UNIVERSITE DE NANTES FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2007

N°24

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES

Soutenu devant le Jury Interrégional le 20 juin 2007 par Mme Stéphanie LEPRIEUR TRUET

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 6 mai 1987 tient lieu de :

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PRODUCTION ET EVALUATION CHEZ L'ANIMAL D'ANTICORPS THERAPEUTIQUES ANTI-GANGLIOSIDE GD2

Président : M. Jacques AUBRY, Professeur d'Immunologie - Nantes

Membres du Jury : M. Stéphane BIRKLE, Maître de Conférence d'Immunologie - Nantes M. Philippe BILLIALD, Professeur de Biochimie - Tours M. Patrick THOMARE, Praticien Hospitalier Pharmacien - Nantes Mme Marie MARAIS, Praticien attaché Pharmacien - Nantes

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	2
Liste des figures et tableaux	5
Liste des abréviations	7
INTRODUCTION	9
PREMIERE PARTIE :	12
Revue bibliographique sur les gangliosides et les anticorps thérapeutiques	i
chez l'Homme	12
1.1 LES GANGLIOSIDES	13
1 1 1 Structure des gangliosides	13
1.1.2 Métabolisme des gangliosides	14
1 1 2 1 Biosynthèse des gangliosides	14
1 1 2 2 Biosynthèse du céramide	15
1 1 2 3 Biosynthèse de la chaîne oligosaccharidique	16
1 1 2 4 Catabolisme des candiosides	10
1 1 2 5 Cas des gangliosides O-acétylés	17
1 1 3 Distribution tissulaire des gangliosides	19
1131 Gandiosides	10
1.1.3.1 Cangliosides	20
1 1 4 Fonctions des gangliosides	20
1.1.4 1 Decompaissance cellulaire	20
1.1.4.1 Neconitalssance cellulare	∠ı 22
1.1.4.2 Modulation du Signal transmernoranalie	22
1.1.5 Extraction et purification des gangliosides	22 22
1.1.6 1 Cos du disiplogangliosido GD2 et de sa forma O acétulóa	ZJ
	24
1.2 LES ANTICORFS THERAFEUTIQUES CHEZ L'HOMME	20 25
1.2.1 Structure à une minimunogrobuline G	20
1.2.2 Les anticorps monocionaux de souris	21
1.2.3 Les anticorps monocionaux chimeriques	20
1.2.4 Les anticorps monocionaux numanises	29
1.2.5 Les anticorps monocionaux numains	29
1.2.6 Autres anticorps therapeutiques pour l'homme	33
1.3 IMMUNUTHERAPIE DES TUMEURS NEUROECTODERMIQUES A L'AIDE	25
D'ANTICURPS MONOCLONAUX ANTI-GANGLIOSIDES	35
1.3.1 Differents anticorps monocionaux anti-gangilosides en cours de	25
recherche	30
1.3.2 Interets de notre anticorps chimerique anti-GD2 O-acetyle, le KM8B6.	
	38
Production et évaluation chez l'animal d'anticorps thérapeutiques anti-	
ganglioside GD2	38
1.4 MATERIEL ET METHODES	39
1.4.1 Matériel	39
1 4 1 1 Produits chimiques et biochimiques	30
1412 Enzymes	55 40
1.4.1.3 Souche bactérienne	

1.4.1.4	1.4.1.4 Anticorps secondaires				
1.4.1.5 Cultures cellulaires					
1.4.1.6	Appareils	41			
1.4.2 Etu	de de la distribution tissulaire du GD2 et du GD2 O-acétylé dans de	S			
tissus huma	ains	41			
1.4.2.1	Préparation des coupes de tissus congelés	41			
1.4.2.2	Analyse immunohistochimique	42			
1.4.3 Ess	sais d'immunotherapie avec les AcM anti-GD2 sur un modele anima	1.42			
1.4.4 Etu	lde de l'effet proapoptotique des ACM 60C3 et KM60C3	43			
1.4.3 COI	KM8B6	13			
1 4 5 1	Amplification génique du segment L-VL de l'AcM KM8B6 (8B6-L-VL) av	4 0			
addition de	e sites de restriction	43			
1452	Digestion du fragment 8B6-L-VL et du vecteur pcDNA3 [®] KM60C3-L				
purifiés pa	ar les enzymes de restriction BamH I et Xho I				
1.4.5.3	Réaction de ligature du fragment 8B6-L-VL dans le vecteur d'expressio	n			
pcDNA3 [®] ł	Ηυ-Ϲκ	45			
1.4.5.4	Transformation de bactéries électro-compétentes par pcDNA3 [®] KM8B6 45	i-L			
1.4.5.5	Criblage par PCR des clones bactériens transformés	46			
1.4.5.6	Production du plasmide d'intérêt pcDNA3 [®] KM8B6-L et séquençage	46			
1.4.6 Coi	nstruction du vecteur d'expression de la chaîne lourde de l'AcM				
chimérique	KM8B6	47			
1.4.6.1 addition de	Amplification génique du segment L-VH de KM8B6 (8B6-L-VH) avec e sites de restriction	47			
1.4.6.2	Digestion du fragment 8B6-L-VH et du vecteur de clonage pBluescript®	П			
SK (+) KM	160C3-H purifiés par les enzymes de restriction BamH I et Nhe I	47			
1.4.6.3	Obtention du vecteur de clonage pBluescript [®] II SK (+) KM8B6-H	48			
1.4.6.4	Digestion du vecteur de clonage pBluescript [®] II SK (+) KM8B6-H et du				
vecteur d'é I	expression pcDNA3.1/Hygro [©] par les enzymes de restriction <i>BamH</i> I et λ 48	(ba			
1.4.6.5	Obtention du vecteur d'expression pcDNA3.1/Hygro [©] KM8B6-H	48			
1.4.7 Tra	insfection de cellules CHO par les vecteurs d'expression codant por	ur			
les chaînes	légères et lourdes de l'AcM KM8B6	49			
1.4.8 Cril	blage des cellules CHO transfectees selectionnees	49			
1.4.9 Pur	Inication des differents Acia produits	51			
1.4.9.1 protóino A	Funication des Acia anti-gangiosides par chromatographie d'annine st	11			
1 4 9 2	Contrôle de qualité des AcM nurifiés	51			
1 4 10 Fxt	raction des gangliosides de tissus tumoraux				
1.4.11 Etu	ide de la spécificité des AcM purifiés				
1.4.11.1	Sur des cellules dessiguées	52			
1.4.11.2	Sur cellules vivantes	53			
1.4.11.3	Par immunofixation sur extrait total de gangliosides tumoraux	53			
1.4.12 Etu	Ide in vitro de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des				
anticorps (A	ADCC)	54			
1.5 RESUL	TATS	55			
1.5.1 Etu	de de la distribution tissulaire du GD2 O-acétylé dans le système				
nerveux et s	sur des tissus tumoraux humains	55			
1.5.1.1	Dans des tissus tumoraux	55			
1.5.1.2	Au niveau des nerts periphériques	55			
1.5.2 Act	tivite anti-tumorale de l'ACM KM60C3 dans un modèle syngènique d	e			
iympnome i	murin	57			

1.5.2.1 KM60C3	Analyse du délai d'apparition de tumeurs après injection des AcM 60	C3 et
1.5.2.2	Analyse de la survie après injection des anticorps 60C3 et KM60C3	58
1.5.3 E	tude de l'effet proapoptotique des AcM 60C3 et KM60C3	58
1.5.4 A	ssemblage des gènes chimériques codant pour l'AcM KM8B6 spé	cifique
du ganglio	oside GD2 O-acétylé	60
1.5.5 E	xpression de l'AcM chimérique KM8B6	66
1.5.6 P	urification des anticorps originels (8b6, 60C3) et des anticorps	
chimériqu	es (KM8B6, KM60C3)	67
1.5.7 E	tude de la spécificité des AcM purifiés 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8	B6 69
1.5.7.1	Sur cellules dessiguées	69
1.5.7.2	Sur cellules vivantes	69
1.5.7.3	Sur extrait total de gangliosides tumoraux	70
1.5.8 E	valuation in vitro de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépenda	nte
des antico	orps (ADCC)	71
DISCUSSION	ET CONCLUSION	73
BIBLIOGRAP	HIE	78

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Structure d'un ganglioside et position dans la membrane plasmique.	15			
<u>Figure 2</u> : Biosynthèse du céramide.				
Figure <u>3</u> : Schéma de la biosynthèse des gangliosides.	18			
Figure 4 : Circuit du catabolisme des gangliosides.	19			
Figure 5 : Exemple de structure de ganglioside : le ganglioside GD2 : II3(NeuAc)2-GgC	Ose3-			
Cer. Le GD2 O-acétylé est obtenu par O-acétylation sur le carbone C9.	20			
Figure 6 : Structure d'une immunoglobuline G.	28			
Figure 7 : Schéma représentant les zones hypervariables (CDR) et leurs charpentes (F	FR)			
constituant le site de liaison entre l'antigène et l'anticorps appelé paratope.	28			
Figure 8 : Schéma représentant la production d'hybridomes et d'anticorps monoclonau	х			
murins	30			
Figure 9 : Schéma représentant trois types d'anticorps : de souris, chimérique et				
humanisé	31			
Figure 10 : Représentation schématique d'un phage filamenteux et exemple d'expres	ssion à			
la surface d'un phage filamenteux dans la technique du phage display.	34			
Figure 11 : Schéma représentant un anticorps de lama, à deux chaînes lourdes et le V	НН			
appelé Nanobody [®] de la société ABLYNX [®] .	36			
Figure 12 : Représentation schématique de la technique d'obtention d'un anticorps				
chimérique dans notre laboratoire.	40			
Figure 13 : Schéma illustrant le principe du test immunologique ELISA indirect.	53			
Figure 14 : Etude de la distribution cellulaire du GD2 O-acétylé par analyse				
immunohistochimique de neuroblastome et de nerfs périphériques humains.	59			
Figure 15 : Délais moyens d'apparition des tumeurs pour les souris C57BL/6 greffées a	avec			
des cellules EL-4.	59			
Figure 16 : Courbes de Kaplan Meyer des quatre lots de souris C57BM/6 greffées ave	С			
5x10 ⁴ cellules tumorales EL-4.	60			
Figure 17 : Représentation de l'effet proapoptotique des AcM sur les cellules tumorales	s EL-4,			
en fonction du temps et de la concentration en anticorps.	61			
Figure 18 : Analyses électrophorétiques sur gel d'agarose à 1 %, des vecteurs codant	pour			
les chaînes légères et lourdes de l'AcM chimérique KM8B6.	66			
Figure 19 : Echange du segment génique L-VL de l'AcM 60C3 avec celui de l'AcM 8B6	6 dans			
le vecteur d'expression de la chaîne légère chimérique.	67			

clonage pBluescript [®] II SK(+).				
Figure 21 : Clonage de la chaîne lourde de l'AcM chimérique KM8B6 dans son ve	cteur			
d'expression pcDNA3.1/Hygro [©] .	68			
Figure 22 : Production en AcM KM8B6 de cinq clones transfectés stables.	69			
Figure 23 : Analyse électrophorétique SDS-PAGE des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 e	et KM8B6			
purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A.	71			
Figure 24 : Spécificité des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6 déterminée par El	LISA sur			
cellules dessiquées IMR32 et Neuro-2a.	72			
Figure 25 : Spécificité des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6 déterminée par				
immunofluorescence indirecte sur cellules vivantes IMR32 et Neuro-2a.	73			
Figure 26 : Spécificité des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6 déterminée par				
immunofixation sur extrait total de gangliosides tumoraux séparés par HPTLC.	74			
Figure 27 : Evaluation de la propriété d'ADCC des AcM produits sur les cellules IN	/IR32, en			
présence de cellules effectrices NK-CD16/ γ à un rapport effecteurs / cibles de 20 λ	/1; 74			

Tableau L. Les différents anticorps monoclonaux thérapeutiques actuellement sur le ma	arché
aux Etats-Unis.	33
Tableau II : Séquence nucléotidique et en acides aminés de la chaîne légère et de la cl	haîne
lourde de l'anticorps chimérique anti-GD2 O-acétylé KM8B6.	63
Tableau III : Nombre de clones double résistants qui sécrètent l'AcM chimérique	
KM8B6.	69
Tableau IV : Rendements de production en AcM des hybridomes (8B6 et 60C3) et des	
clones CHO18B (KM60C3) et 8H10 (KM8B6).	70

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABTS : 2,2' azino-di-(3-sulphonate d'éthylbenzthiazoline)
- ACE : antigène carcino-embryonnaire
- AcM : anticorps monoclonal
- ADCC : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps)
- ADNc : acide désoxy-ribonucléique complémentaire
- AMM : autorisation de mise sur le marché
- ATCC : American Type Culture Collection
- ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
- BIOT-GAH : biotin conjugated goat anti-mouse (anticorps polyclonaux de chèvre antiimmunoglobuline de souris conjugués à la biotine)
- BIOT-GAM : *biotin conjugated goat anti-human* (anticorps polyclonaux de chèvre antiimmunoglobuline humaine conjugués à la biotine)
- BSA : *bovin serum albumine* (albumine de sérum bovin)
- CDC : complement-dependent cytotoxicity (cytotoxicité dépendante du complément)
- CDR : *complementarity determining region* (région déterminant la complémentarité)
- CHO : chinese hamster ovary (ovaire de hamster chinois)
- CIP : *calf intestin phophatase* (phophatase d'intestin de veau)
- DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium* (milieu essentiel de Eagle modifié par Dulbecco)
- DNP : désoxyribonucléoprotéine
- DO : densité optique
- EGF : endothelium growth factor
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
- FACS : fluorescence-activated cell sorter (cytomètre à fluorescence)
- FDA : Food and Drug Administration
- FR: framework region (région chassis)
- GAH-FITC : goat anti-human fluorescein isothiocyanate conjugated (anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobuline humaine, conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine)
- GAM-FITC : goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate conjugated (anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobuline de souris, conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine)
- GD2 : disialoganglioside GD2

- HPTLC : *high performance thin layer chromatography* (chromatographie haute performance sur couche mince)
- HRP-GAM : *horse radish peroxydase goat anti mouse* (anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobuline de souris, conjugués à la peroxydase du raifort)
- IgG1 : immunoglobuline d'isotype γ1
- IgG3 : immunoglobuline d'isotype γ3
- KM8B6-H : chaîne lourde de l'anticorps monoclonal chimérique KM8B6
- KM8B6-L : chaîne légère de l'anticorps monoclonal chimérique KM8B6
- 8B6L-VH : région lourde variable de l'anticorps monoclonal murin 8B6 associé à son peptide signal
- 8B6L-VL : région légère variable de l'anticorps monoclonal murin 8B6 associé à son peptide signal
- OAc GD2 : O-acetylated GD2 (GD2 O-acétylé)
- PBS : phosphate buffered salin (tampon phosphate salin)
- PCR : *polymerase chain reaction* (réaction en chaîne par polymérase)
- RIT : radioimmunothérapie
- SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis (électrophorèse au dodécyl-sulfate de sodium en gel de polyacrylamide)
- SVF : sérum de veau foetal
- Tris : tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
- VH : région variable de la chaîne lourde d'un anticorps
- VL : région variable de la chaîne légère d'un anticorps

INTRODUCTION

L'immunothérapie par administration d'anticorps monoclonaux (AcM) s'est maintenant imposée comme une nouvelle modalité thérapeutique des cancers en complément de la chimiothérapie et de la radiothérapie. L'efficacité thérapeutique et la toxicité des anticorps dépendent de l'antigène ciblé, des caractéristiques intrinsèques de l'anticorps utilisé et des agents couplés à cette molécule (radionucléides, toxines). Depuis les années quatre-vingt, vingt anticorps, dont deux conjugués à des radionucléides et un à une molécule de chimiothérapie, ont obtenu, aux Etats-Unis, de la part de la *Food and Drug Administration* (FDA), une autorisation de mise sur le marché (Gura, 2002 ; Harris, 2004 ; Lin *et al.*, 2005 ; Stern et Herrmann, 2005).

Plus de 400 anticorps sont en cours d'évaluation dans des études cliniques et les mécanismes d'action cytotoxique des anticorps « froids » ont été largement élucidés (Lin *et al.*, 2005). Ils agissent principalement en activant la réponse immunitaire de l'hôte par deux voies différentes : soit en initiant une réponse cellulaire par un recrutement des cellules du système immunitaire qui possèdent à leur surface un récepteur au fragment Fc des anticorps (ADCC) ; soit en activant une cascade de protéines du complément (CDC), et aboutissent dans les deux cas à une destruction des cellules tumorales. En associant à la molécule d'anticorps un atome radioactif approprié (lode-131 ou Yttrium-90) pour une radioimmunothérapie (RIT), l'irradiation ajoute une composante cytotoxique à l'activité intrinsèque de l'anticorps (Lin *et al.*, 2005).

Différentes cibles tumorales, dont le ganglioside GD2, ont été considérées pour l'immunothérapie. Les gangliosides sont des glycosphingolipides acides composés d'une région hydrophile oligosaccharidique associée à une partie hydrophobe constituée par un céramide de longueur variable (Svennerholm, 1964). Les gangliodides peuvent comporter un ou plusieurs acides sialiques qui peuvent être *O*-acétylés (Cheresh *et al.*, 1984) et ils sont retrouvés dans tous les types cellulaires, mais leur concentration et leur répartition varient selon les tissus de l'organisme. Il est donc possible de définir, pour chaque type cellulaire, un profil gangliosidique caractéristique qui est modifié durant l'embryogénèse, l'ontogénèse et la transformation tumorale (Hakomori, 1981 ; Ledeen & Yu, 1982). Ainsi, le disialoganglioside GD2 est reconnu comme un marqueur fiable des tumeurs neuroectodermiques, principalement le neuroblastome (Schulz *et al.*, 1984), le mélanome (Cheresh *et al.*, 1986a), le cancer pulmonaire à petites cellules (Cheresh *et al.*, 1986b) et le glioblastome. De plus, grâce à de très rares anticorps monoclonaux, ont été découverts des gangliosides *O*-acétylés (Cheresh *et al.*, 1984) qui présentent une distribution spatio-temporelle originale lors du développement et de l'organisation du tissu nerveux (Constantine-Paton *et al.*, 1986).

Il a toujours été difficile de disposer d'anticorps monoclonaux de souris qui soient exclusivement spécifiques du GD2. La rareté du GD2, l'extrême difficulté de sa synthèse

10

chimique et son très faible pouvoir immunogène (Livingston *et al.*, 1989) ont été autant d'obstacles qui ont retardé l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques du GD2 avec des isotypes qui soient favorables à leur utilisation thérapeutique. Par ailleurs, le phénomène de xéno-immunisation, avec l'induction d'anticorps contre ceux de la souris, limite l'injection de nouvelles doses aux patients. Toutefois, depuis plus de 15 ans, deux anticorps anti-GD2 (3F8 et 14G2a) ont été évalué aux Etats-Unis dans des études précliniques et cliniques, principalement dans le neuroblastome de l'enfant et, à un moindre degré, dans le mélanome chez l'adulte. Une efficacité encore modeste mais encourageante a été rapportée dans de nombreuses publications internationales, mais leur développement a été limité par une toxicité nerveuse parfois sévère nécessitant des antalgiques morphiniques pour calmer les douleurs périphériques. La neurotoxicité a été imputée à la présence de molécules d'antigène GD2 à la surface des fibres nerveuses des nerfs périphériques des malades traités (Yuki *et al.*, 1997). Cette toxicité nerveuse a limité le développement clinique de l'immunothérapie et de la RIT avec les anticorps anti-GD2.

C'est dans ce contexte que notre équipe a souhaité élaborer un nouvel anticorps monoclonal ayant la propriété de reconnaître une cible spécifique aux cellules tumorales d'origine neuroectodermique - le ganglioside GD2 *O*-acétylé (Cheresh *et al.*, 1992; Mezazigh, 1993) - et étant moins immunogène que les anticorps de souris grâce à une chimérisation homme-souris. Cet anticorps est donc à visée thérapeutique, dans le futur, afin de traiter des cancers comme le neuroblastome, le mélanome, le cancer pulmonaire à petites cellules et le glioblastome. Tout cela en espérant une moindre neurotoxicité du fait de l'absence de cet antigène au niveau des nerfs périphériques.

Ainsi, la première partie de ce mémoire est consacrée à une revue générales sur les gangliosides puis sur les anticorps thérapeutiques chez l'Homme. La deuxième partie rapportera les résultats obtenus lors de la production et de l'évaluation chez l'animal d'anticorps monoclonaux anti-ganglioside GD2.

PREMIERE PARTIE :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES GANGLIOSIDES ET LES ANTICORPS THERAPEUTIQUES CHEZ L'HOMME.

1.1 LES GANGLIOSIDES

1.1.1 Structure des gangliosides

Les gangliosides appartiennent à une famille hétérogène de lipides, appelés glycosphingolipides, présents chez tous les eucaryotes, vertébrés et animaux inférieurs, minoritairement dans les plantes et rarement dans les bactéries. Ce sont des composés amphiphiles de la membrane plasmique composés d'un céramide hydrophobe ancré dans la bicouche lipidique, et d'une chaîne oligosaccharidique exposée au milieu extracellulaire. Le céramide se compose d'un alcool aminé, relié au niveau de son groupement amine à un acide gras généralement à longue chaîne par une liaison amide. La chaîne des sucres est quant à elle liée par une liaison glycosidique au niveau de la fonction alcool primaire du céramide (figure 1).



Figure 1. Structure d'un ganglioside (A) et position dans la membrane plasmique (B) (http://csidoc.insa-lyon.fr/these/2005/masson/these.pdf).

Les gangliosides forment un groupe varié de glycosphingolipides caractérisés par la présence d'une ou plusieurs molécules d'acide sialique (ou acide neuraminique) sur la chaîne oligosaccharidique. Ces acides sialiques forment une famille diversifiée de glucides carboxylés à 9 atomes de carbone et chaque groupement carboxyle confère au ganglioside une charge négative caractéristique. Le plus commun des acides sialiques est l'acide *N*-acétyl-neuraminique (Neu5Ac) qui est le précurseur de tous les membres de la famille et qui est prépondérant dans les tissus cérébraux.

Les acides sialiques terminaux de la chaîne oligosaccharidique peuvent être modifiés par une *O*-acétylation en C9 ou en C7 mais l'importance fonctionnelle de ces composés *O*-acétylés demeure imprécise (Manzi *et al.*, 1990).

Les gangliosides sont dénommés par des abréviations correspondant au nombre de résidus acide sialique présents dans la molécule (GM pour monosialoganglioside, GD pour disialoganglioside, GT pour trisialoganglioside...) et par un chiffre correspondant à leur ordre de migration en chromatographie sur couche mince de silice, par exemple : GM1 a la plus faible migration des gangliosides monosialylés du cerveau (Svennerholm, 1964). Cette nomenclature dite de Svennerholm est la plus couramment utilisée mais une autre nomenclature se fondant sur la connaissance détaillée des séquences glycanniques a été recommandée par la Commission Internationale de Nomenclature Biochimique (IUPAC-IUB, 1997) pour identifier des gangliosides plus complexes. Ainsi, l'abréviation Cer pour céramide est précédée du préfixe « ose » indicé du nombre de résidus glucidiques présents et précédée des lettres Gg pour la série Ganglio à laquelle appartient la majorité des gangliosides du cerveau. La position de l'acide sialique substitué latéralement est indiquée par un chiffre romain tandis qu'un chiffre arabe précise le carbone de l'ose de la chaîne oligosaccharidique engagé dans la liaison. C'est ainsi que le GM1 devient II3 NeuAc-GgOse4-Cer.

1.1.2 <u>Métabolisme des gangliosides</u>

1.1.2.1 Biosynthèse des gangliosides

D'une manière générale, la biosynthèse des gangliosides correspond à une glycosylation séquentielle du céramide. Les additions successives de résidus monosaccharidiques sont catalysées par différentes enzymes de la famille des glycosyltransférases. Chaque réaction implique le transfert d'un résidu monosaccharidique depuis un donneur nucléotide-sucre à un lipide accepteur. Les différentes étapes de la synthèse des gangliosides s'accompagnent d'un transport intracellulaire de molécules de

plus en plus grosses du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique *via* l'appareil de Golgi (Schwarzmann & Sandhoff, 1990).

1.1.2.2 Biosynthèse du céramide

Le céramide est synthétisé en plusieurs étapes (figure 2) dont la première est la réaction de la sérine avec le palmitoyl-CoA, dans le réticulum endoplasmique pour former la 3-cétodihydrosphinganine. Après réduction, la sphinganine est obtenue et elle est ensuite acylée par un acyl-CoA d'un acide gras à longue chaîne pour former le dihydrocéramide. L'action d'une désaturase produit le céramide (Merrill & Wang, 1986).



Figure 2. Biosynthèse du céramide (d'après Merrill et Wang, 1986).

Les modifications biochimiques observées lors de la transformation maligne des cellules affectent la biosynthèse du céramide. Des variations de longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras, du nombre de substitutions ou du degré d'insaturation sont constatées. En effet, pour des tissus sains, les chaînes des acides gras sont plus courtes que dans les cellules tumorales (Hakomori & Kannagi, 1983).

1.1.2.3 Biosynthèse de la chaîne oligosaccharidique

Le céramide formé dans le réticulum endoplasmique est alors transporté jusqu'à l'appareil de Golgi où la glucosylcéramide synthase lui transfère un résidu glucose depuis l'UDP-glucose. Puis une galactosyltransférase ajoute un résidu galactose sur le glucosylcéramide pour former le lactosylcéramide, précurseur de tous les gangliosides, excepté le GM4 synthétisé à partir du glucosylcéramide (Degroote *et al.*, 2004).

Les résidus monosaccharidiques suivants sont alors transférés à la chaîne glycannique grandissante par étapes précisément ordonnées. Le lactosylcéramide et ses dérivés sialylés, GM3, GD3 et GT3, obtenus par l'action de sialyltransférases, servent de précurseurs pour la biosynthèse des gangliosides complexes des séries o, a ,b, c. Ces différentes séries sont caractérisées par l'absence (série-o) ou la présence d'un (série-a), deux (série-b) ou trois (série-c) acides sialiques liés sur le premier résidu galactose (figure 3).



Figure 3. Schéma de la biosynthèse des gangliosides (Van Echten et al., 1993) (disponible sur http://csidoc.insa-lyon.fr/these/2005/masson/these.pdf).

Les sialyltransférases I, II et III catalysant les premières étapes de la biosynthèse des gangliosides (formation du GM3, GD3 et GT3) présentent une spécificité importante pour leur substrat. En revanche, les glycosylations successives de ces précurseurs sont catalysées par des glycosyltransférases à faible spécificité, la *N*-acétylgalactosamine transférase (GalNAcT) et la galactosyltransférase II ainsi que les deux sialyltransférases ST-IV et ST-V. Elles transfèrent un résidu saccharidique sur des accepteurs qui diffèrent uniquement par le nombre d'acides sialiques lié au galactose, c'est-à-dire par leur série.

Une fois synthétisés, les gangliosides gagnent leur destination principale, la membrane plasmique *via* un transport vésiculaire.

Les glycosyltransférases présentes et actives dans l'appareil de Golgi varient en fonction du type cellulaire, du stade de développement ou d'un état pathologique (Degroote *et al.*, 2004). Cet équipement enzymatique conditionne la composition en gangliosides de la cellule.

1.1.2.4 Catabolisme des gangliosides

Avant d'être dégradés, les gangliosides présents dans la membrane plasmique sont tout d'abord internalisés par endocytose et acheminés par des vésicules jusqu'aux endosomes. De là, une partie peut être réinsérée dans la membrane plasmique ou rejoindre l'appareil de Golgi mais la majeure partie est acheminée vers les lysosomes, lieu de leur dégradation (figure 4).



Figure 4. Circuit du catabolisme des gangliosides.

Les gangliosides sont alors dégradés par différentes enzymes. Des exoglucidases enlèvent séquentiellement les résidus monosaccharidiques. La chaîne de sucres entière peut également être détachée par une céramide glycanase. Enfin, l'acide gras du céramide peut être ôté par l'action d'une céramide *N*-désacylase. Par ailleurs, une sialidase localisée dans la membrane plasmique catalyse le détachement des acides sialiques des gangliosides. Cette dernière pourrait jouer un rôle important dans la signalisation membranaire en modulant le taux des gangliosides de la membrane plasmique (Sasaki *et al.*, 2003).

1.1.2.5 Cas des gangliosides O-acétylés

L'O-acétylation des gangliosides peut s'effectuer selon différents mécanismes :

- les sialyltransférases peuvent utiliser comme substrat le CMP-acide sialique O-acétylé

- des O-acétylases peuvent utiliser le ganglioside comme substrat et réaliser l'O-acétylation des acides sialiques terminaux, des enzymes différentes assurant cette O-acétylation sur un carbone spécifique de l'acide sialique (C4, C7, C8 ou C9) (figure 5)

- des *O*-acétyltransférases peuvent assurer le recyclage des acides sialiques *O*-acétylés par hydrolyse spécifique de la liaison *O*-acétyle permettant de l'utiliser pour la synthèse des CMP-acide sialique.



Figure 5. Exemple de structure de ganglioside : le ganglioside GD2 : II3(NeuAc)2-GgOse3-Cer. Le GD2 O-acétylé est obtenu par O-acétylation sur le carbone C9.

1.1.3 Distribution tissulaire des gangliosides

1.1.3.1 Gangliosides

Les gangliosides sont largement exprimés dans les tissus des mammifères, selon un profil spécifique de l'espèce, de l'organe ou du tissu considéré, de la cellule ainsi que du stade de développement de l'organe ou de différenciation de la cellule. Il est donc possible de définir pour chaque type cellulaire un profil gangliosidique caractéristique qui est modifié durant l'embryogenèse, l'ontogenèse et la transformation tumorale. Les gangliosides sont prépondérants dans le système nerveux central des mammifères et la concentration la plus forte est observée pour le cortex cérébral (Ledeen & Yu, 1982). Les quatre gangliosides majeurs du cerveau des mammifères sont le GM1, le GD1a, son isomère le GD1b et le GT1b (Ando & Yu, 1977). Une distribution spécifique de ces molécules selon les différentes régions fonctionnelles du cerveau a été observée par Kotani *et al.* (1993) et suggère qu'elles puissent intervenir dans la transmission de l'influx nerveux. Les gangliosides sont par ailleurs retrouvés dans quasiment tous les tissus de l'organisme sous forme de GM3 et de GD3 et notamment dans les cellules vasculaires. Le profil varie selon leur localisation mais le GM3 semble être le ganglioside prédominant dans ces cellules (Senn *et al.*, 1989).

Des modifications qualitatives et quantitatives du profil gangliosidique sont observées chez les cellules transformées par rapport aux cellules normales. Dans le mélanome malin, on observe à la fois une augmentation de la concentration en gangliosides et une modification des proportions relatives des différents gangliosides. En effet, le mélanocyte comporte essentiellement du GM3 avec de moindres quantités de GM2, GD3, GD1a et GT1b. Lors de la transformation tumorale une accumulation de GD3 et de GM2 est retrouvée dans les tumeurs fraîchement prélevées. Ces altérations qualitatives et quantitatives font que les gangliosides comme le GD3, mais aussi le GD2, sont considérés comme des marqueurs fiables des tumeurs neuroectodermiques dont le neuroblastome (Schulz *et al.*, 1984), le mélanome (Cheresh *et al.*, 1986a), le cancer pulmonaire à petites cellules (Cheresh *et al.*, 1986b) et le glioblastome. Le marqueur tumoral GD2 (ainsi que sa forme *O*-acétylée) présente l'avantage d'être exprimé à plusieurs millions d'exemplaires à la surface des cellules transformées alors que la densité de la plupart des autres antigènes tumoraux est dix à cent fois moins importante. En outre, la répartition antigénique est relativement homogène d'une tumeur à l'autre et d'un malade à l'autre (Schulz *et al.*, 1984).

1.1.3.2 Gangliosides O-acétylés

La plupart des gangliosides *O*-acétylés décrits ont une distribution tissulaire spécifique qui est contrôlée lors du développement de l'individu. Ainsi, le GT3 *O*-acétylé est retrouvé dans le cerveau embryonnaire chez le rat (Hirabayashi *et al.*, 1989) et le poulet (Dubois *et al.*, 1990) puis ce taux diminue fortement à la naissance. Le GD3 *O*-acétylé est retrouvé dans le cerveau des mammifères lors du développement embryonnaire et dans les cellules humaines de mélanome malin. Il est aussi retrouvé sur les lymphocytes T et B humains comme un marqueur de leur activation et de leur prolifération (Kniep *et al.*, 1995).

L'addition d'un groupement *O*-acétylé sur le carbone C9 de l'acide sialique d'un ganglioside semble dépendre de mécanismes de régulation intervenant au cours du développement embryonnaire et qui peuvent réapparaître dans certaines tumeurs pour donner des antigènes onco-fœtaux. Ainsi, le GD3 *O*-acétylé initialement décrit dans le cerveau des mammifères lors du développement embryonnaire est exprimé par des cellules humaines de mélanome (Cheresh *et al.*, 1984). Par ailleurs, l'analyse comparée du profil des gangliosides des variants cellulaires du mélanome de hamster montre que l'expression prédominante du GD3 *O*-acétylé accompagne un état de prolifération cellulaire typique d'un stade de malignité très peu différenciée (Ren *et al.*, 1989). Le 9-*O*-acétyl-GD2 est quant à lui retrouvé dans les tumeurs d'origine neuroectodermique telles que le mélanome et le neuroblastome ainsi qu'en faibles quantités dans le cerveau de l'Homme, de la souris et du rat jusqu'à l'âge adulte (Mezazigh, 1993).

1.1.4 Fonctions des gangliosides

L'ensemble des études réalisées jusqu'à présent a révélé que les gangliosides exercent des fonctions de reconnaissance cellulaire et de modulation du signal transmembranaire, leur conférant ainsi un rôle majeur dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, ainsi que dans le développement et l'organisation des tissus ou dans les phénomènes d'oncogénèse.

1.1.4.1 Reconnaissance cellulaire

Par leur localisation à la surface de la membrane plasmique, et leur distribution ubiquiste et spécifique, les gangliosides interviennent dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire. Ils sont impliqués dans la reconnaissance entre cellules grâce à leur interaction avec différentes molécules. Par exemple, une sialoadhésine présente sur les macrophages et impliquée dans les interactions cellulaires au niveau des tissus hématopoïétiques a été décrite comme reconnaissant spécifiquement une séquence oligosaccharidique contenant de l'acide sialique et présente dans les glycoprotéines et les gangliosides (Crocker *et al.*, 1991).

De nombreux pathogènes utilisent les gangliosides comme récepteurs pour leurs toxines. Le plus connu est *Vibrio cholerae* qui produit une entérotoxine cholérique composée de deux sous-unités dont l'une se lie au GM1 membranaire et dont l'autre peut alors pénétrer dans la cellule intestinale et provoquer la pathologie par déperdition d'électrolytes (Gagnon & Saragovi, 2002). Par ailleurs, les gangliosides servent aussi de récepteurs à des virus, notamment celui de la grippe (*Myxovirus influenza*) qui se fixe au GM1 à l'aide de ses hémagglutinines (Suzuki, 1994).

Les gangliosides présentent une grande variété de structures, notamment dans la chaîne oligosaccharidique exposée sur la membrane plasmique et leur répartition est spécifique d'un tissu, de son stade de développement et du type cellulaire. Donc ils concourent à la spécificité d'une cellule et peuvent jouer le rôle d'antigènes et correspondent, par exemple aux antigènes des groupes sanguins (Degroote *et al.*, 2004). Ils sont aussi les marqueurs antigéniques de certaines pathologies. En effet, l'expression des gangliosides est très perturbée dans de nombreuses tumeurs tant quantitativement que qualitativement. Ainsi des mélanocytes exprimant du GM3 en majorité dans des conditions physiologiques, vont synthétiser du GD3 en grandes quantités lors de leur transformation en cellules cancéreuses (Carubia *et al.*, 1984). Par ailleurs, les mécanismes d'implication des gangliosides dans la cancérogenèse restent obscurs. Une hypothèse avancée est que les cellules tumorales synthétisent et libèrent des gangliosides dans leur microenvironnement, ce qui favoriserait leur développement par diminution des réponses immunitaires de l'organisme. Cet effet immunosuppresseur a été observé notamment avec le GD2 de cellules de neuroblastome (Li *et al.*, 1996).

1.1.4.2 Modulation du signal transmembranaire

La localisation des gangliosides dans les microdomaines de la membrane plasmique, appelés « rafts », leur confère un rôle de modulation de signal en interagissant avec des protéines membranaires impliquées dans des cascades de signalisation. Par exemple, le GM3 et le GM1 inhibent la phosphorylation du récepteur à l'EGF (*endothelium growth factor*) alors que le GD1a l'active par stimulation de l'activité tyrosine-kinase associée à ce récepteur. Ces effets inhibiteurs diminuent ensuite la croissance des lignées cellulaires disposant de ces récepteurs (Bremer *et al.*, 1986). Par ailleurs, l'efficacité à inhiber la phosphorylation du récepteur à l'EGF et la croissance de neuroblastomes, par exemple, diffère selon le ganglioside considéré. Ceci indique l'importance de sa structure dans l'action du ganglioside et que des modifications de profils gangliosidiques peuvent jouer un rôle dans la modulation de la croissance cellulaire (Mirkin *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les gangliosides semblent être impliqués dans l'induction d'apoptose. En effet, il a été montré notamment que le GM3 induit l'apoptose des astrocytes (Nakatsuji & Miller, 2001) et le GD3, quant à lui induit l'apoptose des oligodendrocytes (Simon *et al.*, 2002). Il est intéressant de constater qu'*a contrario* le GD3 *O*-acétylé a un effet anti-apoptotique et que sa synthèse dans les cellules tumorales les protègerait de cette mort cellulaire (Kniep *et al.*, 2006)

Les gangliosides sont donc impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques de l'organisme et dans des pathologies telles que le cancer, du fait de leur double fonction de sites de reconnaissance cellulaire et de modulateurs du signal transmembranaire.

1.1.5 <u>Extraction et purification des gangliosides</u>

De nombreuses méthodes ont été proposées pour extraire et purifier les gangliosides mais toutes ont leurs limites. L'extrait lipidique brut obtenu après extraction du matériel biologique est séparé classiquement en un mélange neutre et en un mélange acide. Cette dernière solution est alors fractionnée par différentes étapes chromatographiques (chromatographie sur une colonne de gel de silice ou chromatographie liquide à haute performance) jusqu'à purifier chacun des gangliosides.

Il est essentiel dans toutes ces étapes de purification de préserver la structure originale de l'acide sialique, d'autant plus que les groupements *O*-acétylés sont alcali-labiles. De nombreuses méthodes utilisées pour l'analyse structurale des glycoconjugués sont dans ce cas dénaturantes, ainsi que tout mélange de solvant renfermant de l'ammoniaque qui peut détruire l'acide sialique *O*-acétylé.

1.1.6 Pouvoir immunogène des gangliosides

Intéressons-nous au pouvoir immunogène des gangliosides. Cette propriété a été confirmée par la détection, dans le sérum de malades de mélanomes, d'anticorps dirigés contre certains gangliosides (Portoukalian *et al.*, 1976). Ainsi les gangliosides qui sont des constituants prédominants des mélanomes et d'autres tumeurs neuroectodermiques représentent des cibles potentielles pour le contrôle de la croissance tumorale à l'aide d'anticorps.

Toutefois, le pouvoir immunogène des gangliosides reste faible. L'injection répétée d'un ganglioside seul, aussi bien chez la souris que chez l'Homme, ne suffit pas pour produire des anticorps chez l'hôte vacciné. Par contre, l'immunisation d'une souris avec un ganglioside purifié, adsorbé sur la paroi bactérienne de *Salmonella minnesota* R595, qui sert alors d'adjuvant de l'immunité, permet d'obtenir une réponse humorale dirigée contre ce ganglioside (Livingston *et al.*, 1989a). Chez l'Homme, l'utilisation du Bacille de Calmette et Guérin est plus efficace (Livingston *et al.*, 1989b). La réponse observée a les caractéristiques d'une réponse humorale primaire : l'isotype majoritaire est de type μ (et γ 3 chez la souris), les titres sériques sont faibles et la persistance sérique de ces anticorps est de courte durée. Les injections de rappel n'entraînent pas de réponse secondaire ce qui exclut la formation de lymphocytes B mémoire.

C'est pour renforcer l'immunogénicité des gangliosides que des efforts ont été entrepris afin de définir un protocole d'immunisation qui soit capable d'induire, si possible, chez la souris des molécules d'anticorps autres que celles des sous-classes IgM et IgG3. En effet, ces deux isotypes présentent des inconvénients notoires : les IgM ont une distribution largement vasculaire et les IgG3 ont tendance à s'agréger entre elles au cours de leur purification (Grey *et al.*, 1971). Ainsi, un brevet déposé par Morton en 1998 a apporté une nouvelle solution pour augmenter le caractère immunogène des gangliosides : l'injection de cellules de mélanome irradiées, gardant leur pouvoir antigénique sans provoquer de pathologie, et qui jouent le rôle de vaccin.

La capacité de l'hôte à répondre dépend de modalités particulières à la reconnaissance immunologique des glycoconjugués dont les mécanismes sont mal connus. Par ailleurs, les propriétés moléculaires intrinsèques des gangliosides ont une part importante puisque la modification de l'acide sialique par un ester *O*-acétylé pourrait renforcer l'immunogénicité. En effet, selon Ravindranath *et al.* (1989) l'apparition d'anticorps anti-GD3 chez l'Homme immunisé avec des cellules de mélanome malin dépend de l'expression du GD3 *O*-acétylé sur la cellule cancéreuse. Ainsi, le GD3 *O*-acétylé pourrait être à l'origine, chez l'Homme, d'anticorps qui se fixeraient par réactivité croisée sur le GD3.

23

Il n'est pas rare que les anticorps monoclonaux spécifiques d'un ganglioside reconnaissent encore mieux la forme *O*-acétylée (Manzi *et al.,* 1990).

Le pouvoir immunogène des gangliosides dépend donc non seulement de leur structure et de leur mode de présentation mais aussi du répertoire immunologique de l'hôte immunisé.

1.1.6.1 Cas du disialoganglioside GD2 et de sa forme O-acétylée

Le GD2 est reconnu comme un marqueur fiable des tumeurs neuroectodermiques, principalement le neuroblastome (Schulz *et al.*, 1984), le mélanome (Cheresh *et al.*, 1986a), le cancer pulmonaire à petites cellules (Cheresh *et al.*, 1986b) et le glioblastome. Ainsi, ce ganglioside et sa forme *O*-acétylée sont exprimées à plusieurs millions d'exemplaires à la surface de ces cellules tumorales. En outre, la répartition antigénique est relativement homogène d'une tumeur à l'autre et d'un malade à l'autre (Schulz *et al.*, 1984).

* * *

1.2 LES ANTICORPS THERAPEUTIQUES CHEZ L'HOMME

1.2.1 Structure d'une immunoglobuline G

Chaque immunoglobuline présente une dualité fonctionnelle : une région de la molécule lie l'antigène tandis que l'autre assure les fonctions dites effectrices. Celles-ci comprennent la fixation à des tissus de l'hôte, à diverses cellules du système immunitaire, à certaines cellules phagocytaires, ainsi qu'au composant C1q de la voie classique du complément.

Les immunoglobulines G représentent 70 à 75 % des immunoglobulines totales du sérum humain normal et ont la structure typique de l'anticorps. Ce sont des molécules tétramériques glycosylées formées de deux chaînes lourdes (50 kDa) et de deux chaînes légères (25 kDa) qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures et des liaisons non covalentes. Les domaines N-terminaux des chaînes lourdes et légères sont caractérisées par des séquences variables (VH et VL). Chaque domaine variable contient quatre régions charpentes (FR pour framework) et trois régions appelées CDR (pour complementarity determining region) correspondant à des séquences dites « hypervariables » qui déterminent la spécificité de l'anticorps. Les régions charpentes, bien qu'elles ne participent pas directement à la liaison à l'antigène, jouent un rôle important, lors du repliement des domaines variables, dans le maintien de l'intégrité du site de liaison à l'antigène, appelé paratope. La partie constante de la chaîne lourde comprend trois régions différentes CH1, CH2 et CH3. Des chaînes polysaccharidiques latérales sont situées au niveau des domaines CH2. Les domaines CH2 et CH3 forment le fragment Fc qui permet les fonctions effectrices de l'anticorps (activation du complément et de certaines cellules immunitaires). La partie constante de la chaîne légère est nommée CL (Roitt et al., 2002) (cf figures 6 et 7).



Figure 6. Structure d'une immunoglobuline G. Les chaînes lourdes sont représentées en bleu, les chaînes légères en vert et les ponts disulfures en rouge.



Figure 7. Schéma représentant les zones hypervariables (CDR) et leurs charpentes (FR) constituant le site de liaison entre l'antigène et l'anticorps appelé paratope.

Dans le sérum humain, les anticorps sont polyclonaux, c'est-à-dire qu'ils sont de spécificités différentes et reconnaissent donc des antigènes différents. En thérapeutique, il faut cibler un antigène donné responsable d'une pathologie, d'où la nécessité d'obtenir des anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux représentaient environ 14 % du marché biopharmaceutique en 2002, contre 1 % en 1995. Les ventes mondiales des anticorps monoclonaux ont enregistré une croissance annuelle de 147 % entre 1995 et 2002. Plus de 113 anticorps monoclonaux sont actuellement en développement clinique dont 74 % sont en phase II et III. Le marché mondial des anticorps monoclonaux a été estimé à 5,1 milliards de

dollars en 2003. Entre 29 et 47 nouveaux anticorps monoclonaux sont ou devraient arriver sur le marché entre 2004 et 2009 (ministère de l'économie et des finances, 2006).

Actuellement, 20 anticorps monoclonaux thérapeutiques existent sur le marché américain (tableau I) dont 18 sont disponibles en France et permettent de traiter différentes pathologies selon le principe de la reconnaissance antigène-anticorps provoquant ainsi des réactions immunologiques bénéfiques pour le patient. Du fait de la multitude des antigènes cibles, cette classe de médicaments s'adresse à un vaste spectre de pathologies.

Les premiers anticorps de souris ont été obtenus en 1975, les premiers anticorps chimériques en 1984, les premiers anticorps humanisés entre 1988 et 1991 et enfin les premiers anticorps humains sont apparus entre 1994 et 1999. La dénomination commune internationale des anticorps thérapeutiques permet de savoir de quel type d'anticorps monoclonal il s'agit. Le suffixe « momab » signifie que c'est un anticorps de souris, « ximab » un anticorps chimérique, « zumab » un anticorps humanisé et « mumab » un anticorps humanisé et « mumab » un anticorps humanisé.

1.2.2 Les anticorps monoclonaux de souris

Les anticorps monoclonaux murins sont obtenus grâce à la technique des hybridomes de souris (figure 8). Pour cela, les cellules B de rongeurs préalablement immunisés avec l'antigène choisi, sont fusionnées avec des cellules de myélome apportant leur propriété d'immortalité. Dès que les hybridomes sécrétant l'anticorps sont obtenus, ils doivent être criblés pour trouver la spécificité antigénique recherchée. Puis, les hybridomes sélectionnés sont clonés pour assurer une production réellement monoclonale et sont mis en culture. L'intérêt principal de la technique de l'hybridome est qu'elle se prête à une production à large échelle d'anticorps monoclonaux à un haut degré de pureté. Lorsqu'un hybridome est cultivé dans des flacons de culture cellulaire, l'anticorps est sécrété dans le milieu à d'assez faibles concentrations (1 à 20 µg/mL). Un hybridome cultivé dans la cavité péritonéale d'une souris sécrète l'anticorps dans le liquide d'ascite à des concentrations plus élevées (1 à 10 mg/mL) mais cette technique n'est plus beaucoup employée (Goldsby et al., 2003). Les anticorps monoclonaux murins sont donc relativement faciles à produire et sont largement utilisés en biologie moléculaire, en immunologie... Cependant, leur principal inconvénient reste leur propriété immunogène quand ils sont injectés à des humains, car ils provoquent l'apparition d'anticorps anti-souris (HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies) réduisant rapidement l'efficacité des anticorps murins et pouvant provoquer des réactions allergiques délétères.



Figure 8. Schéma représentant la production d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux murins.

1.2.3 Les anticorps monoclonaux chimériques

Les anticorps monoclonaux chimériques sont issus d'anticorps de souris et d'anticorps humains (figure 9). Les fragments variables des chaînes légères et lourdes de l'anticorps de souris (assurant la reconnaissance de l'antigène) sont raccordées aux fragments constants d'un anticorps humain (assurant les fonctions des immunoglobulines), ceci par des techniques d'ingénierie moléculaire agissant sur les molécules d'ADN. Ces anticorps monoclonaux chimériques gardent donc la même spécificité de reconnaissance de l'antigène que les anticorps de souris dont ils sont issus tout en étant moins immunogènes

pour l'Homme et en gardant les fonctions effectrices des immunoglobulines humaines (activation du complément et de certaines cellules immunitaires).



1.2.4 Les anticorps monoclonaux humanisés

Les anticorps monoclonaux humanisés sont des anticorps chimériques pour lesquels seuls les fragments CDR proviennent de la souris, le reste de la charpente étant d'origine humaine (figure 9). Ces molécules sont obtenues par « greffage » des gènes codant pour ces CDR dans les gènes codant pour l'anticorps humain choisi, par des techniques de biologie moléculaire. L'anticorps humanisé est donc encore moins immunogène que l'anticorps chimérique et possède les fonctions effectrices relatives aux immunoglobulines humaines associées à la reconnaissance spécifique d'un nouvel antigène. Cependant, cette technique est actuellement trop lourde pour être utilisée en routine dans un laboratoire de recherche et elle nécessite de trouver un anticorps humain dont la « charpente » est similaire de celle de l'anticorps de souris d'origine pour assurer une bonne conformation des CDR (Kettleborough *et al.*, 1991).

1.2.5 Les anticorps monoclonaux humains

Les premiers anticorps monoclonaux humains ont été obtenus par l'hybridation hétérologue d'un myélome de souris avec des cellules humaines mais cela a conduit rapidement à une instabilité génomique.

L'immortalisation de lymphocytes B humains par le virus d'Epstein Barr puis leur fusion à des cellules de myélome humain a permis aussi d'obtenir ces molécules mais la production restait faible et limitée dans le temps. Par ailleurs, cette technique est éthiquement limitée puisqu'il n'est pas possible d'immuniser des êtres humains contre n'importe quel pathogène. Ainsi, les seuls lymphocytes susceptibles d'être immortalisés sont donc spécifiques d'antigènes vaccinaux, de bactéries ou de virus ayant infecté des patients de façon naturelle.

Les progrès de l'ingénierie moléculaire permettent maintenant de pallier à ces inconvénients. Le *phage display* est une de ces techniques (figure 10) : les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface, en fusion avec le domaine aminoterminal de leur protéine pIII, des molécules telles que des peptides ou des anticorps dont le gène a été inséré au génome phagique (Souriau *et al.*, 1998). Ainsi, l'ARNm des cellules B humaines (synthétisant des anticorps) est converti en ADNc et les gènes des anticorps sont multipliés par PCR. Des constructions simples sont alors faites, dans lesquelles les gènes des chaînes légères et ceux des chaînes lourdes peuvent se combiner de façon aléatoire, en tandem avec le gène codant pour la protéine pIII de couverture du bactériophage. Puis cette banque de phages est criblée pour sélectionner celui qui a la meilleure affinité avec l'antigène choisi (Roitt & Rabson, 2002).

Dénomination commune internationale	Spécialité	Type d'anticorps monoclonal	Cible	Indication	Statut en France
⁹⁰ Y-ibritumomab tiuxetan	ZEVALIN	murin	CD20	Lymphome non hodgkinien en rechute ou réfractaire après traitement par rituximab	AMM en 2004
muromonab	ORTHOCLONE OKT3	murin	CD3	Rejet aigu d'allogreffe rénale, hépatique ou cardiaque	AMM en 1986
¹³¹ I-tositumomab	BEXXAR	murin	CD20	Lymphome non hodgkinien en rechute après chimiothérapie	Ni AMM, ni ATU
abciximab	REOPRO	chimérique	GP IIb/IIIa	Prévention des complications cardiaques ischémiques chez les patients qui font l'objet d'une intervention coronarienne percutanée (angioplastie, stent)	AMM en 1995
basiliximab	SIMULECT	chimérique	CD25	Prévention du rejet aigu après transplantation rénale allogénique <i>de novo</i> , en association à la ciclosporine et aux corticoïdes	AMM en 1998
cetuximab	ERBITUX	chimérique	EGFR (récepteur au facteur de croissance épidermique)	Cancer colo-rectal métastatique exprimant l'EGFR, après échec de l'irinotécan	AMM en 2004
infliximab	REMICADE	chimérique	TNF-alpha	Maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde active, spondylarthrite ankylosante sévère	AMM en 1999
rituximab	MABTHERA	chimérique	CD20	Lymphome folliculaire de stade III à IV en cas de chimiorésistance, lymphome non hodgkinien agressif diffus en association à une chimiothérapie	AMM en 1998
alemtuzumab	MABCAMPATH	humanisé	CD52	Leucémie lymphoïde chronique chez des patients ayant été exposés aux alkylants et ne répondant pas à la fludarabine	AMM en 2001
bevacizumab	AVASTIN	humanisé	VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire)	Cancer colo-rectal métastatique	AMM en 2005
daclizumab	ZENAPAX	humanisé	CD25	Prévention du rejet aigu après transplantation rénale allogénique <i>de novo</i> en association à la ciclosporine et aux corticoïdes	AMM en 1999
efalizumab	RAPTIVA	humanisé	CD11a	Formes modérées à sévères de psoriasis en plaques en cas de résistance ou aux autres traitements	AMM en 2004
gemtuzumab- ozogamicine	MYLOTARG	humanisé	CD33	Leucémie myéloïde aiguë du sujet âgé	ATU nominative
natalizumab	TYSABRI	humanisé	Intégrine VLA-4	Sclérose en plaque	AMM en 2006
omalizumab	XOLAIR	humanisé	lgE	Asthme persistant sévère	AMM en 2005
palivizumab	SYNAGIS	humanisé	VRS (Virus respiratoire syncitial)	Prévention des infections respiratoires basses graves dues au VRS	AMM en 1999
ranibizumab	LUCENTIS	humanisé	VEGF	Forme humide de la dégénéresence maculaire liée à l'âge	AMM en 2007
trastuzumab	HERCEPTIN	humanisé	HER2	Cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de HER2	AMM en 2000
adalimumab	HUMIRA	humain	TNF-alpha	Polyarthrite rhumatoïde active, rhumatisme psoriasique actif	AMM en 2003
panitumumab	VECTIBIX	humain	EGFR	Cancer colo-rectal	Ni AMM, ni ATU

Tableau I : Les différents anticorps monoclonaux thérapeutiques actuellement sur le marché aux Etats-Unis



Figure 10. A : Représentation schématique d'un phage filamenteux. B : Exemple d'expression à la surface d'un phage filamenteux dans la technique du *phage display*.

Une autre technique d'obtention d'anticorps monoclonaux humains réside dans la manipulation de souris transgéniques. En effet, il est possible d'invalider les gènes codant pour les chaînes légères et lourdes des immunoglobulines dans les cellules souches embryonnaires de souris. Ensuite, des séquences géniques humaines codant pour les deux types de chaînes des immunoglobulines humaines peuvent être introduites. Des lignées de souris transgéniques sont alors établies et produisent des anticorps humains spécifiques d'un antigène donné (Goldsby *et al.,* 2003). Cependant une production industrielle à grande échelle est peu probable du fait de la taille de ces rongeurs qui ne fourniraient donc pas assez d'anticorps.

Ces deux techniques modernes représentent l'idéal puisqu'elles permettent l'obtention d'anticorps monoclonaux humains qui ne sont plus immunogènes pour l'Homme, mais elles sont encore compliquées et coûteuses pour une activité de routine de laboratoire de recherche. Actuellement, un seul anticorps monoclonal humain recombinant est sur le marché français, il s'agit de HUMIRA (adalimumab) dirigé contre le TNF-alpha et obtenu par la technique de *phage display*.

1.2.6 Autres anticorps thérapeutiques pour l'Homme

La société HEMATECH[®]/KIRIN[®] a mis au point une technique de production d'anticorps polyclonaux humains par des vaches transgéniques. Ces anticorps sont donc de spécificités différentes et seront utilisés chez l'Homme pour traiter des déficiences immunitaires. Ces pathologies sont actuellement traitées par l'administration d'immunoglobulines humaines dont la production est dépendante des dons de sang. C'est pour cela que l'équipe de Kuroiwa s'est intéressée à la manière d'obtenir des anticorps humains chez la vache. Cet animal a été choisi pour deux raisons :

- sa taille importante : une vache adulte peut fournir 1125 grammes d'anticorps extraits de son sang, ce qui permet des projets de production à grande échelle
- sa disponibilité : étant très utilisée dans le monde agricole, son système immunitaire a été très étudié et est donc maintenant bien connu

La méthode de Kuroiwa *et al.* (2002), utilisée par cette société, consiste en l'inactivation, dans des cellules souches embryonnaires, des gènes bovins codant pour les immunoglobulines bovines. Un chromosome artificiel humain contenant les loci entiers, non réarrangés, codant pour les chaînes légères et lourdes des immunoglobulines humaines a été créé. Ce vecteur a ensuite été introduit dans des fibroblastes fœtaux afin de remplacer les gènes bovins codant pour les immunoglobulines par les séquences humaines. Ces vaches transgéniques ainsi obtenues sont alors appelées TC bovine[™]. Par la suite, elles sont immunisées contre des antigènes donnés et les anticorps produits sont récoltés par plasmaphérèse puis purifiés et stérilisés par filtration.

Une autre société (ABLYNX[®]) s'oriente actuellement sur la technologie des Nanobodies[®] issus d'anticorps de lama. En effet, il a été découvert que les camélidés possèdent des anticorps sans chaînes légères mais gardant une bonne capacité de liaison aux antigènes. De plus, les régions variables de ces chaînes lourdes non conventionnelles (V_{HH}) présentent une forte homologie avec les régions variables des immunoglobulines humaines (Tanha *et al.*, 2002). Il est à noter que ces chaînes lourdes possèdent les régions CH3 et CH2 des immunoglobulines mais pas la région CH1 (figure 11).

33



Figure 11. Schéma représentant un anticorps de lama, à deux chaînes lourdes (A) et le V_{HH} appelé Nanobody[®] (B) de la société ABLYNX[®].

Ainsi, les Nanobodies[®] (ou V_{HH}) sont une nouvelle classe de protéines thérapeutiques dérivées des anticorps de lama et sont obtenus à l'aide de bactéries ou de levures transformées dans lesquelles a été intégré le gène codant pour cette protéine (Van der Linden *et al.*, 2000). L'intérêt de ces molécules réside dans leur faible immunogénicité pour l'Homme ainsi que dans leur facilité de production. Des essais cliniques de phase I devraient avoir lieu courant 2007, dans le but d'évaluer leur efficacité dans le traitement des thromboses associées à la sténose artérielle (http://www.ablynx.com).

* * *

1.3 <u>IMMUNOTHERAPIE DES TUMEURS NEUROECTODERMIQUES A L'AIDE</u> <u>D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-GANGLIOSIDES</u>

1.3.1 <u>Différents anticorps monoclonaux anti-gangliosides en cours de</u> <u>recherche</u>

Deux anticorps murins, le 3F8 et le 14G2a, sont en phases I et II d'études cliniques aux Etats-Unis et sont dirigés contre le ganglioside GD2 dans le traitement du neuroblastome chez l'enfant et du mélanome métastatique chez l'adulte.

L'anticorps R24, quant à lui, est dirigé contre le GD3 et a été étudié chez des patients atteints de mélanome malin dans des essais cliniques de phase I (Houghton *et al.*, 1985 ; Nasi *et al.*, 1997). Une étude clinique de phase III doit être débutée prochainement.

Un anticorps chimérique anti-GD2, le ch14.18 (apparenté à l'anticorps de souris 14G2a) a été étudié dans un essai clinique de phase I pour traiter dix enfants atteints de neuroblastome en 1998 : des résultats positifs ont été obtenu pour cinq patients (réponse partielle pour l'un d'entre eux et stabilisation de la maladie pour les quatre autres). Cependant des effets secondaires dont des douleurs, de la fièvre, de la tachycardie et de l'urticaire avaient été observés, évoquant des réactions anaphylactiques (Zeng *et al.*, 2005).

Un nouvel anticorps humanisé, appelé ME361, est en cours d'études précliniques, il est dirigé contre le ganglioside GD2 mais son indication n'est pas encore connue (*IMGT*, 2007). Par ailleurs, l'équipe de Nakamura *et al.*, en 2001, a élaboré des anticorps humanisés anti-GD2 (le KM8138) et anti-GD3 (KM8871) qui ne sont qu'à l'état de recherches précliniques mais qui semblent avoir une bonne affinité pour leur cible tout en conservant les fonctions effectrices essentielles des immunoglobulines humaines.

Un anticorps monoclonal humain dirigé contre le GD2 a été testé avec efficacité chez huit patients atteints de mélanome avec métastases cutanées. Vingt et une lésions avaient été traitées par injection intralésionnelle de cet anticorps : 10 avaient complètement régressé, 5 avaient partiellement répondu et 1 avait présenté une réponse mineure. Les seuls effets secondaires observés étaient un érythème modéré aux endroits des injections. Cependant, cet anticorps humain avait été obtenu par la technique d'immortalisation de lymphocytes par le virus Epstein Barr qui ne permet donc pas une production pérenne d'anticorps (Irie & Morton, 1986).

1.3.2 Intérêts de notre anticorps chimérique anti-GD2 O-acétylé, le KM8B6

De nombreux anticorps monoclonaux, murins et chimériques, ciblant le ganglioside GD2 ont été obtenus dans le but de traiter les tumeurs d'origine neuroectodermique exprimant en forte quantité cet antigène. Les anticorps produits par immunisation de souris étaient d'isotypes μ ou γ 3, prédominants dans la réponse immunitaire dirigée contre les structures saccharidiques (Perlmutter et al., 1978). L'utilisation chez le malade des anticorps IgM dont la distribution est classiquement vasculaire fut écartée. Si les IgG3 semblaient avoir les propriétés les plus intéressantes en vue de leur utilisation chez les malades, leur purification a soulevé des problèmes dès leur découverte car elles ont tendance à s'agréger entre elles de manière irréversible (Grey et al., 1971). D'autre part le phénomène de xénoimmunisation, avec l'induction d'anticorps contre ceux de la souris, limite l'injection de nouvelles doses aux patients. Toutefois, depuis plus de 15 ans, deux anticorps anti-GD2 (3F8 et 14G2a) ont été évalués aux Etats-Unis dans des études précliniques et cliniques, principalement dans le neuroblastome de l'enfant et, à un moindre degré, dans le mélanome chez l'adulte. Une efficacité encore modeste mais encourageante a été rapportée dans de nombreuses publications internationales, mais leur développement a été limité par une toxicité nerveuse parfois sévère nécessitant des antalgiques morphiniques pour calmer les douleurs périphériques. Cette neurotoxicité a été imputée à la présence de molécules d'antigène GD2 à la surface des fibres nerveuses des nerfs périphériques des malades traités (Yuki et al., 1997). Le ciblage de ces molécules de GD2 par les anticorps a entraîné une démyélinisation à l'origine des douleurs. Il est évident que cette toxicité nerveuse a limité le développement clinique de l'immunothérapie avec les anticorps anti-GD2, même si le grand nombre de cibles antigéniques de GD2 reste un facteur très favorable pour une application en immunothérapie. Cet effet indésirable fut donc aussi observé avec les anticorps chimériques homme-souris (dont le ch14.18) obtenus dans le but de diminuer la xéno-immunisation.

Deux anticorps monoclonaux de souris avaient été obtenus et caractérisés au laboratoire de notre équipe : le 60C3 (IgG3, κ) reconnaissant le GD2 et sa forme *O*-acétylée, et le 8B6 (IgG3, κ) spécifique du GD2 *O*-acétylé (Cerato *et al.*, 1997). La distribution tissulaire de ce ganglioside *O*-acétylé fut déterminée et révéla l'abondance de cet antigène dans les tissus tumoraux neuroectodermiques et son absence des tissus nerveux périphériques. Notre équipe a donc fabriqué un anticorps chimérique homme-souris par ingénierie moléculaire (figure 12) et produit par des cellules CHO, avec pour but ultime, une
utilisation chez des patients, exempte des effets secondaires rencontrés avec les autres anticorps précédemment cités.



Figure 12 : Représentation schématique de la technique d'obtention d'un anticorps chimérique dans notre laboratoire. A : IgG3 de souris, B : anticorps chimérique, C : IgG1 humaine (V_H : région variable lourde, V_L : région variable légère, C_K : région constante légère, C_γ : région constante lourde).

* * *

DEUXIEME PARTIE :

PRODUCTION ET EVALUATION CHEZ L'ANIMAL D'ANTICORPS THERAPEUTIQUES ANTI-GANGLIOSIDE GD2

1.4 MATERIEL ET METHODES

1.4.1 <u>Matériel</u>

1.4.1.1 Produits chimiques et biochimiques

Le MgCl₂, la solution tampon de PCR 10 X, le marqueur *1 Kb Plus Ladder,* le vecteur pcDNA3.1/Hygro[©], la généticine[®] et l'hygromycine B[©] sont fournis par Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA. Les dNTP proviennent de Promega, Madison, USA.

Le tampon NEB2 10 X, l'albumine de sérum humain (BSA) 100 X, le tampon NEB 3 10 X et la solution tampon de ligature 10 X sont fournis par New England Biolabs, Ipswich, USA. Le bromure d'éthidium et le marqueur *Precision Plus ProteinTM Standard* sont fournis par Bio-Rad, Hercules, USA.

Le glycogène, l'ampicilline, la tétracycline, le milieu DMEM, le milieu RPMI 1640, la Lglutamine, la solution de pénicilline et streptomycine, le PBS, la BSA 1 X, le Tris, le HCl, l'acétate de sodium, l'orcinol, le poly-(isobutyl)-méthacrylate, le 4-chloro-1-naphtol, la colonne DEAE Sephadex A-25, la solution de parformaldéhyde et le colorant de Hoescht 33342 sont fournis par Sigma Chemicals Co, Saint Louis, USA. Le sérum de veau foetal (SVF) est fourni par Biowest, Nuaille, France.

Les plaques stériles 96 puits Microtest[®] sont fournies par Becton-Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France et les plaques de microtitration Immuno-Nunc[®] Maxisorp[®] proviennent de Nunc, Roskilde, Danemark.

Les coffrets *QIAquick Gel Extraction, QIAprep Spin Miniprep* et le réactif *Polyfect*[®] proviennent de Qiagen, Hilden, Allemagne. Le coffret DakoCytomation Envision + System provient Dako, Coppenhague, Danemark.

L'agarose est fourni par Q. Biogene, Morgan Irvine, USA, et l'ABTS par Roche Diagnostics, Meylan, France. L'eau oxygénée 10 volumes provient de Gifrer, Décines, France. Le NaCl, le glycérol, le polyacrylamide, le CaCl₂, le H₂SO₄, l'acétone, le liquide Aquatex[®] et les lames en verre *Superfrost Gold* sont fournis par VWR, Strasbourg, France. Le chloroforme et le méthanol proviennent de SDS, Paris, France. La colonne de protéine A provient de GE Healthcare, Uppsala, Suède, le 2-mercaptoéthanol de Promega, Charbonnières, France et le bleu de Coomassie R250 de Quantum, Wixon, USA.

La solution radioactive de Na₂⁵¹CrO4 est fournie par Perkin Elmer, Wellesley, USA.

1.4.1.2 Enzymes

La *Taq polymerase* est fournie par Invitrogen Life Technologies. La T4 *DNA ligase*, la CIP et les enzymes de restriction *BamH* I, *Xho* I, *Nhe* I et *Xba* I sont fournies par New England Biolabs.

1.4.1.3 Souche bactérienne

La souche bactérienne E. coli XL1 Blue est fournie par Stratagene, La Jolla, USA.

1.4.1.4 Anticorps secondaires

Les fragments $F(ab')_2$ d'anticorps de chèvre biotinylés anti-IgG humaines (BIOT-GAH) et anti-IgG de souris (BIOT-GAM), le complexe préformé streptavidine-peroxydase biotinylé, les fragments $F(ab')_2$ d'anticorps de chèvre marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, anti-IgG humaines (GAH-FITC) et anti-IgG de souris (GAM-FITC) et, enfin, les HRP-GAM, fragments $F(ab')_2$ d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris sont fournis par Jackson Immunoresearch, Soham, Royaume-Uni.

1.4.1.5 Cultures cellulaires

- Hybridome 60C3 : producteur d'AcM de souris, spécifiques du GD2 et du GD2 *O*acétylé (IgG3, κ) (Cerato et *al*. 1997).

- Hybridome 8B6_: producteur d'AcM de souris, spécifiques du GD2 *O*-acétylé (IgG3, κ) (Cerato et *al.* 1997).

- Hybridome 10B8_: producteur d'AcM de souris, spécifiques du GD2 (IgG3, κ).

- Clone 18B_: cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) transfectées sécrétant l'AcM chimérique KM60C3 spécifique du GD2 et du GD2 *O*-acétylé. Ce clone a été obtenu au laboratoire avant mon arrivée.

- Lignée CHO de cancer ovarien de hamster: obtenues gracieusement auprès du Dr. E. Scotet (INSERM U.601, Nantes, France).

- IMR32 : lignée de neuroblastome humain, obtenue auprès de l'ATCC (*American type culture collection*) et exprimant le GD2 et le GD2 O-acétylé.

- EL-4_: lignée de lymphome T murin, obtenue auprès de l'ATCC exprimant le GD2 et le GD2 *O*-acétylé.

- Neuro-2a : lignée de neuroblastome murin, obtenue auprès de l'ATCC n'exprimant ni le GD2 ni le GD2 *O*-acétylé.

- Cellules NK-CD16/ γ : cellules *Natural Killer* mutées de façon à ce qu'elles expriment un grand nombre de récepteurs au fragment Fc des anticorps, obtenues gracieusement auprès du Dr. H. Vié (INSERM U.601, Nantes, France).

Le milieu de culture utilisé pour les lignées d'hybridome et de neuroblastome est le RPMI 1640 avec 10 % de SVF décomplémenté (45 minutes à 56°C), 20 mM de L-glutamine, 10 UI/mL de pénicilline et 0,1 mg/mL de streptomycine. Le milieu utilisé pour la lignée EL-4 et les cellules CHO est le DMEM à 4,5 g/L de glucose auquel sont ajoutés les composants précédemment cités. Les lignées cellulaires sont cultivées en incubateur à 37°C, dans une atmosphère enrichie de 5% de CO_2 et avec 95% d'humidité.

1.4.1.6 Appareils

Le thermocycleur GeneAmp[®] *PCR System 2700* provient de Applied Biosystems, Foster City, USA. Le spectrophotomètre *Multiscan EX* est fourni par Thermo Electron Corporation, Waltham, USA, le Lambda 25 et le compteur à scintillation par Perkin Elmer, Beaconsfield, Royaume-Uni. Le cytomètre de flux FACScan provient de Becton-Dickinson. Le cryostat Leica CM 1900 et le microscope optique sont fournis par Leica, Wetzlar, Allemagne.

1.4.2 <u>Etude de la distribution tissulaire du GD2 et du GD2 O-acétylé dans des</u> <u>tissus humains</u>

1.4.2.1 Préparation des coupes de tissus congelés

Des échantillons tumoraux ont été acquis à partir d'exérèses chirurgicales et des échantillons de nerfs périphériques humains ont été prélevés sur le rameau sensitif distal du nerf musculo-cutané, branche latérale du nerf péronier. Il s'agit pour ces derniers, de prélèvements diagnostiques de neuropathie périphérique. Un fragment de tissus est prélevé et congelé dans de l'isopentane refroidi à la température de l'azote liquide. Au bout de 60 secondes, il est retiré et transféré dans un tube de congélation. À l'aide d'un cryostat Leica CM 1900, des coupes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur des lames en

verre *Superfrost Gold* puis séchées à température ambiante pendant 5 minutes et fixées dans de l'acétone pendant 10 minutes.

1.4.2.2 Analyse immunohistochimique

L'immunocoloration des échantillons tissulaires a été réalisée en utilisant les AcM de souris primaires suivants : l'AcM 10B8 (IgG3, κ) et l'AcM 8B6 (IgG3, κ). L'anticorps servant de témoin négatif est l'AcM anti-désoxyribonucléoprotéine MCA2063 (anti-DNP) (IgG3, κ) puisqu'il se fixe sur un constituant du noyau cellulaire (Serotec, Cergy Saint Christophe, France).

La révélation de la fixation des anticorps primaires est effectuée à l'aide du coffret *DakoCytomation Envision* + *Sytem*. Les coupes tissulaires sont d'abord réhydratées dans une solution de lavage pendant 10 mn. L'activité peroxydase endogène est bloquée par ajout de *Peroxydase Block* pendant 5 mn. Les lames sont alors rincées dans la solution de lavage puis recouvertes par une solution d'AcM primaire dilué à 5 µg/mL dans la solution *Antibody Diluent*. Après une incubation de 30 mn à température ambiante, les lames sont de nouveau rincées puis, couvertes, pendant 30 mn, d'une solution d'anticorps HRP-GAM diluée au 1/500^{ème} dans *Antibody Diluent*. Après rinçage, les lames sont couvertes de la solution de chromogène pendant 30 mn. La réaction de révélation est arrêtée par un bain d'eau distillée. Suit un marquage de contraste à l'hématoxyline pendant 5 mn qui est arrêté par immersion dans l'eau distillée. Enfin, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage aqueux Aquatex[®]. La recherche du marquage des tissus par les AcM anti-GD2 et anti-GD2 *O*-acétylé est faite à l'aide d'un microscope optique au grossissement 100 et 400.

1.4.3 Essais d'immunothérapie avec les AcM anti-GD2 sur un modèle animal

Le modèle animal utilisé est un modèle murin syngénique. En effet, ce sont des souris noires C57BL/6 auxquelles sont administrées des cellules tumorales EL-4 issues d'un lymphome T qui a été induit chimiquement, à l'origine, chez une souris C57BL/6 (Zhang *et al.,* 1998).

Trente-six souris élevées en animalerie agréée de niveau A1 ont reçu une injection sous-cutanée de 5×10^4 cellules EL-4, sous forme de suspension dans du PBS, à l'âge de 12 semaines. Quatre lots de neuf souris ont été constitués selon l'injection intra-veineuse reçue 24 et 72 heures après l'injection des cellules EL-4. Les souris du lot A ont reçu 100 µL de solution de PBS, celles du lot B 100 µg/100µL d'un AcM murin d'isotype IgG1, κ antiantigène carcino-embryonnaire (ACE) (Le Doussal *et al.*, 1993), celles du lot C 100

 μ g/100 μ L d'AcM 60C3 et enfin, celles du lot D 100 μ g/100 μ L d'AcM KM60C3. L'apparition ou non de tumeurs a été vérifiée tous les deux jours.

Pour cette expérience, les souris ont été sacrifiés dès que leur tumeur dépassait 3000 mm^3 . Ce volume a été estimé grâce à la formule suivante (Zeng *et al.,* 1999) : volume (mm³) = longueur (mm) x largeur² (mm) x 0,5.

L'évaluation statistique des délais moyens d'apparition des tumeurs a été réalisée à l'aide du logiciel SAS (*statistical analysis system*) version 9.1 qui a permis une analyse non paramétrique des variances.

1.4.4 Etude de l'effet proapoptotique des AcM 60C3 et KM60C3

Les cellules EL-4 sont incubées avec les AcM 60C3 et KM60C3 selon une gamme de temps et de concentration puis elles sont lavées et fixées avec une solution à 4% de paraformaldéhyde pendant 15 minutes. Le rituximab est utilisé en tant que témoin négatif. Elles sont ensuite colorées avec le colorant vital Hoechst 33342 (qui se fixe sur les molécules d'ADN) pendant 30 minutes à 25°C et montées sur lames pour être lues au microscope à fluorescence Leica de façon à observer la présence de corps apoptotiques.

1.4.5 <u>Construction du vecteur d'expression de la chaîne légère de l'AcM</u> <u>chimérique KM8B6</u>

Le vecteur d'expression utilisé pour la chaîne légère est le pcDNA3[®]KM60C3-L qui contient les segments géniques codant pour la région variable de l'AcM KM60C3 et pour la région constante C,κ humaine.

1.4.5.1 <u>Amplification génique du segment L-VL de l'AcM KM8B6 (8B6-L-VL) avec</u> addition de sites de restriction

Le segment génique 8B6-L-VL est amplifié de façon exponentielle par la technique de PCR, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques dont les séquences sont les suivantes : 5'-*BamH* I 8B6-L-VL aag gga tcc gcc acc atg aag ttg cct gtt et 3'-*Xho* I 8B6-L-VL ccg ttt tat ctc gag ctt ggt ccc. L'enzyme utilisée est une polymérase ADN dépendante thermorésistante : la *Taq polymerase*. La réaction se déroule dans un thermocycleur GeneAmp[®] *PCR System 2700* sur 25 cycles dont chacun comporte 3 étapes : la dénaturation de 45 secondes à 94°C, l'hybridation de 45 secondes à 55°C et l'élongation de 1 minute à 72°C. Le milieu réactionnel a la composition suivante :

dNTP (10 mM)	1	μL
Taq polymerase	5	UI
solution tampon de PCR (10 X)	5	μL
ADNc 8B6-L-VL	1	μL
MgCl ₂ (25 mM)	3	μL
amorce 3' (10 µM)	1	μL
amorce 5' (10 µM)	1	μL
eau stérile qsp	50	μL.

Les amorces choisies introduisent des mutations silencieuses permettant l'ajout de sites de restriction sans modifier la séquence en acides aminés de 8B6-L-VL. En 5' de 8B6-L-VL se trouve le site de restriction pour l'enzyme *BamH* I (gga tcc) et en 3' celui de l'enzyme *Xho* I (ctc gag).

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/mL). La migration est effectuée à 100 V pendant 15 minutes. Le marqueur de poids moléculaires est le *1 Kb Plus DNA Ladder*. Cette électrophorèse permet l'extraction et la purification des produits de PCR à l'aide du coffret *QIAquick Gel Extraction*. La pureté des produits purifiés est alors contrôlée par une nouvelle électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

1.4.5.2 Digestion du fragment 8B6-L-VL et du vecteur pcDNA3[®] KM60C3-L purifiés par les enzymes de restriction BamH I et Xho I

Le vecteur pcDNA3[®]KM60C3-L, préparé au laboratoire antérieurement, est digéré par les enzymes de restriction *BamH* I et *Xho* I afin de libérer le fragment L-VL de l'AcM KM60C3 tout en conservant la partie constante C, κ humaine. Le vecteur obtenu est alors renommé comme suit : pcDNA3[®] Hu-C κ . Ces enzymes permettent aussi d'obtenir un fragment 8B6-L-VL à bouts cohésifs en vue de la réaction de ligature. La digestion enzymatique se déroule sur deux heures dans un bain-marie à 37°C et selon les conditions suivantes :

tampon de digestion NEB2 (10 X)	5	μL
BSA (100 X)	0,5	μL
BamHI	10	UI
Xho I	10	UI
vecteur ou ADNc 8B6-L-VL	1	μg
eau stérile qsp	50	μL.

Le vecteur digéré est ensuite déphosphorylé par l'action de phosphatase d'intestin de veau (CIP) au bain-marie à 37°C pendant deux heures. La composition du milieu de réaction est la suivante :

tampon NEB 3 (10 X)	5	μL
CIP	10	UI
eau stérile qsp	50	μL.

Le vecteur digéré et déphosphorylé pcDNA3[®] hu-Cκ, ainsi que le 8B6-L-VL digéré, sont purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % à l'aide du coffret *QIAquick Gel Extraction*.

1.4.5.3 <u>Réaction de ligature du fragment 8B6-L-VL dans le vecteur d'expression</u> <u>pcDNA3[®]Hu-C κ </u>

La réaction de ligature permet l'insertion, grâce à l'enzyme T4 *DNA ligase*, de l'ADNc codant pour la région 8B6-L-VL dans le vecteur ouvert et déphosphorylé pcDNA3[®] hu-C κ . La réaction se déroule sur 16 heures au bain-marie à 16°C dans le milieu suivant :

solution tampon de ligature (10 X)	2	μL
vecteur digéré déphosphorylé	100	ng,
T4 DNA ligase	400	UI,
ADNc 8B6-L-VL digéré	23	ng
eau stérile qsp	20	μL.

Le produit de ligature est alors nommé pcDNA 3[®] KM8B6-L. Le rapport molaire insert/vecteur était de 3/1.

1.4.5.4 Transformation de bactéries électro-compétentes par pcDNA3[®] KM8B6-L

Avant transformation des bactéries électro-compétentes *E. coli* XL1 blue, le produit de ligature pcDNA3[®] KM8B6-L est précipité par l'éthanol en présence de glycogène et d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 afin d'éliminer les sels présents dans le milieu réactionnel. Le culot d'ADN précipité est repris dans 20 μ L d'eau distillée et déminéralisée. Ensuite, 2 μ L du produit de ligature sont ajoutés à 40 μ L de suspension de bactéries électro-compétentes décongelées sur la glace. Puis les bactéries sont transférées dans des cuves à électrotransformation pour y subir un choc électrique de 25 kV durant quelques millisecondes. La suspension bactérienne est reprise immédiatement dans 1 mL de milieu

2xTY et placée dans une étuve à 37°C et sous agitation pendant 1 heure à 200 rotations par minute (rpm).

À la suite de cette incubation, les suspensions bactériennes sont ensemencées dans des boîtes de Petri contenant du milieu 2xTY. Le milieu est sélectif car il contient 100 µg/mL d'ampicilline et 12,5 µg/mL de tétracycline. Les colonies résistantes transformées apparaissent après une nuit d'incubation en étuve à 37°C.

1.4.5.5 Criblage par PCR des clones bactériens transformés

Des colonies isolées sont déposées stérilement, à l'aide d'une micro-pipette et d'un cône de prélèvement, dans des tubes contenant le milieu réactionnel de PCR suivant :

dNTP (10 mM)	2	μL
Taq polymerase	10	UI
solution tampon de PCR (10 X)	5	μL
MgCl ₂ (25 mM)	6	μL
amorce 3' (10 µM)	2	μL
amorce 5' (10 μM)	2	μL
eau stérile qsp	50	μL

La PCR est réalisée dans le thermocycleur GeneAmp[®] *PCR System 2700* pendant 30 cycles aux mêmes conditions que dans le § 1.4.5.1. La taille des produits de PCR est contrôlée par analyse électrophorétique (cf § 1.4.5.1).

Par ailleurs, chaque cône de prélèvement a été placé dans 5 mL de milieu liquide sélectif LB (ampicilline, 100 μ g/mL et tétracycline, 12,5 μ g/mL) à 37°C pendant 12 heures et sous agitation (300 rpm).

1.4.5.6 Production du plasmide d'intérêt pcDNA3[®] KM8B6-L et séquençage

Une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée sur les dilutions dans le milieu LB des clones révélés positifs au criblage par PCR à l'aide du coffret *QiaPrep Spin Miniprep*.

La séquence en acides nucléiques du plasmide pcDNA3[®] KM8B6-L a été déterminée par la société GENOME Express (Meylan, France).

1.4.6 <u>Construction du vecteur d'expression de la chaîne lourde de l'AcM</u> <u>chimérique KM8B6</u>

Le gène codant pour la chaîne lourde chimérique de l'AcM KM8B6 a été construit à partir du vecteur de clonage pBluescript[®] II SK (+) KM60C3-H. Ce dernier contient les ADNc codant pour la région constante humaine d'isotype C γ 1 et pour la région L-VH de l'AcM de souris 60C3.

1.4.6.1 <u>Amplification génique du segment L-VH de KM8B6 (8B6-L-VH) avec addition</u> <u>de sites de restriction</u>

Le segment d'ADNc codant pour la région 8B6-L-VH, obtenu au laboratoire antérieurement, est amplifié par PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques permettant l'ajout des sites de restriction *BamH* I et *Nhe* I, comme décrit au § 1.4.5.1. Les séquences des amorces sont les suivantes : 5'-*BamH* I 8B6-L-VH ccg tcg gat ccg gcc acc atg aag ttg tgg et 3'-*Nhe* I 8B6-L-VH ccg ggt gct agc tga gga gac tgt. Le site de restriction de Nhe I est gct agc.

Une analyse électrophorétique sur gel d'agarose 1% selon les conditions énoncées au § 1.4.5.1 permet l'extraction et la purification de ces produits de PCR.

1.4.6.2 Digestion du fragment 8B6-L-VH et du vecteur de clonage pBluescript[®] II SK (+) KM60C3-H purifiés par les enzymes de restriction *BamH* I et *Nhe* I

L'utilisation des enzymes de restriction *BamH* I et *Nhe* I dans les conditions décrites au § 1.4.5.2 permet de libérer le fragment d'ADNc qui code pour la région L-VH de l'AcM de souris 60C3 tout en conservant celui codant pour la région constante C_γ1 humaine.

Le vecteur digéré et déphosphorylé, ainsi que le segment d'ADNc digéré codant pour la région 8B6-L-VH, sont purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (cf §1.4.5.2.). Le vecteur est alors renommé pBluescript[®] II SK (+) Hu-Cγ.

1.4.6.3 Obtention du vecteur de clonage pBluescript[®] II SK (+) KM8B6-H

Une réaction de ligature est réalisée entre le segment d'ADNc 8B6-L-VH et le vecteur pBluescript[®] II SK (+) Hu-C γ dans les conditions du § 1.4.5.3. Des bactéries électrocompétentes *E. coli* XL1 Blue sont transformées (cf § 1.4.5.4) par le produit de la réaction de ligature pBluescript[®] II SK (+) KM8B6-H après élimination des sels par précipitation à l'éthanol. Les bactéries transformées sont étalées sur du milieu 2xTY sélectif. Après 12 heures d'incubation à 37°C, les clones résistants sont criblés par PCR (cf § 1.4.5.5) pour rechercher la présence du vecteur. Un clone positif est utilisé pour produire le plasmide d'intérêt par minipréparation (cf § 1.4.5.6). Enfin la séquence du plasmide pBluescript[®] II SK (+) KM8B6-H est déterminée par la société GENOME Express.

1.4.6.4 <u>Digestion du vecteur de clonage pBluescript[®] II SK (+) KM8B6-H et du</u> <u>vecteur d'expression pcDNA3.1/Hygro[®] par les enzymes de restriction *BamH* <u>I et Xba I</u></u>

Les réactions de digestion sont réalisées selon les conditions décrites dans le § 1.4.5.2 à l'aide des enzymes *BamH* I et *Xba* I. Ainsi, le vecteur d'expression pcDNA3.1/Hygro[®] est ouvert puis purifié après électrophorèse sur gel d'agarose 1% à l'aide du coffret *QIAquick Gel Extraction* (cf § 1.4.5.2). Il s'ensuit une déphosphorylation par la CIP (cf § 1.4.5.2). Par ailleurs, la chaîne chimérique lourde de l'AcM KM8B6 est libérée du vecteur de clonage pBluescript[®] II SK (+) KM8B6-H puis est purifiée à l'aide du coffret sus-nommé.

1.4.6.5 Obtention du vecteur d'expression pcDNA3.1/Hygro[©] KM8B6-H

Une réaction de ligature est effectuée entre la chaîne chimérique lourde purifiée et le vecteur pcDNA3.1/Hygro[©] digéré, déphosphorylé et purifié, selon le protocole décrit au § 1.4.5.3. Le produit de la réaction de ligature sert à transformer des bactéries *E. coli* XL1 Blue (cf § 1.4.5.4). La recherche de l'insert codant pour la chaîne chimérique lourde de l'AcM KM8B6 est faite sur les colonies transformées résistantes à l'ampicilline et à la tétracycline, par PCR, comme expliqué au § 1.4.5.5. Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (cf § 1.4.5.1). Une minipréparation de plasmide est réalisée sur la dilution du clone bactérien possédant le plasmide recombinant

pcDNA3.1/Hygro[©] KM8B6-H à l'aide du coffret *QiaPrep Spin Miniprep*. La chaîne lourde chimérique est alors séquencée par la société GENOME Express.

1.4.7 <u>Transfection de cellules CHO par les vecteurs d'expression codant pour</u> les chaînes légères et lourdes de l'AcM KM8B6

Les cellules CHO ont été utilisées comme cellules hôtes pour exprimer et sécréter l'AcM chimérique KM8B6, anti GD2 et GD2 *O*-acétylé. Pour cela, elles ont été cotransfectées par les vecteurs d'expression respectifs des chaînes légères et lourdes de cet anticorps : pcDNA3[®]KM8B6-L et pcDNA3.1/Hygro[®]KM8B6-H, à l'aide du coffret PolyFect[®].

Les cellules transfectées stables ont alors été sélectionnées pour leur résistance à la généticine[®] et à l'hygromycine B[®], cette propriété étant acquise par les plasmides transfectés.

1.4.8 Criblage des cellules CHO transfectées sélectionnées

Les cellules CHO transfectées double résistantes sont tout d'abord clonées par la technique des dilutions limitantes dans des plaques stériles 96 puits Microtest[®], à fond plat, contenant 200 µL de milieu de culture sélectif.

Ensuite, le surnageant des puits est analysé par test immunoenzymatique (ELISA indirecte) afin d'identifier les clones producteurs de l'AcM KM8B6 (figure 13). Avant de réaliser le test ELISA, des cellules IMR32 ont été déposées dans des plaques de microtitration Maxisorp[®] 96 puits, à fond plat puis soumises à une dessication de 24 heures en étuve à 37°C. Chaque puits contient 10⁵ cellules déposées dans 50 µL de tampon PBS. La surface des puits est alors saturée par 200 µL d'une solution de PBS contenant 1% de BSA, pendant une heure sous agitation lente et à température ambiante. Ce milieu d'incubation est éliminé par un retournement rapide de la plaque et les surnageants sont ajoutés, en double, à raison de 100 µL par puits et laissés pendant deux heures sous agitation lente. Après trois lavages avec une solution de PBS, 100 µL par puits d'un anticorps secondaire, BIOT-GAH, dilué au 1/4000^{ème} dans PBS-BSA 0,1 % sont déposés. Après trois lavages en PBS, l'étape suivante est l'ajout de 100 µL par puits de complexe préformé streptavidine-peroxydase biotinylé dilué au 1/4000^{ème} dans PBS-BSA 0,1% et laissé pendant une heure sous agitation lente. Après trois nouveaux lavages, la fixation de l'AcM à sa cible gangliosidique est révélée après dépôt de 100 µL par puits d'une solution contenant le substrat de la peroxydase, l'ABTS. L'intensité de la réaction colorée est lue au spectrophotomètre *Multiscan EX* à 405 nm et permet d'identifier les clones producteurs de l'AcM KM8B6 anti-GD2 *O*-acétylé.



Figure 13. Schéma illustrant le principe du test immunologique ELISA indirect.

La culture des clones ayant donné le signal de détection le plus élévé est ensuite étudiée sur 9 jours. Les cellules sont donc dénombrées et un mL de surnageant est prélévé. La concentration en AcM chimérique des échantillons de surnageant est déterminée par test immunoenzymatique ELISA sur cellules IMR32 dessiquées, selon le protocole ci-dessus.

1.4.9 Purification des différents AcM produits

1.4.9.1 <u>Purification des AcM anti-gangliosides par chromatographie d'affinité sur</u> protéine A

Les différents AcM ont été purifiés à partir des surnageants de culture des hybridomes 8B6 et 60C3, du clone CHO 18B (KM60C3) et du clone CHO producteur de l'AcM KM8B6. Pour chaque type cellulaire, environ deux litres de surnageant sont récoltés et purifiés.

La colonne de protéine A est tout d'abord équilibrée par un tampon 0,1 M Tris-HCl pH 7,8. Le surnageant est déposé sur la colonne à un débit de 1mL/mn. Ensuite la colonne est lavée par 10 volumes de tampon d'équilibration, puis les AcM fixés aux protéines A par leur fragment Fc sont élués par une solution tampon acide pH 3 : 0,1 M glycine 0,2 M NaCl pour les AcM de souris, et 0,1 M citrate de sodium pour les AcM chimériques. L'éluat est récolté par fractions de 800 µL immédiatement neutralisées par 200 µL de 1 M Tris-HCl pH 9. La DO de chaque fraction est lue au spectrophotomètre Lambda 25 à 280 nm et les fractions présentant une DO positive sont rassemblées pour être dialysées dans une solution de PBS 0,3 M NaCl pH 7,4 pour les AcM de souris et de PBS pour les AcM chimériques. La concentration en AcM est alors déterminée par lecture de la DO à 280 nm.

1.4.9.2 Contrôle de qualité des AcM purifiés

Les AcM purifiés sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes réductrices et non réductrices selon la technique de Laemmli (Laemmli, 1970). Des échantillons de 3 µg sont repris en tampon 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 contenant 10 % de glycérol. Cinq % de 2-mercaptoéthanol sont ajoutés en conditions réductrices. Après 2 mn d'ébullition, les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur ayant pour les gels supérieur et inférieur des concentrations respectives en polyacrylamide de 4,5 % et 6 %, en conditions non réductrices et 4,5 % et 12 %, en conditions réductrices. Après électrophorèse à 100 V pendant 2 heures à température ambiante, les gels sont fixés et colorés au bleu de Coomassie R250. Les masses moléculaires sont estimées à partir de la migration de marqueurs de poids moléculaires *Precision Plus Protein*TM *Standard*.

1.4.10 Extraction des gangliosides de tissus tumoraux

Les gangliosides ont été extraits des tumeurs obtenues chez la souris après injection de cellules IMR32 selon la technique décrite par Ariga et al. (1991). L'échantillon de tissu tumoral est broyé dans 10 volumes d'un mélange chloroforme/méthanol (C:M) (1:1, v/v) et laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Après filtration, le résidu est repris dans 2,5 volumes du même mélange puis évaporé sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 40°C. Le résidu sec est dissous dans un mélange chloroforme/méthanol/eau (30:60:8, v/v/v) appelé solvant A. L'extrait est alors déposé sur une colonne échangeuse d'anions DEAE-Sephadex A-25. Les lipides neutres sont éliminés par 15 mL de solvant A alors que les molécules chargées (gangliosides et sels) sont éluées avec 15 mL de méthanol 0,4 M d'acétate de sodium. Trente mL de PBS pH 7,4 sont ajoutés à l'éluat pour dessalage sur une colonne C18 en phase inverse selon la méthode de Williams et McCluer, 1980. Le gel de C18 est d'abord conditionné par 2 volumes de colonne de méthanol puis du mélange méthanol/PBS (1:2, v/v). L'extrait à dessaler est alors déposé sur la colonne et les sels sont éliminés par 2 volumes d'eau distillée. Les gangliosides sont enfin élués par 1 volume de méthanol suivi d'1 volume de C :M (2:1, v/v), puis concentrés dans environ 2 mL de C:M (2:1, v/v).

1.4.11 Etude de la spécificité des AcM purifiés

1.4.11.1 <u>Sur des cellules dessiquées</u>

Des gammes de dilutions successives au demi, dans une solution de PBS-BSA 0,1%, sont réalisées pour chaque AcM purifié (60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6), avec pour concentration initiale 2 μ g/mL. Puis un test immunoenzymatique ELISA sur cellules dessiquées IMR32 et Neuro-2a, est effectué selon le protocole décrit au § 1.4.8. Cependant, l'anticorps secondaire utilisé pour la détection des AcM de souris 8B6 et 60C3 purifiés est le BIOT-GAM dilué au 1/4000^{ème} dans PBS-BSA 0,1%.

1.4.11.2 <u>Sur cellules vivantes</u>

Les cellules IMR32 et Neuro-2a, sont d'abord lavées par une solution de PBS-BSA 1 % puis incubées 30 minutes à + 4°C avec un AcM purifié (60C3, KM60C3, 8B6 ou KM8B6) à la concentration de 10 μ g/mL. Après un nouveau lavage, les cellules sont incubées 30 mn à +4°C avec les GAM-FITC ou les GAH-FITC dilués au 1/100^{ème} dans PBS-BSA 0,1%.

Les cellules subissent un dernier lavage et 10⁴ d'entre elles sont analysées à l'aide d'un cytomètre de flux FACScan dans une fenêtre SSC/FL1-H après exclusion des cellules mortes et des débris cellulaires. Les cellules sont déclarées positives si elles présentent une fluorescence supérieure à 1 log après ajustement du niveau de base à l'aide de témoins marqués non spécifiquement par l'anticorps secondaire seul.

1.4.11.3 Par immunofixation sur extrait total de gangliosides tumoraux

Une chromatographie sur couche mince (HPTLC) est réalisée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice. Des gangliosides issus des tumeurs IMR32 y sont déposés (5 μ L par dépôt) et migrent 20 minutes à température ambiante dans une cuve saturée en solution de chloroforme/méthanol/CaCl₂ 0,22 % (60:35:8, v/v/v). Une révélation chimique des différentes espèces gangliosidiques est effectuée par vaporisation de réactif à l'orcinol/H₂SO₄ (0,4 % orcinol dans eau, m/v) (20%, v/v) qui fait apparaître des bandes colorées. Un extrait gangliosique de cerveau de rat est utilisé comme standard et permet d'identifier les gangliosides selon leur mobilité. Par ailleurs, afin de vérifier la présence d'espèces *O*-acétylées alcali-labiles, 500 μ L des extraits totaux de gangliosides IMR32 sont traités par 500 μ L d'une solution d'ammoniaque 2 M. Au bout de 12 heures d'incubation à température ambiante, cette solution est évaporée sous un courant d'azote et le résidu sec est repris dans 500 μ L de C:M (2:1, v/v).

Les plaques de silice sont ensuite immergées une minute dans une solution d'hexane contenant 0,01 % de poly-(isobutyl)-méthacrylate à propriétés plastifiantes. Après séchage, les plaques sont immergées dans une solution de PBS-BSA 1 % pendant une heure sous agitation lente et à température ambiante pour saturer les interactions non spécifiques. Les plaques sont ensuite immergées, pendant une nuit à + 4°C, dans les solutions à 1 µg/mL d'AcM purifiés 60C3, KM60C3, 8B6 ou KM8B6. Après lavage au PBS, les anticorps secondaires BIOT-GAH et BIOT-GAM dilués au 1/2000^{ème} dans PBS-BSA 0,1 % sont ajoutés (100 µL/puits) et laissés à incuber pendant une heure. Après trois lavages au PBS, le complexe préformé streptavidine-peroxydase biotinylé dilué au 1/2000^{ème} dans PBS-BSA

0,1% est ajouté et laissé à incuber pendant une heure. Après trois derniers lavages, la révélation de la fixation des AcM aux gangliosides se fait ensuite par ajout d'une solution de 4-chloro-1-naphtol préparée extemporanément à raison de 1 mg de ce produit dissous dans 1 ml de méthanol, repris dans 20 mL de PBS et additionné de 180 µL d'eau oxygénée 10 volumes.

1.4.12 <u>Etude in vitro de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des</u> <u>anticorps (ADCC)</u>

Les cellules cancéreuses IMR32 sont marquées au ⁵¹Cr par incubation d'une heure à 37°C dans une solution de chromate de sodium (Na₂⁵¹CrO₄). Après 3 lavages avec du milieu de culture, les cellules marquées sont aliquotées dans des plaques 96 puits à fond conique à raison de 3000 cellules / 25 μ L. Puis elles sont incubées quatre heures à 37°C en présence des AcM produits (60C3, KM60C3) ou du rituximab (IgG1, anti-CD20) qui sert de témoin négatif. Les cellules NK effectrices sont ajoutées en une gamme de ratios E / T (effector / target) différents (50 μ L / puits). Après centrifugation, la radioactivité du ⁵¹Cr libéré suite à la lyse des cellules est mesurée et permet de calculer le pourcentage de lyse cellulaire en fonction de la concentration en anticorps.

* * *

1.5 RESULTATS

1.5.1 <u>Etude de la distribution tissulaire du GD2 O-acétylé dans le système</u> <u>nerveux et sur des tissus tumoraux humains</u>

L'immunoréactivité de l'anticorps de souris 8B6 sur des tissus humains de nerfs périphériques et de tumeurs neuroectodermiques (glioblastome, neuroblastome, mélanome et cancer pulmonaire à petite cellules) a été analysée par immunohistochimie. L'AcM de souris 10B8 spécifique du GD2 (Cerato *et al.*, 1997) a été utilisé comme témoin positif et un AcM IgG3 anti-DNP comme témoin négatif. Les résultats obtenus en immunohistochimie sont présentés sur la figure 14.

1.5.1.1 Dans des tissus tumoraux

Trois échantillons de neuroblastome, provenant de patients différents, ont présenté un marquage positif avec l'AcM 10B8 (IgG3, κ) spécifique du GD2, et avec l'AcM 8B6 (IgG3, κ) spécifique du ganglioside GD2 *O*-acétylé. L'AcM 8B6 se fixe sur les cellules de neuroblastome (figure 14A-3) tout comme l'AcM 10B8 (figure 14A-2). Dans les deux cas, le marquage est de type cytoplasmique et membranaire tandis que les cellules saines adjacentes demeurent négatives. Le même type de marquage a été retrouvé sur trois échantillons de glioblastome provenant de trois patients différents, sur un prélèvement de cancer pulmonaire à petites cellules sur trois analysés, et un échantillon de mélanome sur trois analysés. Aucun marquage n'a été détecté avec l'AcM MCA2063 (IgG3, κ) anti-DNP (figure 14A-1).

1.5.1.2 Au niveau des nerfs périphériques

Les dix échantillons de nerfs examinés présentent un marquage au niveau d'internodes de fibres myélinisées observé avec l'AcM 10B8 (figure 14B-2) alors que les axones et les fibroblastes ne présentent pas de marquage. Ce marquage n'est pas retrouvé ou est très fin avec l'AcM 8B6 (figure 14B-3). Aucun marquage n'est mis en évidence avec l'AcM MCA2063 anti-DNP (figure 14B-1) utilisé comme témoin isotypique.



Figure 14. Etude de la distribution cellulaire du GD2 *O*-acétylé par analyse immunohistochimique de neuroblastome et de nerfs périphériques humains. Colonne A : neuroblastome humain, colonne B : nerf périphérique humain ; ligne 1 : AcM MCA2063 anti-DNP, ligne 2 : AcM 10B8 spécifique du GD2, ligne 3 : AcM 8B6 anti-GD2 *O*-acétylé.

1.5.2 <u>Activité anti-tumorale de l'AcM KM60C3 dans un modèle syngénique de</u> <u>lymphome murin</u>

L'activité anti-tumorale des anticorps 60C3 et KM60C3 a été déterminée dans le modèle de greffe sous-cutanée syngénique du lymphome T murin EL-4 chez la souris C57BL/6 (Zhang *et al.,* 1998).

1.5.2.1 <u>Analyse du délai d'apparition de tumeurs après injection des AcM 60C3 et</u> <u>KM60C3</u>

Après injection de $5x10^4$ cellules de lymphome T murin EL-4, par voie sous-cutanée, à 36 souris C57BL/6, le délai d'apparition de tumeurs a été surveillé pour chaque souris de chaque lot (figure 15). Le lot A qui a reçu 100 µL de PBS, par voie intra-veineuse 24 et 72 heures après l'injection des cellules tumorales, correspond au lot témoin non traité. Les souris du lot B ont reçu l'AcM anti-ACE (appelé F6), les souris du lot C l'AcM 60C3 et les souris du lot D l'AcM KM60C3. Le délai moyen d'apparition des tumeurs des lots A (12,9 jours) et B (12,6 jours) est plus court et que celui des lots C (20,6 jours) et D (28 jours) mais la différence n'est significative qu'avec le délai moyen du lot D (p<0,0005). Par ailleurs, la différence n'est pas significative entre les délais moyens d'apparition pour les lots C et D.



Figure 15. Délais moyens d'apparition des tumeurs pour les souris C57BL/6 greffées avec des cellules EL-4. Lot ayant reçu 200 µL de PBS en IV (A), 200 µg d'AcM F6 (B), 200 µg d'AcM 60C3 (C) et 200 µg d'AcM KM60C3 (D). (n= 9 souris par lot).

1.5.2.2 Analyse de la survie après injection des anticorps 60C3 et KM60C3

Trente et un jours après l'injection de cellules EL-4, 100 % des souris des lots A, B et C sont mortes contre 78 % des souris du lot D. De plus, les 22 % de souris vivantes du lot D le resteront jusqu'au 90^{ème} jour, date de la fin de l'étude. L'injection d'AcM KM60C3, anti-GD2, présente donc un effet bénéfique sur la survie des souris (figure 16).



Figure 16. Courbes de Kaplan Meyer des quatre lots de souris C57BL/6 greffées avec 5x10⁴ cellules tumorales EL-4.

1.5.3 Etude de l'effet proapoptotique des AcM 60C3 et KM60C3

Pour savoir si l'inhibition de la croissance tumorale est due à un effet proapoptotique de l'AcM chimérique KM60C3 plutôt qu'à sa capacité de reconnaissance de l'antigène et d'activation du complément et/ou des cellules immunitaires, deux expériences ont été réalisées. Après fixation sur lames de cellules EL-4 mises en contact avec les AcM 60C3, KM60C3 et rituximab, l'observation par microscopie électronique de ces cellules est faite. Il apparaît que les AcM induisent l'apoptose en fonction du temps et de la concentration en anticorps (figure 17). Au bout de 24 heures de contact, 27% des cellules traitées avec 200 µg/mL de 60C3 sont en apoptose (p<0,001 versus rituximab). Un traitement des cellules avec 200 µg/mL de KM60C3 induit moins de mort cellulaire puisque des corps apoptotiques sont retrouvés pour seulement 10% des cellules (p=0,054 versus 60C3 et p<0,001 versus rituximab).



Figure 17. Représentation de l'effet apoptotique des AcM sur les cellules tumorales EL-4, en fonction du temps (A) et de la concentration en anticorps (B). En bleu, l'AcM 60C3, en rouge l'AcM KM60C3 et en jaune, l'AcM rituximab.

Ces résultats indiquent que l'anticorps de souris 60C3 est assez efficace dans l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses exprimant le GD2 par un effet proapoptotique sur ces cellules. L'anticorps chimérique KM60C3 est, quant à lui, moins puissant dans l'induction de cette apoptose.

* * *

1.5.4 <u>Assemblage des gènes chimériques codant pour l'AcM KM8B6</u> <u>spécifique du ganglioside GD2 O-acétylé</u>

L'AcM chimérique KM8B6 a été obtenu par assemblage des régions variables VH et VL de l'anticorps de souris 8B6, associées à leur peptide signal respectif, aux régions constantes d'une IgG1, κ humaine. Avant ces opérations, nous avons d'abord déterminé les séquences nucléotidiques et en acide aminés de ces différents ADNc (Tableau II). Le segment génique V de la région variable de la chaîne lourde de l'AcM 8B6 appartient à la famille S107 (Brodeur and Riblet, 1986 ; Cerato *et al.*, 1997). Le segment V de la région variable de la chaîne le segment J à la famille J κ 2 (Strohal *et al.*, 1989 ; Cerato *et al.*, 1997).

L'ADNc de la chaîne chimérique légère a été construit en associant l'ADNc qui code pour la région variable de la chaîne légère de l'AcM murin 8B6 et pour le peptide signal correspondant, à l'ADNc qui code pour la région constante d'IgG1 humaine, en utilisant des amorces qui introduisent les sites de restriction enzymatique *BamH* I et *Xho* I sans modifier le cadre de lecture (figure 18A). Il est ensuite introduit dans le vecteur d'expression pcDNA3[®]KM60C3-L qui comporte le promoteur du gène précoce du cytomégalovirus humain pour l'expression de la chaîne chimérique légère et un gène de résistance à généticine[®] nécessaire à la sélection de clones cellulaires transfectés stables (figure 19).

L'ADNc de la chaîne chimérique lourde a été obtenu en associant l'ADNc qui code pour la région variable de la chaîne lourde de l'AcM murin 8B6 et pour le peptide signal correspondant, à l'ADNc qui code pour la région constante d'IgG1 γ humaines, en utilisant des amorces qui introduisent les sites de restriction enzymatique *BamH* I et *Nhe* I sans modifier le cadre de lecture (Figure 18B et C). Compte tenu de l'existence d'un site de restriction enzymatique *Nhe* I dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/Hygro[®], nous avons choisi d'assembler l'ADNc de la chaîne lourde chimérique dans le vecteur de clonage pBluescript II SK (+) KM60C3-H qui contient l'ADNc codant la région constante humaine d'isotype γ 1 (figure 20). Le segment génique de la chaîne chimérique lourde KM8B6-H a donc été finalement inséré dans vecteur d'expression pcDNA3.1/Hygro[®] qui possède le promoteur du gène précoce du cytomégalovirus humain pour l'expression de la chaîne chimérique lourde et un gène de résistance à l'hygromycine B[®] nécessaire à la sélection de clones cellulaires transfectés stables (figure 21). Tableau II. Séquence nucléotidique et en acides aminés de la chaîne légère (A) et de la chaîne lourde (B) de l'anticorps chimérique anti-GD2 O-acétylé KM8B6. En rouge, ce sont les séquences des peptides signaux ; en bleu, les séquences des régions déterminant la complémentarité (CDR) selon la nomenclature IMGT (Lefranc et al., 1989). Les séquences soulignées correspondent aux amorces utilisées pour les amplifications géniques par PCR. Les sites de restriction utilisés pour l'assemblage des ADNc codant pour les chaînes légères et lourdes sont en caractères gras.

Ban	'nΗΙ																				
GGA	TCC	GCC	ACC	-19 ATG	AAG	TTG	CCT	GTT	AGG	CTG	TTG	-11 GTG	CTG	ATG	TTC	TGG	ATT	ССТ	GGT	TCC	AGC
				М	K	L	Р	V	R	L	L	V	L	М	F	W	I	Ρ	G	S	S
				=>	Pept	ide si	gnal														
	1										11										21
AGT	GAT	GTT	GTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	GTC	AGT	CTT	GGA	GAT	CAA	GCC	TCA	ATC
S	D	V	V	Μ	Т	Q	Т	Ρ	L	S	L	Ρ	V	S	L	G	D	Q	A	S	I
	=>	Fran	newor	k regi	ion 1	(FR1))														
									31										41		
TCT	TGC	AGA	TCT	AGT	CAG	AGC	CTT	CTA	AAA	AAT	AAT	GGA	AAC	ACC	TTT	TTA	CAT	TGG	TAC	CTG	CAG
S	С	R	S	S	Q	S	L .	L	к	N	N	G	N	Т	F	L	H	W	Y	L	Q
					=>	Com	plem	entari	ty det	ermin	ing re	gion	1 (CL	PR 1)			=>	FR2			
			a a				51	~~~				~~~				~~~	61	~~~	~~~~		a. a
AAG	TCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CTC T	C.I.I.	ATC	TAC	AAA	GTT	TCC	AAC	CGA	C.II.	TCT	GGG	GTC	CCA	GAC
r.	ъ	G	Q	a	P	ĸ	Ц	Ц	T	T		v רסחר	5		R ED2	ы 2	5	G	v	P	D
											=> (JUNZ		=>	0.1)					
ACC	ጥጥር	лст	ccc	лст		TCA	CCC	707	ጥለጥ	ጥጥሮ	707	CTTC	77G	አምሮ	9T 8T	AGA	CTC	GAG	CCT	GNG	CAT
R	F	S	GGC	S	GGA	S	G00	т	v	F	т	T.	K	т	S	R	v	E	A	E	D
	-	2	0	5	0	5	0	-	-	-	-	-		-	5		•	-		-	Zho I
			91										101								1
CTG	GGA	GTT	TAT	TTC	TGC	TCT	CAA	AGT	ACA	CAT	ATT	CCG	TAC	ACA	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTC
L	G	v	Y	F	С	S	Q	s	т	н	I	Р	Y	т	F	G	G	G	Т	К	L
						=> (CDR :	3							=>	FR4					
	111										121										131
GAG	CTG	AAA	CGA	ACT	GTG	GCT	GCA	<u>C</u> CA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA
Е	L	К	R	Т	V	А	А	Ρ	S	V	F	I	F	Ρ	Ρ	S	D	Е	Q	L	ĸ
					=>	Cκ hι	umain														
									141										151		
TCT	GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	GCC	AAA	GTA	CAG	TGG
S	G	Т	А	S	V	V	С	L	L	Ν	Ν	F	Y	Ρ	R	Е	А	K	V	Q	W
							161										171				
AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	TCT	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	CAG	GAG	AGT	GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC
K	V	D	Ν	A	L	Q	S	G	Ν	S	Q	Е	S	V	Т	Е	Q	D	S	K	D
1 d d	100	m 2 <i>a</i>	100	ama	181	1 a a	1 00	ama	7 00	ата	100			ara	191	ara		ara		апа	mag
AGC	ACC	TAC	AGC	CTC T	AGC	AGC	ACC	C'I'G	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	TAC
5 201	T	T	G	Ц	5	5	1	Ц	T	ц 211	5	r.	A	D	T	Б	r.	л 219	r.	v	T
GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	САТ	CAG	GGC	СТС	AGC	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	AGC	ТТС	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT
A	C	E	v	Т	Н	Q	G	L	S	S	P	v	Т	ĸ	S	F	N	R	G	E	C
		Xba	I			~	-			-					-				-		
		1																			

TAA TCT AGA

*

(B)

E G	Baml GAT	HI r cc	G G	CC A	- CC A	20 TG A	AG T	TG T	<u>GG</u> C	TG A	AC T	GG A	TT T	-1 TC C	1 ГТ G	TA A	CA C'	FT T	TA A	AT G	GT T	TC C	AG T	1 GT G.	AG G	rg ai	AA C'	IG G'	TG GI	AG T	CT G	ga go	GA GO	1' GC T'	1 IG GI	IG CTG
					M 	к => Ре	L eptide	W signa	L al	N	W	I	F	L	V	Т	L	L 31	N	G	F	Q	C	E 	v FR1	K	L	V 41	E	S	G	G	G	L	V	L
C) P	CT (GGG G	GAT D	TCT S	CTG L	AGA R	CTC L	TCC S	TGT C	GCA A	ACT T	TCT S	GAG E =>	TTC F CDR	ACC T	TTC F	ACT T	GAT D	TAC Y	TAC Y	ATG M =>	ACT T FR2	TGG W	GTC V	CGC R	CAG Q	CCT P	CCA P	AGA R	AAG K	GCA A	CTT L	GAG E	TGG W	TTG L	GGT G
T' F	! FT 7 	51 \TT [=> (AGA R CDR2	AAC N	AGA R	GCT A	AAT N	GGT G	TAC Y	ACA T	ACA T	61 GAG E =>	TAC Y FR3	AAT N	CCA P	TCT S	GTG V	AAG K	GGT G	CGG R	TTC F	71 ACC T	ATT I	TCC S	AGA R	GAT D	AAT N	TCC S	CAA Q	AGC S	ATC I	81 CTC L	TAT Y	CTT L	CAA Q Nhe I	ATG M
A. N	AC Z	ACC F	CTG L	AGA R	ACT T	91 GAG E	GAC D	AGT S	GCC A	ACT T	TAT Y	TAC Y	TGT C	GCA A => (AGA R CDR3	101 GTC V	TCT S	AAC N	TGG W	GCC A	TTT F	GAC D	TAC Y	TGG W =>	GGC G FR4	111 CAA Q	GGC G	ACC T	ACT T	CTC L	<u>aca</u> T	GTC V	TCC S	TCA S	 GCT => /	121 <u>AGC</u> S Cγ 1 humain
<u>A</u> T	<u>CC</u> 4	AAG K	<u>GGC</u> G	CCA P	TCG S	GTC V	TTC F	<u>C</u> CC P	CTG L	131 GCA A	CCC P	TCC S	TCC S	AAG K	AGC S	ACC T	TCT S	GGG G	GGC G	141 ACA T	GCG A	GCC A	CTG L	GGC G	TGC C	CTG L	GTC V	AAG K	GAC D	151 ТАС Ү	TTC F	CCC P	GAA E	CCG P	GTG V	ACG T
G' V	IG 1	rcg 3	TGG W	161 AAC N	TCA S	GGC G	GCC A	CTG L	ACC T	AGC S	GGC G	GTG V	CAC H	171 ACC T	TTC F	CCG P	GCT A	GTC V	CTA L	CAG Q	TCC S	TCA S	AGA R	181 CTC L	TAC Y	TCC S	CTC L	AGC S	AGC S	GTG V	GTG V	ACC T	GTG V	191 CCC P	TCC S	AGC S
A(S	GC 1 I	rTG	GGC G	ACC T	CAG Q	ACC T	TAC Y	201 ATC I	TGC C	AAC N	GTG V	AAT N	CAC H	AAG K	CCC P	AGC S	AAC N	211 ACC T	AAG K	GTG V	GAC D	AAG K	AGA R	GTT V	GAG E	CCC P	AAA K	221 TCT S	TGT C	GAC D	AAA K	ACT T	CAC H	ACA T	TGC C	CCA P
C) P	CG 1	231 rgc 2	CCA P	GCA A	CCT P	GAA E	CTC L	CTG L	GGG G	GGA G	CCG P	241 TCA S	GTC V	TTC F	CTC L	TTC F	CCC P	CCA P	AAA K	CCC P	AAG K	251 GAC D	ACC T	CTC L	ATG M	ATC I	TCC S	CGG R	ACC T	CCT P	GAG E	261 GTC V	ACA T	TGC C	GTG V	GTG V
G' V	IG (I	GAC	GTG V	AGC S	CAC H	271 GAA E	GAC D	CCT P	GAG E	GTC V	AAG K	TTC F	AAC N	TGG W	TAC Y	281 GTG V	GAC D	GGC G	GTG V	GAG E	GTG V	CAT H	AAT N	GCC A	AAG K	291 ACA T	AAG K	CCG P	CGG R	GAG E	GAG E	CAG Q	TAC Y	AAC N	AGC S	301 ACG T
TZ Y	AC (CGT R	GTG V	GTC V	AGC S	GTC V	CTC L	ACC T	GTC V	311 CTG L	CAC H	CAG Q	GAC D	TGG W	CTG L	AAT N	GGC G	AAG K	GAG E	321 TAC Y	AAG K	TGC C	AAG K	GTC V	TCC S	AAC N	AAA K	GCC A	CTC L	331 CCA P	GCC A	CCC P	ATC I	GAG E	AAA K	ACC T
A' I	IC 1	rcc S	AAA K	341 GCC A	AAA K	GGG G	CAG Q	CCC P	CGA R	. GAA E	CCA P	CAG Q	GTG V	351 TAC Y	ACC T	CTG L	CCC P	CCA P	TCC S	CGG R	GAG E	GAG E	ATG M	361 ACC T	AAG K	AAC N	CAG Q	GTC V	AGC S	CTG L	ACC T	TGC C	CTG L	371 GTC V	AAA K	GGC G
T' F	FC 7	TAT Z	CCC P	AGC S	GAC D	ATC I	GCC A	381 GTG V	GAG E	TGG W	GAG E	AGC S	AAT N	GGG G	CAG Q	CCG P	GAG E	391 AAC N	AAC N	TAC Y	AAG K	ACC T	ACG T	CCT P	CCC P	GTG V	CTG L	401 GAC D	TCC S	GAC D	GGC G	TCC S	TTC F	TTC F	CTC L	ТАТ Ү
A(S	GC /	411 AAG K	CTC L	ACC T	GTG V	GAC D	AAG K	AGC S	AGG R	TGG W	CAG Q	421 CAG Q	GGG G	AAC N	GTC V	TTC F	TCA S	TGC C	TCC S	GTG V	ATG M	431 CAT H	GAG E	GCT A	CTG L	CAC H	AAC N	CAC H	TAC Y	ACG T	CAG Q	441 AAG K	<u>AGC</u> S	CTC L	TCC S	CTG L
			aam	449																																

TCTCCGGGTAAATAATCTAGASPGK*





Figure 18. Analyses électrophorétiques sur gel d'agarose à 1 %, des vecteurs codant pour les chaînes légères et lourdes de l'AcM chimérique KM8B6. Piste 1 : marqueur des poids moléculaires en paires de bases.

Panneau A : le vecteur d'expression pcDNA3®KM8B6-L ; piste 2 : 8B6-L-VL, piste 3 : pcDNA3®KM8B6-L super-enroulé, piste 4 : pcDNA3®KM8B6-L linéarisé par action de *BamH* I, piste 5 : pcDNA3®KM8B6-L digéré par *BamH* I et *Xho* I, piste 6 : pcDNA3®KM8B6-L digéré par *BamH* I et *Xba* I.

<u>Panneau B</u>: le vecteur de clonage pBluescript[®] II SK (+)KM8B6-H ; piste 2 : 8B6-L-VH, piste 3 : pBluescript[®] II SK (+)KM8B6-H super-enroulé ; piste 4 : pBluescript[®] II SK (+)KM8B6-H linéarisé par action de *BamH* I ; piste 5 : pBluescript[®] II SK (+)KM8B6-H digéré par *BamH* I et *Nhe* I, piste 6 : pBluescript[®] II SK (+)KM8B6-H digéré par *BamH* I et *Xba* I, piste 7 : pBluescript[®] II SK (+)KM8B6-H digéré par *BamH* I, *Nhe* I et *Xba* I.

<u>Panneau C</u> : le vecteur d'expression pcDNA3/Hygro[®]KM8B6-H ; piste 2 : chaîne lourde chimérique KM8B6-H, piste 3 : pcDNA3/Hygro[®]KM8B6-H linéarisé par action de *BamH* I, piste 4 : pcDNA3/Hygro[®]KM8B6-H digéré par *BamH* I et *Nhe* I, piste 5 : pcDNA3/Hygro[®]KM8B6-H digéré par *BamH* I et *Xba* I, piste 6 : pcDNA3/Hygro[®]KM8B6-H digéré par *Bam*H I, *Nhe* I et *Xba* I.



Figure 19. Echange du segment génique L-VL de l'AcM 60C3 avec celui de l'AcM 8B6 dans le vecteur d'expression de la chaîne légère chimérique. <u>Etape A</u>: digestion du vecteur par *BamH* I et *Xho* I. <u>Etape B</u>: ligature de l'ADNc 8B6-L-VL au vecteur. (pCMV : promoteur du gène du CMV ; géné^R : gène de résistance à la généticine[®]).



Figure 20. Assemblage de la chaîne lourde de l'AcM chimérique KM8B6 dans le vecteur de clonage pBluescript[®] II SK(+). <u>Etape A</u>: digestion du vecteur par *BamH* I et *Nhe* I. <u>Etape B</u>: ligature de l'ADNc 8B6-L-VH au vecteur.



Figure 21. Clonage de la chaîne lourde de l'AcM chimérique KM8B6 dans son vecteur d'expression pcDNA3.1/Hygro[®]. <u>Etape A</u>: digestion du vecteur pBluescript[®] II SK(+)KM8B6-H par *BamH* I et *Xba* I avec libération de la chaîne lourde chimérique KM8B6-H. <u>Etape B</u>: digestion du vecteur pcDNA3.1/Hygro[®] par *BamH* I et *Xba* I. <u>Etape C</u>:ligature de l'ADNc de KM8B6-H à son vecteur d'expression. (pCMV : promoteur du gène du CMV ; hygro^R : gène de résistance à l'hygromycine B[®]).

1.5.5 Expression de l'AcM chimérique KM8B6

Les deux vecteurs d'expression obtenus, pcDNA3[®] KM8B6-L et pcDNA3.1/Hygro[®] KM8B6-H ont servi à la transfection de cellules CHO. Les cellules transfectées ont été ensuite clonées par dilutions limitantes en présence de généticine[®] et d'hygromycine B[®] afin de sélectionner les clones double résistants transfectés stables. L'identification de clones sécrétant l'anticorps chimérique a été ensuite réalisée, parmi les clones résistants, à l'aide d'une méthode immunoenzymatique. ELISA. Ainsi, le criblage de 197 clones a permis de retenir quatre clones producteurs : le 6G9, le 7F8, le 8H10 et le 19D11 (Tableau III).

Nombre de clones testés	DO à 405 nm
182	-
6	+
5	++
4	+++
Total : 197	

Tableau III. Nombre de clones double résistants qui sécrètent l'AcM chimérique KM8B6. La sélection des clones est réalisée à l'aide d'un test immunoenzymatique ELISA sur des cellules dessiquées IMR32, à l'aide de l'anticorps secondaire BIOT-GAH.

- : DO inférieure à 3 fois celle du bruit fond ; + : DO comprise entre 3 et 4 fois celle du bruit de fond ; ++ : DO comprise entre 4 et 6 fois celle du bruit de fond ; +++ : DO supérieure à 6 fois celle du bruit de fond.

La caractérisation de ces clones a été ensuite effectuée en fonction du taux de production en anticorps chimérique (figure 22). À l'issue de cette sélection, le clone 8H10 a été retenu pour ses capacités de production (10 mg/L d'AcM au 7^{ème} jour de culture).



Figure 22. Production en AcM KM8B6 de cinq clones transfectés stables. La concentration est déterminée par test ELISA sur cellules dessiquées IMR32, à l'aide de l'anticorps secondaire BIOT-GAH.

1.5.6 <u>Purification des anticorps originels (8b6, 60C3) et des anticorps</u> <u>chimériques (KM8B6, KM60C3)</u>

Pour préparer des lots d'anticorps destinés à des essais d'immunothérapie chez l'animal, 4 L de surnageant de culture des hybridomes 8B6 et 60C3 et des clones CHO 18B (AcM KM60C3) et 8H10 (AcM KM8B6) ont été produits.

Les anticorps de ces productions ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A et les concentrations obtenues en AcM ont été déterminées par lecture de l'absorbance à 280 nm. Les rendements de production sont présentés dans le Tableau IV.

Clone	Rendements de production (mg d'AcM purifié / L de surnageant)
60C3	12
8B6	8
CHO 18B	2,8
CHO 8H10	3,8

Tableau IV. Rendements de production en AcM des hybridomes (8B6 et 60C3) et des clones CHO18B (KM60C3) et 8H10 (KM8B6).

La pureté des différents lots d'anticorps purifiés a été contrôlée par une analyse électrophorétique SDS-PAGE, en conditions dénaturantes réductrices et non réductrices (figure 23).



Figure 23. Analyse électrophorétique SDS-PAGE des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6 purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A. Piste 1 : marqueur des poids moléculaires (kDa). Conditions dénaturantes réductrices (A) et non réductrices (B) : piste 2 : AcM 60C3, piste 3 : AcM KM60C3. Conditions dénaturantes réductrices (C) et non réductrices (D) : piste 2 : AcM KM8B6, piste 3 : AcM 8B6.

Nous observons pour chacune des quatre préparations, seulement deux bandes de migration en conditions réductrices, l'une d'environ 50 kDa et l'autre d'environ 25 kDa correspondant aux chaînes lourdes et légères des IgG (figure 23A et C). En conditions non réductrices, une seule bande est observée d'un poids moléculaire de 150 kDa environ attestant que les chaînes lourdes et légères sont correctement assemblées pour former la molécule d'anticorps (figure 23B et D).

* * *

1.5.7 Etude de la spécificité des AcM purifiés 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6

1.5.7.1 Sur cellules dessiguées

La réactivité des AcM purifiés est analysée par un test immunoenzymatique ELISA sur des cellules dessiquées IMR32 et sur des cellules dessiquées Neuro-2a. La figure 24 montre que les quatre AcM purifiés se fixent sur les cellules IMR32 de manière dosedépendante contrairement aux cellules Neuro-2a.



Figure 24. Spécificité des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6 déterminée par ELISA sur cellules dessiquées IMR32 (bleu) et Neuro-2a (rose). La révélation de la fixation des AcM chimériques est faite par les BIOT-GAH, celle des AcM par les BIOT-GAM. Concentration initiale en AcM : 2 µg/mL.

1.5.7.2 Sur cellules vivantes

La spécificité des AcM purifiés a été analysée par cytométrie de flux sur les cellules vivantes IMR32 et Neuro-2a. Les cellules sont considérées positives au marquage par l'anticorps quand elles présentent une intensité de fluorescence supérieure à 1 log. Ainsi, 76 % des cellules IMR32 sont positives avec l'AcM 60C3, 63 % avec l'AcM KM60C3, 86 % avec l'AcM 8B6 et 65 % avec l'AcM KM8B6 (figure 25). À l'opposé, ces anticorps ne se fixent pas sur les cellules Neuro-2a qui n'expriment pas le GD2 ni sa forme *O*-acétylée. Les anticorps chimériques KM60C3 et KM8B6 présentent la même spécificité que les anticorps murins dont ils sont issus, 60C3 et 8B6.



Figure 25. Spécificité des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6 déterminée par immunofluorescence indirecte sur cellules vivantes IMR32 et Neuro-2a. En bleu est représentée l'autofluorescence des cellules et en rouge le pic de fluorescence observé avec les AcM. La fluorescence associée aux AcM murins (60C3 et 8B6) est obtenue avec les GAM-FITC, celle des AcM chimériques avec les GAH-FITC.

1.5.7.3 Sur extrait total de gangliosides tumoraux

L'extrait total de gangliosides tumoraux provenant d'une xénogreffe de cellules de neuroblastome humain IMR32 permet d'analyser la spécificité des AcM purifiés après séparation des espèces gangliosidiques par HPTLC.

La figure 26 montre que les AcM 60C3 et KM60C3 reconnaissent le GD2 et le GD2 O-acétylé (figure 26B et C, piste 1), alors que les AcM 8B6 et KM8B6 sont spécifiques du GD2 O-acétylé (figure 26D et E, piste 1). Après traitement alcalin des extraits gangliosidiques tumoraux, qui élimine le groupement O-acétyl, les AcM 8B6 et KM8B6 ne reconnaissent plus le GD2 O-acétylé en raison de sa conversion en GD2 (figure 26D et E, piste 2). La bande correspondant au GD2 est alors plus intense tandis que celle correspondant à sa forme O-acétylée disparaît (figure 26B et C, piste 2).



Figure 26. Spécificité des AcM 60C3, KM60C3, 8B6 et KM8B6 déterminée par immunofixation sur extrait total de gangliosides tumoraux séparés par HPTLC. Panneau A : révélation avec le réactif à l'orcinol. Panneau B : AcM 60C3. Panneau C : AcM KM60C3. Panneau D : AcM 8B6. Panneau E : AcM KM8B6. Piste 0 : gangliosides de cerveau de rat ; piste 1 : gangliosides de tumeur IMR32 ; piste 2 : gangliosides de tumeur IMR32 après traitement alcalin.

1.5.8 <u>Evaluation in vitro de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante</u> <u>des anticorps (ADCC)</u>

La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps a été évaluée *in vitro* sur les cellules IMR32, en présence de cellules effectrices (cellules NK-CD16/ γ) selon un rapport effecteurs / cibles de 20 / 1.



Figure 27. Evaluation de la propriété d'ADCC des AcM produits sur les cellules IMR32, en présence de cellules effectrices NK-CD16/ γ à un rapport effecteurs / cibles de 20 / 1. Le rituximab est un témoin négatif.

La propriété d'ADCC semble donc dépendante de la concentration en anticorps et c'est l'anticorps chimérique KM60C3 qui présente la plus forte activité (62 % de lyse cellulaire, pour une concentration de 1 µg/mL d'anticorps). Par ailleurs, après 1 µg/mL, l'augmentation de la concentration en anticorps n'augmente pas significativement l'efficacité d'ADCC, il y a saturation des récepteurs cellulaires au fragment Fc. La lyse cellulaire observée en présence du rituximab n'est pas spécifique et ne dépasse pas les 10% (figure 27).

* * *
DISCUSSION ET CONCLUSION

Le caractère hétérogène des tumeurs humaines constitue sans doute la cause majeure de l'échec des traitements conventionnels par radiothérapie et chimiothérapie, d'autant plus que des clones de cellules résistantes apparaîtront. Et même si une rémission est observée, la maladie résiduelle soulève encore bien des difficultés thérapeutiques. Aussi beaucoup d'espoirs ont été fondés sur l'immunociblage des cellules tumorales par utilisation des AcM soit à titre d'effecteurs immunitaires (immunothérapie passive), soit à titre de vecteurs par couplage à des radioéléments (radioimmunothérapie).

Plusieurs marqueurs tumoraux peuvent être ainsi mis à profit dont le ganglioside GD2 O-acétylé découvert dans notre laboratoire à l'aide de l'AcM 8B6 (Cerato *et al.*, 1997). Il est présent à la surface des cellules de tumeurs neuroectodermiques que sont le neuroblastome (Schulz *et al.*, 1984), le mélanome (Cheresh *et al.*, 1986a), le cancer pulmonaire à petites cellules (Cheresh *et al.*, 1986b) et le glioblastome, tout comme le GD2 pour lequel plusieurs AcM ont été développés aux Etats-Unis dans des études précliniques et cliniques (Mujoo *et al.*, 1989 ; Kushner *et al.*, 2001). Si le disialoganglioside GD2 n'avait jamais été retrouvé dans les tissus sains, le déclenchement de douleurs périphériques chez des enfants traités pour un neuroblastome par l'AcM 3F8 a remis en question l'intérêt des anticorps spécifiques du GD2.

Aussi avons-nous choisi, à la suite d'une étude histologique de la distribution du GD2 O-acétylé – absent du tissu nerveux périphérique (figure 14) – de mettre en valeur l'AcM de souris 8B6 (IgG3, κ), le seul anticorps connu à ce jour pour être spécifique de ce ganglioside. En raison du risque de xéno-immunisation chez l'Homme (Handgretinger *et al.*, 1991 ; Uttenreuther-Fischer *et al.*, 1995) mais aussi de sa tendance à s'agréger lors de sa purification (Grey *et al.*, 1971), nous avons convenu de fabriquer un anticorps chimérique homme-souris KM8B6 par ingénierie moléculaire (Nakamura *et al.*, 2001). Ainsi la région constante de la chaîne légère et celle de la chaîne lourde de l'anticorps de souris (γ 3) ont été remplacées par une région homologue humaine (γ 1) susceptible d'exercer une cytotoxicité tumorale par fixation du complément (CDC) et par l'activation de cellules immunitaires dotées d'un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines de type γ 1 (ADCC) (Mujoo *et al.*, 1991 ; Lin *et al.*, 2005). Par ailleurs, nous avons réalisé une étude préliminaire chez la souris greffée avec des cellules tumorales EL-4, à l'aide de l'anticorps chimérique KM60C3, fabriqué auparavant suivant la même stratégie que pour le KM8B6 et reconnaissant à la fois le GD2 et sa forme *O*-acétylée.

Les résultats de cette étude ont montré que l'anticorps chimérique exerçait une activité anti-tumorale *in vivo* avec un effet bénéfique sur la survie des souris (figure 16), contrairement à l'AcM de souris 60C3 dont il dérive. Un effet retard sur le délai moyen d'apparition des tumeurs est aussi retrouvé avec ce KM60C3 et est significatif par rapport aux lots témoins (figure 15). L'absence de cytotoxicité tumorale observée pour le 60C3 murin semble liée à l'incapacité des IgG3 de souris à activer le complément chez la souris contrairement aux IgG1 humaines (Bergman *et al.*, 2000). Cependant, il faut noter que le délai d'apparition des tumeurs avec le 60C3 est supérieur de 8 jours (différence non significative) à celui des lots témoins, cela peut donc laisser supposer de l'existence d'un effet proapoptotique de l'AcM murin. De ce fait, cet effet a été recherché en mettant en contact des cellules tumorales avec nos anticorps KM60C3 et 60C3, à des concentrations croissantes et pendant des durées différentes. La coloration de Hoescht a montré la présence ou non de corps apoptotiques et il s'est avéré que l'AcM de souris 60C3 avait un effet proapoptotique sur les cellules tumorales exprimant le GD2 à leur surface, contrairement à l'AcM chimérique KM60C3 (figure 17).

Cette propriété des anticorps anti-gangliosides avait été révélée par Aixinjuelo *et al.*, 2000, notamment dans le cancer pulmonaire à petites cellules. Le GD2 étant impliqué dans la prolifération cellulaire de ces cancers pulmonaires, la liaison d'AcM anti-GD2 provoquerait l'apoptose de ces cellules cancéreuses. Le mécanisme d'action évoqué est le suivant : la fixation de l'anti-GD2 à sa cible induirait un regroupement des GD2 sur la membrane cellulaire qui interfèreraient alors avec d'autres molécules membranaires. Ces dernières activeraient ensuite des molécules intracellulaires qui émettraient un signal apoptotique.

Ces résultats préliminaires nous ont donc encouragés à élaborer par ingénierie moléculaire, l'AcM chimérique homme-souris KM8B6, reconnaissant à la fois le GD2 et sa forme *O*-acétylée.

Le système d'expression choisi pour la production de l'anticorps chimérique KM8B6 est la cellule CHO plutôt que les lignées de myélome murin NSO ou SP2O. En effet, les anticorps sécrétés par les cellules CHO ont une cytotoxicité supérieure, en raison d'un profil de glycosylation plus proche de celui de l'Homme (Zeng *et al.*, 2005). Ainsi l'AcM KM8B6, produit à un taux de 3,8 mg/L, a été analysé par électrophorèse SDS-PAGE qui a montré l'assemblage correct des chaînes lourdes et légères pour former la molécule d'anticorps (figure 23).

Après trois séries de tests immunologiques, il est confirmé que le nouvel anticorps chimérique KM8B6 garde la même spécificité que l'anticorps de souris dont il dérive. Ainsi, les tests immunoenzymatiques ELISA sur cellules dessiguées ont démontré que l'AcM KM8B6 se fixait uniquement sur des cellules exprimant le GD2 O-acétylé, tout comme l'AcM 8B6 (figure 24). L'analyse de l'immunofixation sur gangliosides séparés par HPTLC a confirmé cette reconnaissance spécifique (figure 26). Ces deux anticorps sont également capables de se fixer au GD2 O-acétylé présent à la surface des cellules tumorales vivantes comme le démontrent les expériences d'immunofluorescence indirecte sur les cellules IMR32 et Neuro-2a (figure 25). Cependant, une intensité moindre était observée par rapport à l'AcM murin, ce qui pourrait évoquer une diminution d'affinité pour l'AcM chimérique, qui sera prochainement mesurée. Une hypothèse avancée est la disparition d'interactions homophiles décrites entre les domaines variables (Chapman et al., 1990) et/ou constants (Greespan et Cooper, 1992; Greenspan et al., 1998) de certaines immunoglobulines IgG3 de souris. Ainsi, une moindre agrégation des anticorps chimériques entre eux (Kaminski et al., 1999) diminuerait leur nombre sur les cellules vivantes après lavages et modifierait donc le spectre de fluorescence.

Enfin, les propriétés effectrices de nos anticorps ont été évaluées *in vitro* afin de connaître les mécanismes immunitaires mis en jeu en plus de la reconnaissance antigèneanticorps. Steplewski *et al.* (1988) ont montré que les anticorps chimériques homme-souris lgG1 avaient une activité CDC et ADCC supérieure à celle des anticorps de souris ou humains lgG2, lgG3 et lgG4. Nous avons, pour l'instant, évalué l'ADCC.

Il s'avère que l'activité ADCC est dépendante de la concentration en anticorps (figure 27). De plus, bien que les anticorps de souris et chimériques déclenchent cette activité ADCC contre les cellules tumorales exprimant le GD2 et sa forme *O*-acétylée, c'est l' anticorps chimérique qui est le plus actif (62% de lyse cellulaire pour KM60C3 contre 37% pour 60C3 à 1 μ g/mL).

L'activité CDC reste à déterminer *in vitro* pour nos anticorps 60C3 et KM60C3. Par ailleurs, l'anticorps KM8B6, sous forme chimérique homme-souris, va être évalué dans des études *in vivo* dans diverses conditions expérimentales : soit en tant que tel, soit couplé à des radioéléments.

* * *

BIBLIOGRAPHIE

Aixinjueluo W., Furukawa K., Zhang Q., Hamamura K., Tokuda N., Yoshida S., Ueda R. and Furukawa K. (2005). *Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies*. J Biol Chem 280 : 29828-29836.

Ando S. and Yu R. K. (1977). *Isolation and characterization of a novel trisialoganglioside, GT1a, from human brain.* J Biol Chem 252 : 6247-6250.

Ariga T., Yoshida K., Nemoto K., Seki M., Miyatani M and Yu R.K. (1991). *Glycolipid changes in murine myelogenous leukemias: neutral glycolipids as markers for specific populations of leukemias.* Biochemestry 30 : 7953-7961.

Bergman I., Base P.H., Barmada M.A., Griffin J.A. and Cheung N.K.V. (2000). *Comparison of in vitro antibody-targeted cytotoxicity using mouse, rat and human effectors*. Cancer Immunol Immunother 49 : 259-266.

Bremer E. G., Schlessinger J. and Hakomori S. (1986). *Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor.* J Biol Chem 15 :2434-2440.

Brodeur P.H. and Ribblet R. (1986). In Handbook of experimental immunology, Weir Blackwell D.M. (eds). *The Ig-V genes of the mouse*. Palo Alto, USA, ch 89.

Carubia J. M., Yu R. K., Macala L. J., Kirkwood J. M. and Varga J.M. (1984). *Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes*. Biochem Biophys Res Commun 30 : 500 504.

Cerato E., Birklé S., Portoukalian J., Mezazigh A., Chatal J.F. and Aubry J. (1997). *Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives.* Hybridoma 16 : 307-316.

Chapman B., Yuasa H. and Houghton A.N. (1990). *Homophilic binding of mouse monoclonal antibodies against GD3 ganglioside*. J Immunol 145 : 891-898.

Cheresh D.A., Pierschbacher M.D., Herzig M.A. and Mujoo K. (1986a). *Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins*. J Cell Biol 102 : 688-696.

Cheresh D.A., Rosenberg J., Mujoo K., Hirschowitz L. and Reisfeld R.A. (1986b). *Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytolysis.* Cancer Res 46 : 5112-5118.

Cheresh D.A., Varki A., Varki N.M., Stallcup W.B., Levine J. and Reisfeld R.A. (1984). *A monoclonal antibody recognizes an O-acetylated sialic acid in a human melanoma-associated ganglioside.* J Biol Chem 259 : 7453-7459.

Constantine-Paton M., Blum A.S., Mendez-Otero R. and Barnstable C.J. (1986). A cell surface molecule distributed in a dorsoventral gradient in the perinatal rat retina. Nature 324 : 459-462.

Crocker P. R., Kelm S., Dubois C., Martin B., McWilliam A. S., Shotton D. M., Paulson J. C. and Gordon S. (1991). *Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages*. The EMBO J 10 : 1661-1669.

Degroote S., Wolthoorn J. and Van Meer G. (2004). *The cell biology of glycosphingolipids*. Semin Cell Dev Biol 15 :375-387.

Dubois C., Manuguerra J.C., Hauttecoeur B. and Maze J. (1990). *Monoclonal antibody* A2B5, which detects cell surface antigens, binds to ganglioside GT3 (II3 (NeuAc)3LacCer) and to its 9-O-acetylated derivative. J Biol Chem 265 : 2797-2803.

Gagnon M. and Saragovi H. U. (2002). *Gangliosides : therapeutic agents or therapeutic targets ?* Expert Opn Ther Patents 12 : 1215-1223.

Goldsby R. A., Kindt T.J. and Osborne B.A. (2003). *Production des anticorps monoclonaux, dans Immunologie : le cours de Janis Kuby.* Editions Dunod. Imprimeur I.M.E. Ch 4 : 107-108.

Greenspan N.S and Cooper L.J. (1992). Intermolecular cooperativity : a clue to why mice have IgG3 ? Immunol Today 16 : 226.

Greenspan N.S., Dacek D.A. and Cooper L.J. (1998). *Fc region-dependance of IgG3 anti*streptococcal group A carbohydrate antibody functional affinity. J Immunol 141 : 4276.

Grey H.J., Wegman-Hirst J. and Cohn M. (1971). *A new mouse immunoglobulin : IgG3.* J Exp Med 133 : 289-304.

Gura T. (2002). Therapeutic antibodies : magic bullets hit the target. Nature 417 : 584-586.

Hakomori S. (1981). Glycoshingolipids in cellular interaction, differenciation, and oncogenesis. Annu Rev Biochem 50 : 733-764.

Hakomori S. and Kannagi R. (1983). *Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers*. J Natl Cancer Inst 71 : 231-251.

Handgretinger R., Baader P., Dopfer R., Keingelbiel T., Reuland P., Treumer J., Reisfeld R.A. and Niethammer D. (1992). *A phase I study neuroblastoma with anti-ganglioside GD2 antibody 14G2a.* Cancer Immunol Immunother 35 : 199-204.

Harris M.(2004). *Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer*. Lancet Oncol 5 : 292-302.

Hirabayashi Y., Hirota M., Suzuki Y., Matsumoto M., Obata K. and Ando S. (1989). *Developmentally expressed O-acetyl ganglioside GT3 in fetal rat cerebral cortex*. Neurosci Lett 106 : 193-198.

Houghton A.N., Mintzer D., Cordon-Cardo C., Welt S., Fliegel B., Vadhan S., Carswell E., Melamed M.R., Oettgen H.F. and Old L.J. (1985). *Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma*. Proc Natl Acad Sci 82 :1242-1246.

IMGT (2007). http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/GenesClinical/monoclonalantibodies

Irie R. F. and Morton D. L. (1986). *Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2*. Proc Natl Acad Sci 83 : 8694-8698.

IUPAC-UIB (1997). Commission on biochemical nomenclature. Lipids 12: 455-468.

Kaminski M.J., MacKenzie C.R., Mooibroek M.J., Dahms T.E.S., Hirama T., Houghton A.N., Chapman P.B. and Evans S.V. (1999). *The role of homophilic binding in anti-tumor antibody R24 recognition of molecular surface.* J Biol Chem 274 : 5597-5604.

Kettleborough C. A., Saldanha J., Heath V. J., Morrison C. J. and Bendig M. M. (1991). *Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR–grafting: the importance of framework residues on loop conformation.* Prot Engin 4 : 773-783.

Kotani M., Kawashima I., Ozawa H., Terashima T. and Tai T. (1993). *Differential distribution of major gangliosides in rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies*. Glycobiology 3 : 137-146.

Kniep B, Claus C., Peter-Katalinic J., Monner D. A., Dippold W., and Nimtz M. (1995). 7-O-Acetyl-GD3 in Human T-lymphocytes Is Detected by a Specific T-cell-activating Monoclonal Antibody. J Biol Chem 270 : 30173- 30180.

Kniep B., Kniep E., Ozkucur N., Barz S., Bachmann M. Malisan F., Testi R. and Rieber E.P. (2006). *9-O-acetyl GD3 protects tumor cells from apoptosis*. Int J Cancer 119 : 67-73.

Kuroiwa Y., Kasinathan P., Choi Y. J., Naeem R., Tomizuka K., Sullivan E. J., Knott J. G., Duteau A., Goldsby R. A., Osborne B. A., Ishida I. and Robl J. M. (2002). *Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin*. Nature Biotech 20 : 889-894.

Kushner B.H., Kramer K. and Cheung N.K. (2001). *Phase II trial of the anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma*. J Clin Oncol 19 : 4189-4194.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685.

Le Doussal J.M., Chetanneau A., Gruaz-Guyon A., Martin M., Gautherot E., Lehur P.A., Chatal J.F., Delaage M. and Barbet J. (1993). *Bispecific monoclonal antibody-mediated targeting of an indium-111-labeled DTPA dimer to primary colorectal tumors : pharmacokinetics, biodistribution, scintigraphy and immune response*. J Nucl Med 34 : 1662-1671.

Ledeen R.W. and Yu R.K. (1982). *Gangliosides : structure, isolation, analysis*. Meth Enzymol 83 : 139-191.

Lefranc M.P., Chuchana P., Dariavach P., Nguyen C., Huck S., Brokly F., Jordan B. and Lefranc G. (1989). *Molecular mapping of the human T cell receptor gamma (TRG) genes and linkage of the variable and constant regions*. Eur J Immunol 19 : 989-994.

Li R., Gage D., McKallip R. and Ladisch S. (1996). *Structural characterization and in vivo immunosuppressive activity of neuroblastoma GD2*. Glycoconj J 13 : 385-389.

Lin M.Z., Teitell M.A. and Schiller G.J. (2005). *The evolution of antibodies into versatile tumor-targeting agents*. Clin Cancer Res 11 : 129-138.

Livingston P.O., Ritter G. and Calves MJ. (1989a). Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2 and GD3 in the mouse. Cancer Immunol Immunother 29 : 179-184.

Livingston P.O., Ritter G., Srivastava P., Padavan M., Calves M.J., Oettgen H.F. and Old L.J. (1989b). *Characterization of IgG and IgM antibodies induced in melanoma patients by immunization with purified GM2 ganglioside*. Cancer Res 49 : 7045-7050.

Manzi A.E., Sjoberg E. R., Diaz S. and Varki A. (1990). *Biosynthesis and turnover of O-acetyl and N-acetyl groups in the gangliosides of human melanoma cells*. J Biol Chem 265 : 13091-13103.

Merrill A. H. and Wang E. (1986). *Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-trans-double bond after de novo biosynthesis of N-acylsphinganine(s).* J Biol Chem 261 : 3764-3769.

Mezazigh A., Aubry J., Birklé S., Cerato E. and Chatal J. F. (1993). A monoclonal antibody reacting specifically for ganglioside O-acetylated GD2 in neuroectodermal tumors. Glycoconjugate J 10 : 300-301.

Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie, Direction Générale des Entreprises, (2006). *http://www.francetech.gouv.fr*

Mirkin B. L., Clark S.H. and Zhang C. (2002). *Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation and EGF receptor phosphorylation by gangliosides GM1, GM3, GD1A and GT1B*. Cell Prolif 35 : 105-115.

Mujoo K., Kipps T.J., Yang H.M., Cheresh D.A., Wargalla U., Sander D.J. and Reisfeld R.A. (1989). *Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma* tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. Cancer Res 49 : 2857-2861.

Mujoo K., Reisfeld R.A, Cheung L. and Rosenblum M.G. (1991). A potent and specific *immunotoxin for tumor cells expressing disialoganglioside GD2*. Cancer Immunol Immunother 34 : 198-204.

Nakamura K., Tanaka Y., Shitara K. and Hanai N. (2001). *Construction of humanized antiganglioside monoclonal antibodies with potent immune effector functions*. Cancer Immunol Immunother 50 : 275-284.

Nakatsuji Y. and Miller R.H. (2001). Selective cell-cycle arrest and induction of apoptosis in proliferating neural cells by ganglioside GM3. Exp Neurol 168 : 290-299.

Nasi M. L., Meyers M., Livingston P.O., Houghton A.N. and Chapman P.B. (1997). *Antimelanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside*. Melanoma Res. 7 : 155-162.

Perlmutter R.M., Hansburg D., Briles D.E., Nicolotti R.A and Davie J.M. (1978). *Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies*. J Immunol 121 : 566.

Portoukalian J. Zwingelstein G., Dore J.F. and Bourgoin J.J. (1976). *Studies of a ganglioside fraction extracted from human malignant melanoma*. Biochimie 58 : 1285-1287.

Ravindranath M. H, Morton D. L. and Irie R. F. (1989). An epitope common to gangliosides *O-acetyl-GD3 and GD3 recognized by antibodies in melanoma patients after active specific immunotherapy.* Cancer Res 49 : 3891-3897.

Ren S., Slominski A. and Yu R. K. (1989). *Glycosphingolipids in Bomirski transplantable melanomas in hamsters*. Cancer Res 49 : 7051-7056.

Roitt I. M. and Rabson A. (2002). *Techniques de production d'anticorps, dans Immunologie médicale : l'essentiel*. Ch 3 : 48-49. Editions Maloine. Imprimeur Pollina S.A.

Sasaki A., Hata K., Suzuki S., Sawada M., Wada T., Yamaguchi K., Obinata M., Tateno H., Suzuki H. and Miyagi T. (2003). *Overexpression of plasma membrane-associated sialidases attenuates insulin signaling in transgenic mice*. J Biol Chem 278 : 27896-27902.

Schulz G., Cheresh D.A., Varki N.M., Yu A., Staffileno L.K. and Reisfeld R.A. (1984). *Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients*. Cancer Res 44 : 5914-5920.

Schwarzmann G. and Sandhoff K. (1990). *Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids*. Biochemistry 29:10865-10871.

Senn H.J., Orth M., Fitzke E., Wieland H. and Gerok W. (1989). *Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins*. Eur J Biochem 15 : 657-662.

Simon B.M., Malisan F., Testi R., Nicotera P. and Leist M. (2002). *Disialoganglioside GD3 is released by microglia and induces oligodendrocyte apoptosis*. Cell Death Differ 9 :758-767.

Souriau C., Hua T. D., Lefranc M. P. and Weill M. (1998). *Présentation à la surface de pahges filamenteux : les multiples applications du phage display*. Med Sciences 14 : 300-309.

Steplewski Z., Sun L. K., Shearman C.W., Ghrayeb J., Daddona P. and Koprowski H. (1988). *Biological activity of human-mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity.* Proc Natl Acad Sci 85 : 4852-4856.

Stern M. and Herrmann R. (2005). Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy : present and promise. 2005. Crit Rev Oncol Hematol 54 : 11-29.

Strohal R., Helmberg A., Kroemer G. and Kofler R. (1989). *Mouse* $V\kappa$ gene classification by *nucleic acid sequence similarity*. Immunogenetics 30 : 475-493.

Suzuki Y. (1995). Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. Prog Lipid Res 33 : 429-457.

Svennerholm, L. (1964). The gangliosides. J Lipid Res 5 : 145-155.

Tanha J., Dubuc G., Hirama T., Narang S. A. and Mac Kenzie C. R. (2001). Selection by phage display of Ilama conventional VH fragments with heavy chains antibody VHH properties. J Immunol Meth 263 : 97-109.

Uttenreuther-Fischer M.M., Huang C.S. and Yu A.L. (1995). *Pharmacokinetics of humanmouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients*. Cancer Immunol Immunother 41 : 331-338. Varki A., Hooshmand F., Diaz S., Varki N.M. and Hedrick S.M. (1991). *Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetylesterase*. Cell. 65 : 65-74.

Williams M.A. and McCluer R.H. (1980). *The use of SepPak C18 cartridges during the isolation of gangliosides*. J Neurochem 35 : 266-269.

Yuki N., Yamada M., Tagawa Y., Takahashi H. and Handa S. (1997). *Pathogenesis of the neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody therapy*. J Neurol Sci 149 : 127-130.

Zeng G., Li D., Gao C., Birklé S., Bieberich E., Tokuda A. and Yu R.K. (1999). Alteration of ganglioside composition by stable transfection witk antisense vectors against GD3-synthase gene expression. Biochem 38 : 8762-8769.

Zeng Y., Fest S., Kunert R., Katinger H., Pistoia V., Michon J., Lewis G., Ladenstein R. and Lode H.N. (2005). *Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice*. Mol Immunol 42 : 1311-1319.

Zhang H., Zhang S., Cheung N.K.V., Ragupathi G. and Livingston P. (1998). *Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases*. Cancer Res 58 : 2844-2849.

Nom – Prénom : LEPRIEUR TRUET Stéphanie

Titre de la Thèse :

Production et évaluation chez l'animal d'anticorps thérapeutiques anti-ganglioside GD2

Résumé de la Thèse :

L'immunothérapie par administration d'anticorps monoclonaux (AcM) ciblant des antigènes tumoraux s'est imposée comme une nouvelle thérapeutique des cancers. Dans le cas des tumeurs neuroectodermiques, le disialoganglioside GD2 est un marqueur fiable du fait de sa densité d'expression élevée à la surface des cellules tumorales.

Un essai d'immunothérapie chez la souris a montré que l'AcM chimérique hommesouris KM60C3, anti-GD2, contribuait à un allongement du délai d'apparition des tumeurs et à une amélioration de la survie de l'animal. L'induction d'apoptose découverte pour l'AcM natif de souris n'entraîne pas d'effet anti-tumoral significatif par rapport à l'AcM chimérique.

La cytotoxicité tumorale de l'AcM KM60C3 est supérieure en raison de sa capacité de liaison au complément et aux récepteurs du fragment Fc des cellules immunitaires.

La découverte du GD2 O-acétylé, grâce à l'AcM de souris 8B6, et dont l'absence sur le tissu nerveux écarte tout risque de neurotoxicité par fixation d'AcM, a relancé l'immunociblage des gangliosides tumoraux.

Pour limiter le phénomène de xéno-immunisation induit par les AcM de souris, un anticorps chimérique homme-souris KM8B6 a été fabriqué par ingénierie moléculaire et produit avec des cellules CHO à un taux de 3,8 mg/L. La spécificité de cet anticorps recombinant pour le GD2 *O*-acétylé a été confirmée par trois tests immunologiques : sur cellules dessiquées, sur cellules vivantes et sur extraits gangliosidiques tumoraux.

Mots-clés :

TUMEURS NEUROECTODERMIQUES, DISIALOGANGLIOSIDE, IMMUNOCIBLAGE, ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES, ANTICORPS RECOMBINANTS

Jury :

Président : M. Jacques AUBRY, Professeur d'Immunologie - Nantes

Membres du Jury : M. Stéphane BIRKLE, Maître de Conférence d'Immunologie - Nantes M. Philippe BILLIALD, Professeur de Biochimie - Tours M. Patrick THOMARE, Praticien Hospitalier Pharmacien - Nantes Mme Marie MARAIS, Praticien attaché Pharmacien – Nantes

Adresse de l'auteur : 118 Hameau de Saint Barthélémy - 61 000 Saint Germain du Corbéïs.