

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 8 Avril 2016

Par M. LEGROS Valentin

Les modifications post traductionnelles des nouvelles générations d'anticorps monoclonaux :
glycosylation et conjugaison à des molécules thérapeutiques

Membres du jury :

Président : Professeur Jean-Louis CAZIN

Assesseur : Monsieur Christophe CARNOY

Membre extérieur : Monsieur Christophe DE ROMEUF



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice-présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIÈRE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie

Année 2014-2015 (mise à jour 17 février 2015)

M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Année 2014-2015 (mise à jour 17 février 2015)

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

*Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille*

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises
dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury :

Monsieur Jean-Louis CAZIN, Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille II), Docteur ès Sciences Pharmaceutiques, Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie clinique en cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord Pas-de-Calais), Conseiller ordinal élu à l'Ordre National des Pharmaciens section H, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

M. Christophe CARNOY, PhD, Maître de conférences d'Immunologie à la Faculté de Pharmacie, pour son précieux accompagnement sur la réflexion du sujet de ma thèse afin de la rendre plus pertinente ainsi que pour son accompagnement pour la rédaction de ma thèse. Veuillez trouver ma sincère gratitude pour le temps consacré, votre disponibilité et vos conseils dans l'élaboration de ma thèse, ainsi que pour votre rigueur qui m'a permis de réaliser une rédaction de qualité.

M. Christophe DE ROMEUF, Directeur du département d'innovation en immunologie au LFB, pour avoir accepté d'apporter son expertise au jury de thèse lors de la soutenance.

Je remercie également ma famille qui m'a soutenu dans la rédaction de ma thèse en parallèle de mon activité professionnelle, et qui m'a accompagné tout au long de mes études.

Table des matières

REMERCIEMENTS	8
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES FIGURES.....	12
TABLE DES TABLEAUX.....	13
TABLE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION :	16
PARTIE I : GENERALITES SUR LES ANTICORPS ET LES ANTICORPS MONOCLONAUX	17
1. LES ANTICORPS NATURELS.....	17
1.1. Définition.....	17
1.2. Structure d'un anticorps.....	18
1.3. Les isotypes d'anticorps.....	19
1.3.1. Les Immunoglobulines Gamma	20
1.3.2. Les Immunoglobulines M, A, E et D (2) (1)	21
1.4. La réponse immunitaire adaptative humorale et sécrétion des IgG (1) (2).....	21
1.5. Synthèse protéique des IgG.....	23
1.6. La réponse polyclonale et la réponse monoclonale.....	23
1.6.1. La réponse polyclonale	23
1.6.2. La réponse monoclonale.....	23
2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX	24
2.1. Découverte des anticorps monoclonaux	24
2.2. Les différents types d'anticorps monoclonaux	25
2.2.1. Les AcM murins (suffixe –momab)	26
2.2.2. AcM chimériques (suffixe –ximab)	26
2.2.3. AcM humanisés (suffixe –zumab).....	26
2.2.4. AcM humains (suffixe –umab).....	27
2.3. Mécanismes d'actions des AcM	27
2.3.1. Neutralisation	28
2.3.2. Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)	29
2.3.3. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)	29
2.3.4. Oponisation.....	30
2.3.5. Apoptose	30
2.4. La production des AcM humains	30
2.4.1. Culture de lymphocytes B.....	30
2.4.2. Méthode standard actuelle de production des AcM	30
2.4.2.1. La technique du <i>phage display</i>	31
2.4.2.2. La production par culture de cellules de mammifères.....	33

PARTIE II : LA GLYCOSYLATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX ET SON IMPACT SUR L'ACTIVITE

THERAPEUTIQUE	35
1. INTRODUCTION SUR LA GLYCOSYLATION	35
2. LA GLYCOSYLATION DU FRAGMENT CRISTALLISABLE (Fc)	36
2.1. <i>Généralités</i>	36
2.2. <i>Méthodes d'analyse de la glycosylation</i>	38
2.2.1. Spectrométrie de masse et chromatographie liquide (LC/MS)	38
2.2.2. Cristallographie à rayons-X	39
2.2.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	39
2.2.4. Résultats sur la fréquence des types d'oligosaccharides	40
2.3. <i>Processus de glycosylation</i>	41
2.3.1. La glycosylation dirigée sur les acides aminés cibles	41
2.3.2. La N-Glycosylation de l'Asn 297	42
2.4. <i>Ingénierie de la glycosylation et impacts sur l'activité thérapeutique</i>	43
2.4.1. Les AcM non fucosylés	43
2.4.2. La sialylation des AcM	46
2.4.2.1. Effet de la sialylation sur la pharmacocinétique des AcM	46
2.4.2.2. Effets du taux de sialylation sur l'ADCC	47
2.4.2.3. Effet du taux de sialylation sur l'affinité au FcγR	48
2.4.2.4. Effet de la sialylation sur l'affinité aux antigènes	49
2.4.3. Glycosylation à haut taux de mannose	50
2.4.4. Les anticorps monoclonaux aglycosylés humains	51
2.4.4.1. Les propriétés pharmacologiques des AcM aglycosylés non modifiés	52
2.4.4.2. L'optimisation des fonctions effectrices	53
2.4.4.3. Les AcM aglycosylés en essais cliniques	54
3. GLYCOSYLATION DU FRAGMENT ANTIGENE BINDING	55
3.1. <i>Réduction de la polyréactivité des AcM</i>	55
4. DISCUSSION	57
PARTIE III : ANTIBODY BASED CONJUGATE	59
1. GENERALITES	59
1.1. <i>Introduction à l'ADC</i>	59
1.2. <i>Stratégies d'internalisation ou action en surface</i>	62
1.2.1. Libération intracellulaire	62
1.2.2. Libération au niveau de l'angiogenèse tumorale	62
2. CHOIX DE L'ACM	63
3. CHOIX DU LINKER ET CONJUGAISON A L'ACM	63
3.1. <i>Linkers clivables</i>	63
3.1.1. <i>Linkers hydrazone</i>	64
3.1.2. <i>Linkers disulfure</i>	65
3.1.3. <i>Linkers dipeptide</i>	66
3.2. <i>Linkers non clivables</i>	68

4.	LA CONJUGAISON MOLECULE – LINKER – ACM.....	69
4.1.	<i>Conjugaison aux lysines</i>	70
4.2.	<i>Conjugaison aux cystéines</i>	71
5.	LES MOLECULES UTILISEES POUR L'ADC.....	72
5.1.	<i>Radio Immuno Conjugate (RIC)</i>	72
5.2.	<i>Petites molécules</i>	74
5.2.1.	Les auristatines	74
5.2.2.	Les maytansinoïdes.....	75
5.2.2.1.	Cas du trastuzumab – DM1	77
5.2.3.	Les calichéamicines.....	79
5.3.	<i>Immuno Toxines</i>	81
5.4.	<i>Immuno Cytokines</i>	81
6.	DISCUSSION.....	82
	CONCLUSION	83
	BIBLIOGRAPHIE	84

Table des figures

FIGURE 1.	LA LIAISON EPITOPE – PARATOPE. (3).....	17
FIGURE 2.	REPRESENTATION SCHEMATIQUES DES DIFFERENTS ISOTYPES D’IMMUNOGLOBULINES. (5).....	18
FIGURE 3.	REPRESENTATION SCHEMATIQUES DES 4 SOUS-CLASSES D’IGG (8).....	20
FIGURE 4.	LA REPOSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE A MEDIATION HUMORALE. (9).....	22
FIGURE 5.	PRODUCTION DES ACM PAR LA TECHNIQUE DES HYBRIDOMES (11).....	24
FIGURE 6.	LES 4 TYPES MAJEURS D’ANTICORPS MONOCLONAUX UTILISES EN THERAPEUTIQUE.....	25
FIGURE 7.	LES STRATEGIES UTILISEES VIA LES ACM (17).....	28
FIGURE 8.	STRUCTURE PROTEIQUE D’UN PHAGE M13 ET LE GENOME ASSOCIE (20).....	31
FIGURE 9.	LES TECHNIQUES MAJEURES DE SELECTION DES ACM, DONT LES ACM HUMAINS (23).....	33
FIGURE 10.	PROCESSUS DE PRODUCTION DES ACM (25).....	34
FIGURE 11.	LES STRUCTURES OLIGOSACCHARIDIQUES MAJEURES DES ACM (30).....	37
FIGURE 12.	GLYCOSYLATION COMPRENANT UN MOTIF GLCNAC SUPPLEMENTAIRE.....	38
FIGURE 13.	RESULTATS APRES CRISTALLOGRAPHIE A RAYONS-X SUR UN ACM GLYCOSYLE ET BIO- INFORMATIQUE.....	39
FIGURE 14.	⁽¹⁾ PROFILS DES N-GLYCANES D’IGG PRODUITS <i>IN VITRO</i> (34).....	40
FIGURE 15.	SCHEMA DE SEQUENCES PROTEIQUES O-GLYCOSYLEES ET N-GLYCOSYLEES (35).....	41
FIGURE 16.	PROCESSUS DE GLYCOSYLATION DES ACM DANS DES CELLULES DE MAMMIFERE.....	43
FIGURE 17.	⁽²⁾ ANALYSE DE LA STRUCTURE DES N-GLYCANES DE BLX-300 ET DU RITUXIMAB PAR LC/MS.....	44
FIGURE 18.	⁽³⁾ MESURE COMPARATIVE DE L’ADCC ENTRE BLX-300 (AFUCOSYLE) ET RITUXIMAB (FUCOSYLE).....	44
FIGURE 19.	⁽⁴⁾ MESURE COMPARATIVE DE LA CDC ENTRE BLX-300 (AFUCOSYLE) ET RITUXIMAB (FUCOSYLE).....	45
FIGURE 20.	STRUCTURE D’UN ACIDE SIALIQUE.....	46
FIGURE 21.	⁽⁵⁾ ACTIVITE DE L’ADCC D’ACM EN FONCTION DE LEUR TAUX DE SIALYLATION.....	47
FIGURE 22.	⁽⁶⁾ AFFINITE POUR LES RECEPTEURS FCRIIIA EN FONCTION DU TAUX DE SIALYLATION (42).....	49
FIGURE 23.	⁽⁷⁾ MESURE DE L’AFFINITE POUR LES ANTIGENES EN FONCTION DU TAUX DE SIALYLATION (42).....	50
FIGURE 24.	DIFFERENCES CONFORMATIONNELLES ENTRE LA STRUCTURE GLYCOSYLEE ET AGLYCOSYLEE D’UN ACM.....	52
FIGURE 25.	SELECTIVITE D’UN ACM AGLYCOSYLE POUR LES FCRI EN FONCTION DE SES MUTATIONS.....	54
FIGURE 26.	SCHEMA DE LA METHODE DE REDUCTION DE LA POLYREACTIVITE PAR N-GLYCOSYLATION.....	56
FIGURE 27.	REACTIVITE DES VARIANTS DE VRC07 A LA CARDIOLIPINE.....	57

FIGURE 28.	MECANISME DE LIBERATION DE LA MOLECULE CYTOTOXIQUE (56)	60
FIGURE 29.	SCHEMA DE LA STRUCTURE DU TRASTUZUMAB SOUS FORME ADC. (57)	61
FIGURE 30.	STRATEGIES DE LIBERATION DE LA MOLECULE CYTOTOXIQUE (59).	62
FIGURE 31.	FONCTION HYDRAZONE D'UN ADC	64
FIGURE 32.	STRUCTURE DU MYLOTARG®, AVEC LES FONCTIONS HYDRAZONE ET DISULFURE.....	65
FIGURE 33.	ADC POSSEDANT UN <i>LINKER</i> DE TYPE DISULFURE	65
FIGURE 34.	ADC POSSEDANT UN <i>LINKER</i> DE TYPE DIPEPTIDE	66
FIGURE 35.	SCHEMA DU CLIVAGE DU <i>LINKER</i> VALINE-CITRULLINE LIBERANT LA MMAE SOUS FORME ACTIVE 67	
FIGURE 36.	CLIVAGE DE LA LIAISON ACM – <i>LINKER</i> DE L'ADC DANS LE LYSOSOME	68
FIGURE 37.	DISTRIBUTION STATISTIQUE DU NOMBRE DE LYSINES CONJUGUEES PAR ADC (65).	70
FIGURE 38.	DISTRIBUTION STATISTIQUE DU NOMBRE DE CYSTEINES CONJUGUEES PAR ADC (65).	71
FIGURE 39.	SCHEMA DES DIFFERENTS TYPES D' <i>ANTIBODY BASED CONJUGATES</i>	72
FIGURE 40.	REPRESENTATION DE LA DOLASTATINE 10, DE LA MMAE ET D'UN ADC-MMAE.	75
FIGURE 41.	STRUCTURE CHIMIQUE DES COMPOSES DM1 ET DM4, DERIVES DE LA MAYTANSINE.....	76
FIGURE 42.	ESTIMATION DE LA SURVIE SANS PROGRESSION (PFS) PAR ESTIMATEUR DE KAPLAN-MEIER (73). 78	
FIGURE 43.	ESTIMATION DE LA DUREE DE REPONSE OBJECTIVE (DOR) PAR ESTIMATEUR DE KAPLAN-MEIER (73). 78	
FIGURE 44.	FREQUENCE D'APPARITION DES EFFETS INDESIRABLES DANS LES GROUPES HT ET T-DM1 (73). 79	
FIGURE 45.	STRUCTURE EN 2 PARTIES DE LA CALICHEAMICINE.	80

Table des tableaux

TABLEAU 1.	LES PARAMETRES PHARMACOLOGIQUES DES DIFFERENTES CLASSES D'IG. (1) (6)	19
TABLEAU 2.	CLASSIFICATION DES GROUPEMENTS OLIGOSACCHARIDIQUES DES ACM (30).....	37
TABLEAU 3.	SYNTHESE DES EFFETS PRINCIPAUX DES DIFFERENTS GLYCANES DES ACM	58

Table des abréviations

AcM : Anticorps Monoclonal

ADC : Antibody Drug Conjugate

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ARNm : ARN messenger

Asn 297 : Asparagine 297

Asp 297 : Acide Aspartique 297

BCR : B-Cell Receptor

CDC : Cytotoxicité dépendante du complément

CDR : Complementarity-Determining Regions

CHO : Chinese Hamster Ovary

EBV : Epstein-Barr Virus

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Fab : Fragment antigen-binding

Fc : Fragment cristallisable

FcR : Fc receptor

Gal : Galactose

GalNac : N-Acétyl Galactosamine

GlcNac : N-Acétyl Glucosamine

HAMA : Human Anti – Mouse Antibody

HEK 293 : Human Embryonic Kidney

IgA : Immunoglobuline Alpha

IgD : Immunoglobuline Delta

IgE : Immunoglobuline Epsilon

IgG : Immunoglobulines Gamma

IgM : Immunoglobuline Mu

IL2 : Interleukine 2

INF : Interferon

IT : Immuno Toxine

LC : Chromatographie Liquide

MAI : Maladie AutoImmune

MALT : Mucosal Associated Lymphoid Tissu

Man : le Mannose

MDR : Multi Drug Resistance

MMAE / MMAF : MonoMethyl Auristatine E ou F

MS : Spectrométrie de Masse

NANA : Acide N-Acétylneuraminique

NGNA : Acide N-glycolylneuraminique

NK : Natural Killer

PNN : Polynucléaires neutrophiles

RIC : Radio Immuno Conjugate

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ScFV : Single-chain variable fragment

TNF : Tumor Necrosis Factor

Introduction :

Les biothérapies sont apparues à la fin du 18^{ème} siècle avec l'apparition de la vaccination d'Edward Jenner et les premières injections d'insulines par Frederick Banting et Charles Best dans les années 1930. C'est à cette époque que l'insuline est produite et purifiée à partir de pancréas de bœuf et de porc.

La fin du 20^{ème} siècle amena alors des évolutions majeures grâce aux avancées de la médecine, notamment en génétique. L'insuline est dès lors produite dans organismes génétiquement modifiés – des levures et bactéries ayant reçu le gène humain de l'insuline. C'est également durant cette période qu'ont été développés les anticorps monoclonaux, à partir de la découverte du mécanisme d'action des anticorps naturellement produits par le système immunitaire. Ces nouvelles thérapies permettent de cibler spécifiquement un récepteur ou une molécule, là où les petites molécules avaient atteint leurs limites thérapeutiques.

Les anticorps monoclonaux comptent parmi les médicaments les plus vendus dans le monde à l'heure actuelle. Leurs indications principales sont notamment les cancers et les maladies auto-immunes. En premier lieu, le développement de cette technologie consista à augmenter les parties humaines des anticorps produits à échelle industrielle – d'origine murine au début – jusqu'à les rendre complètement humains. Puis une deuxième phase d'évolution s'est enclenchée, consistant à améliorer ou optimiser l'activation des fonctions effectrices de ces anticorps par le système immunitaire. Ces recherches ont porté notamment sur deux axes : la glycosylation et la conjugaison à des molécules thérapeutiques (Antibody Drug Conjugate).

Les travaux de recherches sur la glycosylation ont permis, premièrement de moduler les fonctions effectrices des anticorps monoclonaux, et deuxièmement d'améliorer leurs paramètres pharmacocinétiques et de diminuer leur immunogénicité.

La technologie de conjugaison à des molécules thérapeutiques (antibody drug conjugate) a été développée afin d'utiliser l'internalisation des anticorps dans les cellules cibles pour le traitement des cancers. Le principe consiste en la libération intracellulaire de molécules cytotoxiques, alors que ces mêmes molécules auraient entraîné de graves – voir mortels – effets indésirables si elles avaient été administrées de manière systémique et non ciblée.

Partie I : Généralités sur les anticorps et les anticorps monoclonaux

1. Les anticorps naturels

1.1. Définition

Un anticorps est une immunoglobuline ayant reconnu un antigène. Les immunoglobulines sont des glycoprotéines solubles ou membranaires (1). Elles sont solubles lorsqu'elles sont sécrétées par les plasmocytes lors de la réponse adaptative humorale, suite à la reconnaissance d'un antigène, par le système immunitaire, via une immunoglobuline membranaire d'un lymphocyte B : le récepteur cellulaire des lymphocytes B (BCR).

Un antigène étant composé d'une mosaïque d'épitopes, ou déterminants antigéniques, un anticorps reconnaît et lie – via son paratope - un seul type d'épitope, par liaison non covalente, représenté en figure 1. C'est en se liant aux agents pathogènes porteurs de cet antigène que les anticorps permettent au système immunitaire de les éliminer via différentes fonctions effectrices. Leur mécanisme ainsi que leur efficacité varient en fonction de l'isotype de l'immunoglobuline et de sa sous-classe (2).

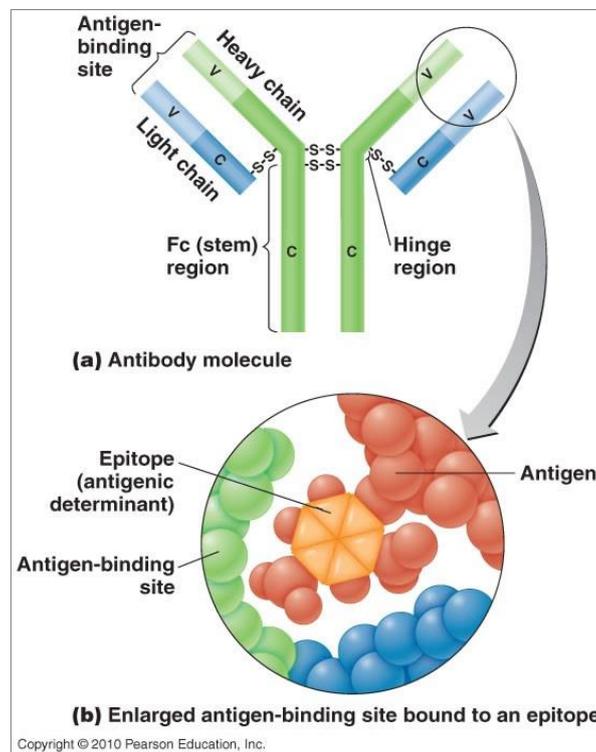


Figure 1. La liaison épitope – paratope. (3)

Le nombre d'épitopes existants est estimé à environ 10^{15} . Pour reconnaître ces multiples Ag, le système immunitaire dispose d'un répertoire immunologique lui conférant un polymorphisme de reconnaissance estimé à 10^{18} récepteurs des lymphocytes B différents. Un clone de

lymphocyte B ne secrète qu'un seul type d'anticorps, et permet donc de lier un seul motif antigénique (1).

1.2. Structure d'un anticorps

Les anticorps peuvent être divisés en trois classes, ou fractions, en fonction de leur masse atomique : la fraction 7S ayant une masse atomique d'environ 150kDa, la fraction 11S ayant une masse atomique d'environ 300 kDa et la classe 19S ayant une masse atomique d'environ 900 kDa (2).

La structure de base consiste en une paire de chaîne légères et une paire de chaînes lourdes qui sont composées en domaines structuraux de 110 acides aminés. Ces domaines structuraux forment les chaînes constituant une immunoglobuline : deux chaînes peptidiques légères L, pouvant être de deux types, κ ou λ . Et deux chaînes lourdes H, pouvant être de 5 types différents, définissant ainsi les 5 isotypes d'immunoglobulines : IgG : γ , IgA : α , IgD : δ , IgE : ϵ et IgM : μ (4), représenté en figure 2.

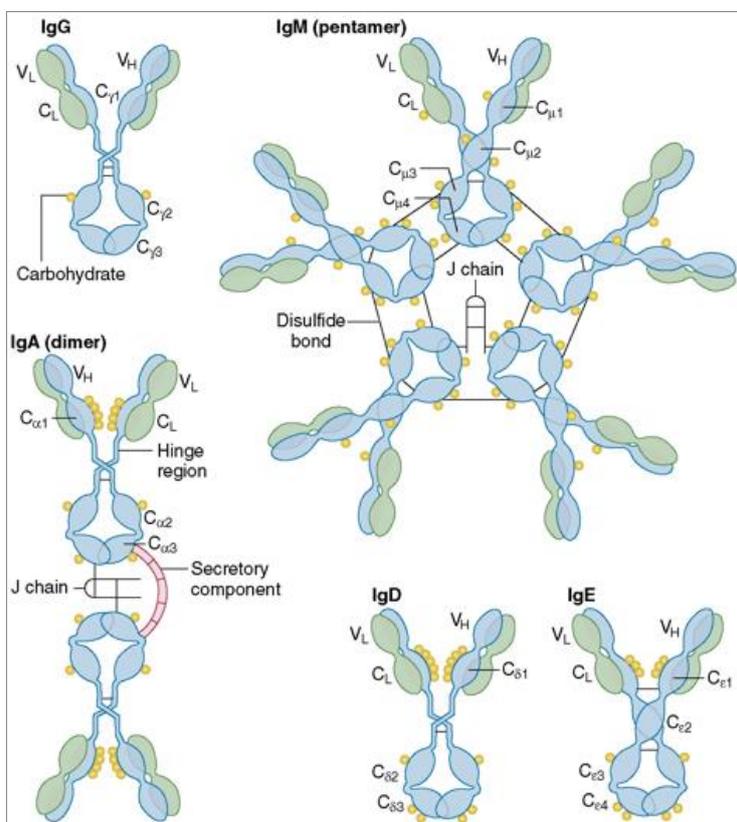


Figure 2. Représentation schématisée des différents isotypes d'immunoglobulines. (5)

Les chaînes L et H sont composées de deux parties, la partie constante C constituée des domaines structuraux C_{H1}, C_{H2} et C_{H3} – et C_{H4} pour certains sous-types d'anticorps – et la partie variable V, constituée des domaines structuraux V_H et V_L, la partie variable formant les paratopes de l'anticorps. L'association des domaines V_H et V_L détermine la spécificité de l'anticorps pour un antigène. Cette partie variable est elle-même composée de régions hypervariables, les Complementarity-Determining Regions (CDR), dont la grande variabilité permet au système immunitaire d'adresser un grand nombre d'antigène, et dont l'avidité pour un antigène spécifique est forte. Il existe trois formes de paratopes pour lier les antigènes : en poche, en sillon ou en surface élargie (2).

Par ailleurs, les anticorps ont une région charnière au niveau du domaine CH2, composée de ponts disulfures. Le nombre de ponts disulfures détermine la sous-classe de l'isotype d'anticorps, et détermine ses propriétés effectrices. La région charnière donne la flexibilité aux paratopes. Plus la région charnière est large, plus la flexibilité entre les deux régions variables est grande. Cette flexibilité est essentielle pour maximiser l'affinité d'un anticorps pour un antigène, du fait de l'éloignement fréquent des épitopes à la surface de l'antigène cible (1).

1.3. Les isotypes d'anticorps

Les isotypes d'immunoglobulines diffèrent selon leurs structures moléculaires, leurs constantes d'affinité, d'avidité et de l'efficacité de leurs fonctions effectrices. Ces différences sont décrites dans le tableau 1.

Tableau 1. Les paramètres pharmacologiques des différentes classes d'Ig. (1) (6)

Sous-classes	IgG				IgA		IgM	IgE	IgD
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2			
Structure	$\kappa_2\gamma_1$ ₂ ou $\lambda_2\gamma_1$ ₂	$\kappa_2\gamma_2$ ₂ ou $\lambda_2\gamma_2$ ₂	$\kappa_2\gamma_3$ ₂ ou $\lambda_2\gamma_3$ ₂	$\kappa_2\gamma_4$ ₂ ou $\lambda_2\gamma_4$ ₂	$(\kappa_2\alpha_1)$ ₂ 1-2 ou $(\lambda_2\alpha_1)$ ₂ 1-2	$(\kappa_2\alpha_2)$ ₂ 1-2 ou $(\lambda_2\alpha_2)$ ₂ 1-2	$(\kappa_2\mu_2)$ ₅ ou $(\lambda_2\mu_2)$ ₅	$\kappa_2\delta_2$ ou $\lambda_2\delta_2$	$\kappa_2\delta_2$ ou $\lambda_2\delta_2$
Fixation du complément (Voie classique - C1q)	++	+	+++	-	-	-	+++	-	-
Fixation avec : - macrophages - polynucléaires neutrophiles (Fc γ R)	+++	+/-	+++	+/-	-	-	-	-	+
Fixation avec : - mastocytes/basophiles (Fc ϵ R)	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Demi-vie (jours)	21-24	21-24	7-8	21-24	5-7	4-6	5-10	1-5	2-8
Distribution	Sérum				Sérum et sécrétions		Sérum et sécrétions	Sérum	Membrane

1.3.1. Les Immunoglobulines Gamma

Les IgG sont l'isotype le plus présent dans le sérum. De la classe des 7S, les IgG sont de plus faible masse atomique que les autres immunoglobulines et ont la capacité de traverser les espaces extracellulaires et intracellulaires. Les IgG lient les épitopes avec une forte affinité et une faible avidité. Leur demi-vie dans le compartiment sanguin est de 23 jours en moyenne, excepté la sous-classe IgG3 possédant une demi-vie moyenne de 7 jours (6).

Les IgG peuvent être divisées en 4 sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 (Figure 3), en fonction de la taille de la région charnière et de la position des ponts disulfures entre les deux chaînes lourdes ou entre les chaînes lourdes et légères. Par ailleurs, les sous-classes d'IgG ont une séquence protéique homologue à 90% (7).

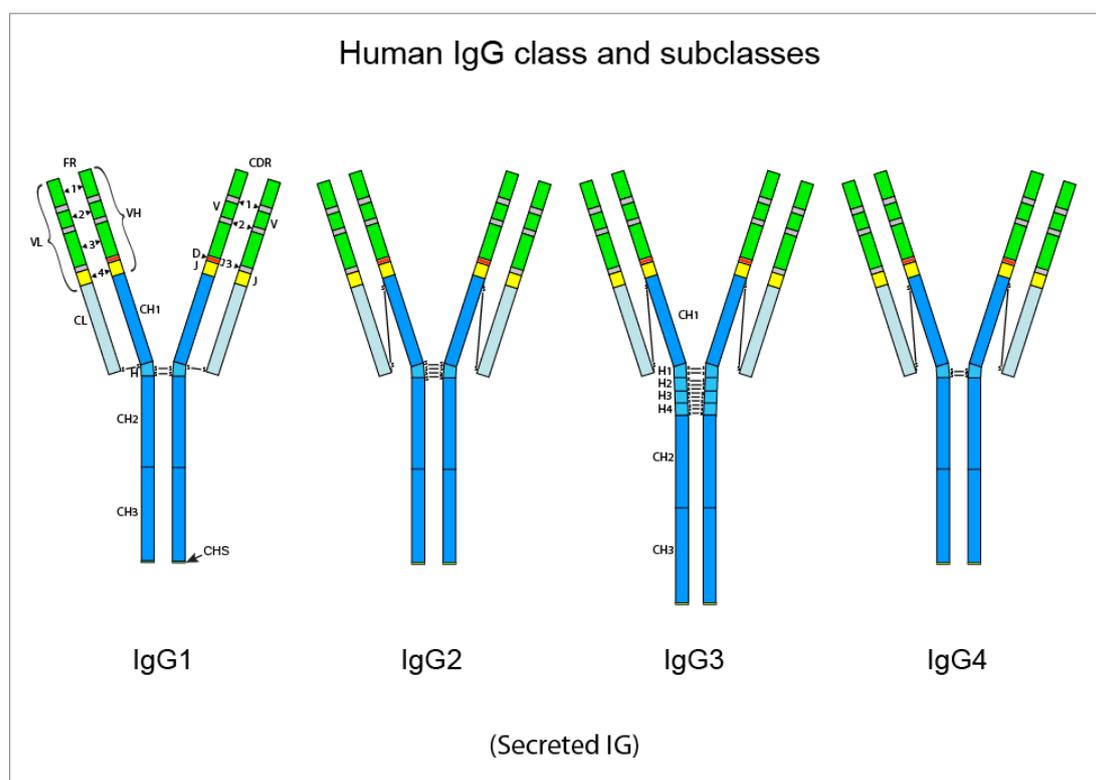


Figure 3. Représentation schématisques des 4 sous-classes d'IgG (8).

Les IgG1 et IgG3 sont produits en réponse à un antigène protéique alors que les IgG2 et IgG4 sont produits en réponse à un antigène glucidique. Leurs propriétés diffèrent au niveau du domaine CH2, avec une variation de la liaison avec les Fc γ récepteurs (Fc γ R) et de l'activation de la voie classique du complément, par la fixation du complexe C1q au niveau de l'Asparagine 297 (Asn 297). Par exemple, l'activation du complément est 40 fois plus puissante avec les IgG1 et IgG3 qu'avec les IgG2, alors que les IgG4 inhibent son activation. Au vue de leurs

propriétés pharmacodynamiques et pharmacologiques, les IgG sont l'isotype le plus utilisé en thérapeutique (2).

1.3.2. Les Immunoglobulines M, A, E et D (2) (1)

Ces quatre isotypes, moins abondants que les IgG, ont chacun leurs spécificités en termes de structure moléculaire, de fonctions effectrices et de localisation au niveau des tissus.

Les IgM, de la classe 19S, les immunoglobulines M sont formées lors de la réponse immunitaire initiale dirigée contre un antigène. Ce sont les premières Ig sécrétées lors de la réponse immunitaire, elle fixe plus efficacement le complément que les IgG. L'isotype M existe sous forme pentamérique soluble ou sous forme monomérique membranaire.

Les IgA, de la classe 11S, est un anticorps le plus souvent en dimère, dont le rôle principal est la défense immunitaire des muqueuses. Les deux monomères sont reliés entre eux par une chaîne J permettant leurs sécrétions dans les tissus muqueux. Leur synthèse protéique est réalisée au sein des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (*mucosal associated lymphoid tissu* – MALT).

Les IgE sont des médiateurs majeurs de la réponse allergique immédiate, notamment avec des conséquences dans des pathologies telles que l'asthme ou les rhinites. La structure des IgE est semblable à celle des IgG, leur structure diffèrent par une chaîne légère ϵ plus fortement glycosylée et un domaine constant supplémentaire C_{H4} , restreignant les IgE à se fixer aux Fc ϵ R des mastocytes et basophiles avec une forte affinité.

Enfin les IgD sont des immunoglobulines soit libre dans le sérum soit fixées sur les lymphocytes B. Leur proportion sérique est inférieure à 1% du fait de leur demi-vie très courte, entre 2 et 3 jours. Des études suggèrent que les IgD sont des autoanticorps issus de lymphocytes B ayant échappé à la sélection clonale.

1.4. La réponse immunitaire adaptative humorale et sécrétion des IgG (1) (2)

Lorsqu'un antigène est reconnu par le système immunitaire, la stimulation de ce dernier se fait par deux voies :

L'immunité à médiation cellulaire, par laquelle des cellules présentatrices d'antigènes vont présenter les épitopes aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes, lors de la phase de coopération cellulaire. Ce processus entraîne la stimulation et la prolifération des cellules effectrices tels que les lymphocytes T cytotoxiques ou les lymphocytes T CD4⁺ sécrétant des cytokines.

Lors de l'activation de l'immunité à médiation humorale, les lymphocytes B ayant reconnu un épitope de l'antigène vont présenter cet épitope aux lymphocytes T. Puis, via le mécanisme de coopération cellulaire, ces lymphocytes B vont entraîner l'activation et la prolifération des lymphocytes T ainsi que celle des lymphocytes B ayant reconnu un épitope de l'antigène cible. Ce phénomène est représenté en figure 4. Ainsi, les lymphocytes vont se différencier soit en lymphocytes B mémoire, soit en plasmocytes. Ce sont les plasmocytes qui vont sécréter de grandes quantités d'anticorps dirigés contre l'antigène cible. Un plasmocyte est issu d'un clone de lymphocyte B et sécrète un seul type d'anticorps. Ces lymphocytes B ont d'abord subi une hypermutation somatique des régions hypervariables du paratope au niveau des centres germinatifs, avant d'être sélectionnés si ils reconnaissent un Ag du non-soi, ou d'entrer en apoptose dans le cas contraire (hors échappement au processus de sélection clonale).

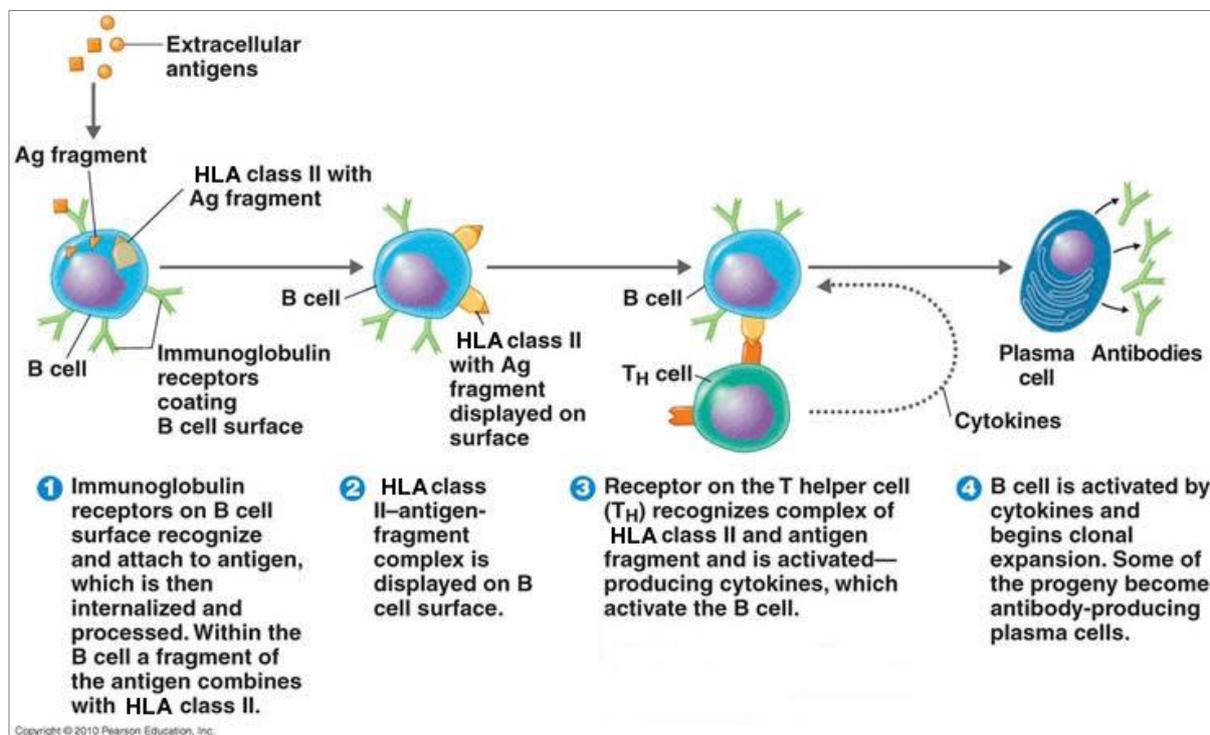


Figure 4. La réponse immunitaire adaptative à médiation humorale. (9)

1.5. Synthèse protéique des IgG

Lorsqu'un lymphocyte B mature se différencie en plasmocyte, un grand nombre d'ARN messagers (ARNm) sont transcrits du gène de l'immunoglobuline. Puis s'ensuit la traduction massive de ces ARNm en protéines, préfigurant la structure finale des immunoglobulines.

Suite à cette traduction, les immunoglobulines vont subir des modifications post traductionnelles. Ces modifications consistent en l'ajout de glycanes sur différents acides aminés de l'immunoglobuline. Pour les IgG, ces modifications interviennent plus particulièrement au niveau de l'Asn 297, et permettent la modulation des fonctions effectrices de l'immunoglobuline. Une fois les modifications post traductionnelles effectuées, les IgG sont sécrétées massivement par les plasmocytes.

1.6. La réponse polyclonale et la réponse monoclonale

1.6.1. La réponse polyclonale

Un antigène étant composé d'une mosaïque d'épitopes, celui-ci peut être reconnu par plusieurs récepteurs des lymphocytes B (un lymphocyte B possédant un seul type de récepteur). Lors de l'expansion clonale suite à la coopération cellulaire avec les lymphocytes T, de multiples lymphocytes B, reconnaissant chacun un épitope distinct composant l'antigène vont donc proliférer et se différencier en plasmocytes.

La réponse est appelée polyclonale puisque plusieurs anticorps différents sont dirigés contre l'antigène, chacun ciblant un épitope spécifique.

1.6.2. La réponse monoclonale

La réponse est dite monoclonale lorsqu'un seul lymphocyte B est activé et par conséquent un seul type d'anticorps est dirigé contre l'antigène en ciblant un épitope spécifique.

Plus particulièrement, la réponse monoclonale peut être observée lorsqu'un antigène donné est ciblé via l'administration d'un traitement par anticorps monoclonaux (AcM).

Les AcM utilisés en thérapeutique sont de type IgG, puisque ce sont des anticorps combinant une demi-vie longue et l'activation de nombreuses fonctions effectrices.

2. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux, dont le développement s'est accéléré suite aux découvertes des docteurs Milstein et Köhler, sont les produits issus des biotechnologies qui se sont développés le plus rapidement, aussi bien pour le diagnostic et le suivi clinique des patients que pour le traitement de pathologies par thérapies ciblées. (10)

2.1. Découverte des anticorps monoclonaux

Les chercheurs César Milstein et Georges Köhler ont partagé le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1984 pour leur travaux sur le principe de production des AcM (Figure 5), ayant permis de prouver formellement la théorie de la sélection clonale (10). Leur principe de production repose sur la technique des hybridomes, en fusionnant *in vitro* une cellule de myélome et une cellule B de souris produisant des anticorps. Suite à l'immunisation des souris par un antigène spécifique, les cellules de la rate ont été fusionnées avec des cellules de myélome. Les hybrides ainsi créés ont été mis en culture, et le screening du surnageant de la culture a permis, pour la première fois, d'obtenir une relativement grande quantité d'AcM purs et ciblant spécifiquement un antigène donné.

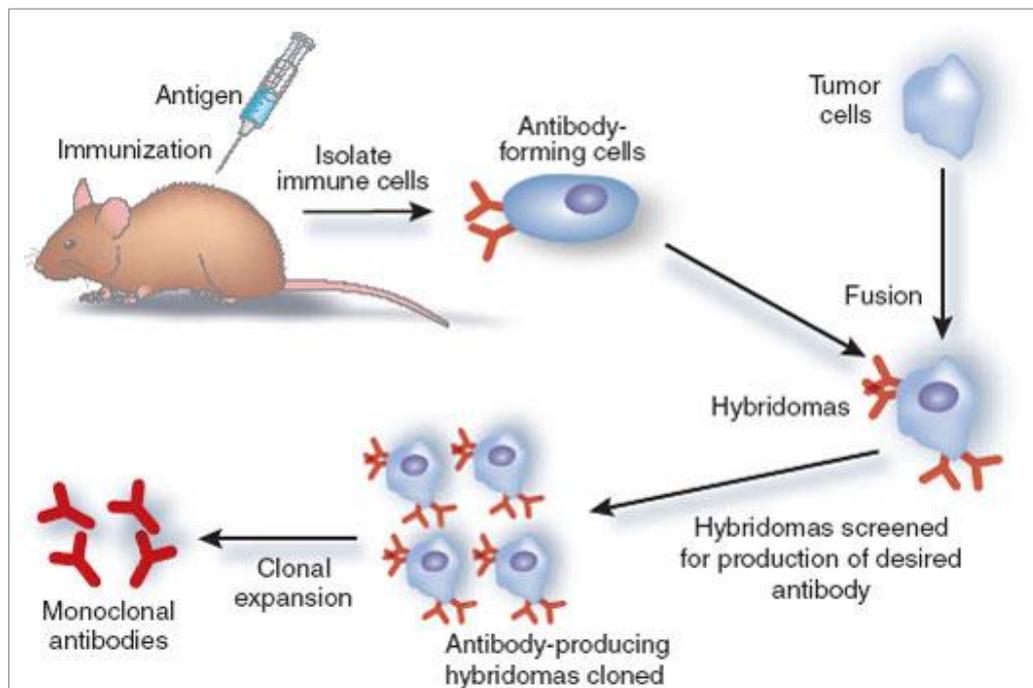


Figure 5. Production des AcM par la technique des hybridomes (11)

La particularité de leur technique fut d'utiliser des cellules de myélome ayant une déficience en hypoxanthine phosphoribosyl transférase. Ainsi, les cellules n'ayant pas fusionné avec les cellules B seraient mortes dans le milieu de culture riche en hypoxanthine (12). Cette technique est devenue le standard pour la production d'AcM murins, notamment pour les tests diagnostiques tels que les tests ELISA.

La technique développée par Köhler et Milstein repose sur trois principes de base :

- Chaque lymphocyte B produit un seul type d'anticorps.
- Les lymphocytes utilisés sont issus de donneurs ayant été préalablement immunisés par l'antigène cible.
- Les lymphocytes B peuvent être immortalisés *in-vitro* en cellule sécrétrice d'anticorps.

Leurs recherches ont permis une évolution rapide du développement des anticorps murins jusqu'au développement d'AcM entièrement humains grâce à l'évolution des techniques de productions.

2.2. Les différents types d'anticorps monoclonaux

Il existe 4 types d'anticorps monoclonaux, chacun étant apparu avec l'évolution des technologies de production de ces glycoprotéines thérapeutiques : les AcM murins, les AcM chimériques, les AcM humanisés et les AcM humains. La différence majeure entre chacun des types d'AcM est le ratio entre les parties humaines et non-humaines (Figure 6).

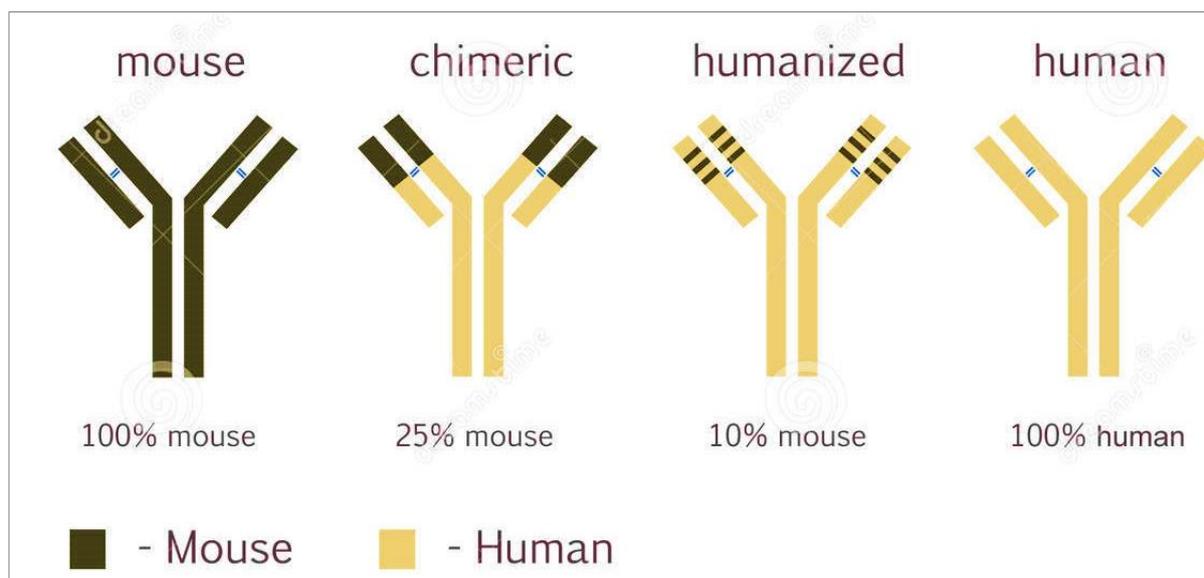


Figure 6. Les 4 types majeurs d'anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique

2.2.1. Les AcM murins (suffixe –momab)

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

Sa structure était de type IgG2 et agissait en bloquant les récepteurs CD3 à la surface des lymphocytes T (13). Les anticorps murins ne sont que très rarement utilisés en thérapeutique à l'heure actuelle, du fait de leur faible demi-vie ainsi que de leur forte immunogénicité. En effet, leur injection entraîne la production rapide d'anticorps humains anti-souris (HAMA) dirigés contre les AcM murins – reconnus comme antigènes du non-soi – provoquant une résistance au traitement, une allergie voir même un choc anaphylactique (4). Par ailleurs, le fragment cristallisable (Fc) étant d'origine murine, les AcM murins ne provoquent pas l'activation de cellules effectrices telles que les macrophages ou les cellules NK.

2.2.2. AcM chimériques (suffixe –ximab)

Les AcM chimériques sont composés de deux parties : le fragment Fc humain, et le fragment *antigen-binding* (Fab) murin, dont les parties variables sont greffées sur le fragment Fc (2), cette partie humaine représentant en moyenne 70% de la structure de l'AcM. Les avantages amenés par cette technique sont multiples. Tout d'abord les AcM chimériques étant en grande partie d'origine humaine, leur immunogénicité diminue, et la résistance au traitement apparaît plus tardivement. De plus, le Fc humain permet aux AcM ayant reconnu l'antigène cible d'activer un certain nombre de fonctions effectrices cellulaires et humorales (14). La demi-vie des AcM chimériques reste plus faible que les IgG naturels. Le traitement par AcM chimérique le plus utilisé est le Rituximab (Rituxan®), un AcM anti-CD20, utilisé dans le traitement de lymphomes à lymphocyte B exprimant le récepteur CD20 ciblé.

2.2.3. AcM humanisés (suffixe –zumab)

Les AcM humanisés sont à plus de 90% humains (4). Leurs parties Fc est entièrement humaine, et leur partie Fab est humaine excepté au niveau des régions hypervariables (CDR). Ces régions hypervariables ont été modifiées au niveau du gène codant pour l'immunoglobuline, par mutagenèse dirigée, afin de moduler l'affinité de l'anticorps pour son épitope cible. Les anticorps humanisés apportent une plus grande efficacité des fonctions effectrices. Par ailleurs, ils sont le plus souvent glycosylés. Ainsi, les AcM humanisés ont une demi-vie quasiment

identique à une IgG humaine, avec un risque de résistance au traitement et une immunogénicité plus faible (14), il existe néanmoins la possibilité de la production d'HAMA due à la présence de séquences murine. Les AcM humanisés représentent le type d'AcM ayant le plus d'autorisations de mise sur le marché, avec de nombreuses indications :

- En oncologie avec par exemple le bevacizumab (Avastin®) dans le traitement des cancers colo-rectal, du poumon, du sein ou encore le trastuzumab (Herceptin®) dans le traitement du cancer du sein.
- Dans le traitement des Maladies Inflammatoires avec par exemple le Certolizumab Pegol (Cimzia®) dans le traitement de la maladie de crohn et le natalizumab (Tysabri®) dans le traitement de la sclérose en plaques.

2.2.4. AcM humains (suffixe –umab)

Ces AcM sont entièrement humains, aussi bien au niveau du Fc que du Fab (14). La demi-vie de ces AcM est encore augmentée par rapport aux autres types, étant donnée leur très faible immunogénicité ainsi que le faible risque de production d'HAMA. En conséquences, les traitements par AcM humains peuvent être administrés à intervalles plus étendus, et avec un risque de provoquer une réaction allergique fortement diminué (15). L'AcM humain le plus utilisé à l'heure actuelle est l'adalimumab (Humira®), un anti TNF utilisé dans de multiples maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante et la maladie de crohn (16).

2.3. Mécanismes d'actions des AcM

Les AcM, lorsqu'ils se lient à leur antigène cible, activent des fonctions effectrices du système immunitaire. Ces fonctions effectrices dépendent de plusieurs paramètres, tels que :

- La sous-classe d'IgG utilisés
- Le taux d'humanisation de l'AcM
- Le type de structure de l'AcM
- La glycosylation de l'AcM

Les 5 principales fonctions effectrices des AcM sont la neutralisation, la cytotoxicité dépendante du complément, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, l'opsonisation et l'apoptose.

D'autres stratégies peuvent être artificiellement utilisées (Figure 7), telle que l'*Antibody Drug Conjugate* qui consiste à fixer une molécule cytotoxique sur l'anticorps pour éliminer une cellule de manière ciblée avec un agent toxique tout en diminuant les effets indésirables.

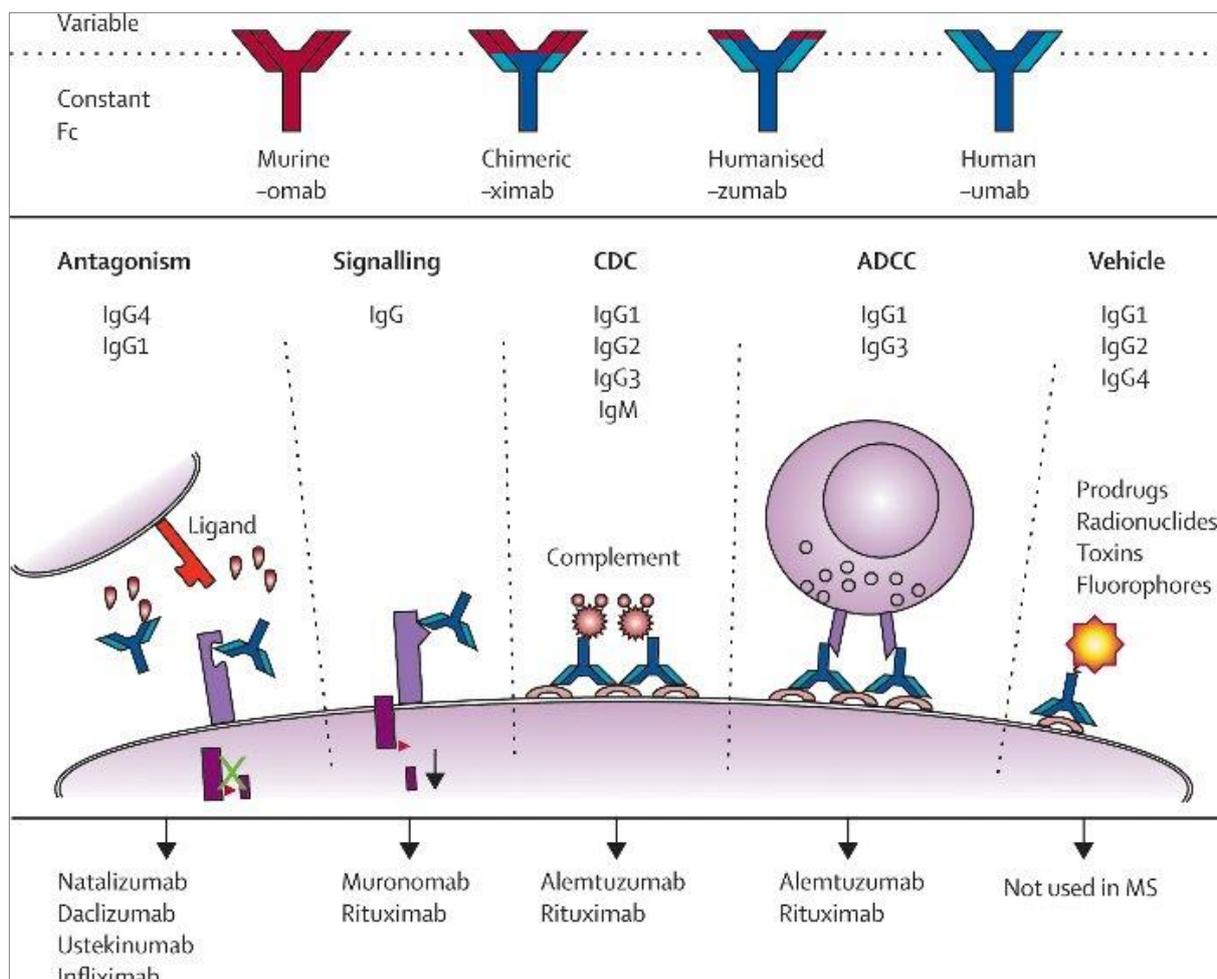


Figure 7. Les stratégies utilisées via les AcM (17).

2.3.1. Neutralisation

C'est la fonction première des AcM. En se liant spécifiquement à l'antigène cible, l'AcM bloque son action néfaste sur le corps. Ainsi, l'adalimumab, un anti-TNF indiqué, entre autres, dans le traitement de la maladie de Crohn, bloque le TNF, ce qui empêche cette cytokine pro-inflammatoire de suractiver la réaction inflammatoire au niveau du tractus digestif affecté par la pathologie. L'autre intérêt de la neutralisation est qu'elle bloque les fonctions biologiques des agents pathogènes telles que les bactéries, ou encore les fonctions des cellules cancéreuses, et facilite également leur élimination (4).

Par ailleurs, cette fonction de neutralisation peut permettre à l'AcM d'agir comme un antagoniste ou un agent bloquant sur les récepteurs extracellulaires de la cible, cela permettant

d'inhiber la cascade de signalisation cellulaire entraînant la réplication incontrôlée des cellules cancéreuses (15).

2.3.2. Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

Lorsque l'AcM se fixe sur sa cible (cellule cancéreuse, bactérie...), sa configuration dans l'espace est modifiée, ce qui entraîne l'exposition de l'Asn297 du fragment Fc. Ceci provoque le cas échéant la fixation de la molécule C_{1q} du complément et l'activation de la voie classique du complément au niveau de cette Asn297. Cette activation est possible avec les isotypes d'IgG1 ou IgG3 (2).

Pour démarrer la cascade d'activation du complément, le C_{1q} doit être fixé à au moins deux AcM. La cascade d'activation implique successivement les différentes molécules du complément jusqu'à former le complexe d'attaque membranaire (CAM). Ce CAM va former des pores au niveau de la membrane de la cellule cible, entraînant sa lyse. La formation des pores potentialise également la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (18).

2.3.3. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

L'ADCC est un mécanisme activé par les AcM, faisant intervenir l'Asn297 du fragment Fc au même titre que la CDC, à la suite de la fixation de l'AcM sur l'agent pathogène. Le principe de l'ADCC est la fixation et l'activation de cellules cytotoxiques du système immunitaire dans le but d'entraîner la cytolyse du pathogène (18). Pour ce faire, les cellules cytotoxiques se fixent à l'AcM via leur récepteur FcγR (I, II ou III). Les 3 principaux types de cellules activées sont : les cellules *natural killer* (NK) CD56⁺ CD3⁻, les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les macrophages.

- Les cellules NK se fixent au fragment Fc via leurs récepteurs FcγRIIIa ou FcγRIIc, ce qui entraîne leur dégranulation, et libère de nombreuses perforines et granzymes provoquant la cytolyse du pathogène cible.
- Les PNN sont activés via leurs récepteurs FcγRI et FcγRIIa.
- Les monocytes et les macrophages sont activés également par leur récepteur membranaire FcγRI et FcγRIIa.

2.3.4. Opsonisation

L'opsonisation est une fonction effectrice qui implique à la fois le complément via la molécule C3b, et le FcγR. L'activation de ce mécanisme provoque la phagocytose de l'antigène par les cellules phagocytaires telles que les monocytes, les macrophages et les PNN (4).

2.3.5. Apoptose

Les AcM, lors de leur fixation sur les récepteurs membranaires des cellules cibles, peuvent être internalisés et provoquer l'apoptose de la cellule cible par cascade de signalisation cellulaire. Cette capacité d'internalisation est aussi à l'origine de l'action des Antibody Drug Conjugate.

2.4. La production des AcM humains

2.4.1. Culture de lymphocytes B

Cette technique, partie intégrante de la méthode de production par hybridomes a été la première utilisée pour tenter de produire les AcM humain. En premier lieu cette technique immortalisait les lymphocytes B humains immunisés en utilisant le virus d'Epstein-Barr (EBV), pour ensuite les mettre en culture et obtenir les AcM humains, avec un rendement faible : 1 cellule immortalisée sur 10000. Puis la technique a évolué en se focalisant sur les systèmes CD40 et TLR9, permettant d'augmenter l'efficacité de l'immortalisation par EBV de 1/10000 à 40% de lymphocytes B immortalisés. Cette technique est beaucoup moins utilisées que les suivantes (19).

2.4.2. Méthode standard actuelle de production des AcM

Les deux principaux défis de la production des AcM humains sont la sélection du lymphocyte B possédant le matériel génétique adapté à la synthèse protéique de l'AcM le plus spécifique à l'antigène cible et le choix d'une méthode de production industrielle avec un rendement et une qualité optimale. Ainsi, la technique permettant d'obtenir une sélection fine des lymphocytes B est le phage display. De plus, la culture de cellule de mammifère présente les caractéristiques nécessaires à la production industrielle d'AcM humains.

2.4.2.1. La technique du *phage display*

Introduction

L'objectif de cette technique est de sélectionner avec la plus grande précision l'AcM ayant la plus grande affinité pour l'antigène cible (15).

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

Par ailleurs l'infection n'est pas létale pour la bactérie, et permet au phage de se répliquer dans *E. coli* à grande échelle.

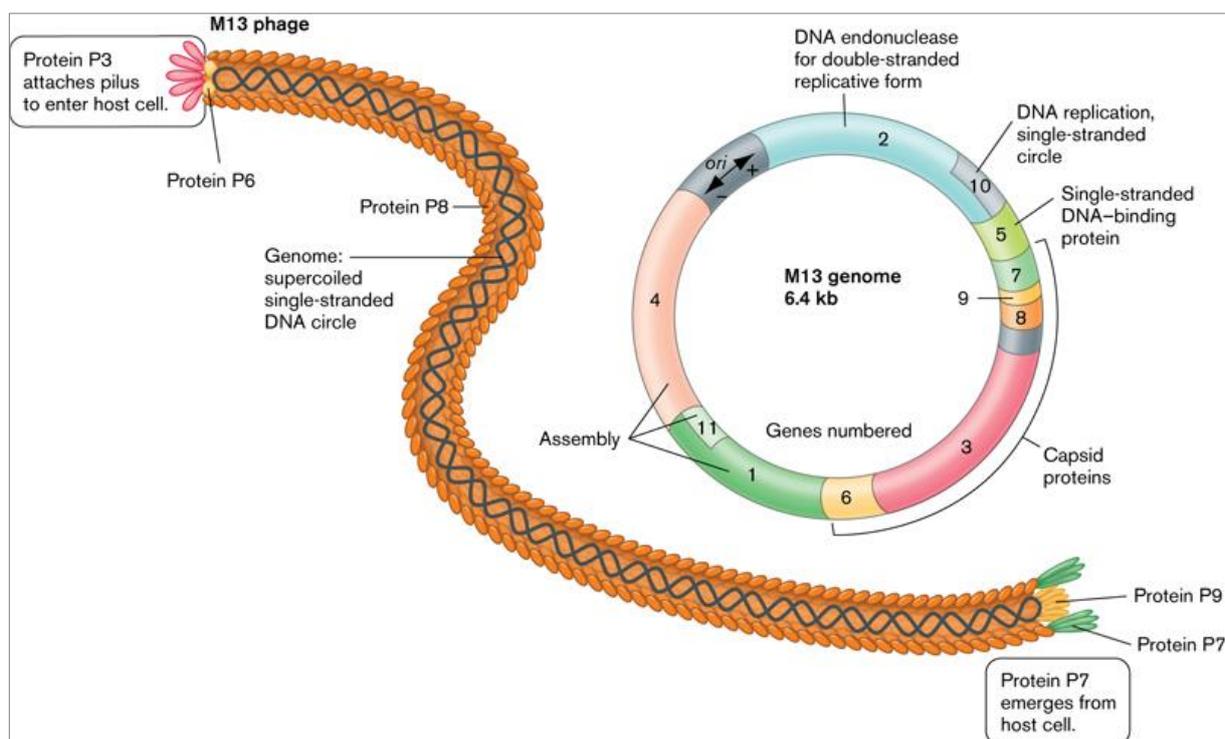


Figure 8. Structure protéique d'un Phage M13 et le génome associé (20).

Le procédé est le plus utilisé à l'heure actuelle pour la sélection des AcM contre des antigènes connus ou nouvellement identifiés, notamment avec l'utilisation des souches de bactériophages filamenteux M13 (Figure 8) et Fd (21). Les applications majeures de ce procédé sont :

- L'identification et l'isolation d'AcM antigène-spécifique

- L'optimisation des propriétés effectrices, de l'affinité ou de la pharmacocinétique des AcM
- La constitution de bibliothèques de gènes d'AcM antigène-spécifiques.

Méthodologie

En premier lieu, le gène codant pour la partie variable de l'AcM est inséré au niveau du gène de la protéine PIII du phage, afin d'obtenir une protéine de fusion PIII/ScFv (*Single-chain variable Fragment*). La protéine PIII est une protéine de surface du phage et permet à ce dernier, entre autre, de pénétrer dans la bactérie cible. Ainsi, lorsque le phage infecte *E. coli* et se réplique via le matériel cellulaire de la bactérie, il exprime à sa surface la protéine PIII/ScFv. Les phages sécrétés sont ensuite exposés à l'antigène cible. L'ADN des phages dont le ScFv de surface a le plus d'affinité pour l'antigène est ensuite amplifié par transduction dans *E. coli*. La sélection des phages d'intérêt est réalisée par plusieurs tests de binding et lavages successifs, avec une sélection de plus en plus fine au fur et à mesure des tests de criblage tels que les tests ELISA.

Ces tests basés sur l'utilisation de bibliothèques de séquences d'AcM issus de lymphocytes B matures ou de séquences nouvelles permettent non seulement de déterminer quelle AcM sera le plus affin contre l'antigène cible, et aussi d'enrichir la bibliothèque elle-même (15) (21).

Les techniques de display se sont beaucoup développées ces dernières années pour affiner la sélection des AcM, dont la principale est le *phage display*, et dont les 4 autres techniques majeures sont : le *Cellule Display*, le *Ribosome Display*, le *ARNm Display* et l'*ADN Display* (22).

D'autres méthodes sont utilisées pour sélectionner les AcM humains les plus affins pour l'antigène cibles, telles que l'utilisation de souris transgéniques ou l'utilisation de lymphocytes B immunisés et immortalisés. Les trois méthodes sont représentées sur la figure ci-dessous.

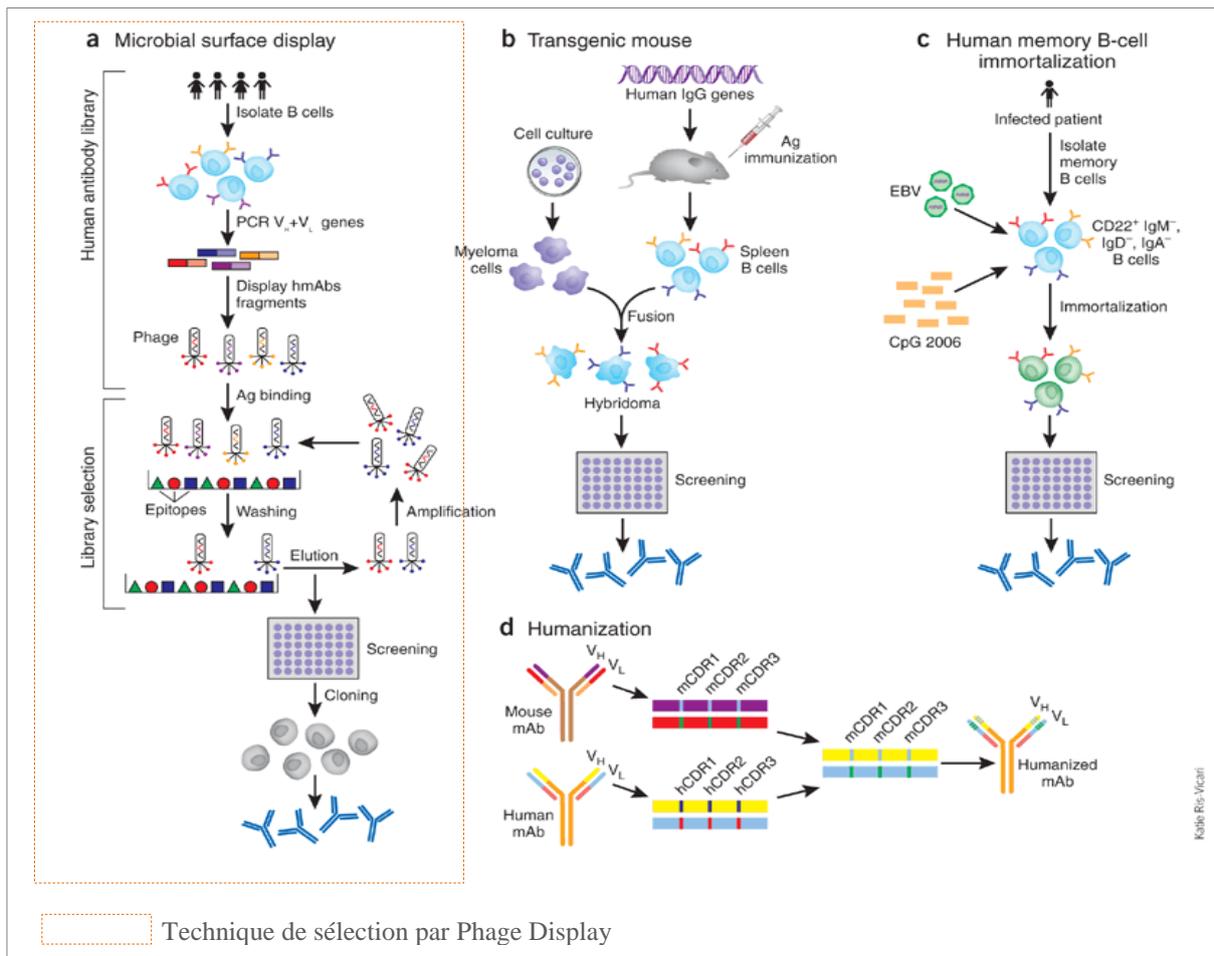


Figure 9. Les techniques majeures de sélection des AcM, dont les AcM humains (23).

2.4.2.2. La production par culture de cellules de mammifères

Une grande partie des AcM à usage thérapeutique sont produits dans des cellules de mammifère, dont les plus utilisées sont les souches : *NS0 murine myeloma cells*, *PER.C6® human cells* et la lignée *Chinese Hamster Ovary (CHO)*, ces dernières étant les plus utilisées pour la production d'AcM humains du fait de leur faible incorporation d'acide N-glycolylneuraminique (NGNA), un acide sialique non produit par les cellules humaines. Nous prendrons l'exemple des cellules CHO pour décrire la méthode de production (15) (24).

Le processus démarre par la construction du vecteur contenant le gène des fragments Fc et Fab de l'anticorps à produire accompagnés de marqueurs d'expression de la protéine par la cellule transfectée. Le vecteur utilisé pour la construction est un plasmide. Ce plasmide est ensuite transfecté dans les cellules CHO. Ces cellules sont mises en suspension, amplifiées et clonées puis enfin le clone avec le plus haut rendement est sélectionné pour la production (10) (24).

Le clone sélectionné est ensuite mis en culture dans des volumes de plus en plus importants. A l'issue de la croissance massive de ce clone, le milieu de culture est récupéré afin d'isoler les AcM sécrétés et de les purifier avant leur utilisation en thérapeutique.

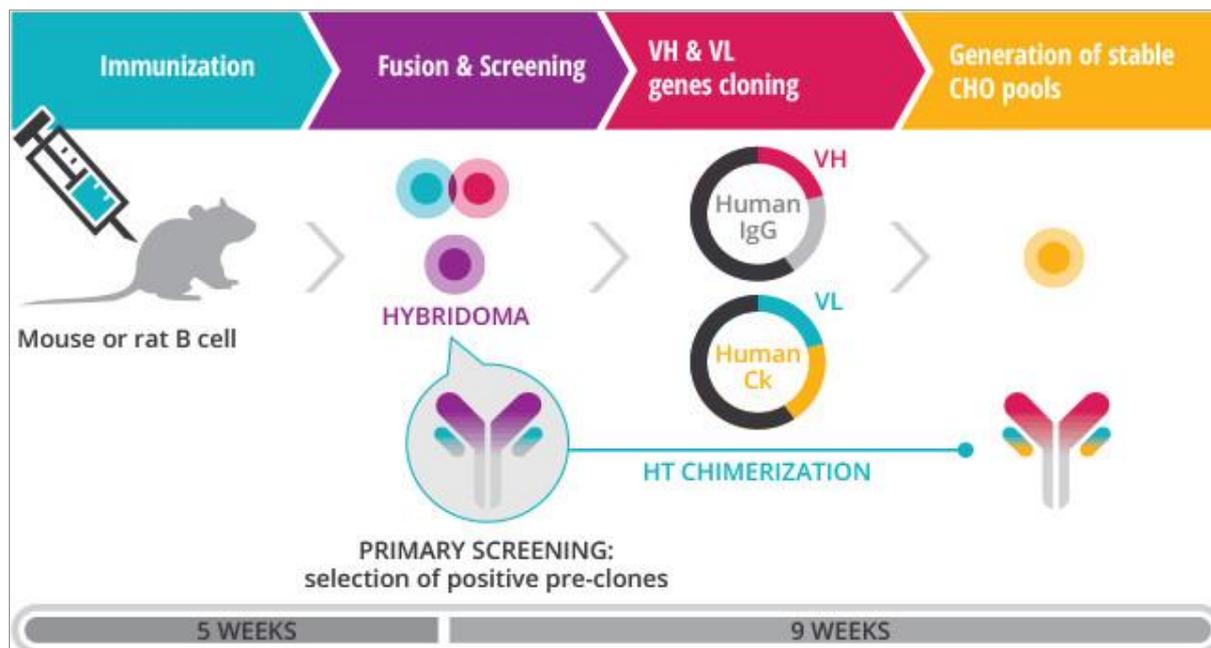


Figure 10. Processus de production des AcM (25).

Lors de ce processus de production, certaines modifications peuvent être apportées sur les AcM dans le but de modifier leurs paramètres pharmacodynamique et/ou pharmacocinétiques. Ces modifications peuvent être d'ordre pré traductionnelles, en agissant sur le gène de l'AcM. Ce type de modification intervient par exemple dans la production d'AcM humanisés de diabodies.

Concernant les nouvelles générations d'anticorps monoclonaux, ces modifications peuvent également être d'ordre post traductionnelles, c'est le cas de la glycosylation et de la conjugaison de molécules thérapeutiques à l'anticorps (*Antibody Based Conjugate*).

Partie II : La glycosylation des anticorps monoclonaux et son impact sur l'activité thérapeutique

1. Introduction sur la glycosylation

Les AcM de type IgG possèdent de multiples sites de glycosylation, dont les plus importants sont situés au niveau de l'Asn 297 des domaines C_H2. Les IgG sont des protéines dites N-glycosylées. De plus, 30% des anticorps circulant sont également glycosylés au niveau de leur Fab. La glycosylation au niveau du fragment Fab est très peu utilisée dans la production des AcM. (26)

Les glycanes situés sur le fragment Fc sont des complexes bi-antennaires à haut degré d'hétérogénéité due à la présence ou l'absence de différents groupements sucrés terminaux. L'ingénierie de la glycosylation joue un rôle essentiel dans l'augmentation de la demi-vie des AcM, ainsi que dans la diminution leur immunogénicité (27). De plus, la glycosylation permet de moduler les fonctions effectrices des AcM, notamment dans l'ADCC par modulation de l'affinité pour les Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII, et dans la CDC.

La glycosylation des AcM à usage thérapeutique requière des enzymes spécifiques. La majorité des cellules autres que mammifères ne possèdent pas de mécanisme de glycosylation ou effectuent une glycosylation propre à leur espèce, ce qui implique une immunogénicité plus importante. De fait, la méthode de production idéale pour développer des méthodes d'ingénierie de la glycosylation sont les cellules de mammifères. Les cellules les plus utilisées et produisant les AcM les plus proches des Ac humains sont les cellules CHO. Néanmoins, la structure des glycanes produits a fréquemment un taux de sialylation plus important lorsque la production a lieu dans des cellules humaines telles que les cellules Human Embryonic Kidney (HEK 293) (27). Une différence significative entre CHO (α 2,3 sialyltransférase) et HEK 293 (α 2,6 et α 2,3 sialyltransférase) est aussi remarquée au niveau de la liaison entre la structure glycanique et le groupement sialylé.

2. La glycosylation du Fragment cristallisable (Fc)

2.1. Généralités

L'ingénierie de la glycosylation sur le fragment Fc est focalisée sur la structure glycanique située au niveau de l'Asn 297. La structure de base bi-antennée est constituée de l'héptasaccharide : N297-GlcNAc-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)₂.

N297 représente l'asparagine 297, GlcNAc la N-acétyl glucosamine et Man le mannose.

La glycosylation du fragment Fc change la conformation des AcM. Les glycanes sont positionnés en partie entre les deux chaînes lourdes, et sont donc inaccessibles pour la plupart des enzymes de dégradation des chaînes glycaniques. La glycosylation des AcM permet également de diminuer fortement leur protéolyse et donc d'augmenter l'efficacité du traitement sur une période plus importante (15). La protection est conférée par les deux antennes de la structure:

- L'antenne α 1,6 protège la chaîne C_H2 hydrophobe grâce à ses propriétés polaires.
- L'antenne α 1,3 protège l'espace interstitielle du dimer C_H2-C_H3.

L'interaction entre les deux structures oligosaccharidiques des deux chaînes lourdes permettent en plus de maintenir le fragment Fc dans une conformation stable et définie (28).

Les deux chaînes oligosaccharidiques ont – sans modification du processus de glycosylation – un taux de sialylation faible. La sialylation des glycanes intervient sur la partie terminale de la chaîne, par l'adjonction de groupements d'acides sialiques tels que l'acide N-acétylneuraminique (NANA). De plus, les groupements oligosaccharidiques des AcM peuvent être fucosylés, notamment au niveau du GlcNAc relié directement à l'Asn 297. Chez les mammifères, les cellules produisant des anticorps ont un mécanisme de fucosylation entraînant une configuration de type α 1,6 par la fucosyltransférase. La structure de la glycosylation de chaque chaîne lourde peut-être ainsi symétrique (deux motifs identiques) ou asymétrique (29).

Les différents groupements oligosaccharidiques des AcM ont été classifiés en fonction de leur structure moléculaire (Tableau 2 et Figure 11), cela permettant d'identifier les effets spécifiques sur les paramètres pharmacocinétiques et /ou pharmacodynamiques de chaque structure sur les AcM (30).

Tableau 2. Classification des groupements oligosaccharidiques des AcM (30)

Dénominations	Afucosylé et Agalactosylé	Afucosylé et Galactosylé	Fucosylé (F)	Acide Sialique (S)
	G0	G1 (1 résidu galactosyl) G2 (2 résidus galactosyl)	G0F G1F G2F	G2S1 G2S2

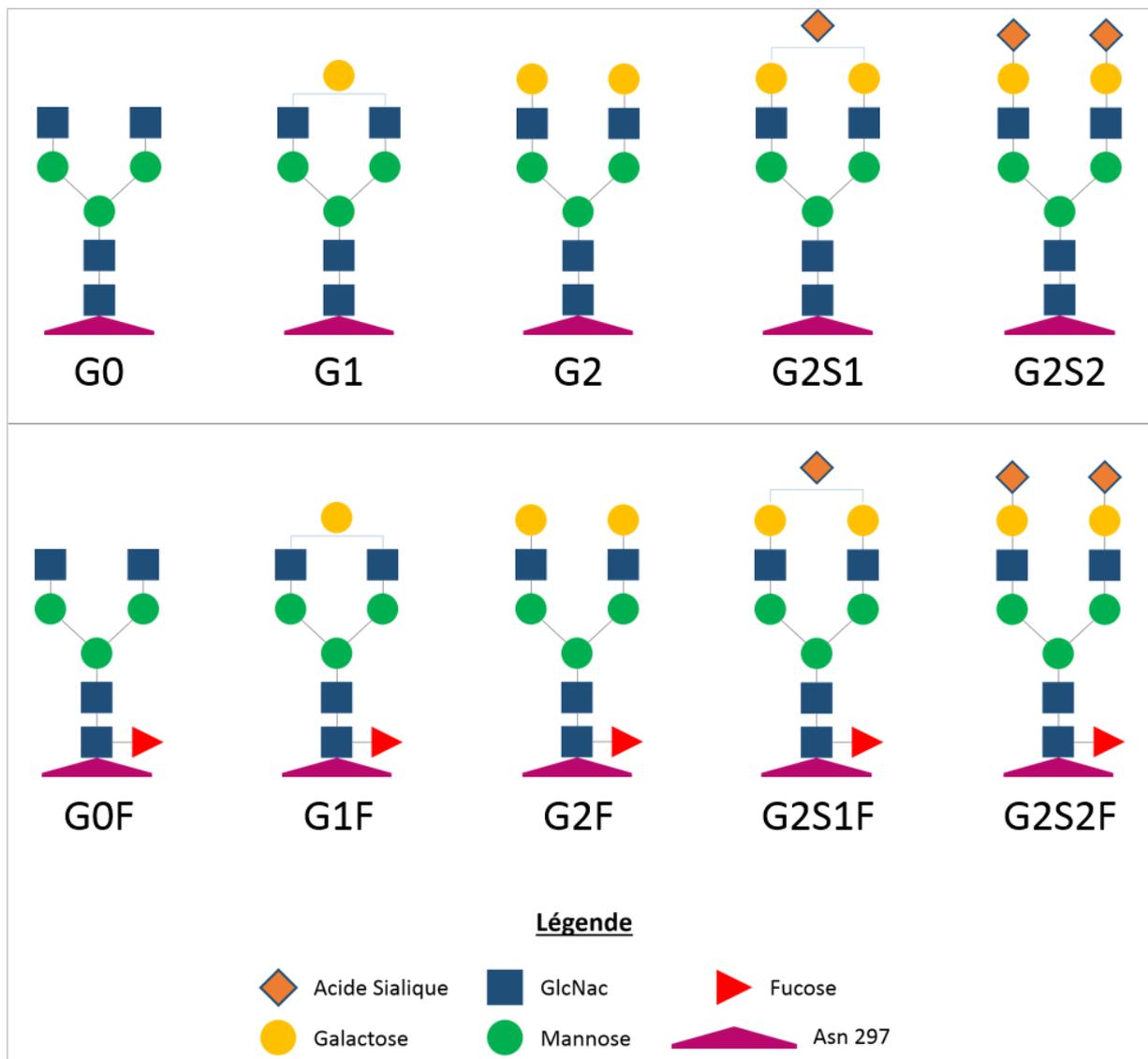


Figure 11. Les structures oligosaccharidiques majeures des AcM (30).

Chacune des structures présentées ci-dessus peuvent également être composées d'un motif GlcNac supplémentaire au niveau du mannose central, entre les deux antennes (Figure 12). Dans la classification, ce motif GlcNac est représenté par la lettre B (G0B par exemple).

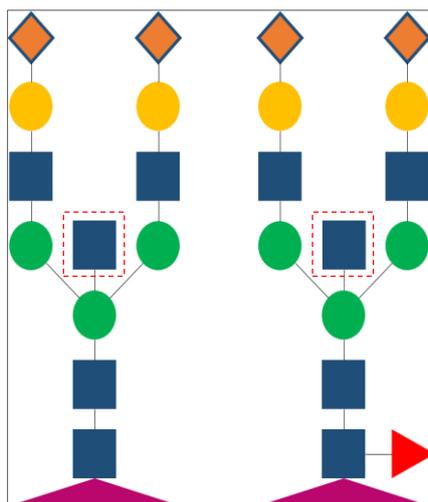


Figure 12. Glycosylation comprenant un motif GlcNac supplémentaire.

Les cellules CHO n'expriment pas la $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyl-transferase III, ce motif est peu présent sur les AcM humains à usage thérapeutique.

2.2. Méthodes d'analyse de la glycosylation

La détermination de la composition des chaînes glycaniques des AcM est utilisée en premier lieu pour définir une relation entre la composition de l'oligosaccharide avec d'une part la conformation de l'AcM et d'autre part ses effets sur les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'AcM. Ce type d'analyse permet également d'évaluer la variabilité des glycoformes lors du processus de production des AcM à usage thérapeutique.

Les deux principales méthodes utilisées sont la spectrométrie de masse et la cristallographie à rayons-X. La résonance magnétique nucléaire a également été adaptée à l'analyse des glycoprotéines.

2.2.1. Spectrométrie de masse et chromatographie liquide (LC/MS)

La première étape de la méthode consiste en la digestion de la glycoprotéine par plusieurs enzymes. Les peptides obtenus sont ensuite analysés, et les glycanes sont détectés par la présence d'acide aspartique, alors qu'une asparagine non glycosylée sera détectée comme telle.

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, la Chromatographie Liquide à Interactions Hydrophiles permet d'accroître la ionisation des oligosaccharides et ainsi de favoriser leur détection et l'analyse de leur structure (31).

2.2.2. Cristallographie à rayons-X

Cette méthode permet d'identifier précisément la structure des glycoformes des AcM. Les résultats initiaux ne permettaient que d'identifier le résidu GlcNac sur l'Asn 297. Afin d'augmenter la précision de la technique, les oligosaccharides doivent avoir la densité électronique appropriée, en prenant en compte les facteurs de conformation, de torsion et de liaison (32). Enfin, pour obtenir la structure définitive de l'AcM et de sa partie glycosylée (Figure 13), les méthodes modernes utilisent la combinaison de banques de données sur les structures existantes et de logiciels de bio-informatique tels que « *Glycam Biomolecule Builder* », en prenant en compte la densité électronique mesurée précédemment (33).

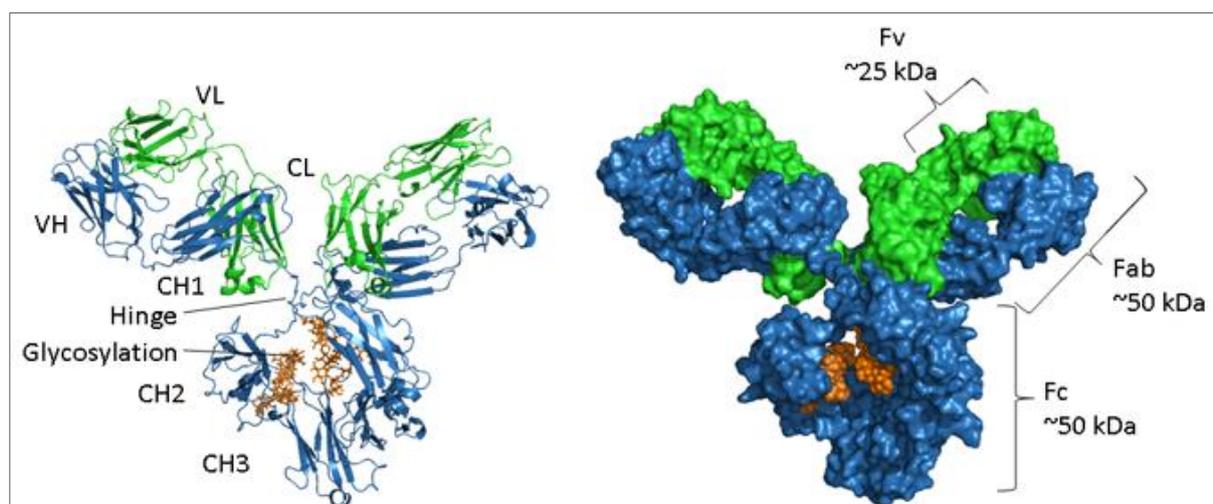


Figure 13. Résultats après Cristallographie à rayons-X sur un AcM glycosylé et bio-informatique

2.2.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'utilisation de la RMN dans l'étude de la structure des glycoformes des glycoprotéines a été rendu possible grâce à l'insertion de ^{13}C et de ^{15}N à la structure oligosaccharidique de la glycoprotéine étudié. Cette technique permet d'éviter la confusion entre la structure de la protéine et la structure de son glycane lors du test « *Nuclear Overhauser effect spectroscopy* ».

L'analyse par RMN a l'avantage – contrairement à la cristallographie à rayons-X – de permettre l'étude des chaînes protéiques et oligosaccharidiques même lorsqu'elles sont flexibles au niveau du site de glycosylation analysé.

2.2.4. Résultats sur la fréquence des types d'oligosaccharides

Les méthodes d'analyses précédemment citées permettent d'identifier le type précis d'oligosaccharide couplé à un AcM et donc de lui attribuer les caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétique spécifiques qu'il confère à cet AcM.

La LC/MS permet par ailleurs d'identifier les variabilités des glycoformes lors de la production d'AcM et de mesurer la fréquence de chaque variant. De plus, l'identification de glycoformes particulières peut indiquer la pureté d'un échantillon d'AcM purifié et ainsi identifier la présence d'autres glycoprotéines (Figure 14) (34).

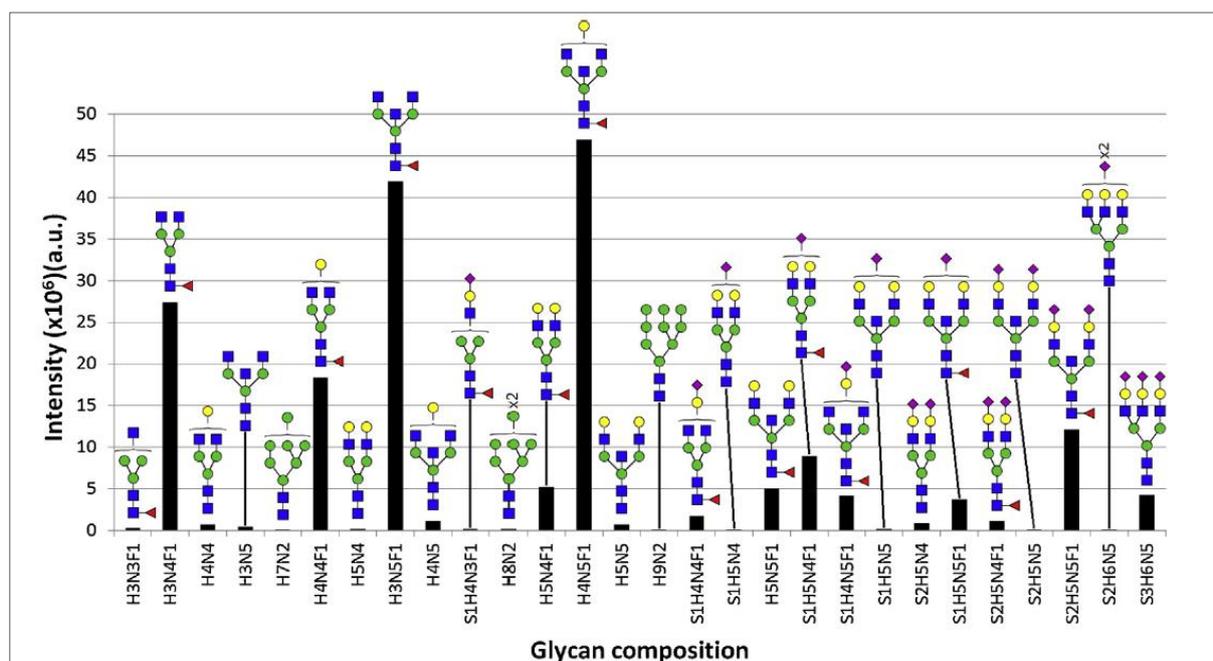


Figure 14. ⁽¹⁾Profils des N-glycanes d'IgG produits *in vitro* (34).

⁽¹⁾Figure 14 : Les N-glycanes ont été isolés de leurs IgG purifiées par clivage enzymatique, puis ont été réduits et perméthylés avant d'être analysés par Chromatographie liquide en phase inverse.

2.3. Processus de glycosylation

Les AcM peuvent être synthétisés avec l'adjonction de deux types de glycosylation (Figure 15) : La N-glycosylation sur une Asparagine, notamment au niveau de l'Asn 297 et la O-glycosylation au sur une Sérine ou une Thréonine. La O-glycosylation est un phénomène très rare sur les AcM à usage thérapeutique, et concerne essentiellement les IgA1.

Aucune séquence particulière n'a encore été identifiée. Le processus de O-glycosylation requiert le transfert d'un N-acétyl galactosamine (GalNAc), ceci pouvant être catalysé par plus de 20 GalNActransférases différentes, ce qui implique une grande variabilité dans la position de ces glycoformes sur les AcM.

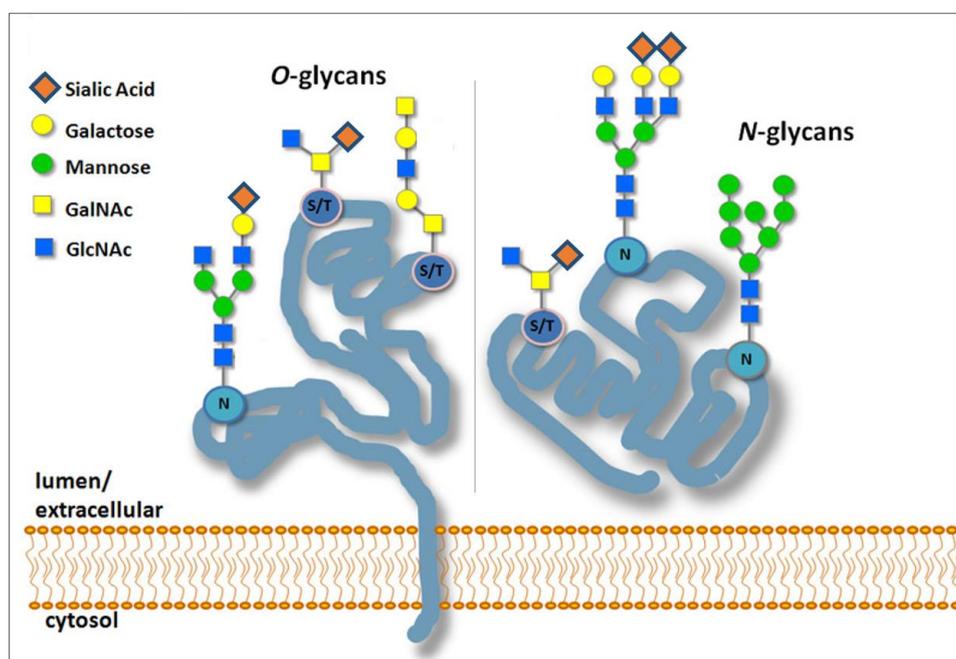


Figure 15. Schéma de séquences protéiques O-glycosylées et N-glycosylées (35).

2.3.1. La glycosylation dirigée sur les acides aminés cibles

Les travaux sur la glycosylation des AcM se sont essentiellement focalisés sur les modifications du glycane au niveau de l'Asn 297. Néanmoins, d'autres sites de glycosylation sont possibles au niveau du fragment Fc. La séquence d'acides aminés nécessaire au complexe oligosaccharidetransférase pour effectuer la N-glycosylation sur une asparagine est : Asn-X-Ser/Thr/Cys-X, 'X' étant n'importe quel acide aminé excepté une proline (36).

Alors que le site de l'Asn 297 est très conservé, d'autres sites sont possibles avec une plus ou moins grande fréquence de glycosylation, en fonction de la séquence d'acides aminés de l'AcM.

Ces sites sont le plus souvent éliminés par mutagenèse dirigée s'ils entraînent des variations trop importante du mécanisme d'action de l'AcM ou des variations pharmacocinétiques diminuant la durée de vie de l'AcM ou augmentant son immunogénicité.

Les sites de glycosylations autres que l'Asn 297 sont conservés s'ils jouent un rôle majeur dans la conformation de la glycoprotéine et dans l'intensité des fonctions effectrices.

2.3.2. La N-Glycosylation de l'Asn 297

Le processus de glycosylation (Figure 16) débute dans le réticulum endoplasmique, avec l'adjonction d'un motif « Glc3-Man9-GlcNac2 » sur l'Asn297 par un complexe oligosaccharyltransférase. Puis une glycoside hydrolase (α -glucosidase) et une mannosidase I clivent le fragment « Glc3-Man ». La structure AcM-Asn297-Man8-GlcNac2 est ensuite transférée vers le *cis*-Golgi via une vésicule de transport. Dans le *cis*-Golgi, 3 mannoses sont clivés de la chaîne oligosaccharidique par une mannosyltransférase pour obtenir la structure « Man5-GlcNac2 ». L'AcM est subséquentement dirigé vers le Golgi médian dans lequel la N-acetylglucosaminyltransferase-I va transférer le groupement UDP-GlcNac sur le mannose de la branche α 1,3 et la Mannosidase-II va cliver deux mannoses au niveau de la branche α 1,6. Avant le transfert de l'AcM au travers du *trans*-Golgi, la N-acetylglucosaminyltransferase-II transfère un groupement UDP-GlcNac sur le mannose de la branche α 1,6. Dans le *trans*-Golgi, les autres groupements sont ajoutés, tels que le fucose par la fucosyltransférase 8, ou encore les acides sialiques (NANA ou Gal) et le groupement GlcNac entre les deux antennes (37).

La composition de l'oligosaccharide de l'Asn 297 conditionne en partie la conformation des AcM et leur interaction avec le système immunitaire. Afin de moduler ces paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, plusieurs techniques sont disponibles.

La première consiste en l'ajout d'inhibiteurs enzymatiques dans le milieu de culture des cellules CHO ou HEK. La N-butyldéoxynojirimycine inhibe la α -glucosidase et permet ainsi d'obtenir des AcM à haut taux de mannose ou des oligosaccharides hybrides. Des effets similaires sont observés via l'utilisation de swainsonine ou de kifunensine. Cette dernière molécule est la plus utilisée pour la production de glycoprotéines avec glycane modifié puisqu'elle permet d'obtenir des structures très homogènes (36).

La deuxième solution consiste en la modification des gènes codant pour les protéines de la cascade de la glycosylation par mutagenèse dirigée. Ces modifications permettent d'inhiber spécifiquement les enzymes cibles.

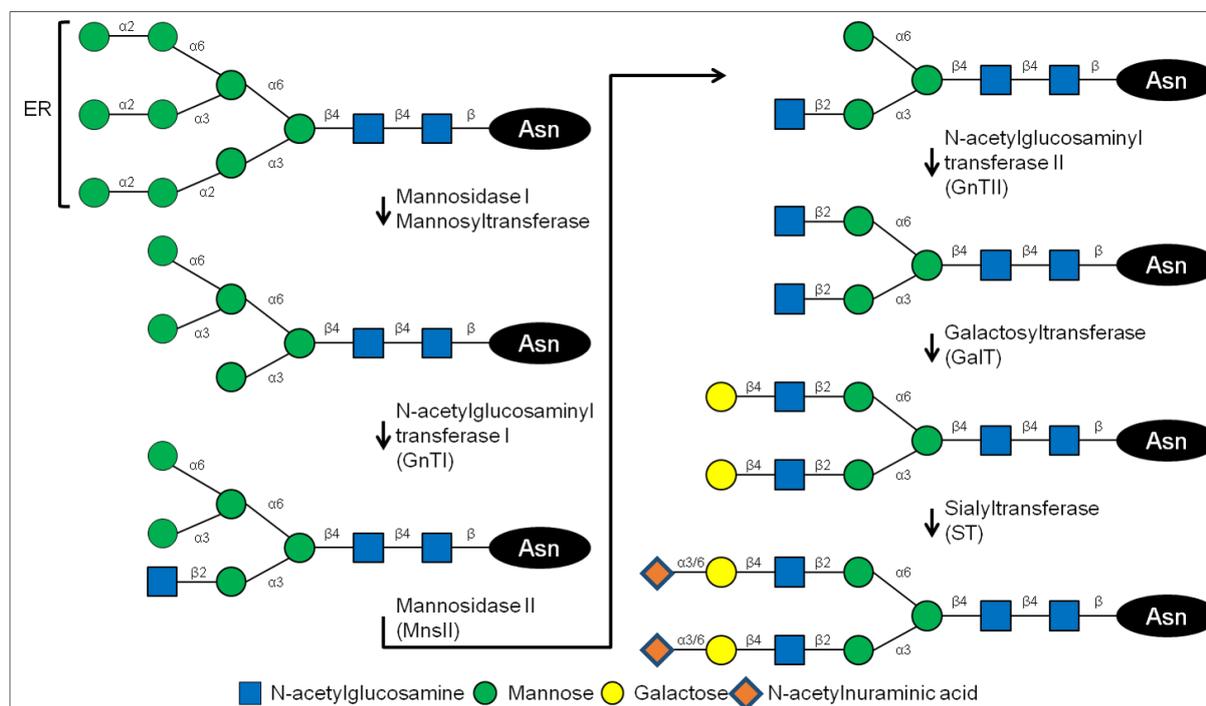


Figure 16. Processus de glycosylation des AcM dans des cellules de mammifère.

Les modifications de la structure du glycane au niveau de l'Asn-297 ont permis d'identifier quatre types majeurs de glycosylation ayant une influence sur les propriétés pharmacologiques des AcM : l'aglycosylation, l'afucosylation, la sialylation et la glycosylation à haut taux de mannose. De plus des méthodes de combinaison entre glycosylation et modification du fragment Fc ont été développées.

2.4. Ingénierie de la glycosylation et impacts sur l'activité thérapeutique

2.4.1. Les AcM non fucosylés

Le principe de développement des AcM afucosylés est d'augmenter l'efficacité de l'ADCC. Il a été démontré qu'entre un AcM fucosylé et un AcM afucosylé, l'affinité pour les antigènes ne montre pas de différence significative. Par ailleurs, cette même étude prouve que l'ADCC est plus élevée pour l'AcM afucosylé.

L'expérience a permis de comparer la différence d'activité entre BLX-300 (AcM afucosylé) et le rituximab (Figure 17 et 18).

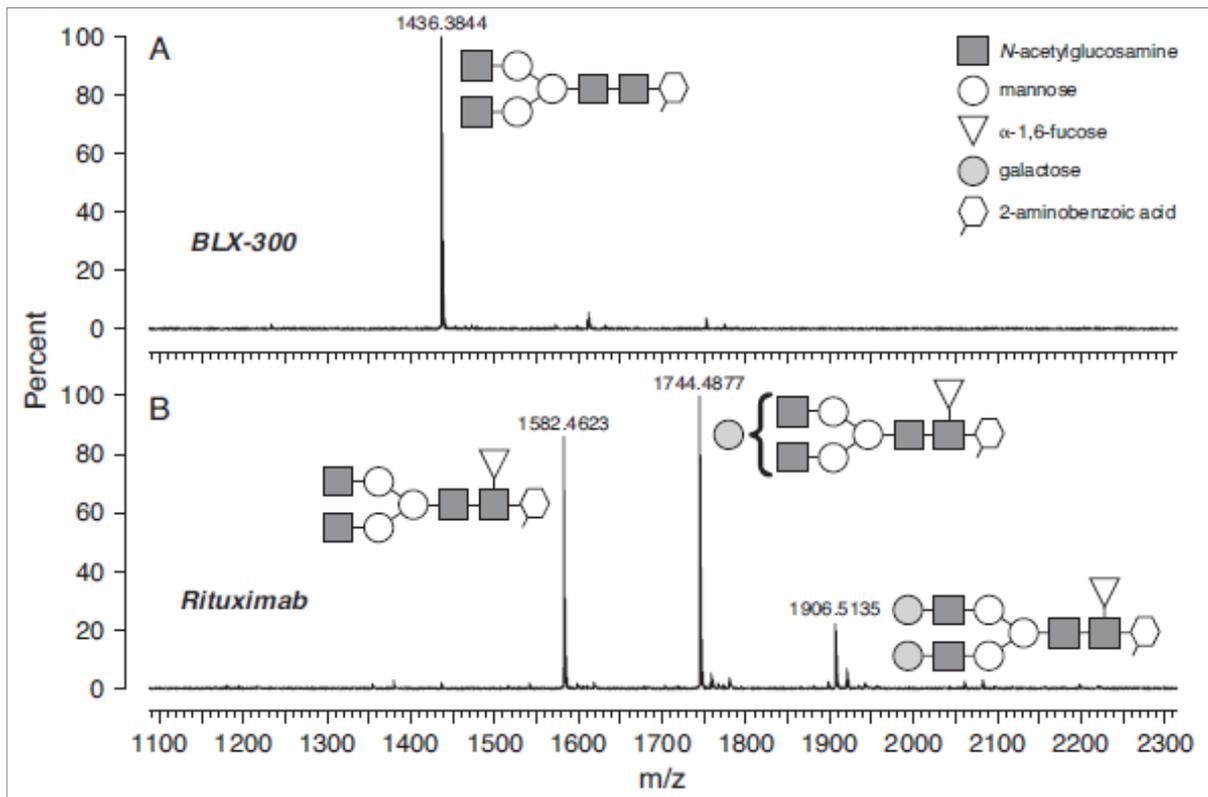


Figure 17. ⁽²⁾Analyse de la structure des N-glycanes de BLX-300 et du rituximab par LC/MS.

⁽²⁾Figure 17 : Le BLX-300 représente 7,8% des protéines totales exprimées (déterminé par test ELISA). Le BLX-300 a été purifié puis sa structure N-glycanique et celle du rituximab ont été isolée par clivage enzymatique.

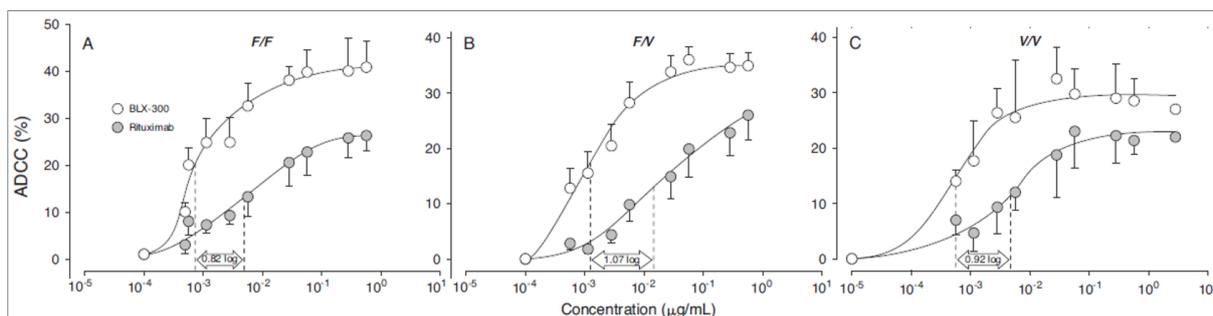


Figure 18. ⁽³⁾Mesure comparative de l'ADCC entre BLX-300 (afucosylé) et rituximab (fucosylé)

⁽³⁾Figure 18 : L'ADCC du BLX-300 et du rituximab a été mesurée en les dirigeants contre des cellules Raji, en présence de cellules effectrices du sang périphérique, puis en mesurant le pourcentage de cellules lysées.

Pour chaque groupe test, l'ADCC est significativement plus importante suite à l'utilisation de BLX-300 par rapport au rituximab. (38)

En théorie, puisque l'ADCC est corrélée à l'affinité de l'AcM pour le récepteur FcγRIIIa, l'AcM afucosylé doit donc avoir une plus grande spécificité pour ce récepteur. En effet, même si l'absence de fucose sur le glycane de l'Asn 297 n'entraîne pas de modifications substantielles de la conformation globale de l'AcM, il en résulte néanmoins une plus grande affinité pour les récepteurs FcγRIIIa. Cette augmentation de l'affinité est due à une surface d'interaction plus grande entre le fragment Fc et le récepteur, la suppression du fucose diminuant ainsi l'encombrement stérique associé (39).

De plus, cette expérience s'est également focalisée sur les variations de la CDC, responsable en partie des effets indésirables du rituximab. (40) Les résultats montrent que l'activité CDC du rituximab est supérieure à celle du BLX-300 (Figure 19).

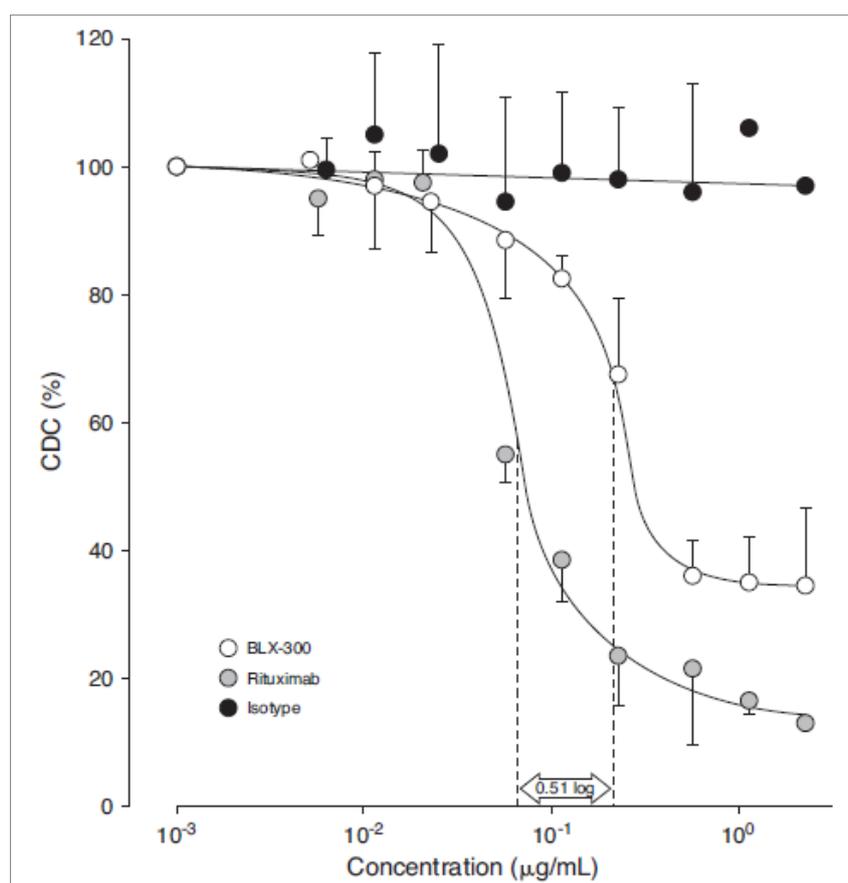


Figure 19. ⁽⁴⁾Mesure comparative de la CDC entre BLX-300 (afucosylé) et rituximab (fucosylé)

⁽⁴⁾Figure 19 : La CDC a été mesurée contre des cellules Raji, à différentes concentrations de BLX-300 et de Rituximab. Un isotype a également été utilisé pour servir de contrôle négatif. La CDC est mesurée par rapport au pourcentage de cellules survivantes.

L'afucosylation des AcM permettrait donc d'optimiser leurs fonctions effectrices en augmentant l'efficacité de l'ADCC tout en diminuant l'efficacité de la CDC, ceci permettant de moduler les fonctions effectrices relativement à leur potentiel thérapeutique ou indésirable.

2.4.2. La sialylation des AcM

Les anticorps humains ne sont sialylés qu'à hauteur de 10%. Concernant les AcM, sans ingénierie cellulaire spécifique, les cellules murines produisent environ 50% d'AcM sialylés alors que les cellules CHO ont une production quasiment négligeable d'AcM sialylés. La sialylation, tout comme l'absence de sialylation ont un effet sur la pharmacodynamique et la pharmacocinétique des AcM. Ces différences sont dépendantes du taux de sialylation des AcM, mais également du type de sialylation : $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$. (30) L'acide sialique est une molécule chargée négativement (Figure 20). Ainsi, l'adjonction de ce groupement au reste de l'oligosaccharide modifie sa charge globale. Il en résulte une modification des interactions hydrophiles et hydrophes entre les acides aminés et les glycanes. Ces changements affectent l'exposition des acides aminés aux protéases ainsi que les fonctions effectrices des AcM.

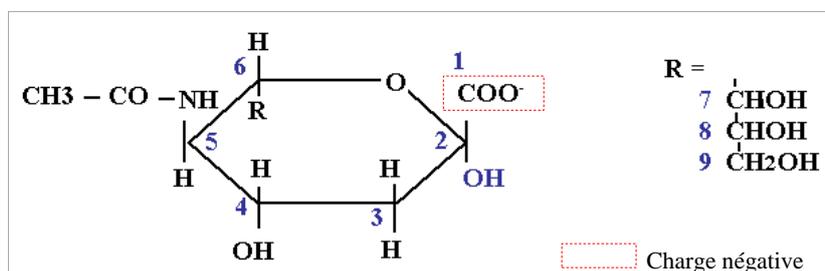


Figure 20. Structure d'un acide sialique

2.4.2.1. Effet de la sialylation sur la pharmacocinétique des AcM

La fonction acide de l'acide sialique rend les AcM plus sensibles à la protéolyse, puisque de nombreuses enzymes, dont des protéases dégradent plus facilement les molécules acides. De plus, l'encombrement stérique supplémentaire engendré par l'acide sialique provoque une modification de la conformation au niveau du domaine C_{H2}, le rendant plus exposé à la dégradation par des protéases. (41)

Outre l'effet de la sialylation sur les paramètres pharmacocinétiques des AcM, les variations dans la conformation du domaine C_{H2} entraînent aussi des modifications des paramètres pharmacodynamiques des AcM. Des expériences mesurant les effets de la sialylation sur

l'ADCC, l'affinité aux FcγRIIIa et l'affinité aux antigènes ont été effectuées. Les résultats sont présentés sur les figures 21, 22 et 23.

2.4.2.2. Effets du taux de sialylation sur l'ADCC

Lorsque l'on compare l'activité cytotoxique de plusieurs AcM en fonction de leur concentration croissante, on observe que le pourcentage de cytolysse, et donc l'efficacité de l'ADCC, et d'autant plus faible que le taux de sialylation des AcM est élevé (Figure 21).

En effet, lorsque que l'on compare plusieurs échantillons : Ab1-WGA-41 (41% d'anticorps sialylés) versus Ab1-WGA-29 (29% d'anticorps sialylés), on remarque qu'une concentration de Ab1-WGA-41 plus élevée est nécessaire pour atteindre le même pourcentage de cytolysse que Ab1-WGA-29 de manière significative (* $p < 0.0001$) (42). Les résultats sont observés avec les concentrations suivantes :

- Ab1-WGA-29 versus Ab1-WGA-20
- Ab2-26 versus Ab2-0
- Ab3-GT-WGA-5 versus Ab3-GT-WGA-67

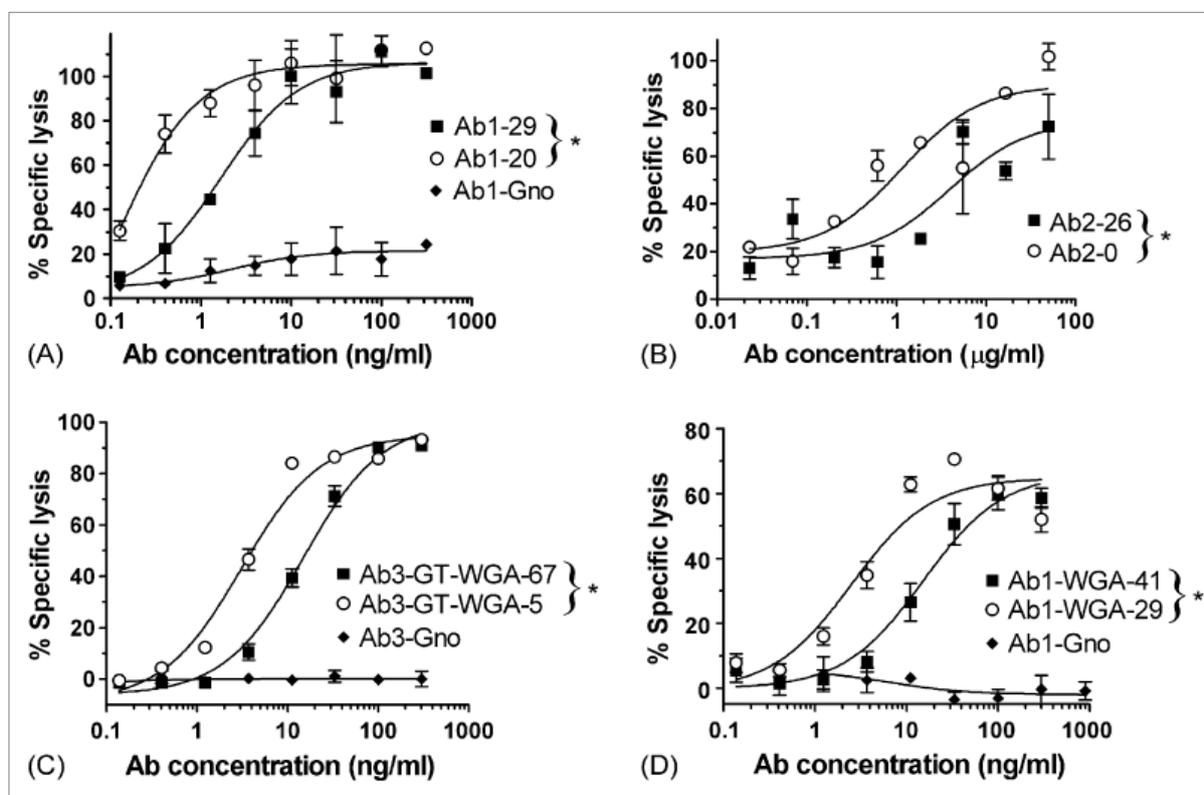


Figure 21. (5) Activité de l'ADCC d'AcM en fonction de leur taux de sialylation

⁽⁵⁾Figure 21 : Ab1, Ab2 et Ab3 réfèrent à des AcM produits selon 3 procédés légèrement différents. Les concentrations utilisés sont les mêmes pour chaque groupe, la variable utilisée est la proportion d'AcM sialylés. L'expérience a été réalisée en exposant les cellules cibles aux différents groupes d'AcM, avec adjonction de cellules immunitaires effectrices issues du sang périphérique. Le taux de lyse était mesuré après 2h d'exposition. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

D'autres études montrent également ce phénomène de diminution de l'ADCC avec l'augmentation du taux de sialylation des AcM (43). La perte d'efficacité de cette fonction effectrice est aussi en partie liée à l'affinité des AcM aux récepteurs FcγR.

2.4.2.3. Effet du taux de sialylation sur l'affinité au FcγR

L'activation de l'ADCC est en partie dépendante de la liaison de l'AcM avec les récepteurs FcγRIIIa (CD16) des cellules NK. L'expérience précédente a donc été poursuivie avec l'étude de l'affinité des AcM aux récepteurs FcγRIIIa en fonction de leur taux de sialylation (Figure 22).

L'étude montre que les AcM ayant un taux de sialylation de 20% ont une affinité supérieure pour les récepteurs FcγRIIIa par rapport aux AcM ayant un taux de sialylation de 29%. La concentration d'AcM (29%) devant être 4 fois plus élevée pour obtenir le même résultat en termes d'affinité. Il en est de même lorsque l'on compare des AcM non sialylés avec des AcM ayant un taux de sialylation de 26%, ces derniers nécessitant une concentration 5 fois plus élevée pour obtenir un résultat comparable en termes d'affinité pour les récepteurs FcγRIIIa.

Une des hypothèses avancée est que la diminution de l'affinité pour les FcγRIIIa serait due en partie à la conformation de l'AcM en fonction du type de sialylation et du taux de sialylation. En effet, en fonction du type de sialylation, l'exposition de charges négatives peut varier, ces charges négatives pouvant entraîner une répulsion avec la surface cellulaire chargée négativement des cellules NK.

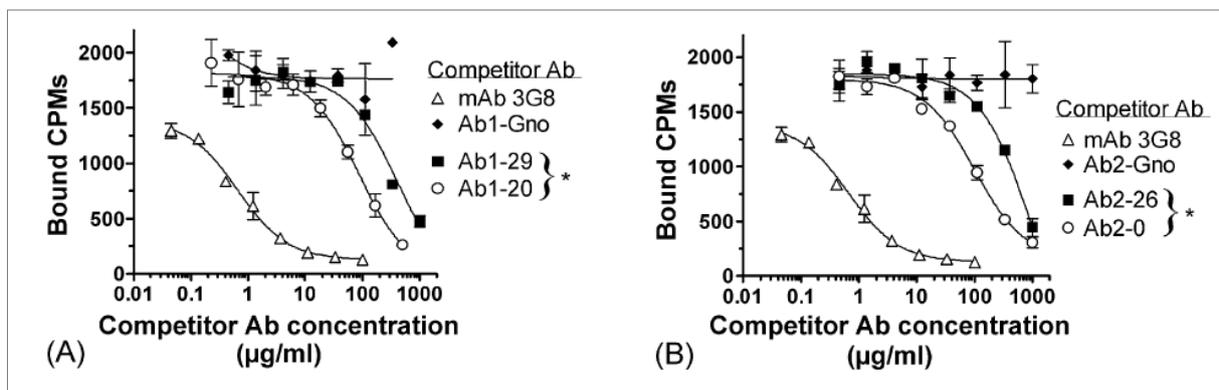


Figure 22. ⁽⁶⁾Affinité pour les récepteurs FcγRIIIa en fonction du taux de sialylation (42).

⁽⁶⁾Figure 22 : La mesure de l'affinité a été réalisée par des études de binding compétitif en fonction du taux d'AcM sialylés de l'échantillon testé. Le marquage utilisé était de l'iode 125.

D'autres études montrent également que la diminution de l'activité effectrice des AcM sialylés pourrait être due à une sur-activation des récepteurs FcγRIIb, ces récepteurs ayant une fonction inhibitrice (44).

2.4.2.4. Effet de la sialylation sur l'affinité aux antigènes

L'expérience précédente a été également utilisée pour mesurer l'affinité épitope - paratope. Les résultats sont cohérents avec les résultats précédents ; on observe également une diminution significative de l'affinité pour l'antigène corrélée avec l'augmentation du taux de sialylation (Figure 23).

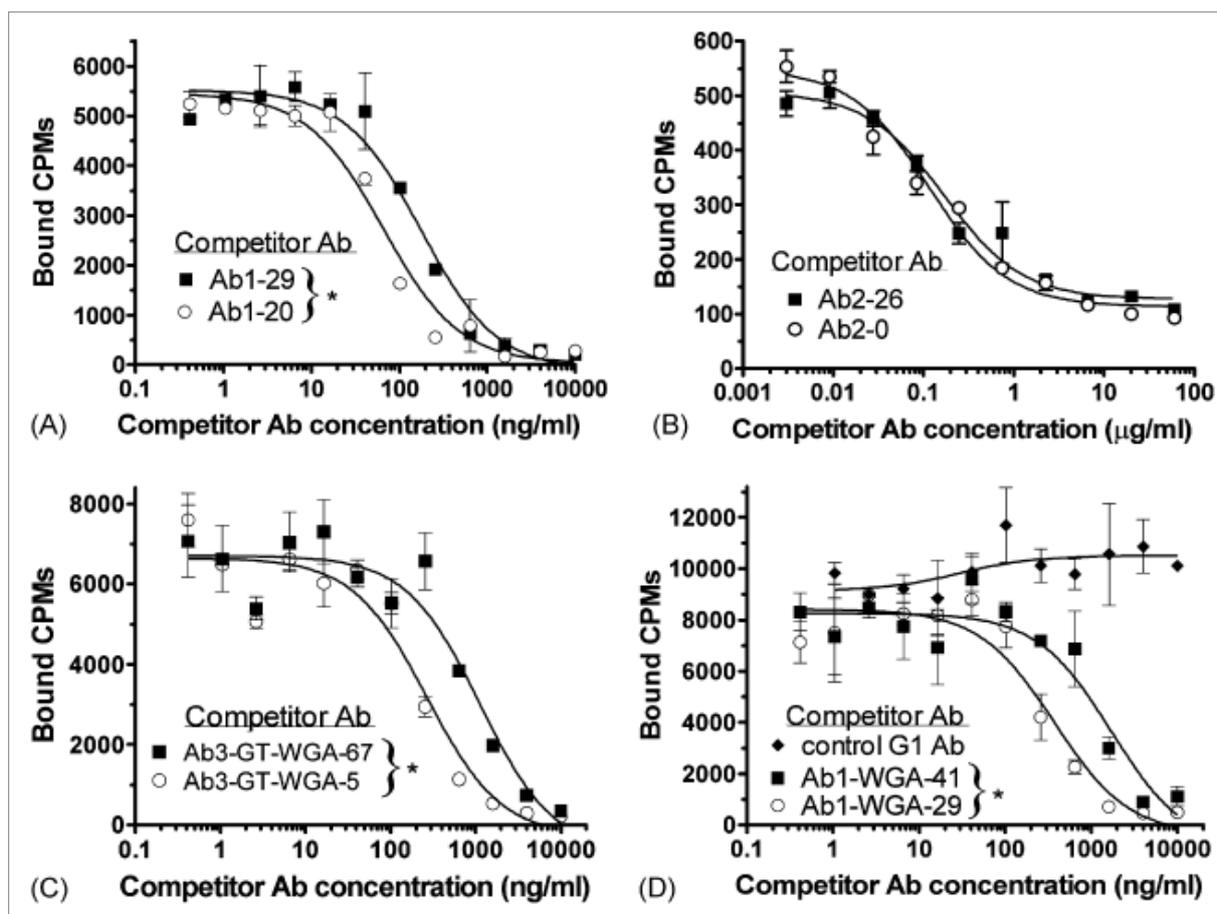
Les résultats montrent cependant que le groupe Ab2 ne montre pas de différences significatives entre les deux niveaux de sialylation. L'hypothèse avancée ici est que la sialylation entraîne une diminution de la flexibilité des AcM au niveau de leur région charnière. Ainsi, en fonction du type d'antigène ciblé, la flexibilité joue un rôle plus ou moins important dans la capacité de l'AcM à fixer l'antigène (43).

Par ailleurs, la diminution de l'affinité de l'AcM sialylé pour son antigène cible ne concerne que les antigènes de surface. L'affinité pour les antigènes solubles n'est pas affectée, puisque la fixation des antigènes solubles ne requiert pas de flexibilité particulière (42).

Pour conclure, la sialylation des AcM diminue leur affinité pour les récepteurs FcγRIIIa et pour les antigènes de surfaces, ce qui diminue intrinsèquement la puissance de l'ADCC. Les AcM

sialylés seraient donc plus indiqués dans la neutralisation d'antigènes soluble, ce qui permettrait parallèlement de réduire le risque de réaction inflammatoire au niveau cellulaire.

Au niveau physiopathologique, les anticorps sialylés ont de moindres propriétés inflammatoires et se fixent moins bien sur les antigènes de surface. Ce constat pourrait entrer dans le mécanisme global des maladies auto-immunes (MAI), étant donné que le taux d'anticorps sialylés est plus faible pour une personne atteinte de MAI que pour une personne saine.



(7) Figure 23 : La mesure de l'affinité a été réalisée par des études de binding compétitif en fonction du taux d'AcM sialylés de l'échantillon testé. Le marquage utilisé était de l'iode 125.

2.4.3. Glycosylation à haut taux de mannose

Les AcM à haut taux de mannose sont obtenus par génie génétique sur les cellules productrices ou par inhibition des mannosidases lors de la synthèse post traductionnelle de l'oligosaccharide. De fait, les AcM à haut taux de mannose ont une structure oligosaccharidique fortement différente des glycanes normalement attachés aux AcM. Cela entraîne une augmentation de la clairance de ces AcM, notamment via la fixation aux récepteurs au mannose. Leur demi-vie est

donc réduite. Les AcM à haut taux de mannose ne sont pas fucosylés (15). Cela rend plus difficile l'étude de leur impact sur l'ADCC et la CDC par rapport à un AcM normalement glycosylé et afucosylé. Différentes études ont montré que ces AcM ont une affinité augmentée pour les récepteurs FcγRIIIa, ce qui augmente leur activité ADCC. Par ailleurs, une telle configuration de la N-glycosylation diminue l'affinité du domaine C_{H2} pour le C1q, entraînant ainsi une diminution de la CDC (45).

Cependant, les résultats d'augmentation de l'ADCC des AcM à haut taux de mannose ne sont pas suffisamment distincts et supérieurs comparés aux AcM afucosylés ayant un oligosaccharide « normal ». Ils ont de plus une demi-vie plus faible, ce qui ne favorise pas leur développement en thérapeutique. Enfin, un certain nombre d'incertitudes sont encore à lever quant aux propriétés exactes de ces AcM.

2.4.4. Les anticorps monoclonaux aglycosylés humains

La glycosylation des AcM et sa modulation dans le but de moduler les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamique a été pendant longtemps un sujet de focalisation de la recherche. Le principe accepté par la communauté scientifique étant qu'un AcM sans glycosylation aurait des résultats insatisfaisant tant au niveau de l'activation de fonction effectrice qu'au niveau de sa durée de vie et de son immunogénicité. En effet, la glycosylation des AcM au niveau de l'Asn 297 joue un rôle majeur dans la conformation de la protéine ainsi que dans l'activation des fonctions effectrices telles que l'ADCC et l'opsonisation via les FcγR, ou encore la CDC via l'activation du complexe C_{1q} (46). De plus, la recherche sur la modulation de la glycosylation a également entraîné le développement de méthodes de production avancées, notamment sur les cellules CHO et HEK, afin de reproduire les motifs oligosaccharidiques voulus.

Cependant, de récentes études ont montré que les AcM aglycosylés modifiés peuvent avoir des propriétés effectrices égales voire supérieures aux AcM glycosylés, avec une demi-vie équivalente (47).

Enfin, la synthèse des AcM aglycosylés ne requérant pas de mécanisme complexe de glycosylation, la production peut être simplifiée, avec des coûts inférieurs, par l'utilisation de cellules procaryotes ou de cellules eucaryotes inférieures (les premières cellules eucaryotes dans la taxonomie des *Eukaryota*).

2.4.4.1. Les propriétés pharmacologiques des AcM aglycosylés non modifiés

Les AcM aglycosylés non modifiés montrent une affinité très faible pour les Fc γ RI de haute affinité ($K_d = 4 \times 10^{-7}$ contre 10^{-9} pour l'AcM glycosylé), dont la résultante est une disparition presque totale de l'activation de fonctions effectrices. Il en est de même pour l'affinité avec les Fc récepteurs de faible affinité tels que Fc γ RIIa, Fc γ RIIb et Fc γ RIIIa, entraînant une diminution importante de l'ADCC, de l'opsonisation et de la CDC (48).

Par ailleurs, la structure cristallographique montre que la conformation du fragment Fc est différente avec une distance plus courte entre les deux domaines C_H2 par rapport au même AcM glycosylés (Figure 24), cette distance étant fortement variable en fonction de la technique de production : cellule CHO ou *E. coli*. De plus, la boucle contenant l'Asn 297 est fortement désorganisée, avec un état entropique plus élevé, lors de l'hydrolyse de l'oligosaccharide par introduction de PNGase-F, entraînant la transformation de l'Asn 297 en Asp 297 (Acide Aspartique) (49). La structure aglycosylée a également une flexibilité plus importante que pour un AcM glycosylé, avec un angle de rotation plus important autour de l'axe du fragment Fc. Cette plus grande flexibilité pourrait expliquer la moindre affinité des AcM aglycosylés pour les Fc γ R.

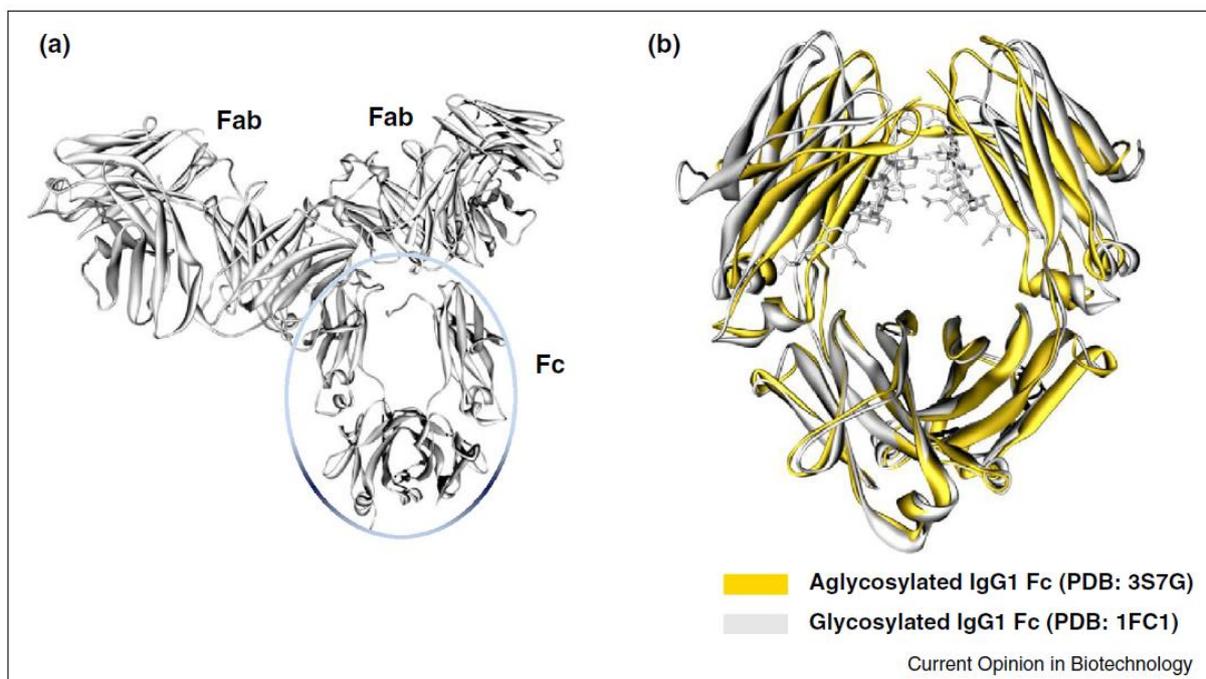


Figure 24. Différences conformationnelles entre la structure glycosylée et aglycosylée d'un AcM.

Afin de développer cette technologie, la mutation N297A a été introduite au niveau de l'Asn 297 sur 6 AcM différents. Leurs propriétés pharmacocinétiques ont ensuite été comparées après

synthèse dans des cellules de mammifère : les deux structures (glycosylé et aglycosylé) ont révélé une liaison épitope-paratope équivalente. Il en est de même pour la solubilité des deux échantillons. Enfin, la demi-vie des deux échantillons en présence de sérum de rat – in vivo – n’a pas révélé de différence significative (62h pour les AcM glycosylés et 64h pour les AcM aglycosylés). La stabilité à basse température et à température corporelle (37°C) est également équivalente.

2.4.4.2. L’optimisation des fonctions effectrices

Bien que normalement peu efficaces, les fonctions effectrices des AcM aglycosylés peuvent être modulées par modification du fragment Fc. En effet, les AcM glycosylés ont bénéficié d’amélioration de leurs fonctions effectrices par mutagenèse dirigée au niveau du fragment Fc. Par exemple, la mutation S239D/I332E a montré une affinité pour le récepteur FcγRIIIa 100 fois supérieure par rapport à l’AcM non muté (50).

Ces mutations ont donc été reprise afin d’améliorer les propriétés des AcM aglycosylé. Ainsi, la mutation N297D qui empêche la glycosylation au niveau de l’Asn 297, a été couplée aux mutations S239D/I332E, ce qui a permis de passer d’une affinité quasi nulle à une affinité égale à 28% de celle du même AcM glycosylé. En couplant la mutation N297D à la mutation A330Y/I332E, l’affinité est augmentée à 43% par rapport à celle de l’AcM glycosylé (51).

L’utilisation d’AcM aglycosylés a également entraîné la découverte de mutation de ces derniers permettant de leur conférer une affinité spécifique pour un type de FcγR, et de sélectionner une activité favorisant l’ADCC ou une activité favorisant la réaction inflammatoire (Figure 25). Ainsi, la double substitution E382V/M428I a induit une affinité spécifique de l’anticorps pour les FcγRI et une affinité quasi nulle pour les autres récepteurs, entraînant une exacerbation de l’ADCC via les cellules dendritiques. En comparaison, le même anticorps glycosylé avait une plus faible ADCC liée aux cellules dendritiques par activation concomitante de plusieurs FcγR, dont le FcγRIIb possédant une action inhibitrice de l’ADCC. La mutation permet donc de stabiliser une conformation particulière permettant à l’AcM de se lier sélectivement au FcγRI lorsqu’il est aglycosylé (48). Cette sélectivité est par ailleurs annulée par l’adjonction d’un oligosaccharide sur l’Asn 297. La mutation M428I améliorerait également la demi-vie de l’AcM. D’autres mutations ont permis de multiplier la demi-vie des AcM aglycosylés par 3 chez le singe, et par 4 chez la souris, telles que les mutations M428L and N434S. D’autres modifications, telle que la double substitution S298G/T299A ont permis d’activer

sélectivement les fonctions effectrices de l'AcM via les récepteurs FcγRI, FcγRIIa et FcγRIIIa sans activer les récepteurs FcγRIIb qui ont des propriétés inhibitrices.

Différentes mutations ont été aussi testées sur le Trastuzumab (Herceptin®), notamment la mutation Fc1004 comprenant 5 mutations (S298G/T299A/N390D/E382V/M428L). En comparaison avec le Trastuzumab utilisé en clinique, le Trastuzumab-Fc1004 a montré une affinité 160 fois supérieure pour le récepteur FcγRIIa, ainsi qu'une sélectivité 25 fois supérieure pour le FcγRIIa par rapport au FcγRIIb (52). L'expérience a également démontré une activation de l'opsonisation supérieure par rapport au Herceptin®.

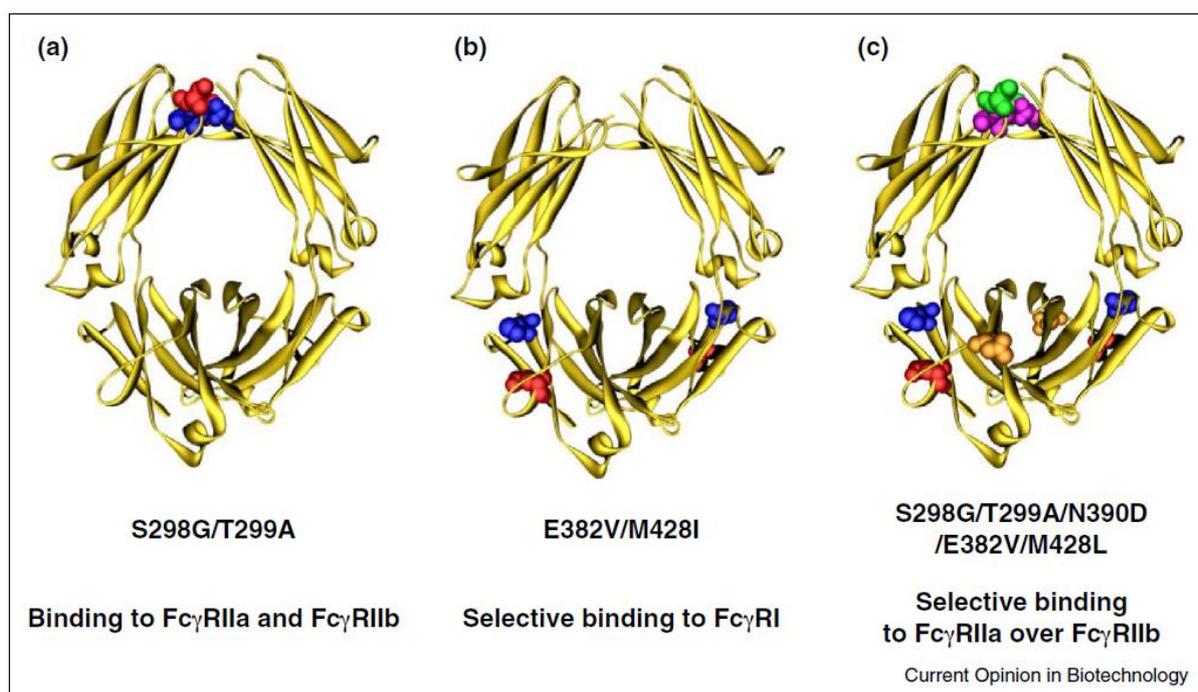


Figure 25. Sélectivité d'un AcM aglycosylé pour les FcγR en fonction de ses mutations

2.4.4.3. Les AcM aglycosylés en essais cliniques

Le premier AcM aglycosylé à avoir été développé est l'otelixizumab, un anti CD3 ciblant les cellules T. Après un premier échec en Phase III, il est actuellement en essai clinique de phase II dans le traitement du diabète de type I auto-immun, indication pour laquelle il a par ailleurs reçu le statut de médicament orphelin.

L'onartuzumab est en développement de phase II dans le traitement du cancer du sein métastatique triple négatif, en combinaison avec bevacizumab contre paclitaxel. Il est également en développement de phase III dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules, en combinaison avec Tarceva® (erlotinib) ou Placebo.

Le clazakizumab, un anti IL-6 est en cours d'essais cliniques de phase II dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrite psoriasique. En juin 2015, le clazakizumab a complété la phase IIb avec succès.

La technologie des AcM aglycosylés commence à se développer en clinique, mais la grande majorité des résultats sont encore insatisfaisants, avec de nombreux échecs en phase I et II.

3. Glycosylation du fragment *antigene binding*

La proportion d'anticorps humains glycosylés au niveau de la région Fab est estimée entre 20% et 30%. Cette forme de glycosylation est différente de celle couramment observée au niveau de l'Asn 297. Ici les glycoformes sont hautement galactosylés et sialylés. La N-glycosylation de ces groupements intervient au niveau des séquences suivantes : N-x-T ou N-x-S, x pouvant être tout acide aminé excepté une proline. La glycosylation du fragment Fab se fait le plus souvent au niveau des domaines V_L et V_H, et est considérée comme une résultante d'hypermutations somatiques. La glycosylation du fragment Fab augmente la solubilité des anticorps, et permettrait également de modifier les paramètres de liaison aux antigènes.

Plusieurs hypothèses sont évoquées quant à la fonction de ces groupements oligosaccharidiques :

- Augmentation de l'avidité vis-à-vis de l'antigène cible
- Diminution de la polyréactivité des anticorps. Cette piste est étudiée pour les AcM thérapeutiques.

3.1. Réduction de la polyréactivité des AcM

La polyréactivité des anticorps est un obstacle couramment observé lors des essais cliniques de nouveaux candidats médicaments. Plusieurs études ont été menées pour réduire cette polyréactivité via la glycosylation du fragment Fab. Cependant, cette forme de glycosylation est rare pour les AcM à usage thérapeutique, puisque ces groupements sont la plupart du temps clivés. Pourtant, la polyréactivité dans AcM peut avoir des conséquences thérapeutiques (53):

- Effets indésirables dues à un manque de spécificité pour l'antigène cible
- Réduction de la demi-vie des AcM
- Diminution de l'efficacité globale du traitement, nécessitant donc des doses plus élevées

Les études menées sur le sujet consistent en la variation génétique des séquences codant pour les domaines V afin d'insérer le groupement oligosaccharidique précisément au niveau de la zone responsable de la polyréactivité, selon le schéma suivant (Figure 26) :

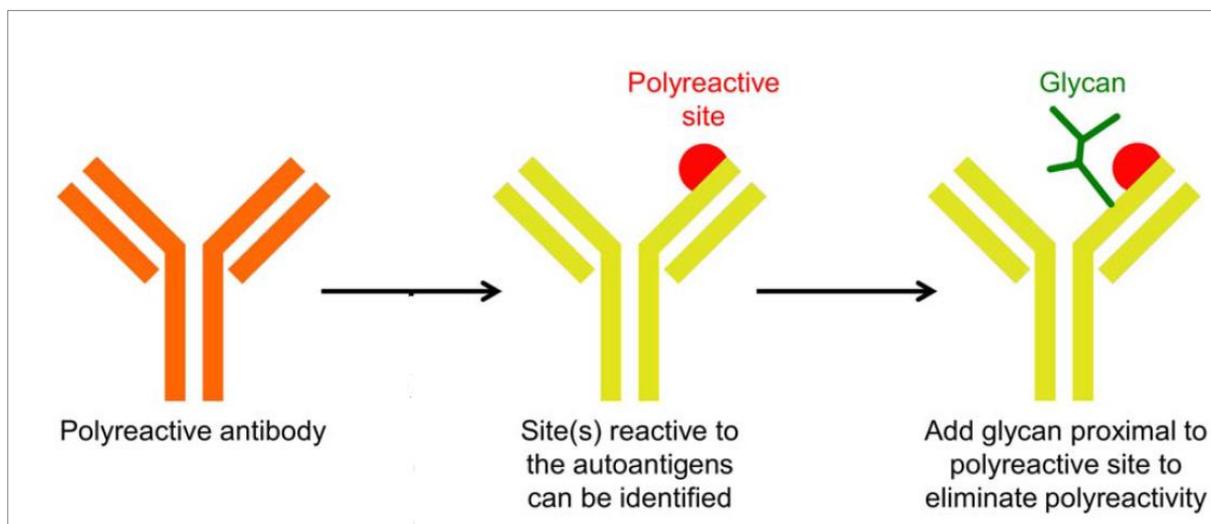


Figure 26. Schéma de la méthode de réduction de la polyréactivité par N-glycosylation

Une étude a été conduite sur la diminution de la polyréactivité d'un anticorps anti VIH-1, le VRC07, ayant une forte polyréactivité (53). Trois variants de cet anticorps, chacun ayant soit une mutation de la chaîne légère, soit une mutation de la chaîne lourde. Puis chacun des variants a été N-glycosylé avec un motif oligosaccharidique commun. L'objectif de l'étude est de comparer la puissance de la neutralisation de l'antigène cible, c'est-à-dire l'avidité de l'AcM pour l'antigène. Les anticorps sont mis en présence d'antigènes pouvant être reconnus en cas de polyréactivité (Figure 27).

Les variants non glycosylés sont dénommés : VRC07-av1 / -av2 / - av3.

Les variants glycosylés sont dénommés : VRC07-av1-g1 / -av1-g2 / etc.

L'étude montre que les anticorps glycosylés sont beaucoup moins polyréactifs, et également que plus le glycane est proche du site de polyréactivité, plus cette polyréactivité diminue (54).

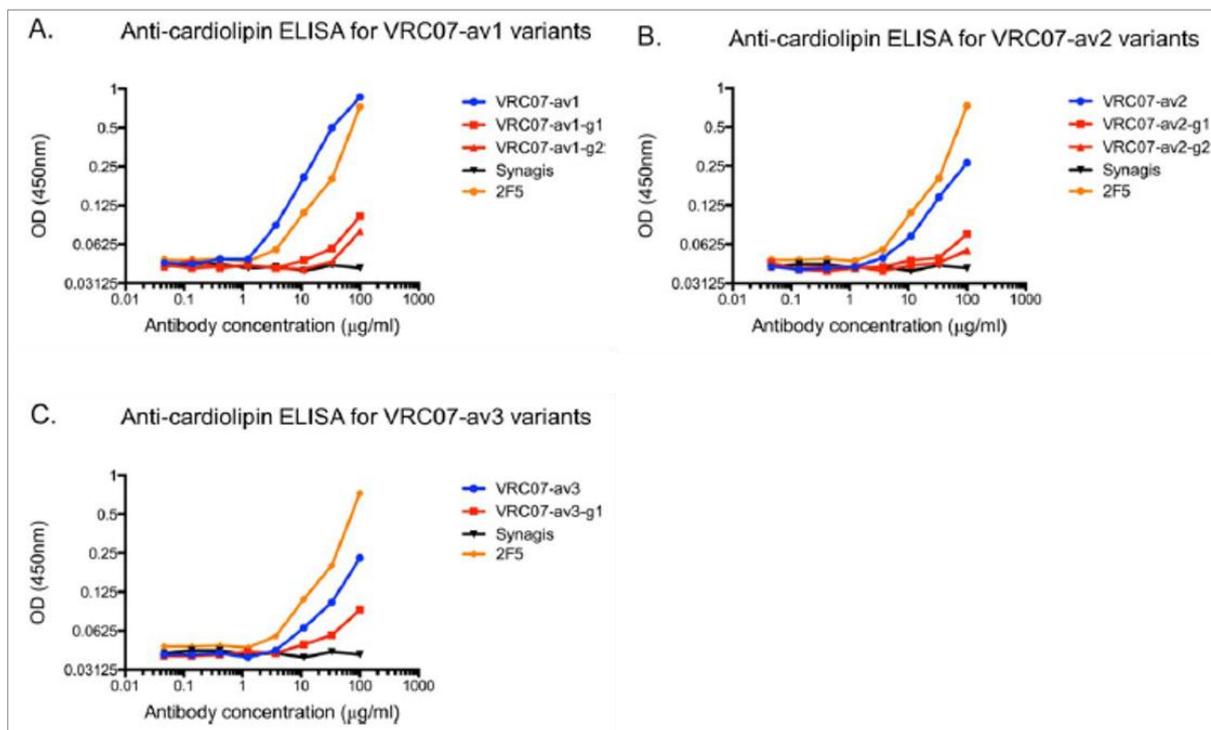


Figure 27. Réactivité des variants de VRC07 à la cardiolipine

Les mêmes résultats sont obtenus en comparant la polyréactivité des variants contre l'antigène Hep-2. De plus, les variants Fab-N-glycosylés se sont révélés plus stable dans le temps que les variants non glycosylés.

A l'heure actuelle seuls quelques AcM sont glycosylés au niveau du fragment Fab, comme par exemple le Cetuximab (Erbix®).

La glycosylation du fragment Fab de certains AcM pourrait être une voie de développement pour augmenter parallèlement leur sélectivité et leur demi-vie, ce qui conférerait un avantage considérable à certains AcM.

4. Discussion

La glycosylation est une voie d'amélioration et de modulation des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des AcM depuis longtemps, et de nombreuses pistes ont déjà été explorées (Tableau 3).

Tableau 3. Synthèse des effets principaux des différents glycanes des AcM

	Mannose	Fucose	Galactose
Effet	Augmente la clairance des AcMs	Fucosylation : diminue l'affinité aux FcγRIIIa	Augmente la clairance des AcMs
	Améliore l'affinité aux FcγRIIIa, augmente l'ADCC	Afucosylation : augmente l'affinité au FcγRIIIa et donc l'ADCC	Améliore la CDC des AcMs
	Diminue l'affinité au C1q et donc la CDC		
	Acide Sialique (NANA)	Acide Sialique (NGNA)	GlcNac
Effet	Apporte des propriétés anti-inflammatoires aux AcMs	Augmente l'immunogénicité des AcMs	Augmente l'affinité au FcγRIIIa et donc l'ADCC
		Diminue l'activité ADCC des AcMs	

Cependant des axes de recherches prometteurs semblent émerger et font l'objet de tests en essais cliniques. Notamment le cas des AcM aglycosylés qui émergent avec de nombreux résultats d'essais cliniques. Même si ces derniers apparaissent majoritairement décevants, c'est une voie de recherche encore très étudiée et qui fait l'objet de nombreuses publications récentes. De plus, la Fab-N-glycosylation apparaît comme une solution intéressante pour le développement d'AcM plus sélectifs, notamment pour les traitements sensibles tels que l'utilisation des *antibody drug conjugates* (ADC).

Partie III : *Antibody Based Conjugate*

1. Généralités

1.1. Introduction à l'ADC

Les AcM avec la technologie ADC sont essentiellement utilisés pour le traitement des cancers. D'une part, les petites molécules utilisées en thérapeutiques sont efficaces mais très toxiques pour les tissus à renouvellement important - tels que les cancers, les tissus intestinaux, l'épithélium – et très peu sélectives (mis à part les thérapies ciblées utilisant les inhibiteurs de tyrosine kinase ayant une activité plus spécifique, mais étant sensibles aux mutations). D'autre part, les AcM sont très sélectifs, mais induisent une activité cytotoxique moins importante.

C'est à partir de ce constat que les ADC ont été créés : il s'agit d'un AcM couplé à une molécule extrêmement cytotoxique via un *linker*. Ainsi, ces molécules sont libérées précisément au niveau des cellules tumorales, réduisant les effets indésirables tout en augmentant l'efficacité du traitement.

Le terme d'ADC est le plus couramment utilisé pour désigner plus généralement l'ABC (*Antibody-Based Conjugate*). Il est important de différencier ces deux termes puisqu'en réalité l'ABC peut être divisé en plusieurs types en fonction de la molécule fixée :

- Les *Antibody Drug Conjugate* (ADC) utilisant des molécules cytotoxiques
- Les Radio Immuno Conjugate (RIC) utilisant des radionucléides
- Les Immuno Toxines (IT) utilisant des toxines
- Les Immuno Cytokines (IC) utilisant des cytokines.

Le mécanisme d'action des ADC consiste premièrement en la création d'un complexe immun entre l'ADC et la cellule tumorale cible, via la sélection préalable d'un clone d'AcM ciblant un récepteur spécifique de la cellule tumorale. Puis, l'ADC doit être internalisé par la cellule cible, et dégradé au sein d'un lysosome. C'est la dégradation de l'ADC qui entraîne la libération intracellulaire de la molécule cytotoxique (Figure 28) (55).

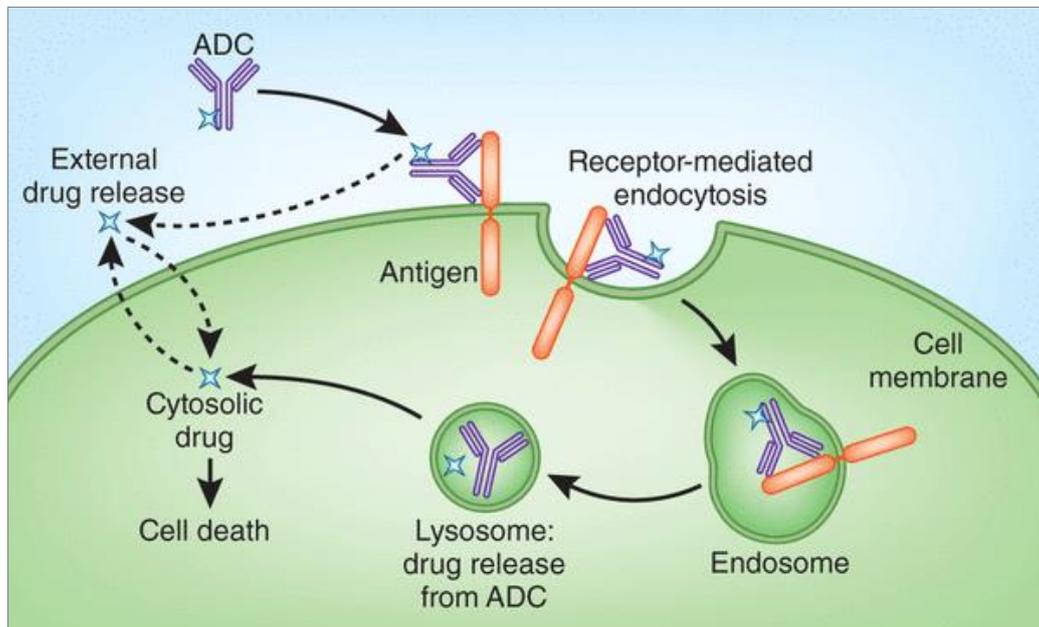


Figure 28. Mécanisme de libération de la molécule cytotoxique (56)

Cependant, malgré une sélectivité plus élevée, des effets indésirables graves peuvent survenir, notamment par libération extracellulaire non contrôlée de la molécule cytotoxique, ou par fixation et internalisation de l'AcM sur un autre tissu du fait de sa polyréactivité.

Le développement de cette technologie (Figure 29) a été long du fait des nombreux paramètres à prendre en compte pour optimiser le développement et l'efficacité des traitements :

- La stabilité de la molécule et du *linker* afin que la libération ait lieu dans la cellule cible.
- La pharmacocinétique de l'ADC, pour éviter l'accumulation dans d'autres organes
- Libération de la forme active de la molécule au niveau intracellulaire.
- Choix du *linker*
- Procédé de synthèse de l'ADC

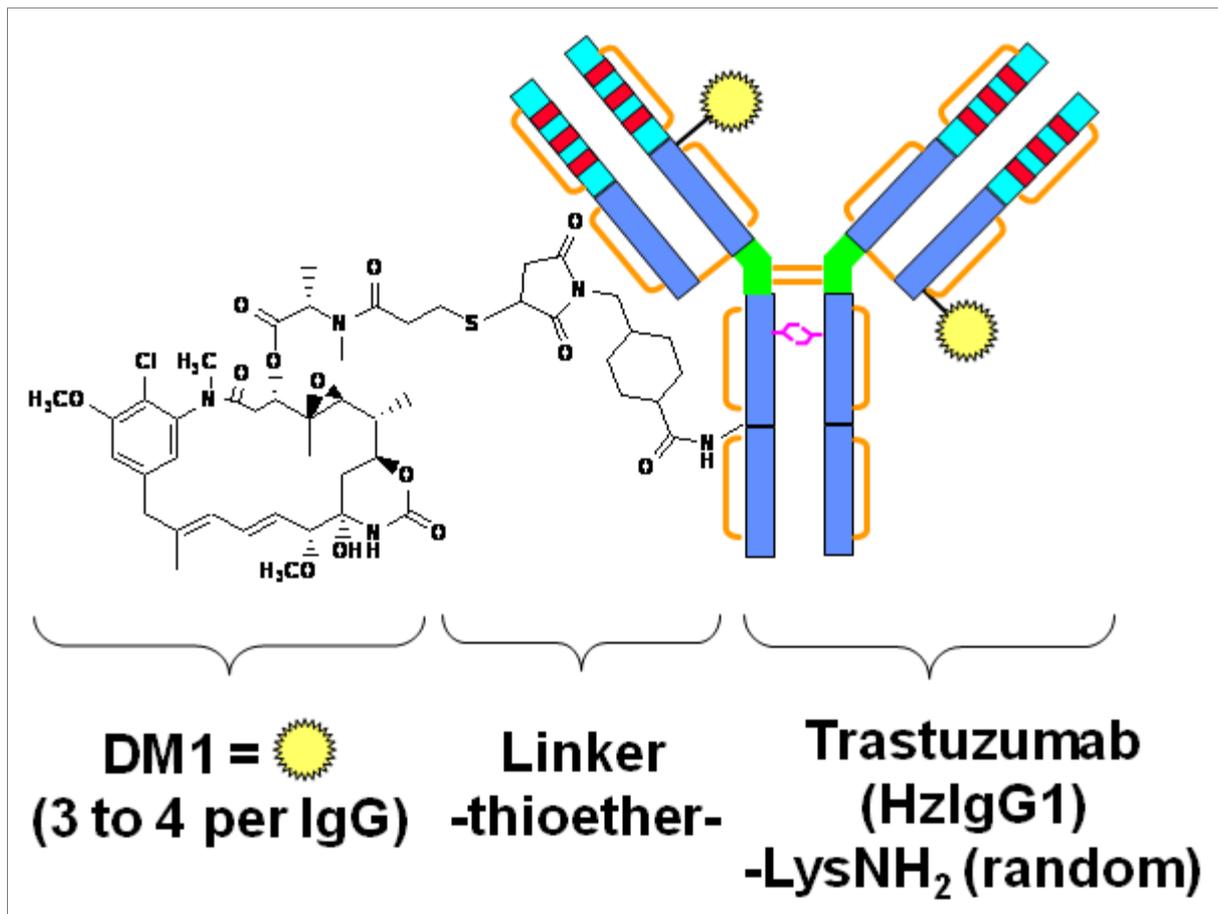


Figure 29. Schéma de la structure du trastuzumab sous forme ADC. (57)

Il existe plusieurs formes de *linker*, ainsi que plusieurs molécules pouvant être utilisées comme agent cytotoxique, on en compte 6 types :

- Petites molécules hautement cytotoxiques
- Toxines protéiques
- Protéines immunomodulatrices
- Enzymes
- Radio-molécules

Outre leur libération intracellulaire qui est la stratégie la plus communément adoptée, la question de la libération extracellulaire peut se poser dans certains cas.

1.2. Stratégies d'internalisation ou action en surface

1.2.1. Libération intracellulaire

La libération intracellulaire de la molécule de l'ADC nécessite une combinaison de paramètres. Tout d'abord l'anticorps doit être capable de fixer spécifiquement un récepteur cellulaire appartenant uniquement à la lignée cancéreuse ciblée. Puis l'AcM doit être internalisé via la fixation à un récepteur permettant d'activer son endocytose. Puis, la cellule doit disposer du matériel cellulaire nécessaire à la libération de la molécule. D'autant plus que certaines tumeurs sont capables d'adaptation et ainsi de réguler négativement l'expression de l'antigène de surface cible.

1.2.2. Libération au niveau de l'angiogenèse tumorale

Une autre approche a donc été développée dans le cas de tumeurs ne permettant pas l'endocytose de l'ADC (Figure 30). Cette méthode est basée sur le ciblage du système néovasculaire de la tumeur. Les AcM ciblent donc des marqueurs spécifiques de l'angiogenèse au niveau du cancer. Ces marqueurs se trouvent généralement au niveau de la matrice extracellulaire sous-endothéliale et sont plus stable que les antigènes de surface des cellules cancéreuses. Cette méthode est encore en voie de développement du fait de certains effets devant être absolument évités, tel que la libération de la molécule directement dans le flux sanguin du patient, pouvant entraîner de graves effets indésirables (58).

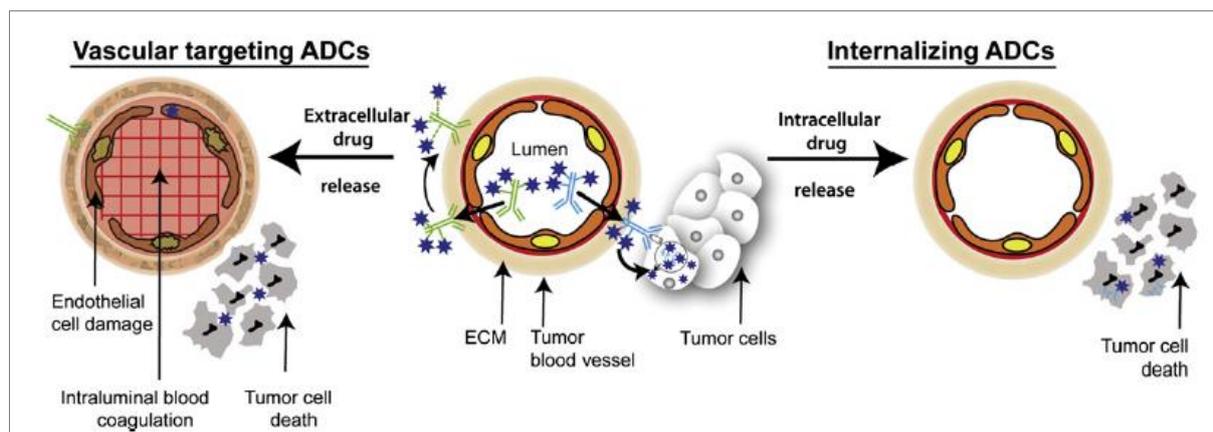


Figure 30. Stratégies de libération de la molécule cytotoxique (59).

La stratégie utilisée actuellement est celle de la libération intracellulaire de la molécule cytotoxique. De ce fait un certain nombre de paramètres sont à définir préalablement, dont le choix de l'AcM qui permettra d'exécuter au mieux cette stratégie.

2. Choix de l'AcM

Les AcM utilisés pour être conjugués à une molécule cytotoxique doivent pouvoir être conjugués à cette molécule sans altération de leur avidité pour l'antigène cible. De plus, ces AcM doivent avoir plusieurs sites de fixation pour molécule, ces sites de conjugaison devant être uniques pour un AcM donné afin que la libération du cytotoxique soit homogène pour chaque ADC. Aussi, l'activation des fonctions effectrices de l'AcM doit être possible sans affecter l'internalisation de ce dernier. Enfin, l'AcM choisi doit être spécifique de l'antigène cible, lui-même spécifique aux cellules tumorales ciblées (60).

3. Choix du *linker* et conjugaison à l'AcM

Le choix du *linker* est essentiel dans le développement de l'ADC puisqu'il conditionne la bonne libération des molécules cytotoxiques au niveau intracellulaire de la tumeur. De fait, les *linkers* doivent être extrêmement stables durant la phase de distribution de l'ADC dans le compartiment sanguin jusqu'au niveau de la tumeur. Puis ils doivent être sensibles aux enzymes intracellulaires lors de leur internalisation dans la cellule tumorale. De plus, lors du clivage du *linker* par les enzymes intracellulaires, la molécule doit être libérée sous sa forme active, sans altération de ses propriétés cytotoxiques. Les *linkers* sont choisis en fonction de la stratégie de libération de la molécule préalablement déterminée. Ils sont divisés en deux catégories : Les *linkers* clivables et les *linkers* non clivables. Le choix est effectué en fonction de la molécule choisie. Par exemple, la « monométhyl auristatine E » (MMAE) est liée à un *linker* clivable puisqu'elle ne tolère pas de substitutions, nécessaire à la formation de *linkers* non clivables (61). D'autres molécules, telle que la maytansine, ne sont pas altérées par la substitution et peuvent donc être liées à un *linker* non clivable. Le choix de la méthode de conjugaison du *linker* à l'AcM est aussi un facteur important, déterminant le nombre de molécules fixées optimal par ADC.

3.1. *Linkers* clivables

Le *linker* clivable est spécifiquement conçu pour ne pas être altéré lors du transport de l'ADC dans les tissus, puis être clivé en intracellulaire lorsque l'AcM utilisé a formé un complexe immun avec l'antigène cible de la cellule cancéreuse et a été internalisé.

3.1.1. *Linkers* hydrazone

Le *linker* hydrazone (Figure 31) est le premier à avoir été utilisé dans la conception des ADC. Le principe de libération est basé sur la stabilité du *linker* à PH sanguin (PH 7,3 – 7,5), mais est sensible au PH acide des endosomes et lysosomes (PH 6,5 – 4,0) lors de l'internalisation de l'ADC. Le clivage est effectué au niveau de la fonction hydrazone du *linker*, hydrolysée à PH acide. Dans les lysosomes, l'hydrolyse de la fonction hydrazone est 16 fois plus élevée que dans le compartiment sanguin.

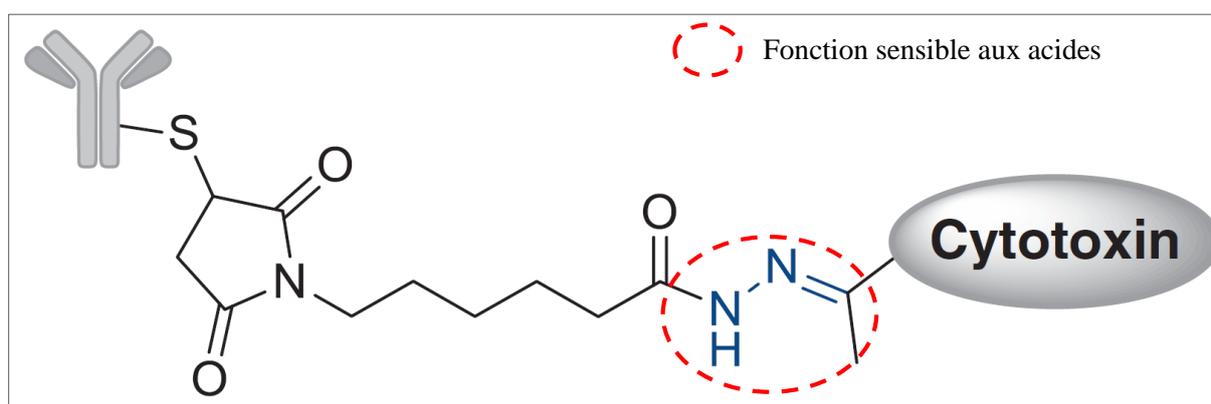


Figure 31. Fonction hydrazone d'un ADC

Un des premiers traitements approuvés utilisant un *linker* de type hydrazone était le Mylotarg® (gemtuzumab + ozogamicin). La fonction hydrazone étant néanmoins peu stable, ce type de complexe a une demi-vie courte dans le plasma humain, de l'ordre de 2 à 3 jours. Du fait de cette instabilité, les molécules cytotoxiques ont tendance à être libérées bien avant l'internalisation de l'ADC, provoquant des effets indésirables systémiques graves. Ainsi, de nombreux traitements par ADC utilisant la fonction hydrazone, tel que le Mylotarg®, ont été retirés du marché à cause de leur toxicité trop importante ayant une incidence significative sur la survie globale des patients (62).

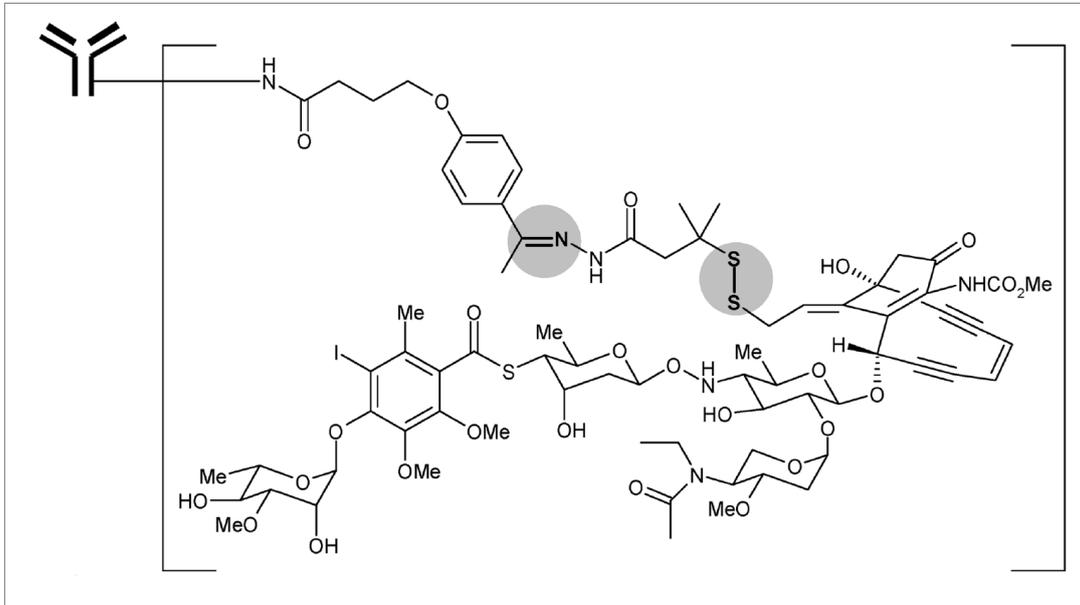


Figure 32. Structure du Mylotarg®, avec les fonctions hydrazone et disulfure

Ici (Figure 32), la molécule est libérée grâce à l'hydrolyse de la fonction hydrazone, puis devient fonctionnelle après clivage de la fonction disulfure (62).

3.1.2. *Linkers* disulfure

Les *linker* disulfure (Figure 33) ont été créés comme alternative aux *linker* hydrazone, afin d'augmenter la spécificité de clivage du *linker* au niveau intracellulaire. En effet, les *linkers* disulfure sont clivés via le glutathion, qui est en concentration 1000 fois supérieure dans le milieu intracellulaire (concentration millimolaire) que dans le milieu extracellulaire (concentration micromolaire). La présence de glutathion est accentuée dans les cellules tumorales qui sont le plus souvent en état d'hypoxie, favorisant ainsi la synthèse d'enzymes réductrices, ce qui augmente *in fine* la concentration de glutathion intracellulaire (63).

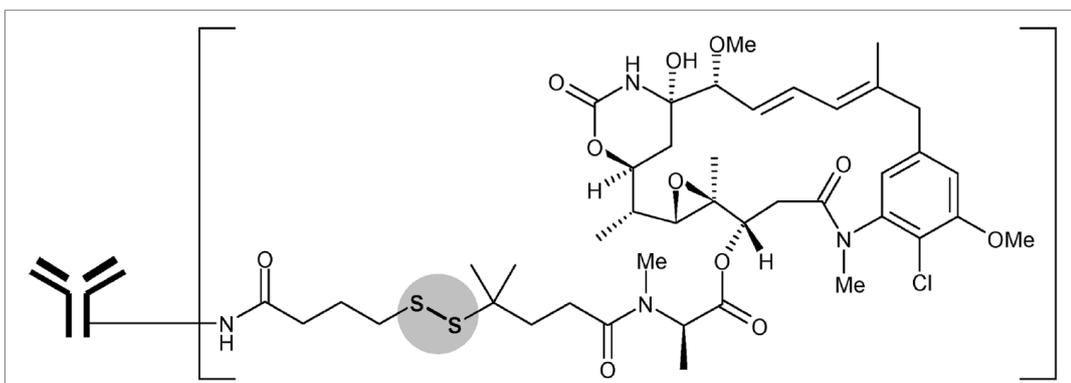


Figure 33. ADC possédant un *linker* de type disulfure

Afin d'augmenter la stabilité extracellulaire du *linker* disulfure et donc la demi-vie de l'ADC, il est possible d'augmenter l'encombrement stérique autour de cette fonction disulfure afin de limiter son exposition dans le compartiment sanguin. Les molécules libérées par catalyse de la liaison disulfure sont méthylées à leur extrémité thiol par l'action de méthyltransférase intracellulaire. De ce fait, ces molécules cytotoxiques non chargées sont capable de traverser les membranes cellulaires pour agir au niveau du noyau de la cellule cible, mais aussi au niveau des cellules voisine de la cellule tumorale ciblée (63).

3.1.3. *Linkers* dipeptide

Ce type de *linker* est composé de deux acides aminés reliant l'AcM et la molécule cytotoxique. La structure dipeptide implique premièrement une excellente stabilité de l'ADC dans le compartiment sanguin, et deuxièmement une libération rapide des agents cytotoxiques par les protéases lysosomales après internalisation de l'ADC (Figure 34). Les protéases impliquées sont la cathepsine B et la plasmine, dont la concentration peut être d'autant plus importante dans les cellules tumorales.

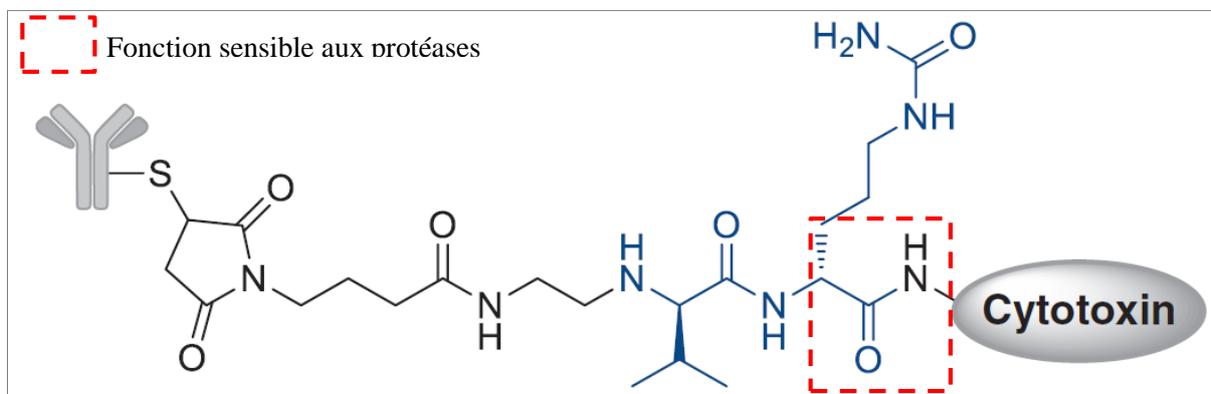


Figure 34. ADC possédant un *linker* de type dipeptide

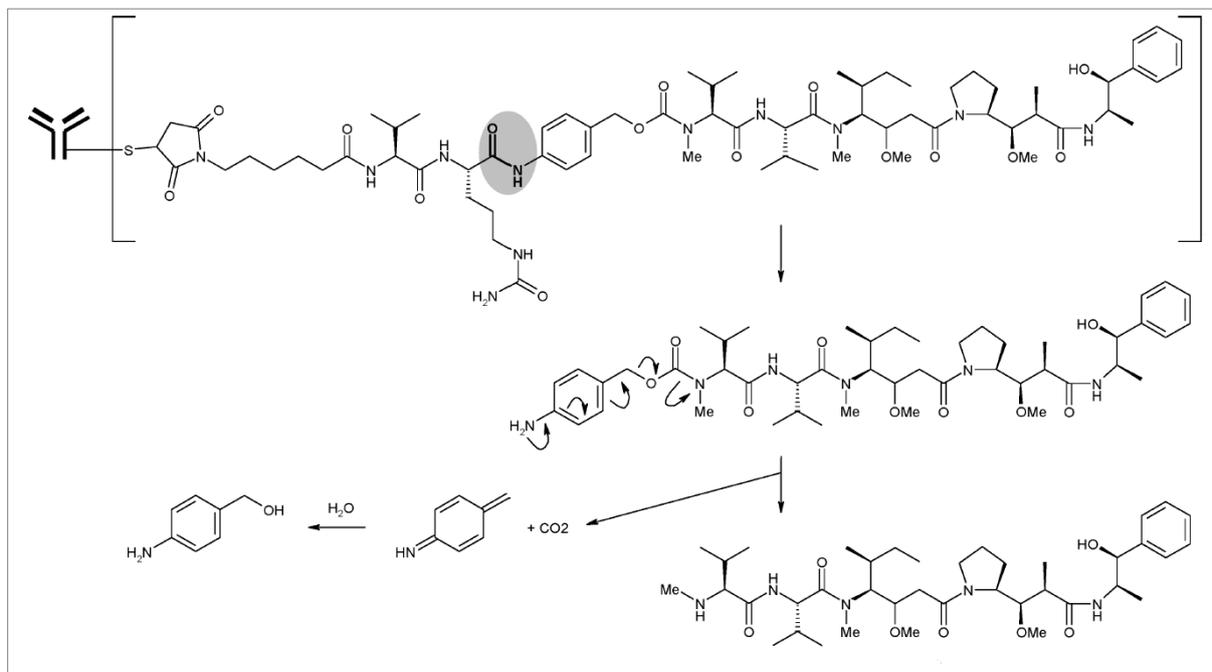


Figure 35. Schéma du clivage du *linker* valine-citrulline libérant la MMAE sous forme active

Les principaux dipeptides utilisés sont :

- Valine – citrulline
- Phenylalanine – lysine

La demi-vie des ADC possédant un *linker* dipeptide est de 40 à 100 fois supérieure à celle des ADC ayant un *linker* de type hydrazone. De plus, suite au clivage du *linker*, les molécules telle que la MMAE sont libérée sous forme active et agissent directement au niveau du noyau de la cellule. Le brentuximab – vedotin (MMAE) (64) est un des traitements par ADC possédant un *linker* de type dipeptide (Figure 35). Il est indiqué : dans le traitement du lymphome hodgkinien CD30 positif récidivant ou réfractaire ainsi que dans le traitement du lymphome anaplasique à grandes cellules systémique récidivant ou réfractaire.

De manière générale, les *linkers* bipeptides ont montrés des résultats cliniques bien supérieurs aux *linkers* disulfure ou hydrazone en termes d'activité pharmacodynamique et en termes de toxicité. Par ailleurs, la dose maximale tolérée est plus élevée pour les ADC ayant un *linker* de type dipeptide par rapport aux *linkers* de type hydrazone. De nombreuses recherches se sont également axées sur la protection extracellulaire des molécules conjuguées, afin de diminuer leur toxicité lorsqu'elles sont libérées hors du compartiment intracellulaire.

3.2. *Linkers* non clivables

Les *linkers* non clivables ont été développés dans la stratégie thérapeutique pour diminuer les effets indésirables apparaissant lors du clivage précoce des *linkers* qui entraîne une libération systémique des molécules cytotoxiques conjuguées. Le mécanisme des ADC à *linker* non clivable est similaire à celui des autres ADC, puisque la libération de la molécule s'effectue également dans le milieu intracellulaire, lors de l'internalisation de l'ADC dans les lysosomes. La différence est que cette libération de la molécule ne dépend plus du clivage du *linker*, mais dépend maintenant de la dégradation même de l'AcM au sein des lysosomes, via des protéases intra-lysosomales. La molécule libérée est donc liée avec le *linker* non clivable, ce qui n'influe pas sur l'activité des cytotoxiques utilisés pour l'ADC (Figure 36).

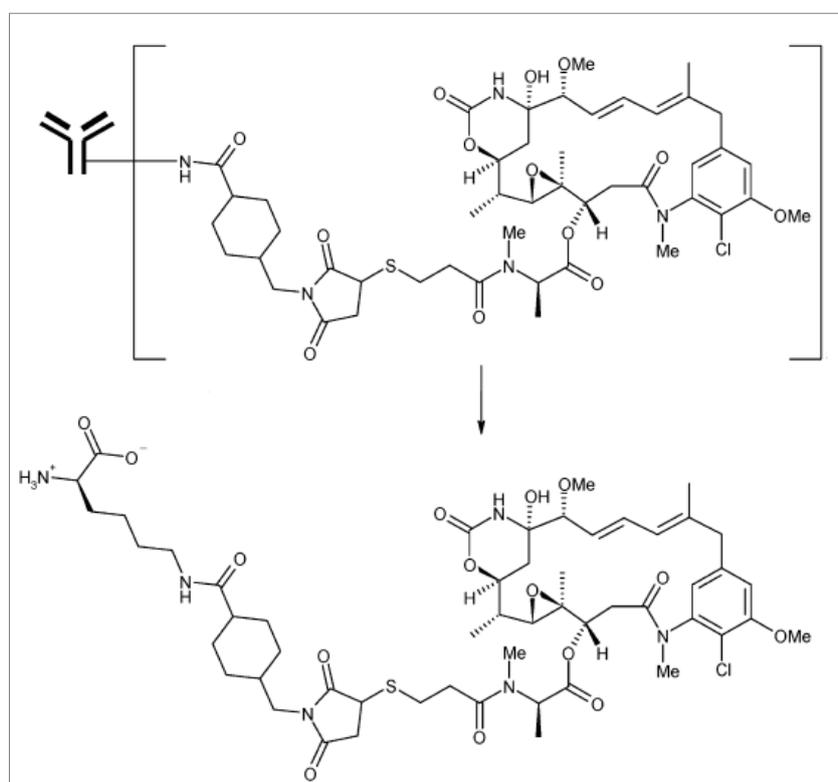


Figure 36. Clivage de la liaison AcM – *linker* de l'ADC dans le lysosome

De plus la stabilité des ADC avec *linker* non clivable est bien plus importante dans le compartiment sanguin par rapport aux *linkers* clivables. Les *linkers* non clivables ont pour la plupart une structure de thioether, dont la stabilité se révèle être plus importante que les autres types de *linkers*. Ainsi, la tolérance des ADC utilisant ce type de *linker* est en général plus élevée que pour les autres types. L'index thérapeutique de ces traitements s'en trouve donc amélioré.

Un des défis des ADC non clivables est leur efficacité en cas de faible endocytose du complexe immun ADC-antigène par la cellule tumorale. A ce titre, ce type d'ADC peut être moins efficace en cas de développement de mécanisme de résistance par la cellule néoplasique, notamment par diminution de l'expression ou faible expression naturelle du motif antigénique au niveau de la surface cellulaire de la tumeur.

A contrario, certaines conditions physiopathologiques au niveau de la tumeur peuvent favoriser l'utilisation de *linkers* clivables, la libération extracellulaire de la molécule – proche de la tumeur – lui permettant de passer la membrane cellulaire et d'exercer son action cytotoxique. Ceci même si l'antigène cible est très peu internalisé par les cellules tumorales.

L'étude des différents types de *linkers* est un champ d'application primordial pour le développement de la technologie des ADC. De plus, un autre paramètre essentiel est à prendre en compte lors du développement de ces biomédicaments : la conjugaison entre le *linker* et l'AcM.

4. La conjugaison molécule – *linker* – AcM

De nombreux paramètres sont à prendre en compte lors de la conjugaison des trois composants d'un ADC : l'AcM, le *linker* et la molécule cytotoxique. Ainsi, les molécules utilisées pour l'ADC ont le plus souvent un caractère hydrophobe, suivant le risque de résistance à de multiples molécules cytotoxiques par mécanisme d'efflux, c'est le principe du *multidrug resistance* (MDR) souvent observé avec l'utilisation d'antibiotiques par ailleurs. L'utilisation de *linkers* hydrophiles est une solution permettant de limiter ce type de résistances par libération de la molécule sous forme de métabolite hydrophile et parallèlement d'augmenter l'efficacité de l'ADC par rapport à l'utilisation d'un *linker* entraînant la libération de la molécule sous forme hydrophobe. Cela étant, la capacité de la molécule à traverser la membrane nucléaire doit rester intacte.

De plus, une autre problématique se pose au-delà de l'efficacité de la molécule et de sa tolérance. C'est celle de la charge moléculaire de chaque ADC en terme de molécules cytotoxiques, via un *linker* prédéfini. Il existe aujourd'hui deux cibles majeures pour la conjugaison du *linker* du fait de leurs groupements nucléophiles : les lysines (fonction NH₂) ou les cystéines (fonction SH).

La conjugaison des ADC est principalement mesurée par test ELISA ou par LC/MS.

4.1. Conjugaison aux lysines

La conjugaison du *linker* et de la molécule à la lysine peut se faire via un processus en une ou deux étapes :

- Conjugaison du *linker* à l'AcM puis conjugaison de la molécule au *linker*.
- Conjugaison de l'ensemble *linker*-molécule à l'AcM.

Un AcM de type IgG1, le plus couramment utilisé possède environ une centaine de résidus de type lysines, dont environ une trentaine peuvent être modifiés pour être conjugués. Ce nombre élevé de site de conjugaison entraîne une forte variabilité de structure lors de la production de l'ADC, avec une répartition statistique du nombre de sites conjugués en forme de gaussienne (Figure 37). Une majorité des ADC ainsi produits ont entre 3 et 4 sites conjugués (65).

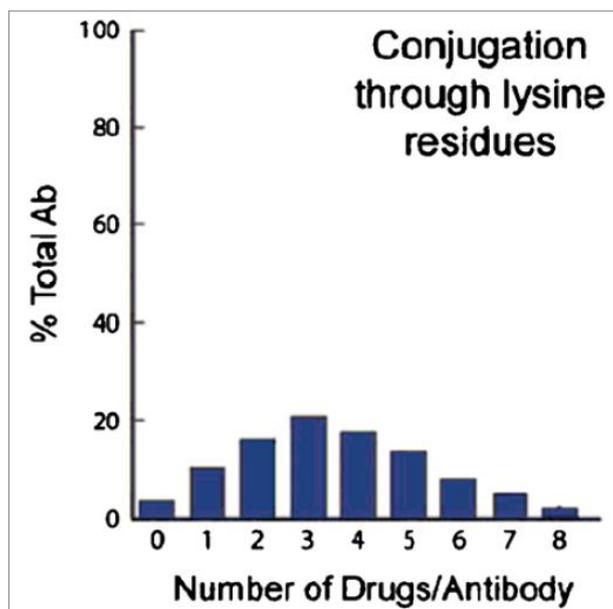


Figure 37. Distribution statistique du nombre de lysines conjuguées par ADC (65).

Outre la variabilité du nombre de sites conjugués, la variabilité de la localisation de ces conjugaisons est également à l'origine de potentielles modifications des paramètres pharmacodynamiques, tel qu'une diminution de l'efficacité du traitement ou de l'affinité de l'ADC pour l'antigène cible, ainsi qu'une variation des paramètres pharmacocinétiques tels que la solubilité ou la stabilité de la structure.

4.2. Conjugaison aux cystéines

Les acides aminés de type cystéine sont impliqués dans la formation des ponts disulfures entre les chaînes d'un anticorps (ponts interchaines), ainsi que dans la formation des ponts intrachainés. Ils ont donc un rôle primordial dans le maintien de la structure de l'AcM et donc dans le maintien de son affinité pour l'antigène cible ainsi que sa capacité à activer des fonctions effectrices. Il est possible de réduire les ponts disulfures interchainés afin de libérer une fonction nucléophile et réaliser la conjugaison avec le *linker*, tout en conservant les ponts disulfures interchainés intacts. Un AcM de type IgG1 possède 4 ponts disulfures interchainés, ce qui limite la charge possible pour chaque ADC au nombre de 8, et ainsi de réduire les problématiques d'hétérogénéité de distribution des charges cytotoxiques par rapport à l'utilisation de la méthode de conjugaison sur lysine. La distribution statistique du nombre de molécules fixées sur chaque ADC est focalisée sur un nombre de 4 (50% environ) ou 2 (30% environ) (Figure 38) (65).

Pour réduire encore la variabilité de répartition des charges moléculaires lors de la production de lot d'ADC destinés à l'usage thérapeutique, la séquence en acides aminés de l'AcM doit être préalablement déterminée par la technique du phage display. Le principe repose sur le remplacement d'un nombre limité d'acides aminés par des cystéines afin d'exposer une fonction thiol réactive sans pour autant altérer les fonctions de liaison et les fonctions effectrices de l'AcM. De plus les ponts inter- et intrachainés sont conservés. Ainsi, le nombre d'agents cytotoxiques est de 2 à plus de 90% sur des positions constantes, permettant d'obtenir un lot homogène pour son utilisation en thérapeutique.

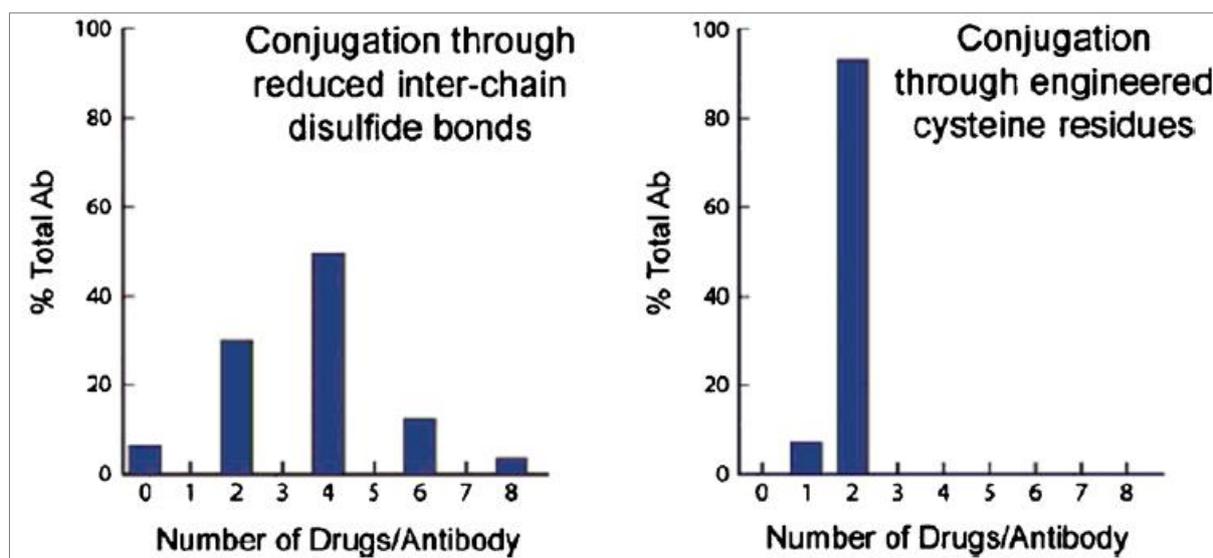


Figure 38. Distribution statistique du nombre de cystéines conjuguées par ADC (65).

5. Les molécules utilisées pour l'ADC

L'ADC est donc un sous type d'une plus large famille thérapeutique. C'est le terme le plus utilisé puisque la majorité des ABC utilisés en thérapeutique sont des ADC. Aussi, un radionucléide ou une toxine peuvent être considérés comme médicament (Drug). Le terme ABC sera utilisé pour cette sous partie afin d'éviter toute confusion entre les différents type de molécules utilisées (Figure 39).

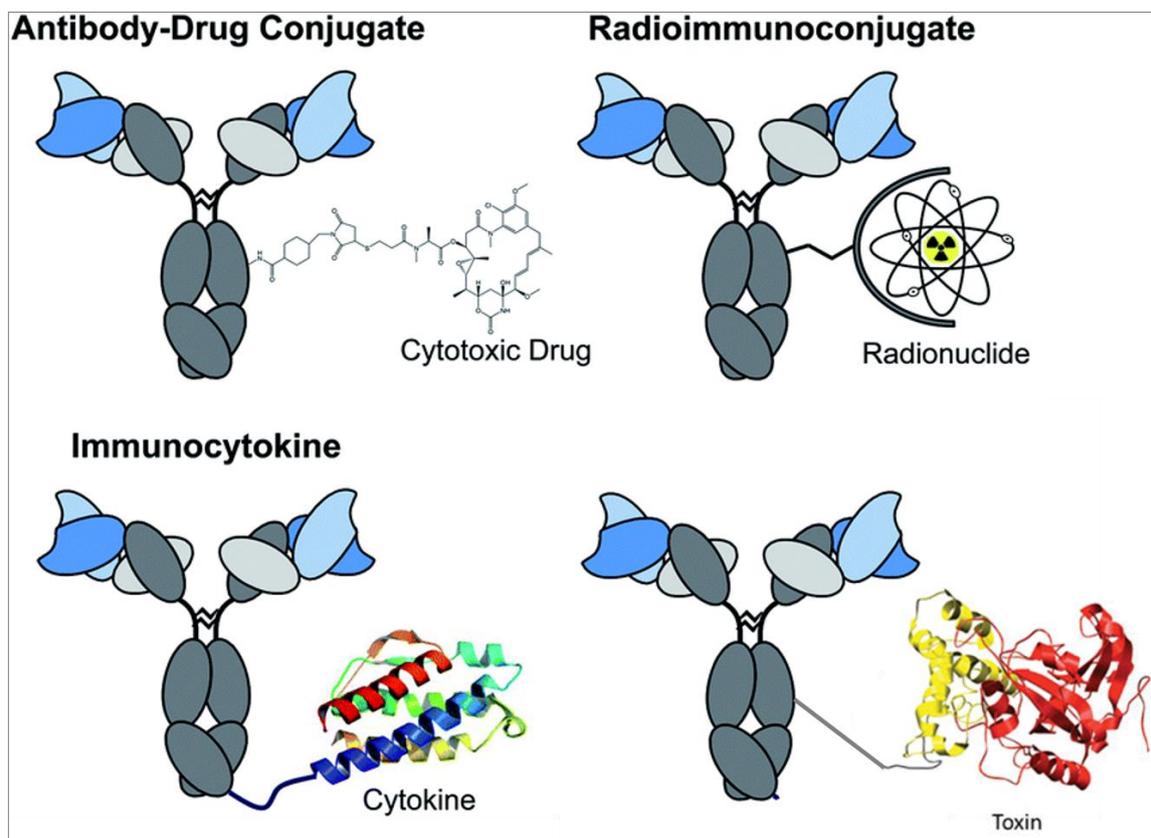


Figure 39. Schéma des différents types d'*antibody based conjugates*.

L'utilisation de ce type de molécules ayant un potentiel cytotoxique extrêmement élevé implique une dose plus faible d'ABC par rapport à l'utilisation d'un AcM classique. De ce fait, l'essentiel du potentiel thérapeutique des ABC réside proportionnellement plus dans leur molécule cytotoxique que dans l'efficacité des fonctions effectrices de l'AcM

5.1. Radio Immuno Conjugate (RIC)

Les RICs sont historiquement les premiers ABC à avoir été étudiés pour deux applications : le diagnostic par imagerie et leur utilisation en thérapeutique. Les premiers RIC étudiés étaient

conjugués principalement à l'Iode 131, puis les développements se sont focalisés sur d'autres types de radionucléide tel que le Brome 77. Les avantages exploités par l'utilisation des RICs sont multiples.

Premièrement, les RICs ne sont que très peu dépendant de l'internalisation du complexe immun ou de la diminution de l'expression de l'antigène à la surface de certaines cellules de la tumeur. En effet, lorsqu'un RIC se fixe sur l'antigène cible, le rayonnement induit par le radionucléide irradie la cellule tumorale cible ainsi que les cellules adjacentes. Cette irradiation est ainsi effective même si les cellules adjacentes n'expriment que très peu d'antigène de surface. Néanmoins, cette irradiation périphérique peut léser les tissus sains proches de la tumeur (66).

Deuxièmement, la libération d'énergie est plus importante lorsque le RIC est endocyté par la cellule tumorale, ce qui limite les effets collatéraux sur les cellules saines autour de la tumeur et lors de la circulation du RIC au travers des différents tissus de l'organisme.

Enfin, dans le domaine de l'imagerie médicale, la spécificité des AcM couplés à un radionucléide permet de cibler précisément un tissu à étudier et de l'observer par imagerie de manière très précise. Cependant, les effets de l'irradiation sur les tissus ont limité le développement de cette technologie, même si concernant l'imagerie, les doses utilisées sont plus faible que les doses thérapeutiques et les radionucléides utilisés sont moins actifs.

A l'heure actuelle, seulement deux traitements de type RIC sont approuvés :

- 90-Yttrium (^{90}Y)-Ibritumomab Tiutexan (Zevalin®) : émetteur β
- 131-Iode (^{131}I)-Tositumomab (Bexxar®) : émetteur β et γ

Tous deux sont composés à base d'AcM murin. Ce sont des anti-CD20 indiqués dans le traitement des lymphomes folliculaires (67). D'autres traitements ont été ou sont en cours d'essais cliniques, mais la toxicité de ces produits est souvent un frein à leur mise sur le marché. En effet, en plus des cas de toxicité à court terme (rashes, vomissements, diarrhées, myalgie, hypotension...), la toxicité des RIC se mesure également à long terme du fait de l'irradiation des tissus sains lors de la distribution de l'AcM radioconjugué dans les tissus. Les particules β émises par les radionucléides provoquent des cassures des brins d'ADN, et ceux sur des distances pouvant atteindre jusqu'à 50 cellules. De plus, les irradiations peuvent causer une myélosuppression chez les patients, notamment du fait de l'élimination lente des composés radioactifs. C'est généralement l'apparition de ce dernier symptôme qui détermine la Dose Limite Toxique (DLT) (66). Le traitement par Bexxar® émettant également un rayonnement γ , il est possible de calculer la dose efficace optimale afin de limiter au mieux les risques de toxicité, et notamment les effets à long terme. L'iode radiocactif du Bexxar® pouvant

s'accumuler au niveau de la thyroïde, les patients reçoivent parallèlement de l'iodure de potassium en prévention pour éviter les risques de pathologie thyroïdienne tumorale. Enfin, ces traitements sont exclusivement utilisés à l'hôpital, et la conjugaison du radioisotope doit se faire dans le délai le plus court possible avant l'administration au patient. Ceci implique que l'hôpital ait le matériel nécessaire pour manipuler les radioisotopes et les conjuguer aux AcM.

Ce dernier paramètre est également un frein majeur à l'utilisation des RIC en thérapeutique, largement dépassés par les ADCs, dont l'utilisation en thérapeutique est beaucoup moins contraignante.

5.2. Petites molécules

La plupart des molécules utilisées agissent soit au niveau de l'ADN, soit par blocage des microtubules. Ces molécules doivent avoir un potentiel thérapeutique important, de l'ordre du picomolaire idéalement, puisque l'on estime que seulement 1% à 2% des ADC atteignent effectivement l'espace intracellulaire (68). Ceci étant dépendant de l'affinité de l'ADC pour l'antigène cible, la spécificité de l'antigène cible des cellules tumorales, le taux d'expression de cet antigène à la surface cellulaire et le taux d'internalisation du complexe immun formé. Trois types de molécules sont couramment utilisées en développement : les auristatines et les maytansinoïdes sont les plus fréquentes, suivies des calichéamicines.

5.2.1. Les auristatines

La classe des auristatines sont des agents inhibiteurs de la tubuline. Ils dérivent d'un pentapeptide naturel antimitotique : la dolastatine 10, dont les auristatines sont des analogues synthétiques (Figure 40).

Les deux auristatines les plus utilisées dans le développement des ADC sont la MMAE et la MMAF. La MMAF dérive de la MMAE et se différencie par la présence d'un groupement phénylalanine (F) chargé à son extrémité C-terminale.

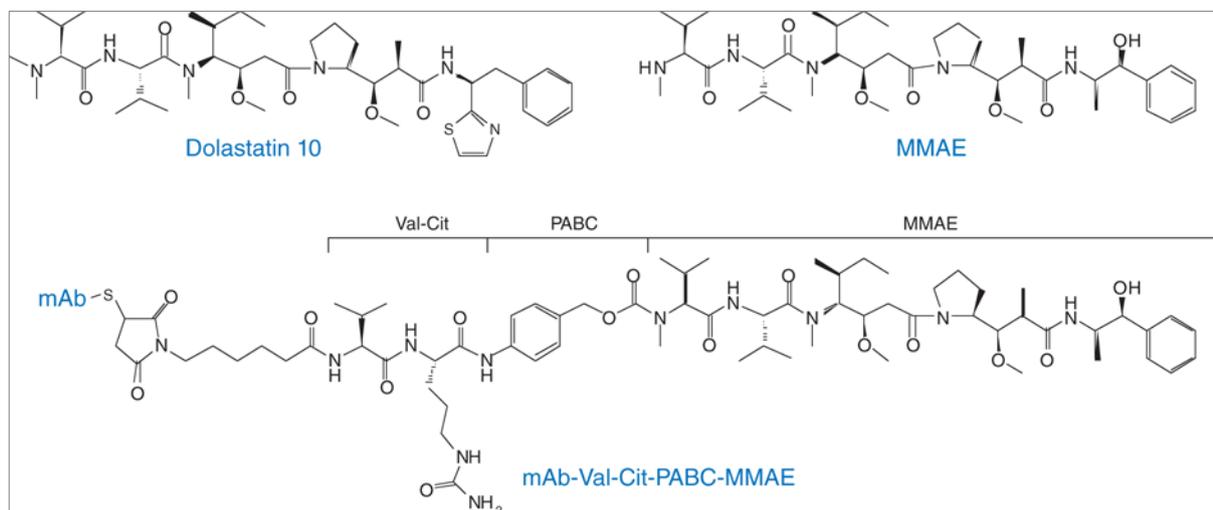


Figure 40. Représentation de la dolastatine 10, de la MMAE et d'un ADC-MMAE.

Ces molécules inhibent l'hydrolyse du GTP tubuline dépendante permettant la dépolymérisation de la tubuline, et bloque l'échange GDP – GTP du monomère β de la tubuline, ce qui inhibe également la polymérisation des microtubules. Ainsi, la MMAE et la MMAF induise un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, provoquant la mort de la cellule tumorale. La MMAE et la MMAF ont une IC_{50} de l'ordre du picomolaire et du nanomolaire respectivement, et l'ajout d'un groupement O-méthyl à la MMAF augmente fortement sa capacité d'inhibition de la polymérisation/dépolymérisation des microtubules (69).

Le brentuximab vedotin (Adcetris®) est un AcM de type chimérique liée à la MMAE via un *linker* de type valine-citruline (vcMMAE). Le brentuximab vedotin a obtenu son AMM en 2011 (FDA) et 2012 (ANSM) dans le traitement de deux types de lymphomes :

- Lymphome hodgkinien (LH) CD30 positif récidivant ou réfractaire chez l'adulte, après greffe autologue de cellules souches (ASCT) ou après au moins deux traitements antérieurs quand l'ASCT ou une polychimiothérapie n'est pas une option de traitement.
- Lymphome anaplasique à grandes cellules systémique (LAGCs) récidivant ou réfractaire chez l'adulte (70).

Une majorité des auristatines en essais cliniques sont des MMAE, les ADC comprenant la MMAF sont beaucoup moins testés du fait de la plus faible fenêtre thérapeutique de ce produit.

5.2.2. Les maytansinoïdes

Les maytansinoïdes sont des benzoansamacrolides dont le mécanisme d'action impacte également la mitose cellulaire par inhibition de la tubuline (71). Le composé d'origine, la

maytansine, a été déclinée en différents dérivés dont le DM1 et le DM4 qui sont utilisés en thérapeutique ou en cours de développement clinique.

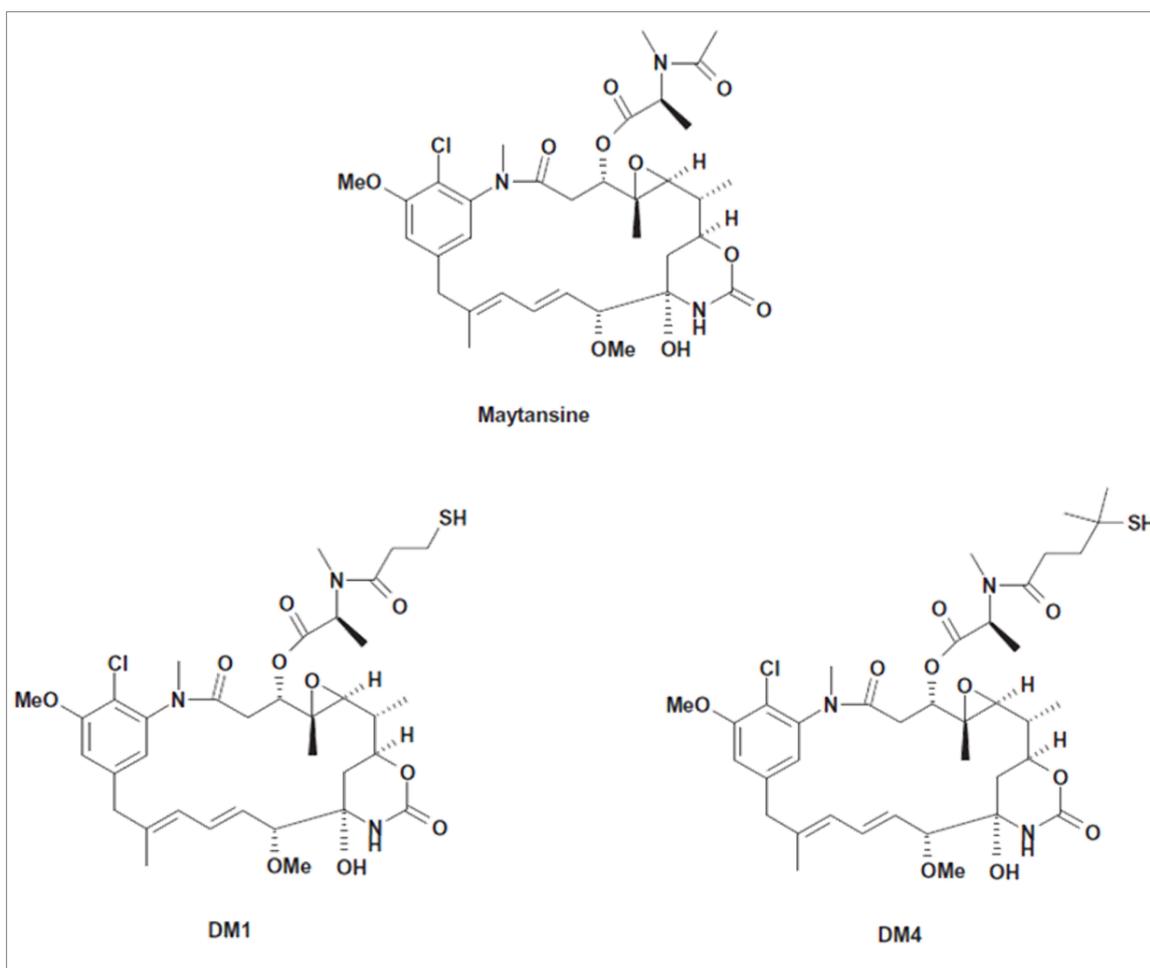


Figure 41. Structure chimique des composés DM1 et DM4, dérivés de la maytansine

Le mécanisme d'action de ces molécules est également lié à l'inhibition de l'instabilité dynamique des microtubules. Premièrement, DM1 et DM4 se lient à la tubuline soluble, l'empêchant ainsi de se polymériser. De plus, ces composés se fixent aux extrémités des microtubules via des sites de fixation de haute affinité, inhibant la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules. Ce type de composé a montré un potentiel antimittotique au moins 20 fois supérieur à celui de la vinblastine (72).

Le traitement le plus utilisé à l'heure actuel avec un ADC – maytansinoïde est le trastuzumab – emtansine (Kadcyla®), autrement cité trastuzumab – DM1.

5.2.2.1. Cas du trastuzumab – DM1

Le trastuzumab (Herceptin®) est un AcM humanisé indiqué en 1^{ère} ligne dans le traitement du cancer du sein HER2 positif métastatique ou avancé non résecable, en combinaison avec un taxane (le docetaxel est le plus utilisé dans cette indication). Récemment, le même laboratoire a développé un ADC à partir du trastuzumab, le Kadcyla®, approuvé en 2013 en tant que 2^{ème} ligne de traitement dans la même indication, mais ne nécessitant pas l'adjonction d'une chimiothérapie supplémentaire, du fait de la présence du composé DM1 lié au trastuzumab. L'intérêt de ce traitement est de combiner l'action du trastuzumab via ses fonctions effectrices, et l'action d'une chimiothérapie classique, avec une spécificité beaucoup plus importante puisque DM1 étant conjugué au trastuzumab via un *linker* non-clivable de type thioether, son action sera beaucoup plus concentrée au niveau de la tumeur par rapport au docetaxel qui aura un effet plus systémique sur les tissus à forte multiplication cellulaire. L'intérêt du Kadcyla® pourrait donc être double : premièrement d'augmenter l'efficacité du traitement et deuxièmement d'améliorer la tolérance au traitement. Enfin, il est important de noter que la MMAE est un cytotoxique plus puissant que le docetaxel, entraînant donc plus d'effets indésirables en cas de prise systémique à dose équivalente voir plus faible.

Une étude clinique de phase II a été conduite sur des patients ayant un cancer du sein HER2 positif métastatique ou non résecable (73). C'est une étude randomisée, multicentrique et ouverte. Les critères primaires d'évaluation étaient la survie sans progression et la tolérance. Les critères secondaires de l'étude étaient le taux de survie globale, le taux de réponse objective, la durée de la réponse objective et le taux de bénéfice clinique. L'étude a inclus 137 patients : 67 dans le groupe trastuzumab + docetaxel (HT) et 70 dans le groupe trastuzumab – DM1 (T-DM1).

Concernant la survie sans progression, le groupe T-DM1 avait une médiane de 14,2 mois contre 9,2 mois pour le groupe HT, avec un risque relatif de 0,59 (95% IC, entre 0,36 et 0,97 ; P=0,035). Le résultat est significatif. Par ailleurs, la durée de réponse objective pour le groupe HT était de 9,5 mois, alors que la durée de réponse objective n'a pas été atteinte dans le groupe T-DM1. Ces deux estimations ont été réalisées par estimateur de Kaplan Meier (Figures 42 et 43) (73).

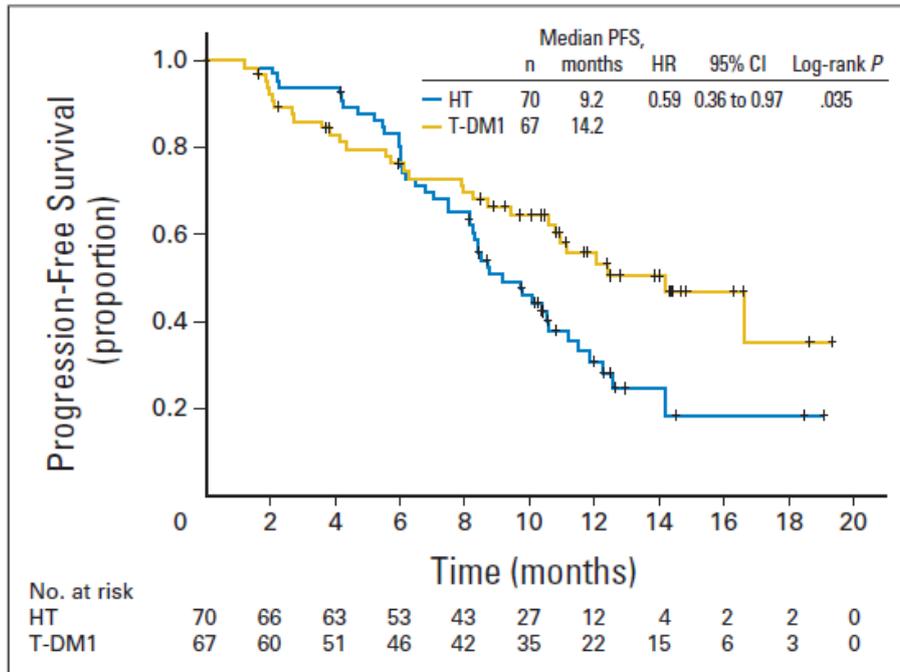


Figure 42. Estimation de la survie sans progression (PFS) par estimateur de Kaplan-Meier (73).

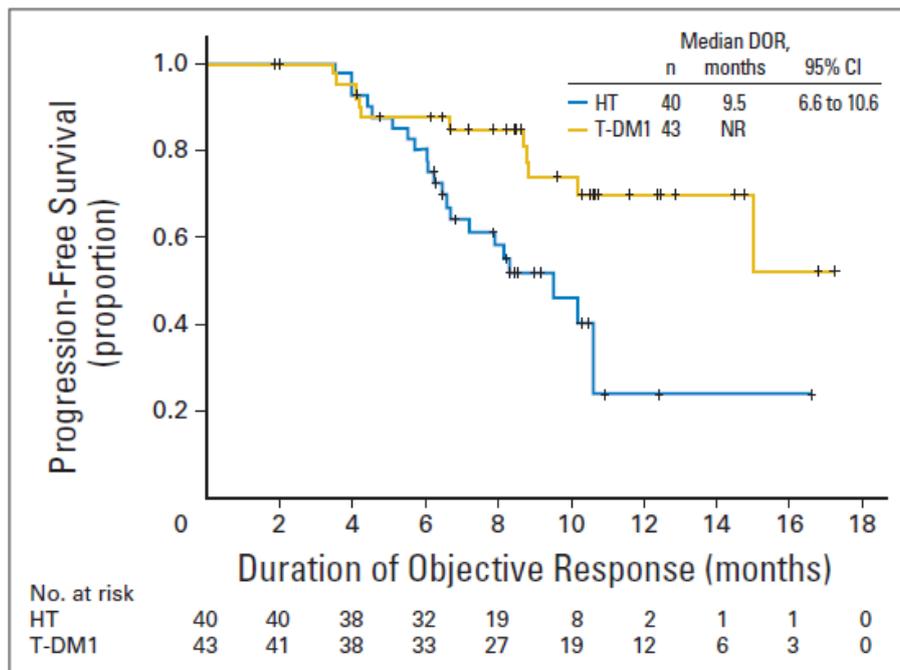


Figure 43. Estimation de la durée de réponse objective (DOR) par estimateur de Kaplan-Meier (73).

Concernant la tolérance du traitement entre les deux groupes, le traitement par T-DM1 présente un meilleur profil que le groupe traité par HT. En effet, en comparant HT versus T-DM1, le taux d'effets indésirables supérieurs au grade 3 était de 90,9% versus 46,4% respectivement. De la même manière, les effets indésirables de grade 4 ont été rapportés à 57,6% pour le groupe HT contre 5,8% pour le groupe T-DM1. Il en est de même pour les autres mesures de tolérance globale au traitement (Figure 43) (73).

Table 2. Adverse Events of Any Grade Occurring in $\geq 25\%$ and/or Grade ≥ 3 Occurring in $\geq 5\%$ of Patients in Either Treatment Group								
Adverse Event	All Grade				Grade $\geq 3^*$			
	HT (n = 66)†		T-DM1 (n = 69)†‡		HT (n = 66)†		T-DM1 (n = 69)†‡	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Hematologic								
Neutropenia§	43	65.2	11	15.9	41	62.1	4	5.8
Thrombocytopenia§	4	6.1	19	27.5	2¶	3.0	5¶	7.2
Leukopenia§	17	25.8	7	10.1	16	24.2	0	
Febrile neutropenia	9	13.6	0		9	13.6	0	
Anemia	18	27.3	9	13.0	3	4.5	2	2.9
Nonhematologic								
Alopecia	44	66.7	3	4.3	—		—	
Fatigue	30	45.5	34	49.3	3	4.5	3	4.3
Nausea	29	43.9	34	49.3	0		2	2.9
Diarrhea	30	45.5	11	15.9	2	3.0	0	
Peripheral edema	29	43.9	7	10.1	4	6.1	0	
Increased AST	4	6.1	30	43.5	0		6	8.7
Pyrexia	15	22.7	28	40.6	1	1.5	0	
Headache	12	18.2	28	40.6	0		0	
Back pain	21	31.8	19	27.5	3	4.5	1	1.4
Epistaxis	6	9.1	19	27.5	0		0	
Dyspnea	18	27.3	10	14.5	2	3.0	0	
Arthralgia	20	30.3	16	23.2	1	1.5	0	
Cough	14	21.2	18	26.1	0		0	
Vomiting	17	25.8	17	24.6	0		2	2.9
Increased ALT	4	6.1	18	26.1	0		7	10.1
Pneumonia	1	1.5	6	8.7	0		4	5.8

Figure 44. Fréquence d'apparition des effets indésirables dans les groupes HT et T-DM1 (73).

D'un point de vue pharmacologique, ces résultats montrent que l'utilisation d'une chimiothérapie via un ADC est plus efficace, agit de manière plus ciblée et avec un meilleur profil de tolérance par rapport à un traitement avec le même AcM combiné à une chimiothérapie systémique. C'est un cas typique qui montre bien les avantages pouvant être apportés par la technologie des ADCs.

D'un point de vue industriel, ce type de combinaison pour un laboratoire permet également de prolonger la durée de la protection intellectuelle de leur AcM dont les coûts de production importants peuvent être amortis sur une plus longue période de temps. Cela étant valable lorsque le même laboratoire développe l'AcM et l'ADC ; tel est le cas pour le trastuzumab.

Outre l'utilisation des antimétabolites, d'autres cytotoxiques puissants peuvent être utilisés pour cibler notamment l'ADN, telle que les calichéamicines.

5.2.3. Les calichéamicines

La calichéamicine est un des plus puissants cytotoxiques existant. Cette molécule est un agent alkylant, dont les deux principales régions structurales ont un effet distinct et complémentaire au niveau moléculaire de la cellule cible. La structure de la calichéamicine est composée d'une partie aryltétrasaccharidique et d'une partie énediène (cycle à 9 ou 10 chaînons comportants deux triples liaisons séparées par une double liaison) (74). La classe des énediènes est reconnue pour ces propriétés antibiotiques et anticancéreuses puissante mais avec des effets indésirables sévères.

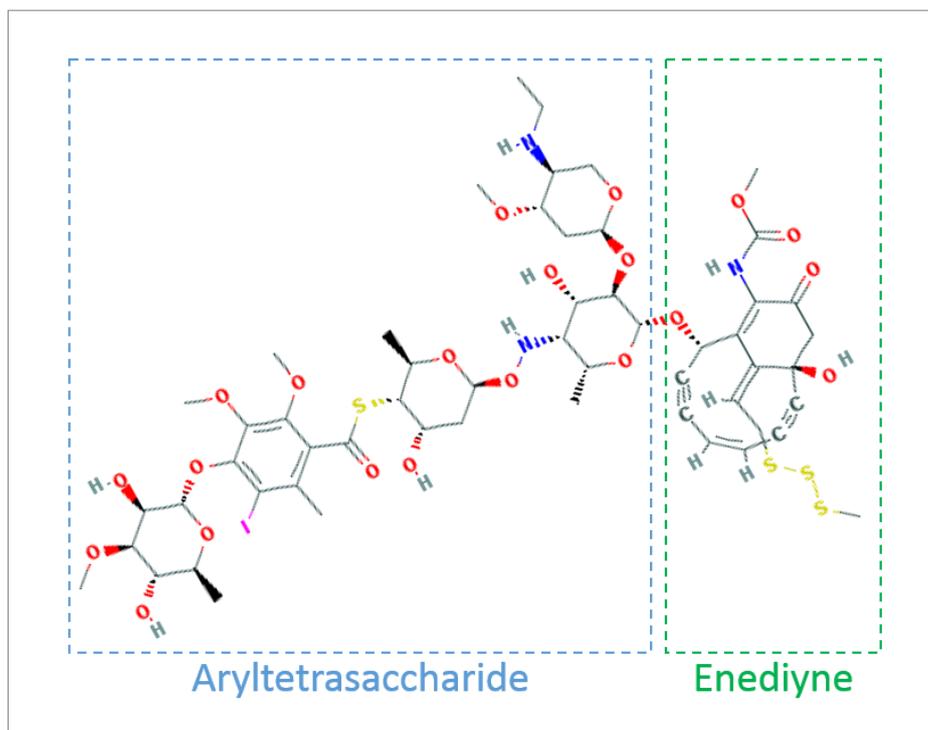


Figure 45. Structure en 2 parties de la calichéamicine.

La partie aryltétrasaccharide permet à la molécule d'atteindre le noyau de la cellule, puis de se positionner au niveau des petits sillons de l'ADN. Une fois positionnée, la calichéamicine se transforme en un composé radicalaire suite à une attaque nucléophile entraînant une cyclisation de Bergman. Ce composé radicalaire réagit avec l'ADN, ce dernier devenant un ADN diradicalaire fortement réactif en présence de dioxygène. C'est enfin cette réaction avec le dioxygène qui entraîne la cassure de l'ADN (75).

Il existe plusieurs types de calichéamicines en fonction de la glycosylation de la calichéamicinone, telles que la calichéamicine $\alpha 3$ possédant une fonction aryltrisaccharide, et la calichéamicine $\gamma 1$, possédant le motif aryltétrasaccharide. C'est ce dernier type qui est utilisé en thérapeutique via les ADC. Un des premiers ADC utilisé en thérapeutique, le Mylotarg® utilisait la calicheamicine comme molécules, fixée à une AcM humanisé via un *linker* de type hydrazone : le gemtuzumab – ozogamicine. L'ozogamicine étant la DCI de la calichéamicine- $\gamma 1$. Ce traitement approuvé en 2000 a ensuite été retiré du marché en 2011. Un autre traitement en cours d'essais clinique, développé par le même laboratoire que le Mylotarg® utilise la calichéamicine comme molécule cytotoxique : l'inotuzumab – ozagamicine. Cet ADC est un anti-CD22 en essais dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique à précurseur B, et a obtenu le statut de médicament orphelin par l'EMA.

Les ADC utilisant la calichéamicine restent peu nombreux par rapport aux essais cliniques menés actuellement avec les auristatines et les maytansinoïdes.

5.3. Immuno Toxines

Les ITs sont des protéines issues d'organismes animaux ou végétaux ayant une activité cytotoxique. Ces protéines sont soit conjuguées à un AcM ou sont fusionnées à la structure par génie génétique. Bien qu'en recherche depuis de nombreuses années, ce type d'ABC n'a pas encore permis la mise sur le marché d'un médicament, notamment du fait de la forte toxicité et du manque de spécificité de ces molécules (76). Les premières générations, généralement conjuguées à un AcM par un *linker* de type disulfure ou thioether ont montré une toxicité trop importante, notamment au niveau vasculaire et hépatique, mais aussi une forte immunogénicité. Puis de nouvelles générations de toxines sont apparues, notamment avec la suppression de leur domaine de fixation cellulaire non-spécifique, dont le rôle a été remplacé par l'AcM conjugué qui cible l'antigène. Ces nouvelles générations semblent avoir une toxicité diminuée, avec plus d'une quarantaine d'ITs en cours de recherche, en conjugaison avec des AcM ou d'autres types de protéines tels que les ScFv (77).

Ces toxines peuvent avoir différents mécanismes d'action, telle la binase qui est une ARNase d'origine bactérienne ou encore l'araline, une ARN-N-glucosidase d'origine végétale.

Un des traitements les plus avancés en recherche clinique est le moxetumomab – pasudotox, un AcM murin anti-CD22 couplé à la toxine pasudotox (fragment d'endotoxine A de pseudomonas) et actuellement en phases d'essais cliniques de phase II et de Phase III dans différents types de leucémie chez l'adulte et chez l'enfant (78).

5.4. Immuno Cytokines

Les cytokines sont des protéines sécrétées par les cellules du système immunitaire afin de moduler la différenciation, la prolifération et l'action des cellules immunitaires, ou encore d'agir sur des cibles cellulaires. De ce fait, certaines cytokines ont été identifiées comme ayant un potentiel anti-tumoral, tel que l'interleukine 2 (IL-2), l'interféron $\alpha 2a$ (IFN- $\alpha 2A$) ou encore le *tumor necrosis factor* (TNF) recombinant. Le potentiel de ces molécules est très élevé, et les cytokines peuvent agir de manière systémique après injection (79). De fait, il est difficile de les utiliser seule en injection pour le traitement des cancers. De nombreuses recherches ont été et sont encore effectuées pour utiliser ces cytokines conjuguées à un AcM afin de concentrer leur

action sur la cible et limiter les effets systémiques. Un des exemples les plus parlant est l'utilisation de l'IL-12 avec un ABC ayant prouvé un effet thérapeutique similaire à l'injection d'IL-12 seule, mais avec une dose 20 fois inférieure (79).

Malgré les propriétés intéressantes des cytokines et les recherches en cours, peu de candidats médicaments ont atteint le stade des essais cliniques. De plus, les recherches se sont focalisées sur l'utilisation de dérivés des AcM classiques tels que les ScFv. De ce fait très peu d'essais cliniques utilisant des AcM – IC sont en cours. Par exemple le hu14.18-IL-12, un AcM de type IgG conjugué à l'IL12 est en cours d'essais clinique de phase 2 dans le traitement du neuroblastome. Une autre étude de phase II avec ce même candidat médicament ont été récemment terminée dans le traitement du mélanome (80).

6. Discussion

Les ABC correspondent à un classe thérapeutique qui s'est développée de manière importante ces dernières années, et notamment les ADC qui représentent plus de 80% des essais cliniques de cette classe. Le nombre d'ADC en développement est passé d'une quinzaine en 2011 à près d'une trentaine en 2013.

Malgré des mécanismes d'action intéressants, les IT et les IC ont pour l'instant beaucoup de difficultés à progresser dans leur développement, avec un taux d'échec en phase pré-clinique et clinique important.

Les ADC sont notamment très prometteurs dans le traitement de pathologies oncologiques. Les traitements sur le marché sont déjà en forte progression, tel que le Kadcylla® qui pourrait passer de 500M€ en 2014 à près d'1Md € fin 2015. Ces traitements sont notamment appréciés du fait de leur meilleure tolérance et du fait de leur potentiel thérapeutique plus élevé par rapport à l'utilisation d'AcM seuls.

Des améliorations peuvent encore être développées, principalement en augmentant la spécificité d'action de l'AcM et de la molécule conjuguée, au niveau de la tumeur. Ceci concerne donc la recherche sur les *linkers*, mais aussi sur la spécificité des AcM utilisés. De plus, de nouvelles stratégies peuvent être étudiées, tels que la combinaison de différentes molécules cytotoxiques sur un AcM afin de multiplier les mécanismes d'action et diminuer le risques d'apparition de mécanismes de résistance par les cellules tumorales.

Conclusion

Les modifications post traductionnelles des AcM sont de plus en plus importantes afin de développer des traitements plus adaptés, spécifiques, efficaces et avec le moins d'effets indésirables possibles. Dans cet esprit, les travaux sur la glycosylation peuvent encore apporter de nouvelles innovations dans le but de moduler les fonctions effectrices mises en jeu en fonction de la pathologie ciblée. De plus les ABC sont en plein développement et représenteront une partie importante des nouvelles générations d'AcM. Bien évidemment, ces sujets, traités séparément dans cette thèse peuvent être abordés simultanément lors du développement d'un ADC, avec pour objectif principal de combiner l'optimisation des fonctions effectrice de l'AcM par le biais de la glycosylation (ou l'aglycosylation) et le mécanisme d'action de la molécule qui lui est conjuguée tout en limitant au maximum l'apparition des effets indésirables. Les modifications post-traductionnelles des AcM sont donc complémentaires dans l'éventail des possibles développements en clinique.

De plus, les AcM peuvent aussi voir leurs fonctions et leur spécificité vis-à-vis d'un antigène optimisées par l'utilisation de modification pré-traductionnelles. Ainsi, l'utilisation de dérivés des AcM est de plus en plus courante, avec le développement important des AcM bispécifiques, permettant de cibler spécifiquement 2 antigènes distincts à la surface de la cellule cible. Ceci permet de diminuer le risque de non activation des fonctions effectrices de l'AcM dû à l'éloignement des antigènes cibles. D'autres technologies ont également permis le développement de parties réduites de l'anticorps, tels que les ScFv, les diabodies.

Enfin, l'utilisation combinée des modifications pré et post-traductionnelles ont permis la modulation plus fine des fonctions effectrices des AcM. Par exemple, l'utilisation de la mutagenèse dirigée permet d'introduire des variations précises dans la séquence des acides aminés de l'AcM afin de modifier

- les conditions de glycosylation pour moduler la flexibilité de l'AcM ou encore la fixation des cellules immunitaire (ADCC) et la fixation du complexe C1q (CDC).
- le nombre de molécules cytotoxiques pouvant être conjuguées à un AcM pour obtenir la charge optimale procurant la meilleure balance efficacité/tolérance.

Les AcM de nouvelle génération vont donc avoir une place de plus en plus importante sur le marché des thérapies ciblées. Ils pourront également être combinés à un compagnon diagnostic dans le cas où l'antigène cible provient d'une mutation particulière ou si l'action de la molécule fixée est dépendante de cette mutation. Cette stratégie s'inscrit dans le cadre du développement d'une médecine personnalisée en délivrant le bon médicament, au bon patient, au bon moment.

Bibliographie

1. Carnoy, C, *Cours d'immunologie deuxième année, 2011.*
2. Dennis K. Flaherty, Ph.D, *Immunology For Pharmacy, Elsevier Mosby, 2012.*
3. Site du Midlands Tech Colledge : *Classes.midlandstech.edu, La liaison épitope - paratope.*
4. Kaplon, H, Carnoy, C, *Acthera : Guide des anticorps monoclonaux et protéines de fusion à usage thérapeutique, 2015.*
5. Actor, J., *review immunology and microbiology 2nd, chapter-3, antibody structure and function Représentation schématiques des différents isotypes d'immunoglobulines.*
6. Lefranc, M.-P. and Lefranc, G., *The Immunoglobulin FactsBook, Academic Press, London, UK, 2001, ISBN:012441351X.*
7. Gestur Vidarsson, Gillian Dekkers and Theo Rispens, *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, Front Immunol, 2014, 5:520.*
8. Site internet Immunogenetics Information System (IMGT), *Représentation schématiques des 4 sous-classes d'IgG. Liens ci-après : <http://www.imgt.org/IMGTeducation/#Tutorials>.*
9. Site interne du Midlands Tech Colledge: *Classes.midlandstech.edu, La réponse immunitaire adaptative à médiation humorale.*
10. Desgranges, C. *Anticorps monoclonaux et thérapeutique, Pathol Biol, 2004, 52:351-364.*
11. W. Michnick, S., S. Sidhu, S., *Submitting antibodies to binding arbitration, Nature Chemical Biology, 2008, 4:326-329.*
12. Ribatti, D. *From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application : An historical reappraisal, Immunol Lett. 2014 Sep;161(1):96-9.*
13. K.H Liu, J. *The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations, Annals of Medicine and Surgery, 2014, 3:113-116.*
14. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. et Baty, D., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, British Journal of Pharmacology, 2009, 157:220–233.*

15. William R. Strohl, Lila M. Strohl, *Therapeutic antibody engineering*, Woodhead publishing series in Biomedicine number 11.
16. Site internet de l'adalimumab (Humira(r)), liens ci-après : <https://www.humira.com/>.
17. Lutterotti A., Roland Martin R., *Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis*, *The Lancet Neurology*, Volume 7, 2008, 6:538–547.
18. J.M. Redman J.M., Hill E.M., AlDeghather D., Weiner L.M., *Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer*, *Molecular Immunology*, 2015, MIMM-4650.
19. Guillot-Chene, P. , Lebecque, S. , Rigal, D. , *Vers une maîtrise industrielle du clonage des lymphocyte B pour la fabrication des anticorps monoclonaux issus du répertoire humain*, *Annales pharmaceutiques française*, 2009, 67:182-186.
20. Slonczewski, J. L. , Foster J. W. , *Microbiology - An Evolving Science, Second Edition*, W.W. Northon & Company Inc.
21. Smith J. , Kontermann R., Embleton J. , *Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis*, *FASEB journal, Review*, 2005, Vol 19.
22. Doerner A., Rhiel L., Zielonka S., *Therapeutic antibody engineering by high efficiency cell screening*, *FEBS Letters*, 2014, 588:278–287.
23. Marasco W. A., Sui J., *The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics*, *Nature Biotechnology*, 2007, 25:1421-1434.
24. Li F., Vijayasankaran N., Shen A. Y., Kiss R. and Amanullah A., *Cell culture processes for monoclonal antibody production*, *mAbs*, 2010, 2:5:466-477.
25. Site internet, *MI mAbs Antibodies for medicine, A high-throughput generation and chimerization antibodies platform* (vue le 05/07/2015).
26. Ritamo I., Cloutier M., Valmua L., Néron S., Rabinä J., *Comparison of the glycosylation of in vitro generated polyclonal human IgG and therapeutic immunoglobulins*, *Molecular Immunology*, 2014, 57:255– 262.
27. Butler M., Spearman M., *The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering*, *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30:107–112.

28. Hayes JM, Cosgrave EF, Struwe WB, Wormald M, Davey GP, Jefferis R, Rudd PM. *Glycosylation and Fc receptors. Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 382:165–199.
29. Decker, E., Parsons, J., Reski, R., *Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors, Frontiers in Plant Science - Plant Physiology, Volume 5, 2014, Article 346.*
30. Raju, S., *Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs, Current Opinion in Immunology*, 2008, 20:471–478.
31. Nettleship J., *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in the Characterization of Glycoproteins, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications: CRC Press, 2011, p. 523-50.*
32. Crispin M, Scanlan CN, Bowden TA. *Structure and Biosynthesis of Glycoprotein Carbohydrates, Comprehensive Biotechnology. 2 ed: Elsevier, 2011, p. 73-90.*
33. Woods Group. *GLYCAM Web. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA 2005-2012.*
34. Ritamo I., Cloutier M., Valmua L., Néron S., Rabinä J., *Comparison of the glycosylation of in vitro generated polyclonal human IgG and therapeutic immunoglobulins, Molecular Immunology*, 2014, 57:255–262.
35. New England BioLab, *Glycobiology, Schéma de séquences protéiques O-glycosylées et N-glycosylées, 21-07-2015, <https://www.neb.com/applications/glycobiology>.*
36. Nettleship J., *Structural Biology of Glycoproteins, Chapter 3, INTECH, 2012.*
37. Kornfeld R, Kornfeld S., *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, Annu Rev Biochem*, 1985, 54:631–664.
38. Gasdaska J., Sherwood S., Regana J., Dickey L., *An afucosylated anti-CD20 monoclonal antibody with greater antibody-dependent cellular cytotoxicity and B-cell depletion and lower complement-dependent cytotoxicity than rituximab, Molecular Immunology*, 2012, 50(3):134-41.
39. Kellner C., Derer S., Valerius T., Peipp M., *Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions, Methods*, 2014, 65:105–113.

40. Van Der Kolk L.E., Grillo-López A.J., Baars J.W., Hack C.E., Van Oers M.H. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment, *Br. J. Haematol*, 2001, 115:807–811.
41. Raju S., Scallon B., Fc glycans terminated with N-acetylglucosamine residues increase antibody resistance to papain, *Biotechnol Prog*, 2007, 23:964-971.
42. Scallon B.J., Tam S.H., McCarthy S.G., Cai A.N., Raju T.S., Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality, *Mol Immunol*, 2007, 44:1524-1534.
43. Kasermann F., Boerema D.J., Ruegsegger M., Hofmann A., Wymann S., Zuercher A.W., Miescher S., Analysis and functional consequences of increased Fab-sialylation of intravenous immunoglobulin (IVIg) after lectin fractionation, *PLOS ONE*, 2012, 7:e37243.
44. Baerenwaldt A., Biburger M., Nimmerjahn F., Mechanisms of action of intravenous immunoglobulins, *Expert Rev Clin Immunol*, 2010, 6:425-434.
45. Yu M., Brown D., Reed C., Chung S., Lutman J., Stefanich E., Wong A., Stephan J.P., Bayer R, Production, characterization, and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked mannose-5 glycans, *Mabs*, 2012, 4:475–487.
46. Jefferis R: Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics, *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8:226-234.
47. Labrijn F., Aalberse C., Schuurman J., When binding is enough: nonactivating antibody formats, *Curr Opin Immunol*, 2008, 20:479-485.
48. Jung T., Reddy T., Kang H., Borrok J., Sandlie I, Tucker W., Georgiou G., Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind FcγRI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2010, 107:604-609.
49. Borrok J., Jung S., Kang H., Monzingo F., Georgiou G., Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc. *ACS Chem Biol*, 2012, 7:1596-1602.
50. Lazar A., Dang W., Karki S., Vafa O., Peng S., Hyun L., Chan C., Chung S., Eivazi A., Yoder C., Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:4005-4010.

51. Lazar A., Chirino J., Dang W., Desjarlais R., Doberstein K., Hayes J., Karki B., Vafa O., *Optimized Fc variants and methods for their generation. US Patent 2009:20090092599.*
52. Jung T., Kelton W., Kang H., Andersen T., Sandlie I., Sarkar A., Georgiou G. *Effective phagocytosis of low Her2 tumor cell lines with engineered aglycosylated IgG displaying high FcγRIIIa affinity and selectivity. ACS Chem Biol, 2013, 8:368-375.*
53. Porcheray F., Fraser JW., Gao B., McColl A., DeVito J., Dargon I., Helou Y., et al., *Polyreactive antibodies developing amidst humoral rejection of human kidney grafts bind apoptotic cells and activate complement,. Am J Transplant, 2013, 13:2590–2600.*
54. Rudicell RS., Kwon YD., Ko SY., Pegu A., Louder MK., Georgiev IS., Wu X., Zhu J., Boyington JC., Chen X., Yang ZY., Doria-Rose NA., McKee K., O'Dell S., Schmidt SD., Chuang GY., Druz A et Soto C., Yang Y., et al. *Enhanced potency of a broadly neutralizing HIV-1 antibody in vitro improves protection against lentiviral infection in vivo, J Virol, 2014, 88:12669–12682.*
55. Senter P., *Potent antibody drug conjugates for cancer therapy, Curr. Opin. Chem. Biol, 2009, 13:235–244.*
56. Senter P., Sievers E., *The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma, 2013 systemic anaplastic large cell lymphoma, Nature Biotechnology, 2012, 30:631–637.*
57. Beck A., Haeuw JF., Wurch T., Goetsch L., Bailly C., Corvaia N., *The Next Generation of Antibody-drug Conjugates Comes of Age, Discov Med, 2010, 10(53):329-339.*
58. H.-P. Gerber, P.D. Senter, I.S. Grewal, *Antibody drug-conjugates targeting the tumor vasculature. Current and future developments, MAbs, 2009, 1:247–253.*
59. Casi G., Neri D., *Journal of Controlled Release, 2012, 161:422–428.*
60. Nimmerjahn, F., Ravetch, JV, *Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies, Cancer Immun, 2012, 12:13.*
61. Hamann PR, Dushin RG, *Antibody Drug Conjugates in Oncology, New Frontiers in Chemical Biology: Enabling Drug Discovery, The Royal Society of Chemistry, 2011, 224-257.*
62. Van Der Velden VHJ., Te Marvelde JG., Hoogeveen PG., *Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia in ViVo and*

- in Vitro* saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood*, 2001, 97:3197-3204.
63. Sato, G., Swanson JA., Lee KD., *Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, 55:199–215.
64. Jain N., Smith SW., Ghone S., Tomczuk B., *Current ADC Linker Chemistry*, *Pharm Res, Expert Review*, 2015, 1095-015-1657-7.
65. Panowski S., Bhakta S., Raab H., Polakis P., Junutula JR., *Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy*, *mAbs*, 2014, 6:1–12.
66. Litvak-Greenfeld ., Benhar I., *Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64:1782–1799.
67. Kraeber-Bodéré F., Bodet-Milin C., Rousseau C., Eugène T., Pallardy A., Frampas E., Carlier T., Ferrer L., Gaschet J., Davodeau F., Gestin JF., Faivre-Chauvet A., Barbet J., Chérel M.. *Radioimmunoconjugates for the treatment of cancer*, *Semin Oncol*, 2014, 41(5):613-22.
68. Teicher BA., Chari RVJ., *Antibody conjugate therapeutics : challenges and potential*, *Clin Cancer Res*, 2011, 17:6389–97.
69. Oflazoglu, E., Kissler, KM., Sievers, EL., Grewal, IS., Gerber, HP., *Combination of the anti-CD30-auristatin-E antibody-drug conjugate (SGN-35)with chemotherapy improves antitumour activity in Hodgkin lymphoma*, *Br J Haematol*, 2008 142:69–73.
70. ADCETRIS - *Résumé des Caractéristiques du Produit EMA*, septembre 2015.
71. Lopus M., Oroudjev E., Wilson L., Wilhelm ., Widdison W., Chari R., Jordan MA., *Maytansine and Cellular Metabolites of Antibody-Maytansinoid Conjugates Strongly Suppress Microtubule Dynamics by Binding to Microtubules*, *Mol Cancer Ther*, 2010, 9:2689–2699.
72. Lopus M., *Antibody-DM1 Conjugates as Cancer Therapeutics*, *Cancer Lett*, 2011, 307(2):113–118.
73. Hurvitz SA., Dirix L., Kocsis J., Bianchi GV., Lu J., Vinholes J., Guardino E., Song C., Tong B., Ng V., Chu Y., Perez EA.,. *Phase II Randomized Study of Trastuzumab Emtansine Versus Trastuzumab Plus Docetaxel in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Metastatic Breast Cancer*, *J Clin Oncol*, 2013, 31:1157-1163.

74. *Enediyne, Academie Nationale de Pharmacie, <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Enediyne> (vue le 25/08/2015).*
75. *Bouchard H., Viskov C., Garcia-Echeverria C., Antibody drug conjugates A new wave of cancer drugs, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24:5357–5363.*
76. *FitzGerald DJ., Wayne AS., Kreitman RJ., Pastan I., Treatment of hematologic malignancies with immunotoxins and antibody-drug conjugates, Cancer Res, 2011, 71(20):6300-9.*
77. *Madhumathi J., Devilakshmi S., Sridevi S., Verma RS., Immunotoxin therapy for hematologic malignancies: where are we heading?, Drug Discov Today, 2015, S1359-6446.*
78. *ClinicalTrials.gov : <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=pasudotox&Search=Search>, le 28/08/2015 .*
79. *Pasche N., Neri D., Immunocytokines a novel class of potent armed antibodies, Drug Discovery Today, 17:11-12.*
80. *ClinicalTrials.gov, search for hu14.18 IL12, results by 29/08/2015.*

Nom : LEGROS

Prénom : Valentin

Titre de la thèse : Les modifications post traductionnelles des nouvelles générations d'anticorps monoclonaux : glycosylation et conjugaison à des molécules thérapeutiques

Mots-clés : Anticorps Monoclonaux, Glycosylation, Antibody Drug Conjugate, Thérapie Ciblée

Résumé :

Les anticorps monoclonaux ont représenté une avancée majeure dans le développement des thérapies ciblées, en permettant un traitement dirigé contre des cellules ou des protéines spécifiques, notamment dans le traitement des cancers et des maladies auto-immunes. Produits d'abord en faibles quantités et avec une structure d'anticorps de souris, les anticorps monoclonaux sont maintenant produits en quantité industrielles, et les nouvelles techniques ont permis de développer des anticorps monoclonaux ayant les structures des anticorps humains, afin d'augmenter la demi-vie, l'efficacité des traitements et de diminuer le risque d'immunogénicité. Puis de nouvelles techniques sont apparues pour développer le potentiels des anticorps monoclonaux, telles que les modifications post-traductionnelles.

La Glycosylation constitue le champ de développement le plus important des modifications post-traductionnelles des anticorps monoclonaux. Plus particulièrement, les recherches se sont concentrées sur la fucosylation, la sialylation, la glycosylation à haut taux de mannose et l'aglycosylation, qui permettent de moduler les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des anticorps monoclonaux.

La conjugaison de l'anticorps à des molécules thérapeutiques (ou antibody drug conjugate) est une technologie de modification post-traductionnelle de plus en plus utilisée afin d'améliorer l'efficacité des traitements, notamment contre le cancer. Cette technologie se base sur le choix du bon anticorps monoclonal, conjugué à une molécule à très forte activité cytotoxique grâce à un linker, dont le développement constitue une des clés du succès des antibody drug conjugates.

Membres du jury :

Président : Professeur Jean-Louis CAZIN

Assesseur : Monsieur Christophe CARNOY

Membre extérieur : Monsieur Christophe DE ROMEUF