainsi que d'extraction et de purification. Les plantes transgéniques pourraient représenter un moyen de production peu coûteux.

Les animaux transgéniques : les principales techniques de transgénèse utilisées sont la microinjection dans les pronuclei ou dans le cytoplasme de l'embryon, les vecteurs rétroviraux et les cellules ES -embryonnaires souches- de mammifères. Les animaux transgéniques peuvent être utilisés afin de produire des protéines hétérologues : production de facteur IX de la coagulation dans le lait de brebis transgéniques, lactoferrine humaine obtenue dans le lait de vache transgénique, hormone de croissance humaine dans le lait de souris, hémoglobine humaine produite dans le sang du porc... L'intérêt d'une production de protéines recombinantes dans le lait ou le sang d'animaux transgéniques se heurte cependant à des niveaux d'investissements très lourds pour des marchés *a priori* très restreints.

2. Objectifs de la technologie

Contexte concurrentiel et économique

Grâce aux avancées scientifiques spectaculaires des vingt dernières années en matière de génie génétique et de biologie moléculaire, il est aujourd'hui envisageable de modifier le patrimoine génétique d'un organisme vivant en lui incorporant un fragment d'ADN provenant d'une espèce différente, et de lui faire exprimer cette information génétique étrangère. Ces savoir-faire nouveaux de la génétique ont permis d'ouvrir des voies de recherche et de développement nouvelles aux perspectives considérables. Il devient possible aujourd'hui, en s'appuyant sur ces méthodologies, de reprogrammer le code génétique d'un micro-organisme en lui insérant un gène précis, qui lui permettra de produire une protéine recombinante précieuse (à usage médical -interféron, insuline, hormone de croissance...- ou

industriel -enzymes...-).

Les procédés biotechnologiques permettent ainsi de produire des molécules nouvelles -trop complexes à synthétiser par voie chimique-, ou constituent une alternative plus intéressante en regard d'autres procédés d'obtention de molécules actives (à titre d'exemple, l'utilisation de l'hormone de croissance autrefois extraite d'hypophyses de cadavres a malheureusement entraîné des cas de maladie de Creutzfeld-Jacob -lié à un prion présent dans ces extraits-, risque aujourd'hui inexistant avec l'utilisation de la même hormone recombinante, c'est-à-dire obtenue par génie génétique).

Les enjeux économiques sont colossaux. De 50 milliards de francs aujourd'hui, le marché mondial des biotechnologies, dans lequel les protéines recombinantes occupent une place primordiale, devrait atteindre les 300 milliards au tournant de ce siècle.

Mais sur ce marché des protéines recombinantes, la France reste en situation de dépendance, principalement vis-à-vis des Etats-Unis. Ce constat est à corréliser avec la situation de l'industrie pharmaceutique française qui n'est plus aujourd'hui qu'au 7^o ou 8^o rang mondial, alors qu'elle fut en position d'innovateur dans les années 70. La réussite américaine en biotechnologie s'explique notamment par les rapprochements qui se sont opérés entre les secteurs biotechnologique et pharmaceutique, alors qu'en France, l'industrie pharmaceutique a insuffisamment intégré les nouveaux outils de la biologie moléculaire, condition

Sine aua non du développement des activités biotechnologiques

Le tissu industriel national en biotechnologie ne compte qu'une dizaine d'entreprises de taille significative. Force est de constater que l'industrie française dans ce secteur n'a pas bénéficié d'un soutien financier suffisant, à l'instar notamment des entreprises biotechnologiques américaines, soutenues par une forte activité de capital-risque et par des levées importantes de capitaux sur le NASDAQ. Cependant cette situation devrait s'améliorer grâce à la mise en place du Nouveau Marché parisien, destiné à soutenir le financement des entreprises en forte croissance.

Fonctions remplies

La mise au point de systèmes de production de protéines recombinantes a pour objectif d'industrialiser la fabrication de ces protéines précieuses. Ces systèmes de production doivent être optimisés, en particulier en termes de qualité des produits obtenus, de rendement et de coût de production.

3. Environnement technologique

Technologies concurrentes :

Sont susceptibles de venir en concurrence à ces systèmes de production des procédés tels que :

- la synthèse chimique, incluant les hémisynthèses : celle-ci convient à la synthèse de petites molécules, avec une activité fonctionnelle équivalente aux protéines recombinantes ; mais la synthèse chimique nécessite au préalable une connaissance des mécanismes d'action des protéines ;
- l'extraction et la séparation, par criblage, de protéines précieuses présentes à l'état naturel dans certains végétaux ;
- la thérapie génique : plutôt que d'administrer une protéine, cette thérapie consiste à administrer un gène vectorisé (vecteur viral ou vecteur de synthèse). Cependant cette thérapie se situe encore au stade de l'expérimentation clinique.

Évolutions technologiques :

Les évolutions technologiques actuelles en matière de production de protéines recombinantes se limitent essentiellement à des améliorations et optimisations des procédés existants.

Les efforts portent essentiellement aujourd'hui sur les aspects plus en aval (caractérisation des fonctions des protéines recombinantes obtenues, physiologie, possibilité d'obtention de produit pur...).

6. La production de protéines "médicamenteuses" partir de plantes génétiquement modifiées

d'après la conférence de **Yann RANGE** (Dr Plant Pathology and Plant Molecular Genetics) journées académiques SVT Mai 2004 - académie de Clermont-Ferrand

1. Intérêt de la production de protéines dites "recombinantes" par des OGM

- les sources naturelles de protéines médicamenteuses sont limitées, d'où la nécessité de produire par d'autres moyens certaines protéines à visée thérapeutique notamment.
- les risques de contamination sont quasi inexistantes avec les protéines "recombinantes" ; en effet les extraits naturels de protéines médicamenteuses la plupart du temps d'origine animale ne sont pas purs à 100% . Les protéines extraites de végétaux génétiquement modifiés sont purifiées et surtout ne peuvent pas être contaminées par des agents moléculaires ou pathogènes communs aux plantes et humains.
- cette technique permet de produire des protéines modifiées afin d'augmenter par exemple l'efficacité de la molécule médicamenteuse (en modifiant par exemple quelques acides aminés)
- ce procédé permet une homogénéité des molécules produites : Toutes les molécules synthétisées du même lot ont les mêmes caractéristiques biochimiques.

2. Le système des plantes transgéniques présente des avantages

une sécurité biologique : aucun agent pathogène connu peut infecter des plantes et des animaux

- la production peut se faire à grande échelle par la culture de ces plantes transgéniques
- la production peut se faire à des coûts plus faibles que d'autres systèmes industriels de production.
- la production de protéines complexes qu'on ne sait produire par aucun autre procédé aujourd'hui, est possible par ces techniques.

3. Les végétaux utilisés comme système d'expression dans les laboratoires

- **le tabac** : l'expression du gène codant la protéine recombinante a lieu dans les feuilles uniquement (les autres tissus de la plante ne produisent pas la protéine bien que possédant le gène inséré). Les protéines recombinantes sont donc extraites de ces feuilles rapidement car celles-ci sont rapidement périssables.
- **le maïs** : l'expression du gène codant la protéine recombinante a lieu dans les graines seulement. Les graines peuvent être stockées 2 à 3 ans sans que la protéine recombinante s'altère. Les grains de maïs sont dégermés et l'extraction des protéines recombinantes se fait à partir de l'endosperme de la graine.

4. Les étapes : Du gène ... au médicament

- ✓ En laboratoire, synthèse et transformation du gène codant la protéine à produire = étape de "végétalisation" qui a pour but d'améliorer l'expression du gène dans les cellules végétales choisies .
- ✓ En laboratoire, transfert du gène par des plasmides bactériens dans les cellules végétales cultivées in vitro.
- ✓ En laboratoire , culture in vitro de plants exprimant le gène transféré et intégré.
- ✓ En Serre , puis en champs (après autorisation de mise en champ) , multiplication de la biomasse végétale génétiquement modifiée.

- ✓ En laboratoire extraction des tissus végétaux et purification de la protéine recombinante.
- ✓ Essais cliniques de la protéine médicamenteuse (durée de 3 à 6/8 ans)
- ✓ Mise sur le marché du médicament.

5. Les aspects réglementaires de la production de plantes transgéniques à destinée médicamenteuse

- Contrôle du projet par le "Comité de génie génétique" , le "comité de génie biologique" , le Ministère de l'agriculture
- proposition de lignes de conduite en matière réglementaire éditées en accord avec l'EMA
- publication de documents sur concepts et dépôts de brevets.
- précautions requises pour obtenir les autorisations de mises en champ :
 - choix d'une parcelle présentant certaines caractéristiques dans un lieu précis.
 - les outils de récolte sont dédiés aux récoltes de ces plantes transgéniques.