

UNIVERSITE DE NANTES

UFR DE MEDECINE ET DES TECHNIQUES MEDICALES

**Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la cocaïne, la
méthamphétamine et leurs dérivés pour utilisation en clinique
humaine**

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale Chimie Biologie

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Immunologie

Présentée

Et soutenue publiquement par

Yannic DANGER

Le 23 octobre 2003, devant le jury ci-dessous

Président du jury Hervé Galons, Professeur, Université de Paris V

Rapporteurs Daniel Baty, Directeur de Recherche CNRS, Marseille
Pierre-Yves Renard, Professeur, Université de Rouen

Examineurs Dominique Blanchard, Docteur ès-Science, JOUAN S.A., Saint-Herblain
Gilles Folléa, Docteur et directeur de l'EFS-PL, Nantes
Charles Tellier, Professeur, Université de Nantes
Robert Floch, DrugAbuse Sciences SAS, Paris

Directeurs de Thèse : Dominique Blanchard
Charles Tellier

Le travail présenté a été réalisé à l'initiative de la société DrugAbuse Sciences, dans le laboratoire de Biotechnologie de l'Etablissement Français du Sang des Pays de la Loire.

Je remercie vivement,

Le Docteur Gilles Folléa pour m'avoir accueilli au sein de son établissement et pour son soutien et ses conseils lors de moments difficiles,

M Pouletty, Mme Greetham et Mme Hiance pour m'avoir permis de participer à ce formidable projet. Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers Mme Hiance qui a toujours été présente pour répondre à mes interrogations et m'a donné la chance de finir ce travail,

Le Professeur Charles Tellier sans qui ce travail n'aurait jamais pu commencer ni s'achever. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, mais également pour votre disponibilité, vos conseils et votre précieuse aide au cours de ces 3 années, et encore plus lors de la rédaction du mémoire.

Dominique Blanchard, mon directeur de thèse qui m'a offert la possibilité de travailler avec lui pendant 3 ans. Je vous remercie pour votre enseignement, vos conseils et votre aide des premiers jours, et je l'espère, futurs.

Je tiens à remercier Anne Devys pour m'avoir encouragé, et pour avoir contribué à la bonne fin de ce travail, notamment par ses nombreuses corrections. C'est avec plaisir que j'aurais continué à travailler sous ta responsabilité.

Merci à Frédéric Koralewski pour sa disponibilité, ses conseils, ses critiques et son soutien.

A toute l'équipe de DAS SAS que j'ai rencontré : M Kusmieriek, Pauline, Stéphanie, Isabelle et Vanessa. Merci pour vos conseils, aides et accueils.

Aux personnels de l'EFS de Nantes, en particulier aux techniciennes de Biotechnologie. J'exprime spécialement ma reconnaissance envers Catherine qui m'a fait part de son savoir, pour sa bonne humeur et ses petites histoires.

Merci à Marie-Jeanne de m'avoir supporté dans son bureau durant ces longues années, pour son aide et ses remarques.

Je remercie M Galons pour sa coopération lors des programmes de recherche et dans la rédaction des articles. Merci à Caroline pour ta collaboration, j'espère que notre travail contribuera au développement de DAS et permettra de sauver des vies.

A mes parents,

A Nolwenn,

Et à Richard,

A ma famille et mes amis

A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à ce que j'atteigne ce niveau, et à l'accomplissement de ce travail.

Sommaire

<u>Liste des illustrations</u>	7
<u>I Introduction</u>	11
<u>II Des drogues à l'immunothérapie</u>	14
<u>II.1 Généralités sur les drogues et leurs usages</u>	15
<u>II.1.1 Drogues cibles étudiées</u>	17
<u>II.1.1.1 La méthamphétamine</u>	17
<u>II.1.1.2 L'ecstasy</u>	18
<u>II.1.1.3 La cocaïne</u>	18
<u>II.1.1.4 Phénomène de dépendance</u>	19
<u>II.1.1.5 Métabolisme</u>	20
<u>A Métabolisme des amphétamines</u>	20
<u>B Métabolisme de la cocaïne</u>	22
<u>II.1.2 Rappel de physiologie</u>	24
<u>II.1.2.1 Le système nerveux central (SNC)</u>	24
<u>II.1.2.2 Le système cardio-vasculaire</u>	25
<u>II.1.3 Effets physiologiques et psychologiques des amphétamines et de la cocaïne</u>	26
<u>II.1.3.1 Action sur le système nerveux central (SNC)</u>	26
<u>II.1.3.2 Action sur le système cardio-vasculaire</u>	29
<u>II.1.3.3 Autres actions cellulaires</u>	30
<u>II.2 L'immunothérapie</u>	31
<u>II.2.1 Rappel sur la structure des anticorps</u>	33
<u>II.2.2 Principe de l'immunothérapie</u>	36
<u>II.2.3 Domaines d'application</u>	37
<u>II.2.3.1 Action neutralisante</u>	37
<u>II.2.3.2 Outils de cancérologie</u>	38
<u>II.3 Anticorps polyclonaux anti-cocaïne</u>	40
<u>II.3.1 Travaux préliminaires</u>	40
<u>II.3.2 Conception des haptènes</u>	42
<u>II.3.3 Sélection de l'haptène</u>	44
<u>II.3.4 Obtention du CocAB</u>	44
<u>II.3.4.1 Caractérisation</u>	44
<u>II.3.4.2 Etude in vivo</u>	45

II.3.5	Avantages et limites	46
III	Matériel et Méthodes	48
III.1	Immunisation et culture cellulaire	49
III.1.1	Préparation des immunogènes	49
III.1.2	Immunisation	50
III.2	Obtention d'hybridomes sécréteurs monoclonaux	52
III.2.1	Fusion	52
III.2.2	Criblage	54
III.2.3	Clonage	55
III.2.4	Détermination des isotypes	56
III.2.5	Production d'anticorps	57
III.2.6	Clivage protéolytique	58
III.3	Purification	58
III.3.1	Etape de purification	58
III.3.2	Concentration et de contrôle des anticorps	60
III.4	Techniques immunochimiques	61
III.4.1	Détection des anticorps	61
III.4.1.1	Technique ELISA	62
III.4.1.2	Compétition ELISA	63
III.4.1.3	Technique RIA	63
III.4.2	Détermination des constantes d'affinité	66
III.4.2.1	Généralités	66
III.4.2.2	Rappel sur la réaction antigène anticorps	66
III.4.2.3	Détermination de l'affinité par la méthode ELISA	68
III.4.2.4	Détermination de l'affinité par la technique RIA	71
III.4.2.5	Détermination de l'affinité par mesure directe en Biacore	73
III.4.2.6	Détermination des constantes d'affinité par mesure indirecte en BIAcore	79
III.5	Recherche de réactivités croisées avec cellules sanguines	81
IV	Résultats	83
IV.1	Anticorps monoclonaux anti-cocaïne	84
IV.1.1	Immunisation	84
IV.1.2	Fusion	85
IV.1.3	Production et purification	90

IV.1.4	Caractérisation des anticorps obtenus	91
IV.1.4.1	Affinité et réactions croisées	91
IV.1.4.2	Discussion	95
IV.1.5	Conclusion	97
IV.2	Anticorps anti-méthamphétamine	99
IV.2.1	Travaux antérieurs	99
IV.2.1.1	Domaine diagnostique	99
IV.2.1.2	Domaine thérapeutique	99
IV.2.1.3	Objectif	101
IV.2.2	Anticorps monoclonaux	101
IV.2.2.1	Stratégie employée	101
IV.2.2.2	Immunisation	103
IV.2.2.3	Fusion	103
A	Fusion Met1 n°243	104
B	Fusion Met1 n°249 et 258	105
C	Fusion Met2	106
D	Bilan des fusions Met1 et Met2	107
IV.2.3	Caractérisation des anticorps obtenus	108
IV.2.3.1	Réactions croisées avec différentes molécules	108
A	Anticorps issus de la fusion 243 (Met1)	110
B	Anticorps issus de la fusion 258 (Met1)	111
C	Anticorps issus de la fusion 246 (Met2)	112
IV.2.3.2	Réactivités avec les cellules sanguines humaines	113
IV.2.3.3	Détermination des constantes d'affinité	114
IV.2.3.4	Caractérisations complémentaires	115
IV.2.3.5	Conclusion	118
IV.3	Obtention de nouveaux anticorps anti-méthamphétamine à l'aide d'haptènes optimisés	120
IV.3.1	Présentation des haptènes	120
IV.3.1.1	Immunisation	121
IV.3.1.2	Fusions	122
IV.3.2	Caractérisation des anticorps	123
IV.3.2.1	Tests de compétition par ELISA	123
IV.3.2.2	Analyse BIAcore	125

A	Détermination de l'affinité par mesure directe	125
B	Détermination de l'affinité par compétition BIAcore	126
IV.3.3	Conclusion	127
V	Discussion	129
V.1	Anticorps anti-drogue	130
V.1.1	Stratégie de conception des immunogènes	130
V.1.2	Méthodes de détermination de la constante d'affinité	135
VI	Conclusion	137
VII	Annexe	140
VII.1	Synthèse des haptènes	141
VII.2	Couplages	144
VII.2.1	Méthode des anhydrides mixtes	144
VII.2.2	Méthode avec le succinidyl-maléimide	144
VIII	Références bibliographiques	145

Liste des illustrations

Figure 1 : Evolution de la quantité de drogues saisies (en kg) en Europe entre 1985 et 1999	15
Figure 2 : Structure de la phénéthylamine, de la méthamphétamine et de l'ecstasy	17
Figure 3 : Structure de la cocaïne	19
Figure 4 : Métabolisme des amphétamines	22
Figure 5 : Métabolisme de la cocaïne	23
Figure 6 : Distribution des neurones à dopamine (en vert), à noradrénaline (en bleu) et à sérotonine (rouge) et leurs projections	24
Figure 7 : Exemple d'action de la cocaïne et de la méthamphétamine sur un neurone à dopamine	27
Figure 8 : Illustration de l'action de l'ecstasy sur un neurone à sérotonine	31
Figure 9 : Synthèse d'une chaîne légère kappa d'immunoglobuline	34
Figure 10 : Structure d'une immunoglobuline G et de ses dérivés	35
Figure 11 : Augmentation de la concentration plasmatique en cocaïne due à la présence d'anticorps anti-cocaïne	41
Figure 12 : Efficacité du CocAB à neutraliser la cocaïne dans le sang	46
Figure 13 : Schémas du couplage des haptènes sur une protéine porteuse	50
Figure 14 : Evolution de la réponse humorale en fonction du nombre d'immunisation	51
Figure 15 : Principe de la fusion cellulaire pour la production d'anticorps monoclonaux	54
Figure 16 : Schéma de fixation et d'élution des immunoglobulines sur la protéine A en fonction de leur classe	59
Figure 17 : Contrôle de pureté des anticorps en SDS PAGE	61
Figure 18 : Schéma descriptif d'un test de compétition par ELISA	63
Figure 19 : Schéma de principe de l'ELISA et du RIA	65
Figure 20 : Forces d'interactions	66
Figure 21 : Représentation de Scatchard	67
Figure 22 : Exemple de détermination du K_D par la méthode ELISA	71
Figure 23 : Exemple de détermination du K_A par la méthode RIA	73
Figure 24 : Principe de la résonance plasmonique de surface	74
Figure 25 : Représentation schématique du transport d'analyte	76
Figure 26 : Détermination des constantes cinétiques du CocAB à l'aide du logiciel BIAevaluation	79

Figure 27 : Exemples d’histogrammes obtenus lors de l’analyse de cellules en cytométrie de flux	82
Figure 28 : Titre des sérums des souris immunisées par TT H3’ durant les différentes immunisations.	85
Figure 29 : Structure de l’haptène H3’ (à droite) et de l’haptène GNC (haptène de l’anticorps GNC92H2, à gauche)	97
Figure 30 : Bilan général de la production d’anticorps anti-cocaïne à l’aide de l’haptène H₃’	98
Figure 31 : Evolution du titre en anticorps dans le sérum de souris Balb/c immunisées en fonction de l’immunogène.	103
Figure 32 : Haptène biotine 1	106
Figure 33 : Ic₅₀ (μM) déterminés pour différents métabolites et réactivités croisées (en %) vis-à-vis de la méthamphétamine pour l’anticorps 6H5D1C4 suivant sa forme.....	118
Figure 34 : Bilan général de la production d’anticorps anti-méthamphétamine à l’aide des haptènes Met1 et Met2	119
Figure 35 : Comparaison des titres des sérums de souris immunisées à l’aide des haptènes Met3, Met4, Met5 et Met1’ après les injections 2 et 3.....	121
Figure 36 : Moyenne des IC₅₀ (en M) mesurée par ELISA des sérums de souris prélevés à T3	122
Figure 37 : Proposition d’haptène anti-ecstasy	134
 Tableau 1 : Concentrations sanguines (μg/mL) de quelques drogues associées à leurs niveaux de toxicité	26
Tableau 2 : Demi-vie des anticorps suivant le format.....	37
Tableau 3 : Exemples d’anticorps utilisés en immunothérapie et en immunotoxicothérapie ..	40
Tableau 4 :Immunoconjugués pour la conception d’anticorps anti-cocaïne.....	43
Tableau 5 :Caractéristiques du CocAb.....	45
Tableau 6 : Composition des gels de polyacrylamide et des tampons utilisés pour l’analyse des anticorps purifiés.....	61
Tableau 7 : Conditions d’immobilisation et intensité de couplage exprimé en RU.....	77
Tableau 8 : Données sélectionnées pour la modélisation des sensorgrammes.....	77
Tableau 9 : Conditions expérimentales pour l’analyse de cellules par CMF.....	81
Tableau 10 : Spécifications des anticorps monoclonaux anti-cocaïne.....	84
Tableau 11 : Hybridomes isolés lors du criblage primaire.....	86
Tableau 12 : Isotype des anticorps anti-cocaïne produits	88

<u>Tableau 13 : Etude par cytométrie de flux de l'action des anticorps anti-cocaïne sur les cellules sanguines humaines.....</u>	90
<u>Tableau 14 : Rendement de production des anticorps 4D8 et 5B3 en fonction de la méthode utilisée</u>	91
<u>Tableau 15 : Constantes d'affinité (M^{-1}) des anticorps sélectionnés pour la cocaïne mesurées par différentes méthodes</u>	92
<u>Tableau 16 : Détermination de l'affinité de l'anticorps 4D8 sous forme IgG ou Fab à l'aide de la technique ELISA (cocaïne) et du BIAcore à faible immobilisation (BSA-H_3').....</u>	93
<u>Tableau 17 : Affinités relatives des anticorps monoclonaux anti-cocaïne exprimées en pourcentage</u>	94
<u>Tableau 18 : Comparaison des caractéristiques des anticorps obtenus avec des anticorps publiés</u>	96
<u>Tableau 19 : Haptènes publiés pour la développement d'anticorps anti-méthamphétamine.....</u>	100
<u>Tableau 20 : Structures comparées des molécules endogènes et de drogues.....</u>	102
<u>Tableau 21 : Fusions anti-méthamphétamine à partir des haptènes Met1 et Met2.....</u>	104
<u>Tableau 22 : Isotype des anticorps anti-méthamphétamine obtenus avec les haptènes Met1 et Met2.....</u>	107
<u>Tableau 23 : Molécules utilisées pour la caractérisation des anticorps anti-méthamphétamine</u>	109
<u>Tableau 24 : Réactions croisées des anticorps issus de la fusion 243.....</u>	110
<u>Tableau 25 : Réactions croisées des anticorps issus de la fusion 258.....</u>	112
<u>Tableau 26 : Réactions croisées des anticorps anti-Met2</u>	113
<u>Tableau 27 : Constantes d'affinités des anticorps anti-méthamphétamine (en M^{-1}).....</u>	114
<u>Tableau 28 : Principales caractéristiques des deux anticorps sélectionnés par DAS.....</u>	116
<u>Tableau 29 : Rendement de production en fonction de la méthode utilisée</u>	116
<u>Tableau 30 : Comparaison des affinités mesurées en RIA ou en BIAcore (M^{-1}) pour l'anticorps 6H5 sous forme d'IgG ou de Fab.....</u>	117
<u>Tableau 31 : Nouveaux haptènes pour produire des anticorps anti-méthamphétamine.....</u>	120
<u>Tableau 32 : Fusions anti-méthamphétamine à partir des haptènes Met3, Met4, Met5 et Met1'.....</u>	122
<u>Tableau 33 : Réactivité croisée des anticorps anti-met1' par technique ELISA.....</u>	124
<u>Tableau 34 : Résultats des constantes cinétiques déterminées par BIAcore.....</u>	125
<u>Tableau 35 :Détermination de l'affinité (M^{-1}) par compétition BIAcore et méthode de calcul ELISA.....</u>	126

<u>Tableau 36 : Présentation des quantités de produits nécessaires pour le couplage des haptènes sur les protéines porteuses</u>	144
--	-----

I Introduction

La consommation de drogue dans le monde ne cesse d'augmenter, et avec elle le nombre d'accidents et d'incidents médicaux liés à cette pratique. A ce jour, le monde médical ne dispose pas d'outils spécifiques pour traiter les intoxications aiguës (ou « overdose ») à la cocaïne et aux amphétamines, ni pour aider les utilisateurs désirant arrêter ces pratiques.

Une solution proposée par plusieurs équipes pour répondre à cette attente est l'immunotoxicothérapie. Par leur capacité à discriminer des molécules relativement similaires et à capturer leur cible avec de fortes affinités, les anticorps, monoclonaux ou polyclonaux, sont des outils de choix pour lutter contre les effets nocifs des drogues. Suivant leur administration, ils peuvent répondre au problème des overdoses comme à celui de la désintoxication (la persistance d'anticorps anti-drogue dans l'organisme pendant plusieurs jours permet de limiter les effets d'une prise de drogue en cours de cure). Leur efficacité à neutraliser des peptides a été largement démontrée comme par exemple pour neutraliser les effets de venins ou de toxines.

Des études préliminaires ont pu prouver la faisabilité de ce concept pour neutraliser la cocaïne dans un organisme : des anticorps spécifiques sont capables de capter la cocaïne circulante dans le sang, et d'empêcher la diffusion de la cocaïne du système circulatoire vers les tissus par l'établissement d'un gradient entre les deux compartiments. Ces résultats ont permis le développement d'anticorps polyclonaux équins, le CocAB, dont l'efficacité a pu être prouvée à l'aide d'un modèle animal. Un faible taux d'anticorps spécifiques dans la composition du CocAB, et les inconvénients des anticorps polyclonaux ont conduit la société DrugAbuse Sciences (DAS) à envisager le développement d'anticorps monoclonaux.

Ce travail s'inscrit dans une prestation de recherche et développement effectuée au laboratoire de Biotechnologie de l'Etablissement Français du Sang, à la demande de la société DrugAbuse Sciences. Le premier chapitre traitera des drogues pour lesquelles des anticorps monoclonaux ont été obtenus ; de la stratégie proposée pour répondre à la demande de médicaments spécifiques, et une dernière partie exposera les premiers résultats obtenus par la société DAS qui sont à l'origine de ce projet.

Dans le second chapitre, les méthodes utilisées pour l'obtention des anticorps monoclonaux seront exposées, ainsi que les différents protocoles ayant permis de les caractériser.

Le troisième chapitre sera divisé en deux parties : la préparation et la caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la cocaïne à partir de l'haptène H₃' utilisé pour la production du CocAB, seront abordées dans la première partie de ce chapitre. Suite aux résultats obtenus avec la cocaïne, la recherche d'anticorps anti-méthamphétamine a été l'objet

de la seconde partie de ce travail. La mise en place de ce projet et la caractérisation complète des anticorps obtenus, ainsi que le développement de nouveaux immunogènes seront également abordés à la fin de ce chapitre.

L'analyse critique des résultats sera abordée dans la discussion. Dans ce chapitre, la stratégie de conception des immunogènes et le devenir des anticorps obtenus seront discutés ; puis les méthodes de détermination des constantes d'affinité utilisées dans ce travail seront critiquées.

II Des drogues à l'immunothérapie

II.1 Généralités sur les drogues et leurs usages

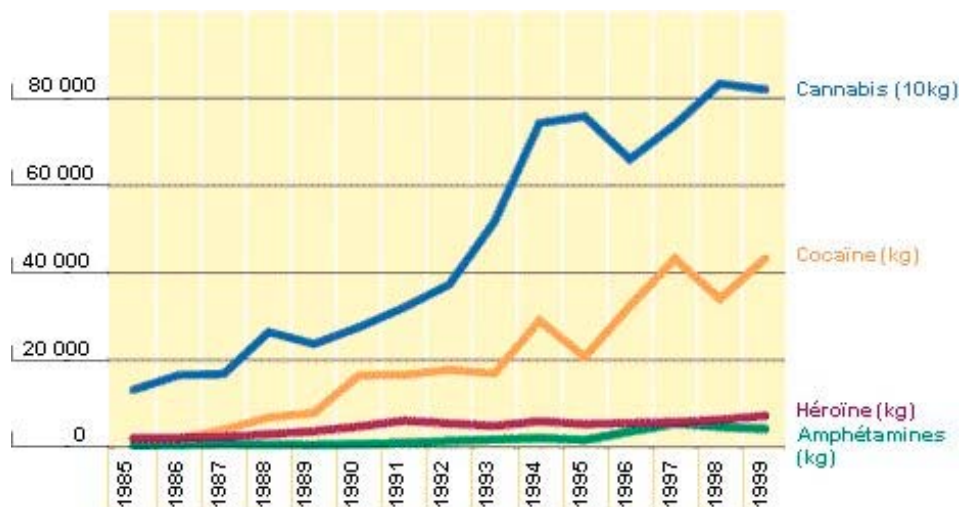
Depuis le début de la civilisation, l'homme utilise des substances psychoactives pour des usages religieux, initiatiques ou thérapeutiques. En Europe, c'est vers la fin du Moyen Age que l'usage de certaines d'entre elles fût prisé. Avec le commerce des épices, l'opium devient un produit nouveau et attractif comme peut l'être notamment le chocolat, le café ou le tabac [1]. Ainsi Baudelaire, dans le *Paradis artificiel* (1860), parle « d'une substance mise à la mode depuis des années, [...] dont les effets sont bien autrement foudroyants et puissants que ceux du vin ».

L'extraction et la purification de ces psychotropes, contenus dans des plantes, se sont améliorées au fil des siècles. Avec l'avènement de la synthèse organique, la diversité et la quantité de ces molécules ont augmenté de façon importante. Durant la seconde guerre mondiale, les stimulants de type amphétamine connaissent un succès grandissant : les premiers utilisateurs sont les militaires, mais très vite des civils (sportifs, enseignants, médecins, routiers,...) utilisent à leur tour ces produits permettant de contrecarrer, entre autres, la fatigue.

Bien que retirés de la vente libre dans les années 50 un peu partout dans le monde (1950 au Japon, 1955 en France), le nombre de consommateurs augmente régulièrement d'année en année grâce à l'existence de réseaux parallèles (cf. Figure 1)[2, 3].

Figure 1 : Evolution de la quantité de drogues saisies (en kg) en Europe entre 1985 et 1999 [2]

Cette évolution est représentative de l'évolution du nombre d'utilisateurs si on considère que le nombre de saisies reflète la demande. NB : Quantité en dizaine de kg pour le cannabis.



A la fin des années 90, l'ONU estimait à 180 millions le nombre de personnes consommant des drogues, dont 29 millions pour des stimulants type amphétamine et 14 millions pour le type cocaïne [3]. Le nombre de drogues illicites et d'utilisateurs s'accroît d'année en année, entraînant par conséquent une augmentation du nombre d'intoxications aiguës et d'accidents liés à la prise de stupéfiant. On constate également un accroissement des cas de poly-consommations depuis une dizaine d'années [4]. La demande de traitements efficaces pour ces molécules est de plus en plus importante, tant pour l'aide à la désintoxication que pour la médecine urgentiste. Les approches pharmacologiques des traitements de la dépendance à la cocaïne ou à la méthamphétamine n'ont pas permis jusqu'à présent de trouver de solutions satisfaisantes. Pour aider les professionnels de la santé, la société DrugAbuse Sciences souhaite développer une gamme de produits spécifiques des drogues capables de les neutraliser *in vivo*.

On peut diviser les substances psychoactives en 6 classes d'après les effets recherchés qu'ils procurent :

- ✓ Les stimulants, comme la cocaïne, les amphétamines, la nicotine ou la caféine.
- ✓ Les dépresseurs, comme l'alcool, les benzodiazépines ou les barbituriques.
- ✓ Les anesthésiques dissociatifs, comme les kétamines.
- ✓ Les analgésiques, comme la morphine, l'héroïne ou la méthadone.
- ✓ Le cannabis et dérivés (tétrahydrocannabinol).
- ✓ Les hallucinogènes, comme les LSD (Diéthylamide de l'acide lysergique) ou la mescaline.

A ce jour, les stimulants sont au second rang des substances illicites consommées dans le monde [3], et donc responsables de très nombreux cas d'incidents médicaux et sociaux. Du fait du nombre de personnes touchées, deux composés majeurs de cette classe, la cocaïne et la méthamphétamine, ont été sélectionnés pour l'élaboration de produits thérapeutiques, objet de ce travail.

II.1.1 Drogues cibles étudiées

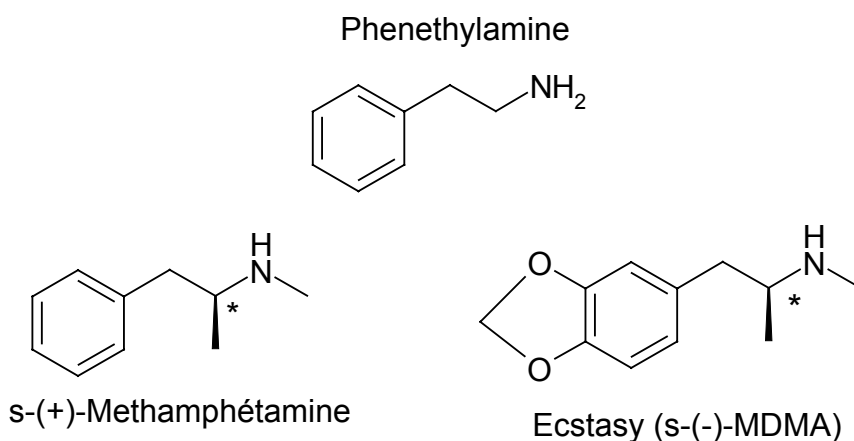
II.1.1.1 La méthamphétamine

Découverte à la fin du 19^e siècle, les amphétamines ont été synthétisées pour soigner les maladies d'ordre psychiatrique, mais également pour le traitement de l'asthme, ou encore de l'obésité [1]. Elles sont composées d'une structure de base, un phénéthylamine (ou 1-amino-2-phényléthane), molécule présente naturellement dans les urines humaines à un taux de l'ordre de 30µg/L [5]. On constate qu'un taux élevé dans les urines peut traduire une schizophrénie paranoïaque chronique. Divers groupements chimiques, tel que des méthyles ou des hydroxy, peuvent être ajoutés ou substitués pour obtenir des molécules d'actions variées ; on estime à plus de 200 le nombre de dérivés différents synthétisés dans des laboratoires clandestins [6].

On peut classer en deux groupes les amphétamines en fonction des effets qu'ils produisent. D'une part, les composés principalement stimulants, comme la méthamphétamine, et d'autre part les composés favorisant la création de liens sociables, telle que la MDMA (ou ecstasy). Les structures de ces deux composés sont présentées en Figure 2. Une des caractéristiques de ces molécules est la présence d'un carbone asymétrique dont le rôle est important du point de vue fonctionnel : les énantiomères S(+) de la méthamphétamine et de l'amphétamine ont des effets psychostimulants cinq fois plus importants que l'énantiomère R(-) [7].

Figure 2 : Structure de la phénéthylamine, de la méthamphétamine et de l'ecstasy.

* Carbone asymétrique



II.1.1.2 L'ecstasy

L'ecstasy, appelée également Adam ou Eve, a pour nom chimique le 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA). Synthétisée pour la première fois par les laboratoires de la société pharmaceutique Merck, la molécule est brevetée en 1914 comme anorexigène. Ce composé a été utilisé par l'armée pour stimuler l'éveil des troupes, ou par des psychothérapeutes pour résoudre des problèmes d'ordre relationnel [8, 9]. L'ecstasy est devenue par la suite une drogue récréative vers la fin des années 1970 ; on observe depuis une augmentation du nombre de consommateurs d'ecstasy, qui est principalement utilisée par de jeunes adultes, dans des contextes festifs.

Depuis peu, on classe l'ecstasy comme composé entactogène [10]. Cette dénomination, d'origine grecque (« en » et « gen ») et latine (« tactu »), est distincte des stimulants psychomoteurs et des hallucinogènes. Elle regroupe les composés qui permettent de « toucher l'intérieur », autrement dit, qui valorisent la conscience de soi et abolissent les barrières de la communication et les émotions. Dans cette famille, on trouve des dérivés de l'ecstasy comme la MDE (N-éthyl-(R,S)-3,4-méthylènedioxyamphétamine, ou EVE), MDA (3,4-méthylènedioxyamphétamine, ou LOVE), MBDB (N-méthyl-3,4-méthylène-dioxyéthyl-amphétamine),... Ici encore, la présence d'un carbone asymétrique est un élément très important du point de vue de la toxicité de ces molécules. Ainsi, l'effet hallucinogène de la MDE est attribué à l'énantiomère R(-), alors que l'énantiomère S(+) provoque des effets similaires à l'amphétamine. De plus, la forme R(-) serait la forme responsable des effets neurotoxiques [11].

II.1.1.3 La cocaïne

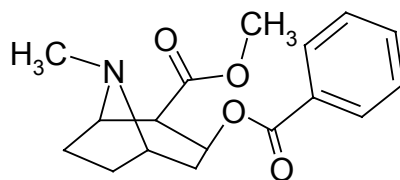
La cocaïne (Figure 3) est un alcaloïde extrait des feuilles de *Erythroxylon coca*, arbuste cultivé principalement en Amérique du Sud, et dont les plants mesurent de 70 à 80 cm. Sa structure est élucidée vers 1865, et dix ans plus tard, des dérivés de la cocaïne sont utilisés pour les anesthésies locales [12, 13]. Dès 1880 aux Etats-Unis, la cocaïne devient populaire, en particulier dans le domaine médical où on lui trouve de nombreuses applications. Elle est administrée comme tonique et pour la désintoxication de l'alcool, de l'opium et de la morphine, voire comme aphrodisiaque. Même Sigmund Freud préconise son emploi pour soigner la neurasthénie. Mais très vite, les effets néfastes de cette drogue sont constatés, Freud

décrit dès 1887 les problèmes de l'utilisation de la cocaïne pour soigner l'alcoolisme ou la dépendance à la morphine. Les premières mesures pour en limiter l'usage sont prises aux Etats-Unis en 1906.

Depuis les années 30, la consommation de cocaïne s'est progressivement répandue, d'une part à cause des mœurs des années 60, d'autre part par une amélioration de la formulation. En effet, la cocaïne, après extraction des feuilles de coca, peut être utilisée sous forme de pâte brune, ou sous forme de chlorhydrate pour un produit un peu plus élaboré. Le chlorhydrate de cocaïne permet des modes d'administrations différentes (absorption nasale, injection intraveineuse), complémentaires de la pâte brune de coca qui est seulement fumée. A partir du chlorhydrate de cocaïne et de bicarbonate de soude, on peut obtenir une forme solide qui, chauffée, produit de la vapeur de cocaïne sans la dégrader, en produisant de petit craquement sonore : le crack. Cette formulation simple d'emploi, avec un taux de pureté élevée, est la plus employée ces dernières années, surtout aux Etats-Unis.

Enfin, on constate, depuis quelques années, une augmentation du nombre d'intoxications aiguës à la cocaïne provoquées par la rupture de sachets (body packing) de drogue à l'intérieure du système digestif, lors de transport par des trafiquants et/ou pour dissimuler la drogue lors de contrôle des autorités [14, 15].

Figure 3 : Structure de la cocaïne



II.1.1.4 Phénomène de dépendance

La dépendance est une notion qui a évolué au cours du temps. Ainsi au 19^e siècle, les individus sous l'emprise des drogues étaient considérés comme des dégénérés. La distinction entre l'alcoolisme et l'abus de drogues a augmenté le rejet de ces individus socialement indésirables. Les périodes de prohibition ont accentué ce clivage en considérant l'alcoolisme comme un problème sanitaire, et la toxicomanie comme un fléau social [16]. Ce n'est qu'avec le classement des drogues par leurs effets thérapeutiques en 1952 que les toxicomanes ont été considérés comme des malades. En France, l'accès aux soins a été augmenté pour les drogués

par le vote de la loi du 31 décembre 1970, malgré l'illégalité de l'usage des stupéfiants. La société s'est intéressée un peu plus aux conditions de vie des toxicomanes ces dernières décennies en partie à cause de l'épidémie du VIH : Les utilisateurs de cocaïne ou de méthamphétamine sont une population à risque pour la transmission du virus à cause de l'utilisation de seringues [16].

Le phénomène de dépendance est lié au plaisir que procure une substance et à la nature même du cerveau. On assimile l'aire tegmentale ventrale (ATV) et le noyau accumbens, zones riches en neurones dopaminergiques, à des régions intervenant dans le système de récompense. L'excès de dopamine dans ces régions, qu'il soit provoqué par des amphétamines ou de la cocaïne, apporte un sentiment de bien être qui est rapidement suivi par un mal-être important envahissant l'utilisateur, le poussant à reprendre de la drogue. Ce phénomène est appelé renforcement négatif, et est particulièrement visible dans le cas de sevrage. A contrario, la recherche de plaisir peut être à l'origine du renforcement positif : c'est l'arrêt de cette satisfaction qui exige l'administration de la drogue pour retrouver le plaisir, non pas pour éviter le malaise. On peut supposer qu'une combinaison de ces deux phénomènes est responsable de la dépendance, et des troubles du comportement (stimulus conditionnel). Goodman a ainsi défini la notion d'addiction comme « le processus par lequel un comportement, pouvant permettre à la fois une production de plaisir et d'écarter ou d'atténuer une sensation de malaise interne, est employé d'une façon caractérisée par l'impossibilité répétée de contrôler ce comportement et sa poursuite en dépit de la connaissance de ses conséquences négatives. » [17]. A présent, l'usage abusif de drogues est considéré comme un trouble du comportement à part entière.

II.1.1.5 Métabolisme

A Métabolisme des amphétamines

D'une façon générale, le métabolisme des amphétamines est assuré par le cytochrome P450 (CYP), et le plus souvent par la famille d'isoenzyme CYP2D6 [18]. La CYP2D6 est polymorphe et est non fonctionnelle chez 5 à 9% de la population caucasienne (caractère autosomal récessif du gène) [8]. Environ 45% de la méthamphétamine ingérée est excrétée sans modification dans les urines (mécanisme pH dépendant) ; 15% est excrétée sous forme de méthamphétamine hydroxylée, 4 à 7% sous forme d'amphétamine, et le reste sous forme

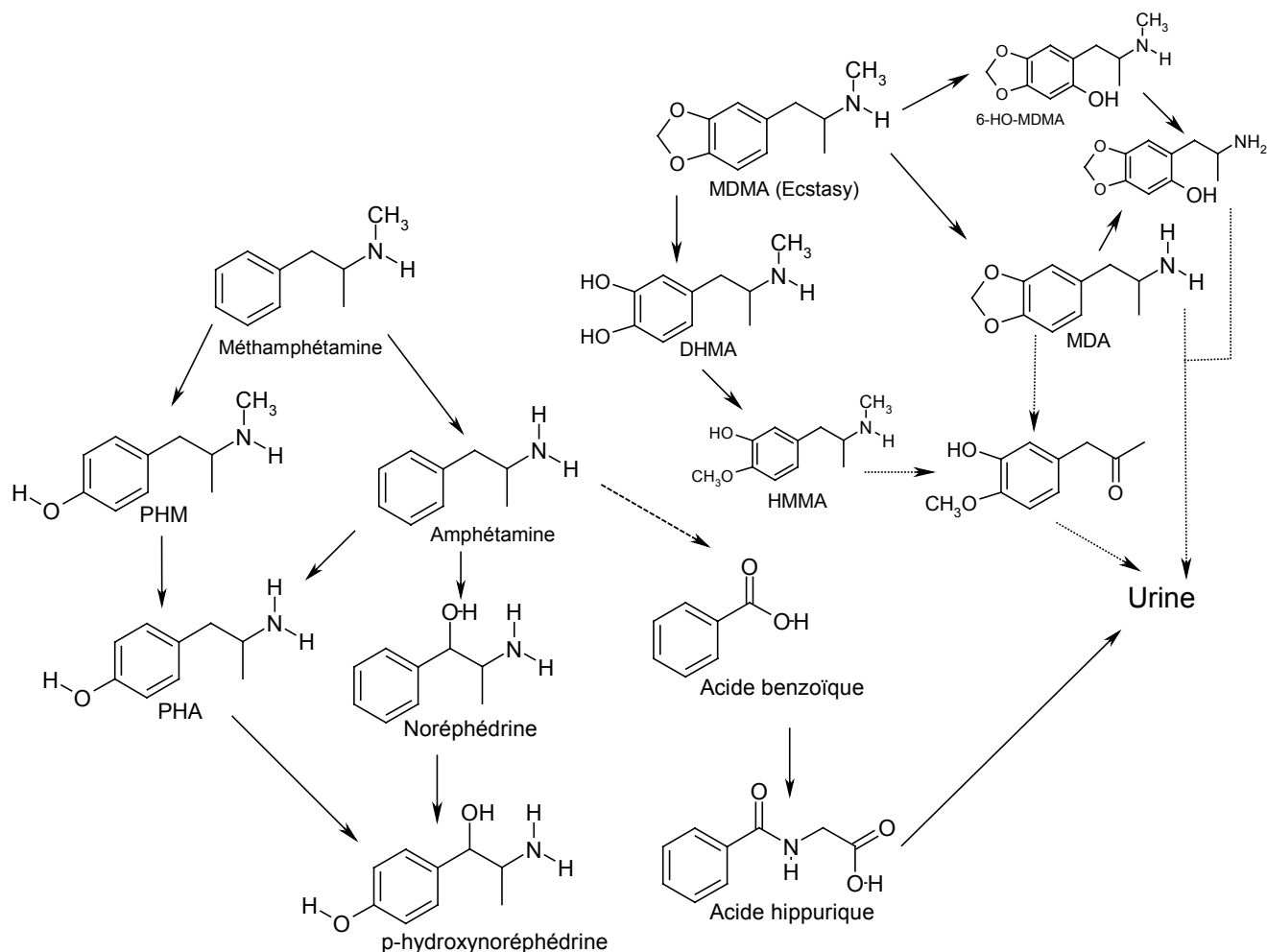
de métabolites primaires d'amphétamine. Dans le sang, la méthamphétamine a une demi-vie de 11 à 12h, avec un pic de concentration plasmatique entre 3h et 5h après injection. 23% à 43% sont excrétés dans les premières 24h, et l'élimination totale de l'organisme se produit entre 3 et 5 jours [19]. Les voies métaboliques principales de l'amphétamine et de la méthamphétamine sont des successions d'hydroxylation, N-déméthylation, déamination oxydative, N-oxydation et conjugation de l'azote. Les métabolites phénoliques sont partiellement excrétés sous forme conjuguée.

Deux voies métaboliques dominantes se chevauchent dans la dégradation des dérivés d'amphétamine chez l'homme : déméthylation et O-déalkylation (cf. Figure 4). Deux voies de déméthylation existent : *in vivo* et en présence modérée d'ecstasy, le composé majoritairement formé est le DHMA (dihydrométhamphétamine), alors qu'*in vitro*, il se forme préférentiellement du MDA. Le catabolisme préférentiel est ainsi une dégradation oxydative du groupement méthylènedioxy en 3,4-dihydroxymétabolite (DHMA), suivie d'une méthylation en position 3 du noyau aromatique aboutissant ainsi à la formation du 4-hydroxy-3-méthoxyamphétamine (HMA). La seconde voie aboutit à la formation de MDA (3,4-méthylènedioxyamphétamine) via une N-déméthylation [20]. Une troisième voie donnant des acides benzoïques est obtenue par désamination oxydative de la chaîne latérale [9]. Des variants alléliques du cytochrome P450 2D6 pourraient être responsables des différences de métabolisme entre individu [21].

L'observation du métabolisme de la MDMA et de la MDE par Meyer et al [22] a permis de mettre en évidence une quantité plus importante de S-MDE ayant franchit la barrière hémato-encéphalique que d'énantiomère R. Ces auteurs suggèrent un passage sélection énantiomérique de ces composés lors du passage de la barrière hémato-encéphalique, qui expliquerait des différences de métabolismes. Le passage de composés de petites tailles comme le sont la MDMA ou la cocaïne se fait par diffusion passive à travers les membranes lipidiques, et sans doute par transporteurs d'acides aminés neutres.

Figure 4 : Métabolisme des amphétamines

Les flèches en pointillé symbolisent des réactions avec intermédiaires. D'après [23, 18]



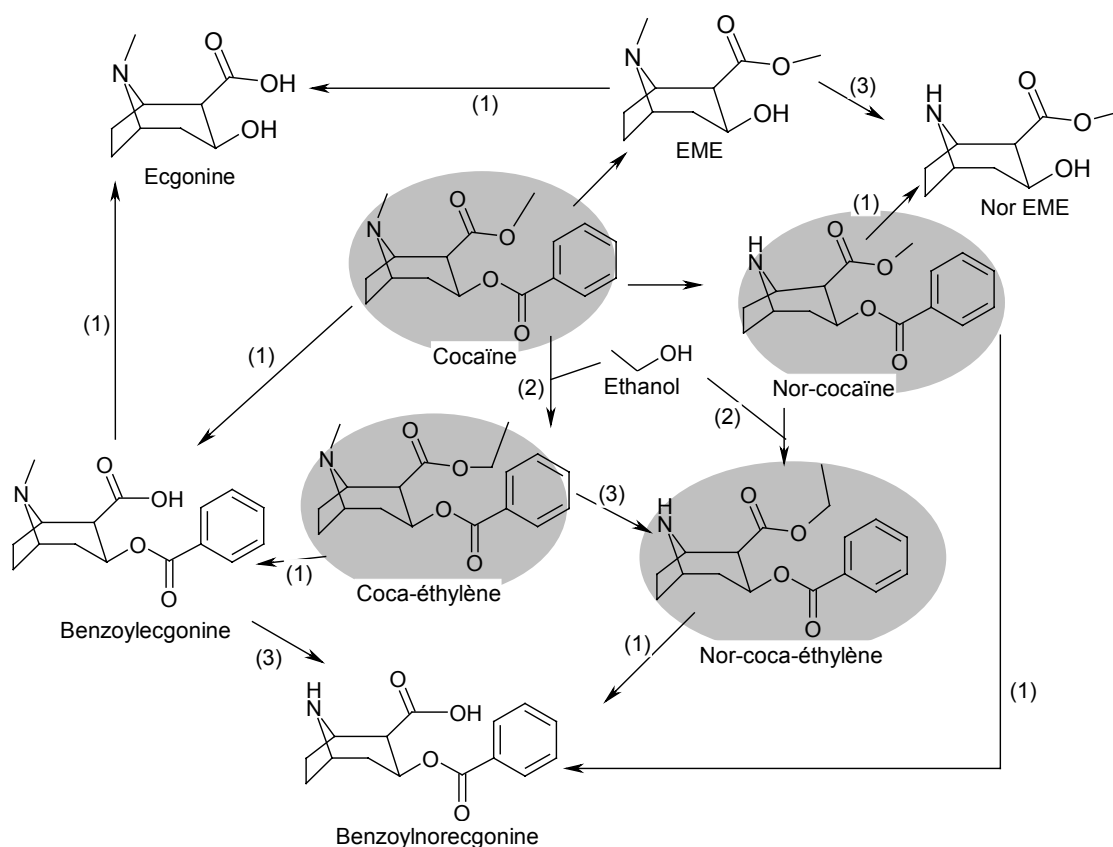
B Métabolisme de la cocaïne

Dans le sang, la cocaïne a une demi-vie de 45 à 75 min lors de prise par voie intraveineuse ou nasale, avec un pic de concentration plasmatique au bout de 30 min (1 heure par voie orale, 2 heures lors de la mastication de poudre de feuilles de coca), et 65% des morts liées à la cocaïne surviennent dans les 5 heures qui suivent l'injection de la cocaïne [24]. Plus de 80% de la cocaïne sont métabolisés en composés non toxiques que sont la benzoylecgonine, l'ester méthylique de l'ecgonine et l'ecgonine. Les carboxylésterases jouent un rôle important dans ce mécanisme d'élimination urinaire, tout comme dans la dégradation de la coca-éthylène. La coca-éthylène est formée lors de la prise combinée de cocaïne et d'alcool par trans-estérification *in vivo*, et est un composé plus toxique que la cocaïne.

Il apparaît que la dégradation de la cocaïne par l'intermédiaire du cytochrome P450 est une voie minoritaire bien que largement responsable de l'hépatotoxicité. Cette voie conduit à la formation de norcocaïne par N-déméthylation, et a pour conséquence des réactions d'oxydation au niveau du réticulum endoplasmique [25] accompagnées de la libération de radicaux libres et de superoxydes. L'hépatotoxicité provoquée par la cocaïne pourrait être potentialisée par des endotoxines comme le LPS [26]. La figure suivante présente les voies métaboliques de la dégradation de la cocaïne et de ses métabolites par les microsomes du foie, des reins, des poumons et du cerveau [27].

Figure 5 : Métabolisme de la cocaïne

Les numéros présents sur les flèches indiquent des réactions d'hydrolyse (1), de trans-estérification (2), et de N-déméthylation (3). Les composés toxiques sont sur fond de grisé.

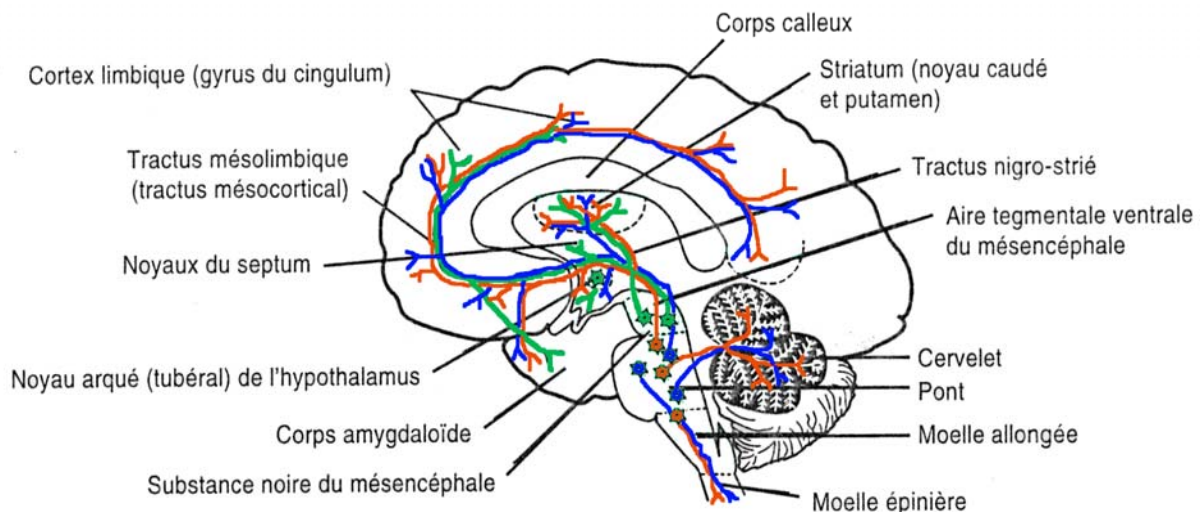


II.1.2 Rappel de physiologie

II.1.2.1 Le système nerveux central (SNC)

Les cibles des drogues de type cocaïne ou amphétamines sont les récepteurs ou les transporteurs à monoamines (catécholamine : adrénaline, dopamine et noradrénaline ; indolamine : sérotonine) localisés sur des neurones. Ces récepteurs sont impliqués dans la transmission des signaux électriques (dépolarisation de la membrane) neurones-neurones ou entre neurones-muscles, via des effecteurs chimiques, les neurotransmetteurs. La distribution des neurones contenant ces neurotransmetteurs dans le cerveau n'est pas homogène. Ainsi, la sérotonine (5-HT) est présente seulement dans les noyaux du raphé du tronc cérébral, dont les axones innervent pratiquement tout le système nerveux central en se projetant dans le télencéphale, le cervelet et la moelle épinière. Comme l'illustre la Figure 6, la dopamine et la noradrénaline sont localisées dans des régions plus diverses : localisés dans la substance noire du mésencéphale et de l'hypothalamus, les neurones à dopamine se projettent dans le tractus mésolimbique, le cortex limbique, le striatum et l'hypothalamus. Avec les noyaux localisés dans le locus ceruleus, les neurones à noradrénaline ont des projections dans toutes les parties du SNC. [28, 29].

Figure 6 : Distribution des neurones à dopamine (en vert), à noradrénaline (en bleu) et à sérotonine (rouge) et leurs projections.



Certaines régions du cerveau sont associées à des activités cérébrales (mémoire, lecture par exemple) ou des comportements (agressivité, euphorie) ou des états (insomnie, anorexie),

et peuvent être caractérisées par des concentrations élevées de certains neurotransmetteurs. La présence de neurones riches en neurotransmetteurs et leurs projections dans les différentes zones du cerveau sont à l'origine de voies de communications. Les neurones à sérotonine sont impliqués dans la régulation des affects, de l'humeur, de l'impulsivité et de la température corporelle. Les neurones à dopamine innervent des régions du cerveau impliquées dans le contrôle de la motricité, les aires cérébrales (impliquées dans le traitement cognitif de l'information, sensibles aux situations anxiogènes), et le système limbique qui intervient dans le contrôle des émotions, des affects et des motivations. Les zones impliquées dans la régulation hormonale (hypothalamus hypophyse) sont en partie régulées par les noyaux à noradrénaline, tout comme les états de vigilance et la réponse au stress, et les émotions.

II.1.2.2 Le système cardio-vasculaire

Les catécholamines sont des neurotransmetteurs importants pour la contraction du muscle cardiaque. La noradrénaline est le neurotransmetteur des 2^{èmes} neurones de la chaîne sympathique qui innervent le cœur et les vaisseaux. Son affinité pour les récepteurs β_1 de la membrane des myocytes cardiaques est responsable de l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la contractilité myocardique. La noradrénaline agit aussi sur le muscle lisse cardiaque en se liant aux récepteurs α , ce qui provoque une vasoconstriction (α_1) ou des effets modulateurs (α_2 , effet feedback de la noradrénaline). Enfin, la noradrénaline peut se fixer sur les récepteurs β_2 des artérioles du muscle strié squelettique, du foie et du cœur, induisant des effets vasodilatateurs [30].

Le système humoral peut également être source de catécholamines ayant une action sur le système cardiaque : l'adrénaline et la noradrénaline peuvent être sécrétées dans le sang par des cellules médullosurrénales. Les effets sur le système cardiovasculaire provoquent une augmentation de la fréquence cardiaque et contractile, la vasoconstriction des vaisseaux et la vasorelaxation. Ce sont des différences d'affinités pour les récepteurs α et β qui régulent ce système : l'adrénaline a plus d'affinité pour les récepteurs β qu' α , et inversement pour la noradrénaline.

II.1.3 Effets physiologiques et psychologiques des amphétamines et de la cocaïne

Les drogues de type stimulant ont une multitude d'effets qui dépendent du type de composé, de la dose et des voies d'administration. Par exemple, les effets sont habituellement plus puissants lorsque ces drogues sont injectées. En règle générale, on considère que les actions recherchées persistent pendant trois à six heures pour les amphétamines, alors que celles de la cocaïne ne durent pas plus d'une heure.

Les effets désirés lors de l'usage d'amphétamine ou de cocaïne sont de provoquer l'euphorie, de réduire le sommeil, voire de l'empêcher : la vigilance est temporairement augmentée, et la sensation de fatigue est limitée. L'estime de soi peut être renforcée, la psychomotricité stimulée et la libido accrue. En plus de ces actions, l'ecstasy permet une levée des inhibitions sociales avec augmentation de la sensualité et des besoins de contacts tant physiques qu'intellectuels, avec des effets hallucinatoires. On observe aussi des comportements stéréotypés (ou de masse) avec l'usage de certaines molécules dont la méthamphétamine [31].

Pour toutes ces drogues, plus les doses sont importantes, plus les effets « indésirables », dus à la fin de l'activité, sont également importants. Ainsi, des comportements dépressifs, violents ou suicidaires peuvent être rencontrés chez des utilisateurs, particulièrement lors d'intoxications aiguës. Le tableau suivant résume les concentrations sanguines associées aux toxicités pour quelques drogues étudiées.

Tableau 1 : Concentrations sanguines (µg/mL) de quelques drogues associées à leurs niveaux de toxicité [32]

Droque	Non Toxique	Toxique	Mortel
Amphétamine	0,03-0,11	>0,5	>1
Méthamphétamine	0,01-0,05	0,6-5	>10
Cocaïne	0,05-0,93	0,9	1-20

II.1.3.1 Action sur le système nerveux central (SNC)

Les amphétamines agissent sur la libération de neuromédiateurs de type dopaminergique et sérotonergique. Via les vésicules contenues dans le cytoplasme des

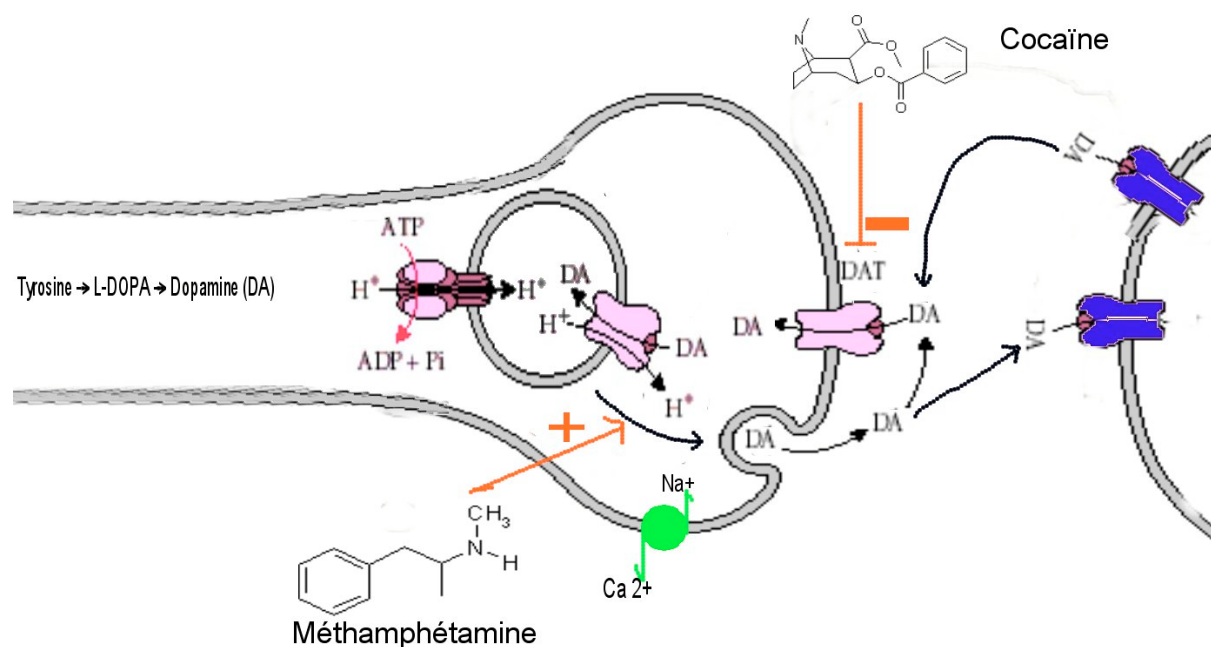
neurones, elles libèrent massivement les neurotransmetteurs dans l'espace intra-synaptique tout en inhibant les transporteurs chargés du recyclage de ces molécules [33, 34]. Elles épuisent ainsi les neurones en neurotransmetteur, provoquant en conséquence des effets temporaires, ne perdurant que pendant le temps où l'activité de certains réseaux neuronaux du cerveau sont amplifiés. L'ecstasy, et ses dérivés ont une action préférentielle sur les neurones à sérotonine [9, 35] ; les effets psychologiques indiqueraient un rôle de la sérotonine et de nor-épinephrine [36], mais les effets euphorisants de la MDMA sont dus à des interactions avec le système dopaminergique (libération dose dépendante de dopamine chez le rat [37]).

La cocaïne a de grandes affinités pour les transporteurs à la dopamine, à la sérotonine et à la noradrénaline, ce qui inhibe le recyclage de ces amines dans les neurones pré synaptiques. De plus, elle se fixe modérément sur divers canaux ioniques [38] ; par exemple, son action sur les canaux sodiques, au niveau des axones, est à l'origine de l'utilisation de la cocaïne comme anesthésique local.

Pour résumer, les drogues stimulantes que sont les amphétamines et la cocaïne augmentent la quantité de neurotransmetteurs dans les espaces intra-synaptiques, prolongeant ainsi les signaux (Figure 7).

Figure 7 : Exemple d'action de la cocaïne et de la méthamphétamine sur un neurone à dopamine.

DA : Dopamine ; DAT : Transporteur à dopamine ; H^+ : proton



D'autres dispositifs liés à l'activité nerveuse peuvent être perturbés par la prise de stupéfiant. Par exemple, l'ingestion de MDMA, de MDA et de MDE est associée à une augmentation de la salivation, de la bruxomanie (grincement des dents) et du trismus (crispations de la

mâchoire). Ces deux derniers effets provoqués par les muscles faciaux peuvent être expliqués par le re-largage de sérotonine qui est le neuromédiateur des fibres excitatrices du nerf crânien VII (nerf facial).

A fortes doses, les amphétamines peuvent chez l'animal provoquer une perte durable de terminaison nerveuse à dopamine dans le striatum. Ces modifications ont une incidence directe sur le fonctionnement du cerveau, par conséquent peuvent expliquer des changements de comportement [39, 31]. Des dommages sur des terminaisons nerveuses à sérotonine induits par une dose élevée de méthamphétamine ont pu être mis en évidence chez l'animal, ainsi que des activités diminuées pour les enzymes responsables de la synthèse de dopamine et de sérotonine [40]. Ces observations ont été particulièrement bien mises en évidence avec l'ecstasy : dans un premier temps, la drogue produit un largage rapide de sérotonine, suivi par une diminution substantive du taux de sérotonine et de 5-HIAA (acide 5-hydroxyindoleacétique), le métabolite majeur de la sérotonine dont le retour à la normale survient au bout de 24h.

L'abus prolongé de méthamphétamine peut provoquer une psychose paranoïaque-hallucinatoire, qui dans certains cas peut être confondue avec une schizophrénie paranoïaque [41]. Une consommation abusive de ces stupéfiants peut provoquer des pertes de mémoire et des indices persistants de neuro-dégénérescence dans le cerveau humain qui pourraient induire à long terme des maladies de type Parkinson [34]. Chez la souris, la perte de catécholamine dans la région striatale par l'action de la MDMA reflèterait une dégénération neurotoxique des terminaisons nerveuses à dopamine comme cela est le cas lors de l'administration de méthamphétamine chez des rongeurs (souris et rats) [42].

La stéréochimie est un facteur important vis-à-vis de la neurotoxicité, aussi bien pour les amphétamines et leurs dérivés que pour la cocaïne. Carroll [43] a démontré que le site de fixation de la cocaïne sur le transporteur de la dopamine est stéréospécifique, d'une affinité 60 à 670 fois supérieure pour la forme R(-). Au niveau fonctionnel, on peut citer l'exemple de la MDMA dont les deux énantiomères causent une déplétion importante de sérotonine corticale, mais seulement la forme S-(+) induit des déplétions significatives de sérotonine et de transporteur 5HT sept jours après l'administration. Autre exemple, la S-(+)-MDA provoque des changements de comportements plus importants que les deux énantiomères de la MDMA,

ce qui indiquerait que la S-(+)-MDA aurait des effets supplémentaires sur le système nerveux central en plus du système sérotonergique [44].

II.1.3.2 Action sur le système cardio-vasculaire

Les amphétamines augmentent la fréquence cardiaque, ce qui engendre une hypertension artérielle pouvant être la source d'hémorragies et d'arythmies. L'action de la méthamphétamine sur le rythme cardiaque se déroule en deux étapes, une bradycardie initiale suivie par une tachycardie. Une injection de S-(+) méthamphétamine en intraveineuse (IV) à une dose faible (30 mg) peut provoquer une élévation significative du rythme cardiaque et de la pression artérielle de manière dose dépendante. Ces effets ont été partiellement expliqués par une interaction avec les récepteurs α_1 et β_1 adrénergique, et par une stimulation dopaminergique pour les effets hémodynamiques périphériques [45]. L'action vasoconstrictrice de ces molécules accentue encore ces conséquences. L'effet de la prise répétée de méthamphétamine, sur le système cardiovasculaire, suivie d'une période d'abstinence n'est pas négligeable. Ainsi, une dose journalière de méthamphétamine chez l'homme développe une tolérance à la tachycardie, mais pas aux changements de pression artérielle dus à la drogue [46].

Comme pour les amphétamines, il a été montré chez le rat que l'ecstasy pouvait provoquer des troubles cardiaques de type tachycardie ou arythmie, mais également faciliter la vasoconstriction. Ces dysfonctionnements cardiaques provoquent alors une hyperthermie associée à une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) et à une rhabdomyolyse. Dans de rares cas, cette élévation rapide de température corporelle au-dessus de 42°C conduit à la mort [47]. Il est à noter que cette hyperthermie n'est pas liée à la dose, ni même aux habitudes de consommation, et peut refléter une action sur le système sérotonergique [44].

Les effets sur le système cardio-vasculaire de la cocaïne sont importants, ainsi la prise de cocaïne augmente le risque d'infarctus du myocarde [48, 49]. Ce phénomène, sans doute dû au blocage de la re-capture de la noradrénaline dans les terminaisons nerveuses, peut avoir des effets sur la vasoconstriction coronarienne et sur la stimulation cardiaque pouvant conduire à l'infarctus du myocarde [50]. Parallèlement, la cocaïne provoque une vasoconstriction de la plupart des vaisseaux sanguins. Ce phénomène peut aboutir à la nécrose de certains tissus insuffisamment irrigués dont l'exemple typique est la destruction de la cloison nasale.

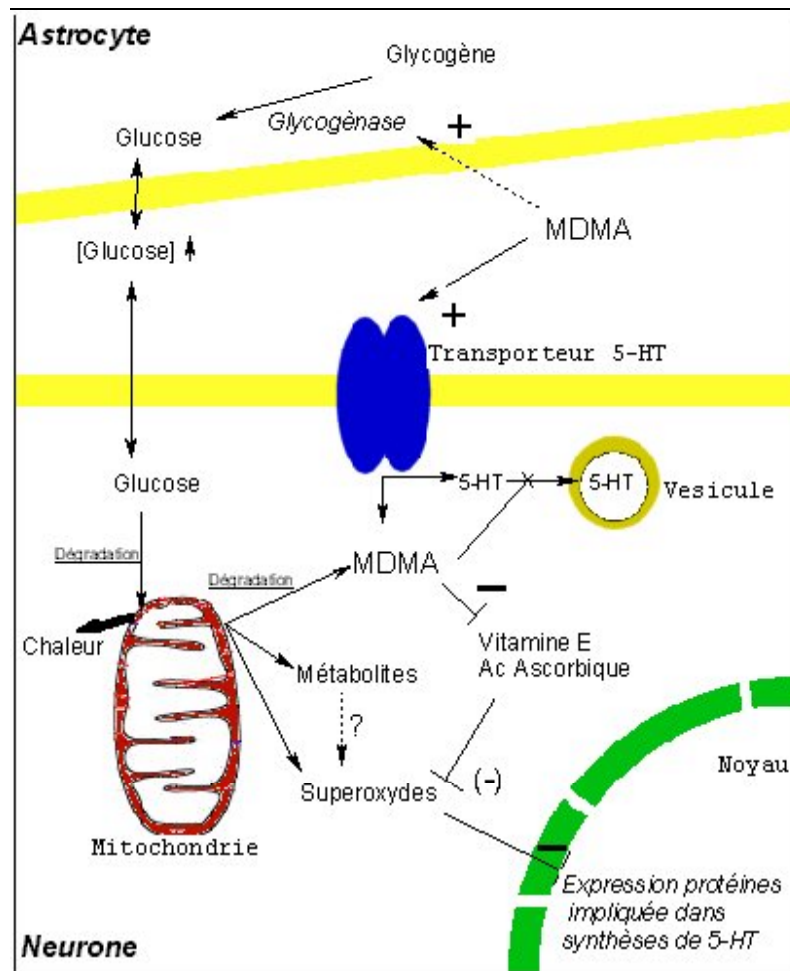
L'ingestion d'alcool combinée à celle de cocaïne conduit à la formation d'un composé plus toxique que la cocaïne ou l'alcool seul, la coca-éthylène. La coca-éthylène provoque une dépression significative de la fonction cardiaque, et prolonge la conduction cardiaque. Un blocage puissant de canaux sodiques diminue l'impulsion transmise et la relaxation / la contraction du myocyte [24]. On constate également que la coca-éthylène est moins anxiogénique, mais prolonge l'effet initial de la cocaïne. La coca-éthylène a une demie vie plus longue que la cocaïne (quelques heures (3,5 à 5,5h) contre moins d'une heure pour la cocaïne) [51], ce qui provoque une concentration plasmatique égale ou supérieure à celle de la cocaïne.

Il a été montré que la coca-éthylène agit comme un mécanisme sérotonergique à faible concentration pour potentialiser l'effet des neurones excités par l'éthanol, et comme un mécanisme dopaminergique à fortes concentrations. Le potentiel de la coca-éthylène dans ces deux actions est similaire à ceux de la cocaïne. Ces effets de la coca-éthylène sont propices à contribuer à des effets synergiques sur le mécanisme de récompense dopaminergique quand l'éthanol et la cocaïne sont utilisés ensemble [52].

II.1.3.3 Autres actions cellulaires

A l'intérieur des cellules, les amphétamines ou la cocaïne semblent provoquer une élévation de radicaux libres, éléments très nocifs pour la cellule. Prenons l'exemple de la MDMA. Chez le rat, sa présence cause des dégâts aux neurones sérotonergiques en augmentant le taux de radicaux libres formés (stress oxydatif) dans les terminaisons nerveuses, après avoir été incorporée dans la cellule via les transporteurs à sérotonine [53]. La vitamine E et l'acide ascorbique, deux agents anti-oxydants, diminuent en concentration sous l'effet de l'ecstasy qui augmente la formation de radicaux hydroxy [54]. Ce stress oxydatif, accompagné par un affaiblissement des réserves énergétiques du cerveau (stress bioénergétique), contribuent aux mécanismes neurotoxiques des dérivés amphétamines : une injection d'ecstasy provoque une diminution dose dépendante de glycogène dans le cerveau qui persiste pendant 1h, provoquant l'hyperthermie [55, 56, 47] (Figure 8). On constate tout de même qu'une diminution de la température ambiante diminue les effets neurotoxiques de la méthamphétamine chez le rat [31], mais le mécanisme n'est pas tout à fait compris.

Figure 8 : Illustration de l'action de l'ecstasy sur un neurone à sérotonine



L'étude des effets des amphétamines et de la cocaïne ont mis en évidence des modifications du fonctionnement génomique de la cellule. Ces drogues peuvent activer des gènes intervenant dans la médiation de la réponse comportementale [57], ou être responsables du déclenchement de l'apoptose cellulaire [58, 59].

II.2 L'immunothérapie

A ce jour, il n'existe pas de médicament pour neutraliser ou inverser spécifiquement les effets des drogues dans le corps humain ; les traitements à base de buprénorphine, de méthadone (substituant de l'héroïne) ou de naltrexone (lutte contre l'alcoolisme) ne sont que des substituts pour calmer le désir de consommer.

Deux stratégies coexistent pour neutraliser les drogues libres circulantes dans le système sanguin et faire diminuer leur taux dans les tissus. La première est d'utiliser des enzymes de type estérase pour augmenter le catabolisme des drogues, en favorisant la formation de composés non toxiques. Chez l'homme, la cocaïne est dégradée par des enzymes naturellement présentes dans le plasma (butyrylcholinestérase ou BchE) [60], et le foie (carboxylestérase humaine hCE-1 et hCE-2)[61, 25]. Avec une demi-vie de plusieurs jours, la BchE pourrait être une solution pour le traitement des intoxications aiguës à la cocaïne. Cependant, son activité catalytique faible ($k_{cat} = 154 \text{ min}^{-1}$) mais surtout la constante de Michaelis de cette enzyme ($K_m = 18 \text{ }\mu\text{M}$) nécessiterait des quantités très élevées pour permettre de diminuer de façon significative les effets physiologiques et toxiques de la cocaïne (K_m de l'ordre de $100 \text{ }\mu\text{M}$ pour les hCE [25]). Par biologie moléculaire, S. Brimijoin et al ont obtenu une enzyme recombinante de la BchE (r-BchE) afin d'améliorer les caractéristiques catalytiques [60]. Les résultats présentés montrent une augmentation de l'activité catalytique ($k_{cat} = 4,1 \text{ min}^{-1}$) mais une faible augmentation de la constante de Michaelis ($K_m = 4,5 \text{ }\mu\text{M}$). Bien que l'administration de r-BchE permet une diminution de la concentration en cocaïne plasmatique correspondant à une augmentation de métabolites non toxiques (Benzoylecgonine, ester méthylique d'ecgonine), les auteurs ne démontrent pas l'efficacité de cette enzyme à réduire les effets physiologiques et toxiques de la drogue (le seuil de toxicité de la cocaïne dans le sang est de l'ordre de $3 \text{ }\mu\text{M}$).

La seconde est l'emploi d'anticorps spécifiques pour former des complexes drogue-anticorps, permettant ainsi l'élimination des drogues par phagocytose (exemple digitaline). Ces anticorps peuvent être endogènes dans le cas d'une immunisation active (vaccin, [62, 63]) ou injectés dans le cas d'une immunisation passive.

Certaines équipes ont choisi une voie intermédiaire en utilisant des anticorps catalytiques. Mis en évidence par Schultz et Lerner en 1986 [64], il s'agit d'anticorps possédant une activité enzymatique, dont les mécanismes sont comparables aux enzymes. Dans le domaine des stupéfiants, cette démarche a été employée contre la cocaïne, sans grand succès à ce jour : mis à part l'anticorps catalytique murin mAb15A10 obtenu par l'équipe de Landry DW [65-68], très peu ont été décrits, et à ce jour, aucun anticorps de ce type n'est disponible pour le domaine thérapeutique. Les vitesses des réactions des anticorps catalytiques sont pour le moment très inférieures à celles des enzymes, et les quantités d'anticorps nécessaires à la neutralisation des effets toxiques sont trop importantes pour une application chez l'homme. A titre d'illustration, on observe une diminution significative de la quantité de cocaïne dans le sang à partir d'une dose de 100mg/kg d'anticorps catalytique mAb15A10 chez l'animal ([68],

[65], [69]). Cette quantité importante d'anticorps à injecter s'explique par une constante de Michaelis élevée ($K_M = 220 \mu\text{M}$), et dans une moindre mesure par son activité catalytique (k_{cat}) évaluée *in vitro* à $2,3 \text{ min}^{-1}$ [70].

II.2.1 Rappel sur la structure des anticorps

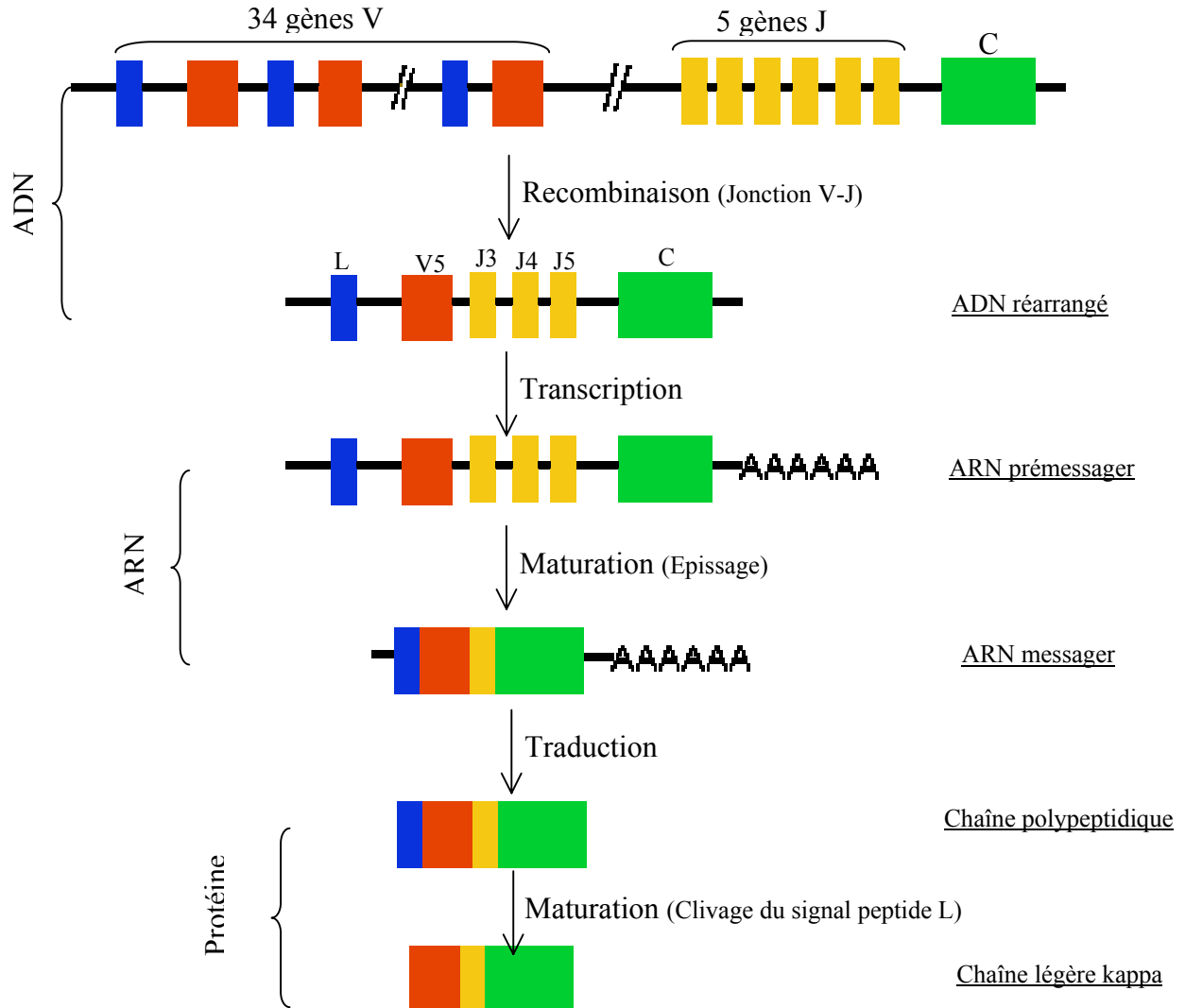
Notre approche repose sur les propriétés des anticorps à fixer de façon spécifique une molécule donnée. Un anticorps, ou immunoglobuline (Ig), est une protéine composée de différentes chaînes polypeptidiques, et exprimée, puis sécrétée, par des lymphocytes B. On distingue les anticorps en différentes classes en fonction de la nature de la chaîne lourde (μ , δ , γ , α et ϵ) qui les composent. Dans des applications d'immunothérapie, la classe d'anticorps la plus couramment employée est l'IgG, composée de deux chaînes légères identiques κ ou λ , et de deux chaînes lourdes γ identiques qui sont réunies par des ponts disulfures (Figure 10).

La chaîne légère est constituée de deux domaines, une région variable et une constante, tandis que la chaîne lourde est formée d'une région variable et trois constantes. Ces régions variables, en position N terminale de chaque polypeptide, contiennent des régions hypervariables au nombre de trois appelées CDR (Complementary Determining Regions), séparées par des régions plus conservées appelées régions charpentes (ou framework). La juxtaposition dans l'espace des CDR de la chaîne légère et de la chaîne lourde définit le paratope (site de liaison de l'anticorps à l'antigène). La variabilité des CDR s'explique par le réarrangement des gènes codants pour les immunoglobulines. La région variable de la chaîne lourde est composée de 3 familles de gènes, V D et J, et celle de la chaîne légère de deux familles V et J, chaque famille regroupant plusieurs gènes. C'est la combinaison d'un gène de chaque famille qui va être à l'origine de la diversité des anticorps : en dehors des mutations somatiques, cette diversité combinatoire permet de composer plus de 10^8 à 10^9 IgG différentes chez l'homme (10^6 à 10^7 chez la souris). Ces réarrangements aboutissent à la formation d'un gène unique comportant un seul gène V, un seul gène D et un seul gène J codant pour la chaîne lourde (un seul gène V et J codant pour la chaîne légère, cf. Figure 9), et un lymphocyte n'exprimera qu'un seul type d'anticorps.[71, 72]

Figure 9 : Synthèse d'une chaîne légère kappa d'immunoglobuline.

D'après http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/_FR/Genetique/figure2.html

Schéma de recombinaison V-J et étapes de transcription, épissage, traduction et maturation de la chaîne légère kappa. Le peptide signal L est clivé immédiatement après synthèse dans le réticulum endoplasmique pour donner une chaîne kappa mature.

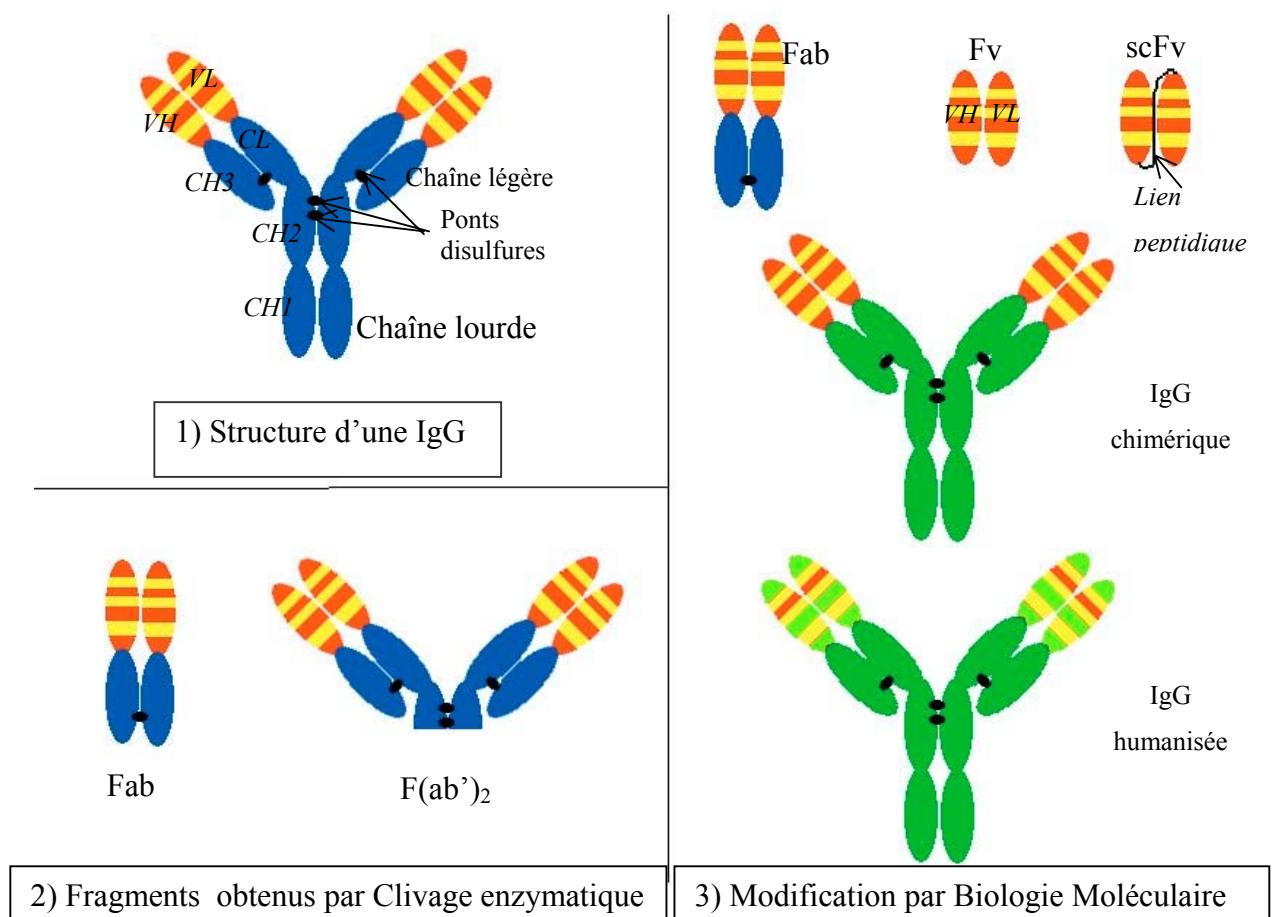


Les régions constantes des chaînes lourdes ont des rôles importants. Tout d'abord, on définit une région charnière entre les domaines constants C1 et C2 qui assure la flexibilité de la molécule, permettant la mobilité dans l'espace des deux bras. D'autre part, ces domaines sont des sites de clivages pour des enzymes protéolytiques (pepsine, papaïne, ...), permettant la libération de fragments $F(ab')_2$ ou $F(ab)$ et Fc . Ce dernier fragment assure l'essentiel des propriétés impliquées dans de nombreux processus biologiques : activation du complément, liaisons aux récepteurs Fc et aux membranes cellulaires, transfert placentaire, ... Grâce à la fragmentation de l'anticorps, on élimine ainsi des interactions pouvant nuire à son utilisation *in vivo*. La partie constante des anticorps est très conservée entre individu de même espèce, ce

qui n'est pas vrai entre espèces différentes, même si de nombreuses homologies peuvent exister, comme entre l'homme et la souris. L'anticorps peut alors être perçu comme un antigène et être détruit par l'organisme receveur. En supprimant la partie Fc, on diminue ce risque. Une autre possibilité, dans le cas d'anticorps monoclonaux, consiste à remplacer des régions de l'immunoglobuline par biologie moléculaire : des domaines d'immunoglobulines d'une espèce donnée, par exemple murin, sont remplacés par des domaines homologues d'espèces différentes (par exemple humain). On obtient soit des anticorps chimériques lorsque seuls les domaines constants sont remplacés, soit des anticorps humanisés lorsque des acides aminés des régions charnières sont également changés (Figure 10).

Figure 10 : Structure d'une immunoglobuline G et de ses dérivés

Les domaines constants murins sont figurés en bleu, les régions charnières d'origine murine en rouge et les CDR d'origine murine en jaune. Les séquences humaines sont figurées en vert.



II.2.2 Principe de l'immunothérapie

L'immunothérapie, méthode thérapeutique consistant à stimuler de façon active ou passive les réactions immunitaires [73], a vu le jour à la fin du 19^e siècle avec la neutralisation de venins de serpents chez l'animal. De nos jours, l'usage des anticorps dans le domaine médical va du marquage histologique, à la destruction de cellule cible par couplage de l'anticorps à une source radioactive, en passant par l'activation de pro-droque. Quel que soit le domaine d'application envisagé, c'est la spécificité de la reconnaissance des anticorps pour une cible donnée, ainsi que leur capacité à être modifiés (marquage, clivage...) qui en font un outil de choix. De plus, il s'agit de molécules stables supportant des variations de pH ou de températures, et dont la production est, en général, relativement aisée.

Notre approche est basée sur le concept de l'immunothérapie par voie passive. Grâce à l'injection d'anticorps ou de fragments d'anticorps dans le système circulatoire, les substances toxiques sont capturées, limitant ainsi la capture tissulaire et favorisant leur élimination par le système immunitaire (macrophages) et rénale.

Les anticorps utilisés pour l'immuno-toxico-thérapie, ou pour l'immunothérapie, sont le plus souvent sous forme réduite en fragment Fab (intoxications digitaliques) ou en $F(ab')_2$ (anti-venins), ceci pour plusieurs raisons :

- Diminuer fortement les risques d'immunogénicité de l'anticorps en éliminant la partie Fc, qui n'intervient pas dans la reconnaissance de l'antigène, mais interagit avec les cellules de l'organisme. A noter que les fragments $F(ab')_2$ peuvent provoquer la formation d'anticorps anti-idiotype, pouvant neutraliser l'action de l'anticorps spécifique.
- Favoriser l'élimination par voie rénale (cf. Tableau 2) : Les IgG ont une clairance sanguine plus lente, ce qui augmente le risque de provoquer des réactions d'immunogénicité. Un compromis doit être trouvé entre la taille de l'anticorps, sa demi-vie dans l'organisme et sa capacité à accéder à l'antigène ; c'est pourquoi le fragment $F(ab')_2$ est très souvent sélectionné pour les toxines alors que le fragment Fab est plus employé pour les petites molécules comme les drogues.
- Augmenter le volume de distribution et pénétrer les organes cibles comme le système nerveux central après avoir franchi la barrière hémato-encéphalique (Si la taille des fragments est suffisamment petite comme les Fab ou les scFv)

Ce dernier point est très important quand on sait que de nombreux produits thérapeutiques sont incapables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Les drogues lipophiles de petites

tailles (<600 Da), comme la cocaïne ou la méthamphétamine, peuvent entrer dans le cerveau en pénétrant la membrane lipidique des cellules endothéliales. La diffusion passive d'une drogue dépend des gradients de concentration entre le cerveau et le sang, de sa solubilité lipidique, et est inversement reliée au degré d'ionisation et au poids moléculaire [74].

Tableau 2 : Demi-vie des anticorps suivant le format

Synthèse de données d'après [75], [76], [77], [78]

Format	Demi-vie	Format	Demi-vie
IgG humaine	24 jours	Fragment F(ab') ₂	16 à 48 heures
IgG recombinante	11 à 24 jours	Fragment Fab'	4 à 24 heures
IgG humanisée	3 à 24 jours	Fragment Fab	2 à 23 heures
IgG chimérique	4 à 15 jours		

II.2.3 Domaines d'application

Les anticorps utilisés en immunothérapie peuvent avoir trois fonctions : identifier, capturer et détruire. Ces deux dernières fonctions sont très largement développées à l'heure actuelle dans le domaine médical comme l'illustrent les deux exemples d'applications suivants et le Tableau 3.

II.2.3.1 Action neutralisante

L'immunothérapie est née avec les premiers essais de neutralisation des venins de serpent chez l'animal, à l'aide d'anticorps ou de fragments d'anticorps. Rapidement, des anticorps spécifiques ont été développés pour la neutralisation de toxines ou le traitement d'intoxication à des médicaments, comme la digoxine (cardiotonique extrait de la digitale laineuse) ou plus récemment des anti-dépresseurs, mais également comme complément thérapeutique. C'est le cas du Abciximab, un fragment Fab chimérique de haute affinité (~1-5 nM), dirigé contre le complexe glycoprotéique GP IIb/IIIa, qui est utilisé comme inhibiteur de l'agrégation plaquettaire pour prévenir les complications chez certains patients atteints de maladies cardiaques [79].

Des fragments d'anticorps (Fab) capables, lors d'intoxications aiguës, de neutraliser la digoxine dans la circulation sanguine sont actuellement commercialisés par différentes entreprises (par exemple, Digidot chez Roche ou Digibind Chez Wellcome [80, 81]) : dans 90% des cas d'intoxication à la digoxine, un début d'amélioration est observé 19 min environ après l'administration de Digibind. Ces anticorps sont injectés sous forme de Fab car ils sont 3 fois plus efficaces que les IgG en raison du plus grand volume de distribution et de l'élimination rénale précoce des complexes Fab-digitalique.

Dans le domaine de drogues, des anticorps anti-phencyclidine (PCP) ont été obtenus et les fragments Fab sont en cours de tests cliniques. Les résultats chez l'animal ont montré la capacité des fragments Fab anti-PCP à diminuer rapidement les effets de cette drogue sur le comportement [82, 83]

Cette technique nécessite d'obtenir des anticorps d'affinité suffisamment élevée pour maintenir un complexe anticorps-drogue stable, et permettre une élimination de la drogue. De plus, et mis à part le coût très élevé de cette stratégie [79], un inconvénient majeur de l'utilisation des anticorps non humain reste qu'ils ne peuvent être injectés qu'un nombre de fois réduit (1 à 2 fois) pour éviter des complications liées au développement d'anticorps capable d'inhiber leur action (réactions antigéniques). En effet, il n'est pas envisageable de chimériser ou d'humaniser des anticorps pour cette stratégie compte tenu du coût d'une telle modification.

II.2.3.2 Outils de cancérologie

En médecine nucléaire, les anticorps ont été initialement utilisés pour diagnostiquer et localiser des tumeurs solides (immunoscintigraphie). Dans cette méthode, des anticorps couplés à un élément radioactif vont être injectés par voie intraveineuse, et se fixer au niveau de la tumeur. A l'aide d'une caméra gamma, ces anticorps sont détectés, ce qui permet ainsi la visualisation précise des zones atteintes. On peut citer par exemple le Zelavin ou le Bexxar, deux anticorps murins entiers tous deux dirigés contre la protéine CD20, et radiomarqués respectivement à l'isotope Y-90 (radiation bêta) et à l'isotope I-131 (radiation bêta et gamma) [76].

La radioimmunothérapie a été développée à partir de cette technique : les anticorps injectés, sous forme de fragments ou chimériques/humanisés, délivrent des doses tumoricides à des micrométastases grâce au couplage d'éléments radioactifs dont les radiations sont

capables d'atteindre les noyaux de cellules environnantes [84]. A l'heure actuelle, ces techniques nécessitent des doses élevées d'anticorps ce qui entraînent des effets secondaires importants. De ce fait, de nombreuses recherches sont en cours pour mettre au point de nouvelles stratégies comme l'utilisation de radio-isotope à effet à faible distance (Borothérapie) ou l'utilisation de systèmes en deux ou trois temps [85, 86] : le principe de base est de découpler la phase de localisation des tumeurs de la phase de destruction de celle-ci dans le but de diminuer l'irradiation non spécifique des organes cibles. De là est né le concept ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy), qui associe l'utilisation d'un anticorps spécifique est couplé à une enzyme et d'une prodrogue capable de libérer une molécule toxique sous l'action de l'enzyme liée à l'anticorps. Cette méthode présente l'avantage d'une destruction localisée, compatible avec des concentration élevés de molécules active au niveau de la tumeur. Cependant, cette technique est limité par le choix de l'enzyme couplé à l'anticorps, et au risque de réaction immunitaires associé ; c'est pourquoi certains auteurs propose l'usage d'un anticorps catalytique en remplacement de l'enzyme (stratégie ADAPT). Une alternative proposée à cette méthode est le système AES (Affinity Enhancement System) mis au point par J Barbet [87] : Ce procédé repose sur l'utilisation d'anticorps bispécifique, à la fois dirigé contre un antigène tumoral et contre un haptène, et d'un haptène chélateur d'un radio-isotope. Par exemple, le fragment d'anticorps se fixe sur la cellule tumorale, puis un haptène chélateur d'un radioisotope reconnu par cet anticorps est injecté.

L'utilisation des anticorps offre une solution d'avenir pour le traitement des cancers, complémentaire des techniques de chimiothérapie [88], comme le montrent des produits commercialisés tels que le Rituximab (anti-CD20 chimérique) dans les lymphomes [76] et le Trastuzumab (anti-Her 2-neu humanisé) dans les cancers du sein [89]. Dans ces deux cas exemples, l'anticorps est l'agent « actif », c'est-à-dire que la fixation de l'anticorps à un récepteur provoque la lyse de la cellule (via l'activation du système immunitaire), ou l'inactivation d'un signal intracellulaire.

Tableau 3 : Exemples d'anticorps utilisés en immunothérapie et en immunotoxicothérapie

Synthèse de données d'après les données fournisseurs (fiches techniques) et [76, 89, 78, 88, 75]

Domaine	Nom générique	Type	Indication	Dose
Immunothérapie	Muromonab	IgG Murin	Greffe de reins	5 mg / jour
	Basiliximab	Chimérique	Greffe de rein	4 à 20 mg
	Trastuzumab	Humanisé	Métastases du cancer du sein	2 à 4 mg/kg
	Abciximab	Chimérique	Anti-plaquette	0,125 à 0,25 mg/kg
	Palivizumab	Humanisé	Anti-viral	15 mg/kg
	Alemtuzumab	Humanisé	Leucémie LB chronique	30 mg
Immunotoxicothérapie	Digidot	Fab de chèvre	Intoxication à la digitoxine	0,4 à 1,6 g
	Bothrofav	Fab ₂ équien	Envenimation au Bothrops	
	CroFab	Fab de chèvre	Envenimation de serpent	3 à 9 g

II.3 Anticorps polyclonaux anti-cocaïne

La neutralisation des effets de toxines (peptides ou composés chimiques) par immunisation passive a été privilégiée par la société DrugAbuse Sciences pour l'élaboration de produits thérapeutiques, avec la production d'anticorps polyclonaux spécifiques chez l'animal.

II.3.1 Travaux préliminaires

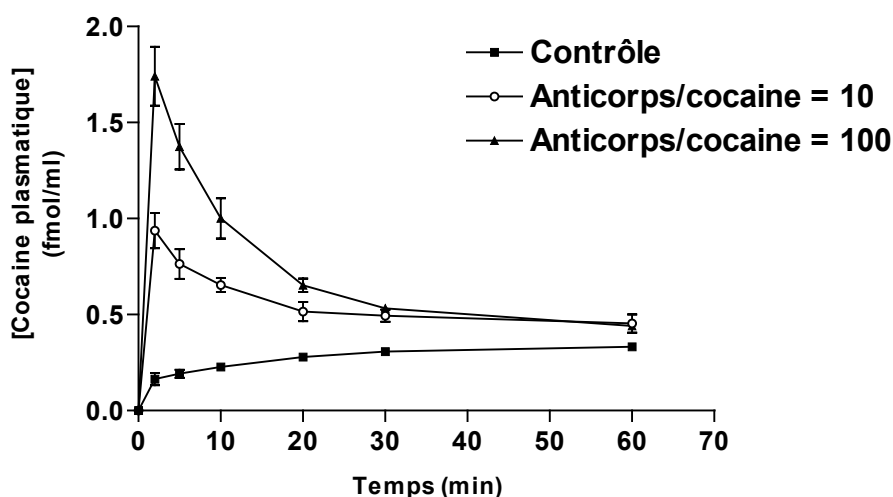
Une première étude, menée par JM Sherrmann [90], a été réalisée pour s'assurer que des anticorps murins spécifiques peuvent, dans le sang, inhiber le passage de la cocaïne dans le cerveau, et que cette capture par des anticorps diminue la quantité de drogue dans le cerveau, grâce à la création d'un gradient.

Le premier point de cette étude a été réalisé à l'aide du modèle de perfusion cérébrale *in situ* décrit par Takasato et coll. [91] chez le rat, avec un anticorps monoclonal spécifique de souris ($K_a = 5,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$) ayant une réactivité croisée importante pour la benzoylecgonine. Brièvement, différents mélanges d'anticorps et de cocaïne marquée (^3H -cocaïne) de

stœchiométrie variable ont été injectés dans le cerveau. Les résultats montrent que l'inhibition de la capture cérébrale de la cocaïne est dépendante du pourcentage de la fraction libre de cocaïne et de la stœchiométrie du mélange.

La seconde partie de l'étude a été de valider l'efflux de la cocaïne grâce à la présence d'anticorps dans le système circulatoire. La cinétique de la ^3H -cocaïne dans le plasma et dans les tissus a été suivie chez des rats, pré-traités ou non 48 heures avant avec des anticorps anti-cocaïne, ayant reçu une dose par voie intracérébroventriculaire de cocaïne marquée. En absence d'anticorps, la concentration plasmatique de cocaïne augmente rapidement au bout de 2 min pour atteindre un plateau vers 60 min (Figure 11). Chez les rats ayant reçu une injection d'anticorps, on observe une brusque augmentation de la concentration plasmatique en cocaïne, au bout de 2 min qui est 16 fois supérieure au témoin pour un rapport molaire anticorps/ ^3H -cocaïne de 10, puis une diminution progressive pour atteindre la valeur des rats non traités. Ces anticorps, incapables de pénétrer dans le cerveau à cause de leur taille et circulant dans le flux sanguin, sont capables d'extraire la cocaïne de ses sites de distribution cérébrale.

Figure 11 : Augmentation de la concentration plasmatique en cocaïne due à la présence d'anticorps anti-cocaïne ([90])



Ces deux expériences ont démontré la faisabilité du projet : un anticorps murin anti-cocaïne d'affinité forte ($5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$) est capable de capter la cocaïne présente dans le sang, et d'induire l'efflux de cette drogue d'organe comme le cerveau vers la circulation sanguine, ceci malgré une forte réactivité croisée avec un métabolite non toxique. Bien que non étudié,

ce mode d'action doit permettre de limiter rapidement les effets neurotoxiques dus à la drogue, mais pourrait également servir pour les traitements de désintoxication.

II.3.2 Conception des haptènes

La génération d'anticorps est obtenue par la stimulation du système immunitaire d'un animal suite à l'injection de la molécule cible. Pour favoriser l'obtention d'anticorps d'intérêt, la création d'immunogène, molécule capable d'induire une réponse immunitaire [71] et composée d'une protéine de haut poids moléculaire et d'un haptène (molécule dérivée du composé contre lequel on souhaite des anticorps, généralement de faible poids moléculaire incapable de susciter à elle seule la formation d'anticorps [71], est une étape nécessaire).

80 % de la cocaïne sont dégradés en composés non toxiques (le reste en composés toxiques) dont le premier métabolite est la benzoylecgonine. La conception d'haptène doit permettre d'obtenir des anticorps d'affinité élevée, discriminant les composés toxiques des non toxiques, tout en n'ayant pas d'effet sur l'organisme dans lequel ils seront injectés. Pour arriver à ce résultat, différentes modifications de la molécule toxique, ici la cocaïne, peuvent être envisagées en fonction des caractéristiques des métabolites. Lors de l'élaboration de l'haptène, un élément à prendre en considération est la méthode utilisée pour fixer cet haptène sur une protéine, le tout formant ce qu'on appelle un immunogène. L'utilisation d'une protéine dite porteuse est nécessaire pour induire une réponse immunitaire avec des haptènes de petites tailles : des molécules inférieures à 600 Daltons ne peuvent pas être présentées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, et donc déclencher une réponse immunitaire cellulaire. Cette protéine est choisie en fonction de son immunogénicité et du nombre de sites de fixation possibles pour l'haptène.

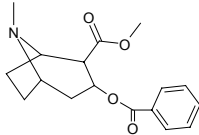
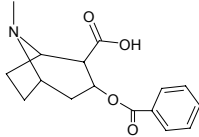
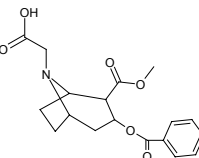
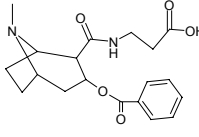
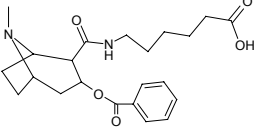
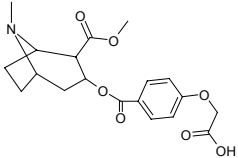
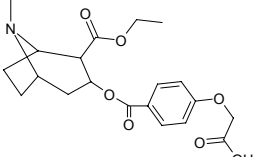
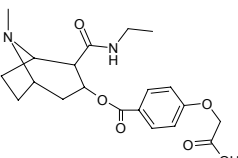
La société DrugAbuse Sciences s'est associée au laboratoire de chimie organique du Pr Galons pour synthétiser sept haptènes différents combinés soit à la BSA (albumine de sérum bovin), soit à la KLH (hémocyanine de patelle), ou soit à la TT (anatoxine tétanique). La combinaison des haptènes et des protéines porteuses a conduit à la formation de 19 immunogènes présentés dans le tableau 1, et à un brevet américain n° 587,110.

On peut ainsi distinguer trois types de stratégies pour la modification de la cocaïne :

1. Modification au niveau de l'azote (haptène H1)
2. Modification au niveau de l'ester (Haptène H0, H2, HS2 et H6)
3. Modification au niveau du noyau aromatique (Haptène H3, H3' et H6)

Tableau 4 :Immunoconjugués pour la conception d'anticorps anti-cocaïne.

EDC : Ethyl-carbodiimide hydrochloride; AM : Anhydride Mixte ; N : Méthode confidentielle de Scripps Research

Haptène	Protéine porteuse	Méthode de couplage	Structure
Cocaïne			
H0	BSA	EDC	
H1	BSA	EDC	
	KLH	EDC	
H2	BSA	EDC ; AM	
	KLH	EDC ; AM	
HS2	KLH	N	
H3	BSA	AM ; N	
	KLH	AM ; N	
	BSA	AM ; N	
H3'	KLH	AM ; N	
	TT	AM	
	BSA	AM	
H6	TT	AM	

II.3.3 Sélection de l'haptène

Des séries d'immunisation chez le lapin ont permis de déterminer l'immunoconjugué permettant d'obtenir des anticorps de forte affinité (supérieur à 10^8 M^{-1}) pour la cocaïne et la coca-éthylène d'une part (toxiques), et une non-spécificité pour la benzoylecgonine (non-toxique). Tous les immunogènes, exceptés ceux à base de l'haptène H1, ont permis d'obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre la cocaïne. A partir des données établies, le dérivée TT-H3' a été conservée comme candidat pour le développement industriel d'anticorps polyclonaux (Affinité élevée pour la cocaïne de l'ordre de $5 \cdot 10^{10} \text{ M}$ et profil de réactivités croisées optimum).

II.3.4 Obtention du CocAB

L'immunisation par TT-H3' de chevaux a permis la production d'anticorps polyclonaux anti-cocaïne dont l'affinité et la spécificité ont été très proches des valeurs observées chez le lapin. Les raisons du changement d'espèces ont été d'origine économique et sanitaire : production en grande quantité d'anticorps, excellente sécurité sanitaire de cette espèce et risques réduits de contamination virale. Pour rappel, de nombreux anti-venins ou anti-tétaniques sont produits chez le cheval.

La concordance des spécificités d'anticorps entre le lapin et le cheval et la mise au point des protocoles d'immunisation (dose, rythme d'immunisation) ont permis la production de lots de CocAB (fragments F(ab')_2 purifiés d'anticorps polyclonaux) en vues d'essais pré-cliniques.

II.3.4.1 Caractérisation

La préparation d'une solution de fragments F(ab')_2 de cheval dirigés contre la cocaïne a été le fruit d'une collaboration avec de nombreux industriels dont, par exemple, Aventis Pasteur. De nombreuses analyses ont permis de définir et de caractériser les lots produits en vue des tests pré cliniques. Ces résultats sont résumés dans le tableau ci après :

Tableau 5 :Caractéristiques du CocAb

Caractéristiques	Spécifications	Lot 2000FAC001
Concentration protéique	60 à 120 g/L	95,2 g/L
Affinité	$> 10^8 \text{ M}^{-1}$	$1,33.10^9 \text{ M}^{-1}$
Titre	> 500	2254
Pureté	$F(ab')_2 > 95\%$	$F(ab')_2 : 91,97\%$
	$Fab < 15\%$	$Fab : 7,96\%$
	Polymères et agrégats $< 5\%$.	Polymères et agrégats : $< 0,5\%$
	100% pour la cocaïne	100,00
Spécificité	100% pour la cocaéthylène	241,61
	$< 10\%$ pour la norcocaïne	2,30
	$< 10\%$ pour la benzoylecgonine	0,21
	$< 10\%$ pour l'ecgonine methylester	0,02
	$< 10\%$ pour l'ecgonine.	0,08

La fraction d'anticorps spécifique a été évaluée à l'aide du titre des anticorps par RIA (Radio-Immuno-Assay) avec de la ^3H -cocaïne, et confirmée par les essais d'immunopurification sur colonne d'affinité. Ainsi, 5 % des fragments $F(ab')_2$ sont spécifiques de la cocaïne.

Les spécifications requises ont été dictées par les expériences préliminaires de Schermman (preuve de l'efficacité avec un anticorps d'affinité supérieure à 10^8 M^{-1} pour la cocaïne), et par la toxicité des métabolites de la cocaïne (faible reconnaissance des composés non toxiques pour favoriser l'effet du CocAB sur les molécules toxiques).

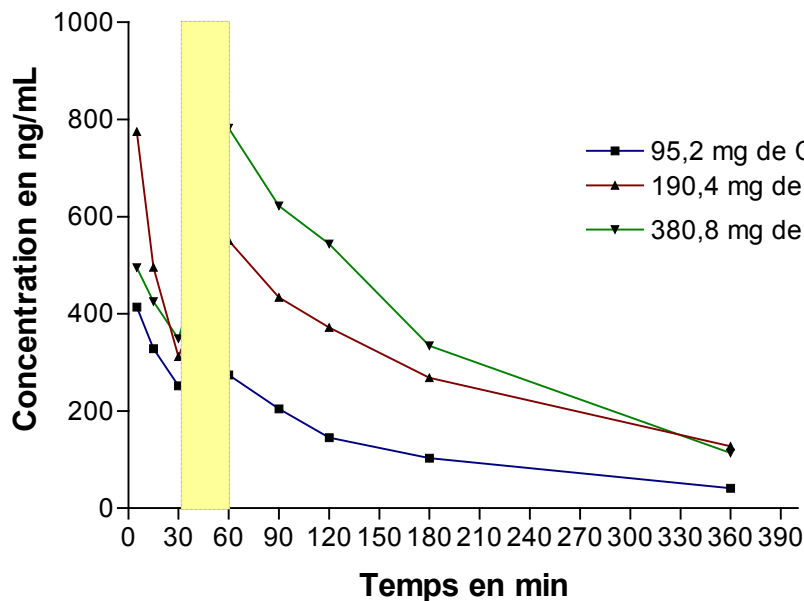
II.3.4.2 Etude *in vivo*

La capacité du CocAb à neutraliser *in vivo* la cocaïne a été explorée en utilisant le chien comme modèle expérimental. Pour cette étude réalisée sur 15 chiens âgés de 22 à 33 mois, une dose fixe de 2 mg de cocaïne par kilogramme a été administrée par voie intraveineuse, et des concentrations variables de CocAb (95,2 ; 190,4 ou 380,8 mg/kg) ont été injectées après la cocaïne en infusion intraveineuse pendant 30 min (Figure 12). Les résultats de cette étude ont permis de montrer que les fragments $F(ab')_2$ d'anticorps anti-cocaïne fixent et neutralisent la cocaïne présente dans les compartiments vasculaires ; et redistribuent la

cocaïne des compartiments « non vasculaires » vers les compartiments vasculaires. Ces résultats sont en parfaite concordance avec les expériences préliminaires de faisabilité présentées précédemment.

Figure 12 : Efficacité du CocAB à neutraliser la cocaïne dans le sang

Expériences réalisées chez le chien. Suivi de la concentration en cocaïne plasmatique totale après injection de CocAB et effet de la quantité injectée. Chaque dose est perfusée au bout de 30 min et pendant 30 min (marque jaune).[92]



II.3.5 Avantages et limites

La production d'anticorps polyclonaux permet d'obtenir des quantités importantes de manière relativement aisée, ce qui a pour conséquence de les rendre moins coûteux que la production d'anticorps monoclonaux. Mis à part l'optimisation du protocole d'immunisation, l'obtention d'anticorps fonctionnel est plus rapide avec un programme polyclonal que monoclonal. Néanmoins, même le protocole le plus optimisé ne peut résoudre le problème d'hétérogénéité des anticorps polyclonaux, ni la variabilité des lots entre eux, ou même la génération d'anticorps « toxique » (auto-anticorps). Pour ces raisons, et parce que le CocAB ne possède que 5% d'anticorps spécifiques, un programme de recherche d'anticorps monoclonaux spécifiques a été décidé.

La première partie de ce travail portera sur l'obtention et la caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-cocaïne. Le développement d'anticorps monoclonaux anti-

méthamphétamine fera l'objet de la seconde partie. Les méthodes de mesure d'affinité et le devenir des anticorps isolés seront discutés en conclusion.

III Matériel et Méthodes

III.1 Immunisation et culture cellulaire

Les anticorps monoclonaux sont essentiellement obtenus par immunisation de souris ou rat. Pour débiter ces programmes, la souris a été choisie en raison d'une longue expérience acquise avec cet animal par le laboratoire de biotechnologie de l'EFS-PL de Nantes, et par la disponibilité d'un partenaire de fusion adapté.

III.1.1 Préparation des immunogènes

Les haptènes ont été synthétisés au laboratoire de chimie organique 2 de l'université de Paris V dirigé par le professeur Galons. Les expérimentations ont été menées par Caroline Gadjou dans le cadre de son mémoire de thèse CIFRE. Les schémas de synthèse sont présentés en annexe.

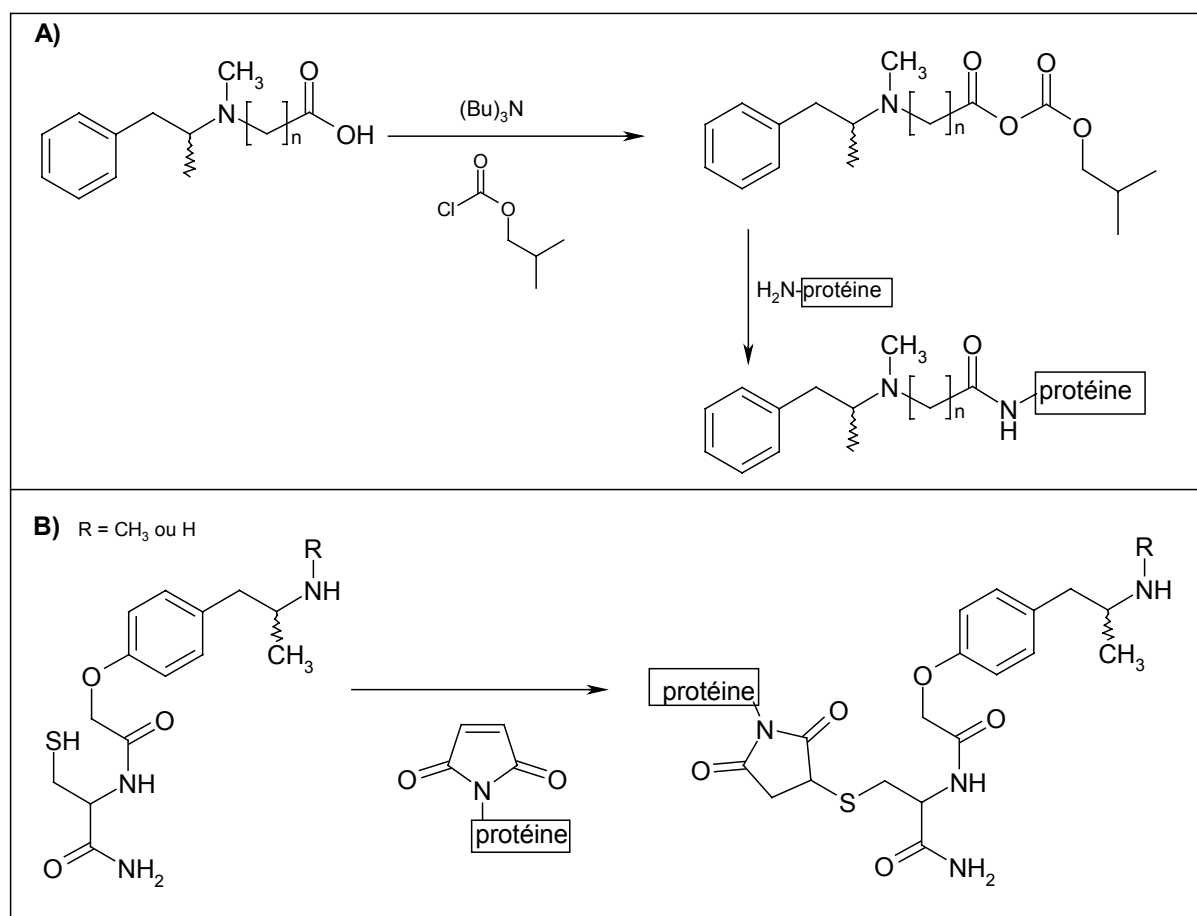
Les haptènes ont été couplés, par la méthode des anhydrides mixtes, à la BSA (albumine de sérum bovin, ou « bovin serum albumin »), à la TT (anatoxine tétanique, ou « tetanus toxoid ») et / ou à la KLH (Hémocyanine de patelle, ou « Keyole Limpet Hemocyanin »). La BSA est un bon immunogène, mais elle induit la formation d'anticorps dirigés contre elle de façon importante. La KLH est une protéine de haut poids moléculaire (780 à 830 kDa suivant l'isoforme) extraite de mollusque composée de sous-unités (KLH1 et KLH2) dont le ratio varie suivant les individus [93]. Il s'agit de la protéine porteuse la plus employée car très immunogène. L'utilisation de la TT, lors du programme polyclonal cocaïne, a permis l'obtention d'anticorps d'intérêt de façon plus efficace qu'avec la KLH. Il s'agit d'une protéine de 150 kDa sous sa forme pro-active qui n'est pas couramment utilisée pour la production d'anticorps monoclonaux.

Le couplage à la BSA est réservé à la réalisation de tests ELISA, et les conjugués TT ou KLH ont été utilisés pour l'immunisation des souris (Balb/c, âgé de 8 à 10 semaines). L'utilisation de protéine porteuse différente pour l'immunisation permet, lors des tests ELISA, de ne pas détecter les anticorps dirigés contre la protéine porteuse. Pour les haptènes Met1, Met2 Met5 et Me1', le couplage a été réalisé par condensation de la fonction carboxylique de l'haptène avec la fonction amine de la protéine selon la méthode de l'anhydride mixte d'Erlanger. Le dérivé carboxylé forme avec le chloroformiate d'isobutyl un intermédiaire qui réagit avec la fonction amine de la protéine pour donner les immunogènes

(Figure 13-A). Le couplage des haptènes Met3 et Met4 a été effectué selon la méthode des maléimides. Dans un premier temps, les fonctions amines primaires de la protéine sont activées par le maléimide hydrosoluble (succinimidyl 4-(N-maléïdométhyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)). L'haptène est ensuite additionné au conjugué formé ; le groupement thiol réalise alors une addition de type Michaël avec sur le maléimide (Figure 13-B).

Figure 13 : Schémas du couplage des haptènes sur une protéine porteuse.

A) Couplage des haptènes Met1, Met2, Met5 et Met1'. B) Couplage des haptènes Met3 et Met4.



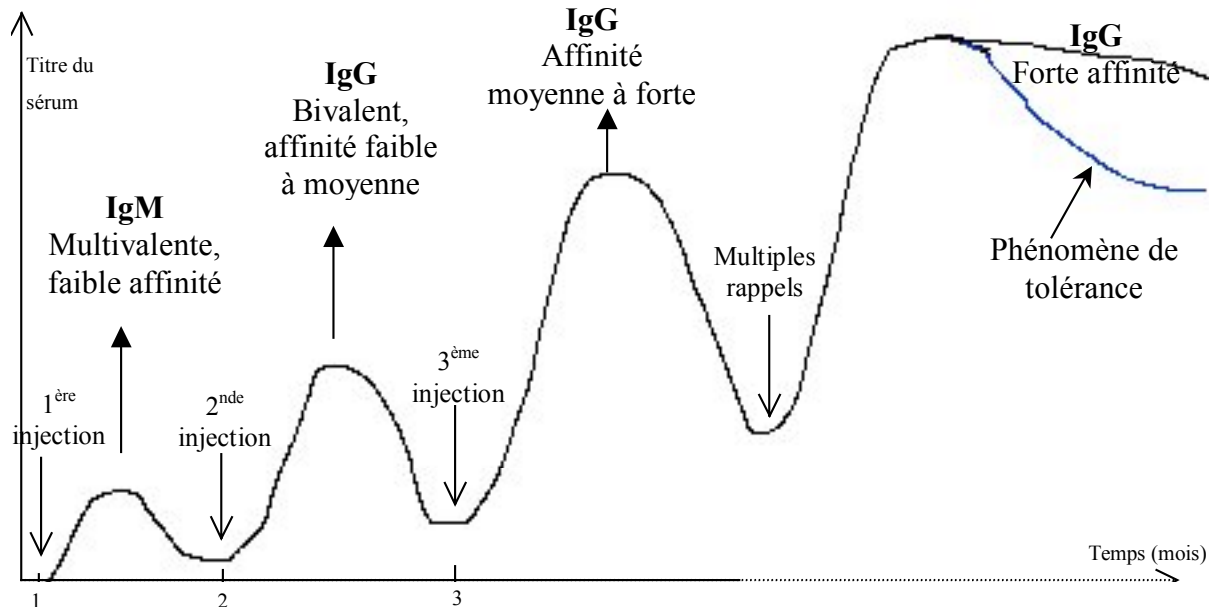
III.1.2 Immunisation

Comme l'illustre la Figure 14, la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B évolue en fonction de la fréquence de l'exposition de l'antigène au système immunitaire. Ce phénomène est lié à la maturation des lymphocytes B au niveau des centres germinaux : les lymphocytes qui possèdent les anticorps capables de fixer l'antigène sont alors amplifiés par expansion clonale (une cellule B donne plusieurs cellules B filles parfaitement identiques). De plus, il peut y avoir commutation de classe de la chaîne lourde au niveau du gène exprimant le

domaine constant, sans modification du gène réarrangé VDJ, ceci permettant le passage de la sécrétion d'IgM à celle d'IgG [71].

Figure 14 : Evolution de la réponse humorale en fonction du nombre d'immunisation. (d'après [94])

Echelle de temps indicative, fonction des injections.



En vue de la génération d'anticorps monoclonaux, l'objectif de l'immunisation est d'obtenir en quantité des cellules capables d'exprimer des anticorps de forte affinité, ce qui nécessite que l'antigène doit rester le plus longtemps possible dans l'organisme et être facilement capturé par les cellules présentant l'antigène (APC). Pour favoriser cet état, des adjuvants tels que l'adjuvant de Freund ou l'alumine sont fréquemment utilisés. Leur rôle est de protéger l'antigène, et de retarder sa dispersion dans l'organisme ainsi que la phagocytose par la formation de gros agrégats particuliers. De plus, la formulation de certains adjuvants, tels que celui de Freund complet, favorisent l'activation du système immunitaire grâce à la présence de microorganismes pathogènes inactivés.

Au cours de ces travaux, des prélèvements sanguins ont été réalisés pour chaque souris avant la première immunisation afin de disposer des sérums pré-immuns. Pour les immunisations, les injections ont été effectuées par voie intra-péritonéale, espacées de 21 jours. Lors de la première injection, 50µg d'antigène, dilué en PBS ou en eau physiologique, ont été émulsifiés avec un volume égal de Freund complet (Sigma ; volume final strictement inférieur à 500 µL). Pour les injections suivantes, de l'adjuvant de Freund incomplet a été utilisé dans les mêmes conditions.

A partir de la seconde injection, le titre en anticorps reconnaissant l'haptène a été déterminé à l'aide du sérum de chaque souris prélevé dans le sinus rétro orbital, 4 jours après l'injection. Le délai de 4 jours permet de s'assurer que les cellules productrices ont eu le temps de sécréter des anticorps spécifiques en quantité suffisante.

III.2 Obtention d'hybridomes sécréteurs monoclonaux

III.2.1 Fusion

La technique d'hybridation cellulaire ou fusion pour la production d'anticorps monoclonaux repose sur les travaux réalisés par Kohler et Milstein [95]. Cette technique, schématisée à la Figure 15, consiste à fusionner les membranes cellulaires de deux partenaires pour mettre en commun les gènes des deux cellules : un splénocyte (cellule de la rate sécrétrice d'anticorps) et une cellule de myélome d'origine lymphoblastoïde (cellule cancéreuse, immortalisée).

Les souris sont euthanasiées par asphyxie à l'éther. Le prélèvement de la rate est réalisé sous hotte stérile pour limiter les risques de contamination, et une ponction sanguine est réalisée par voie intracardiaque pour disposer du sérum qui servira de témoin positif lors des étapes de criblage.

La rate est retirée et conservée dans du RPMI 1640 (Gibco) pour être ensuite perfusée jusqu'à blanchiment ou écrasée sur un tamis. La suspension de splénocytes est récupérée et lavée. A l'aide du système Unopette qui permet de lyser les hématies, les splénocytes sont comptés sur lame de Malassez.

Parallèlement, des cellules de myélome en culture sont lavées et comptées en présence de bleu trypan. Les cellules myélomateuses utilisées pour la fusion cellulaire sont des cellules tumorales et non sécrétrices d'anticorps, bien que d'origine lymphoblastoïde. La lignée SP2/o utilisée pour ces travaux ne possède pas de chaîne lourde, mais une chaîne légère κ non fonctionnelle [96, 97]. Cette lignée est déficiente pour l'enzyme hypoxanthine-guanidyl phosphoribosyl transférase (HGPRT), ce qui empêche les cellules d'utiliser la voie *de novo* pour la synthèse des bases puriques. Cette caractéristique permet d'éliminer les cellules de myélome n'ayant pas fusionné avec des splénocytes grâce à l'emploi d'aminoptérine, un inhibiteur de la voie endogène : cette substance bloque les voies principales de biosynthèse de

purines et de pyrimidines dans les cellules animales principalement en inhibant la dihydrofolate réductase.

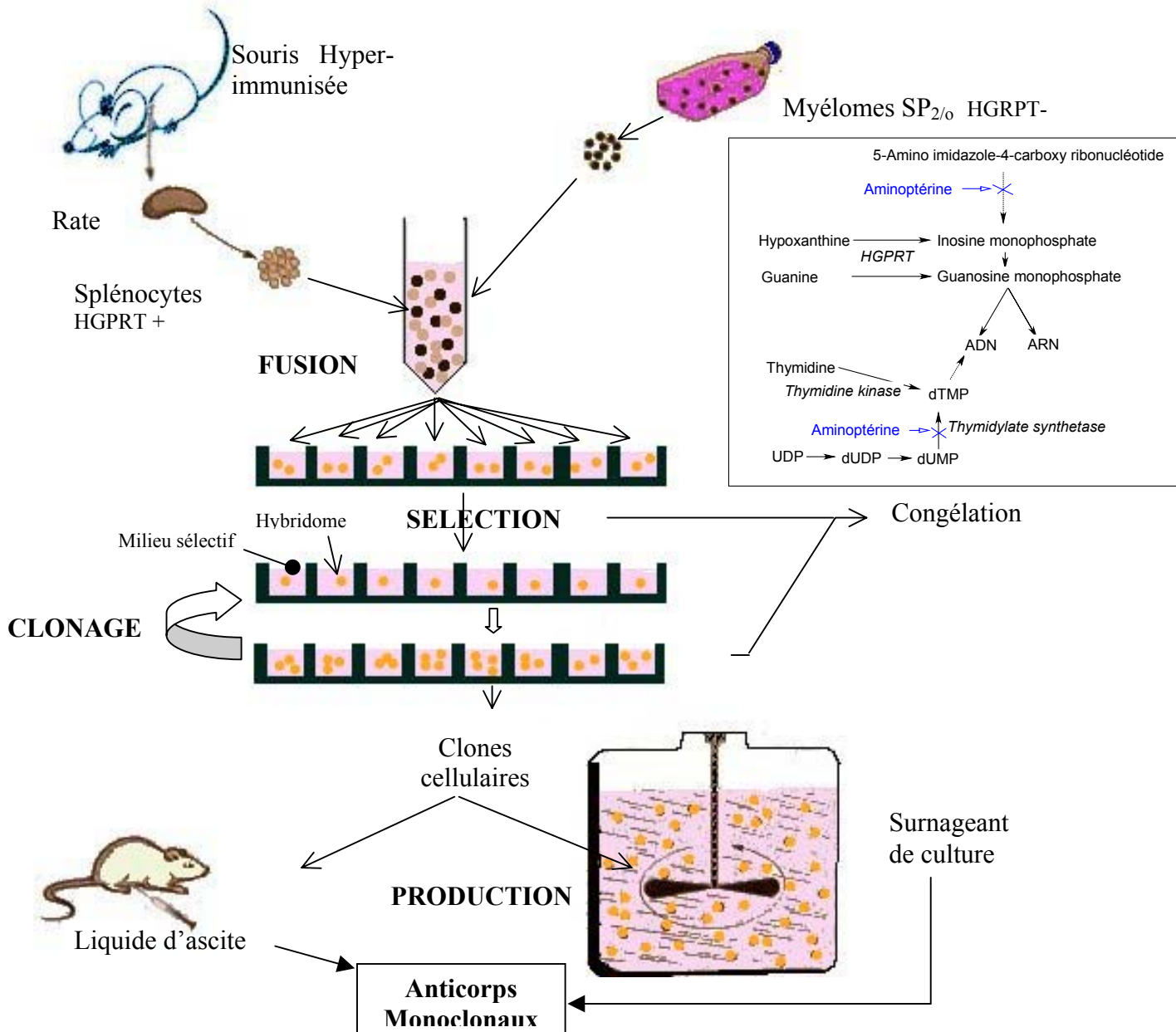
Les splénocytes sont mélangés avec les myélomes dans une proportion de 5 pour 1 en présence de DMSO et de PEG (1 mL de PEG à 5% de DMSO, produits Sigma). Le PEG permet d'exclure les molécules d'eau entre les cellules, et le DMSO peut être utilisé pour augmenter la fluidité des membranes. Après une courte période de mise en contact (1min 30), 20 mL de RPMI sont ajoutés par fractions pendant une durée totale de 3 min avant de laisser reposer le mélange pendant 10 min. Le mélange est ensuite centrifugé (5 min à 1200 tours/min), et le culot est repris dans un milieu de culture sélectif composé d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine (milieu HAT : RPMI 1640, hypoxanthine 0,1mM, aminoptérine 0,4μM, thymidine 16μM, L-glutamine 2mM, sodium de pyruvate 1mM, pénicilline 200UI/mL, streptomycine 100 UG/mL, FCS 15% ; produits Gibco) puis réparti dans les plaques de culture numérotées (100μL par puits). Les puits sont complétés à 200μL soit avec une solution de macrophages, soit avec du surnageant de culture de cellules P388 (10% final) ou encore avec une solution de thymocytes. Ces cellules ou ces surnageants doivent apporter les facteurs de croissance (type IL-6,...) nécessaires à la bonne prolifération cellulaire des hybridomes ainsi qu'à la sécrétion d'anticorps.

Dans les puits, grâce à l'utilisation du milieu sélectif HAT, les cellules de myélomes ou les splénocytes qui n'auront pas fusionnés vont mourir au cours des prochains jours ; les autres seront appelés hybridomes. Parmi ces hybridomes, tous n'ont pas la capacité de sécréter des anticorps ; l'étape de criblage va permettre de discriminer les hybridomes non sécréteurs des sécréteurs et d'éliminer des clones produisant des anticorps d'intérêt limité.

La fusion cellulaire est l'étape limitant de cette techniques. En effet, dans les conditions les plus favorables, seulement 1% des cellules de départ fusionnent, et sur ce pourcentage, une cellule sur 10^5 forme une cellule hybride viable. La fusion cellulaire est un processus aléatoire et non influençable, de ce fait on peut très bien imaginer qu'une population intéressante ne fusionne pas. Enfin, l'étape de criblage peut également être limitante, car si un type d'anticorps d'intérêt n'est exprimé que par une population relativement faible, les chances d'isoler les hybridomes sont également faibles.

Figure 15 : Principe de la fusion cellulaire pour la production d'anticorps monoclonaux

En encart, les voies métaboliques impliquées dans le processus de sélection cellulaire.



III.2.2 Criblage

Le criblage est réalisé sur des puits dans lesquels la pousse cellulaire est suffisante (au moins 70% de la surface du puits doit être recouverte), en général à partir du 12^e jour, puis tous les deux à trois jours. Les cellules dont le surnageant a été identifié comme positif sont ensuite mises en culture en plaque macropuits (1,5 mL) pour être amplifiées. Le but est d'éliminer les faux positifs, d'augmenter la quantité de surnageant pour des analyses plus

poussées, et de sauvegarder par congélation les clones intéressants. Cette sélection repose sur l'intensité de la réponse en ELISA (Cf. paragraphe III.4.1.1) qui traduit la présence d'anticorps de forte affinité, et /ou en quantité importante. Afin d'affiner notre sélection, des tests de compétition par ELISA ont été entrepris (Cf paragraphe III.4.1.2) . Ce procédé permet d'éliminer rapidement des cellules exprimant des anticorps non spécifiques ou sans intérêt.

III.2.3 Clonage

Le rôle du clonage est d'isoler la ou les cellules produisant les anticorps d'intérêt, et d'autre part de stabiliser ces hybridomes. Un puits détecté positif et amplifié contient un mélange d'hybridome qui peut être composé :

- De clones non sécréteurs,
- De cellules qui expriment des anticorps non spécifiques ou sans intérêt,
- D'hybridomes qui ne produisent pas le même anticorps d'intérêt,
- D'hybridomes produisant des anticorps d'intérêt,

Au cours de la fusion cellulaire, il peut y avoir compétition entre les chromosomes de chaque cellule mère pouvant aboutir à la perte des informations nécessaires à l'expression d'anticorps. Au sein du puits de culture, les cellules non sécrétrices peuvent se multiplier plus rapidement que les autres et ainsi « étouffer » les hybridomes intéressants.

Par clonages successifs, on obtient alors des lignées cellulaires stables, monoclonales (issue d'une cellule unique), dont les productions d'anticorps seront identiques entre elles.

Le clonage cellulaire est le plus souvent réalisé par la technique de dilution limite qui consiste à isoler une cellule unique en diluant un mélange cellulaire dans un grand volume de milieu. Ces cellules sont alors réparties dans des plaques de culture de 96 puits de façon à avoir statistiquement 0,5 ; 1 ; 5 ou 10 cellules par puits. Plus la quantité de cellules par puits est faible, plus la chance d'obtenir rapidement un hybridome monoclonal est élevé, mais plus le risque de perdre le clone est important.

Pratiquement, les cellules isolées lors du criblage primaire sont comptées sur lame de Malassez en présence de bleu trypan qui colore les cellules mortes. Une série de dilutions réalisées en macropuits permet d'obtenir les solutions à 10 cellules/mL nécessaires pour répartir une demi-plaque de 96 puits à 1 cellule par puits, par exemple. Lorsque les hybridomes se sont suffisamment développés, le surnageant est alors prélevé et testé en

ELISA. Les puits dont le surnageant est positif sont alors amplifiés, et de nouveau testés en ELISA. En général, deux dilutions limites sont suffisantes pour obtenir un clone monoclonal, la règle étant d'avoir 67% de pousse positive pour considérer un hybridome cloné (d'après la loi de Poisson, la probabilité d'avoir un clone monoclonal est alors de 99,9%).

III.2.4 Détermination des isotypes

La détermination de la classe et de la sous-classe des anticorps est un élément important de la caractérisation de l'anticorps, et particulièrement pour le clivage protéolytique des anticorps en fragment Fab et F(ab')₂. Cette identification peut être réalisée dès la fin du criblage primaire (sur les surnageants d'amplification, avant dilution limite), pour éliminer des anticorps dont l'isotype n'est pas souhaité comme les IgM. La détermination de l'isotype a été réalisée lors du criblage primaire et des productions pilotes par technique ELISA, et confirmée par un test immunologique sur bandelette.

Pratiquement, on sensibilise une plaque ELISA ou une membrane de nitrocellulose (Dot Blot) avec 5 anticorps de rat purifiés (anti-IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, et anti-chaîne légère kappa de souris (Sigma)) pendant 1 heure à 37°C. Après lavages, les plaques et la membrane de nitrocellulose sont saturées à l'aide d'une solution de TBS-BSA 5% pendant 1 heure, puis lavées. Les plaques ELISA sont stockées à -35°C jusqu'à utilisation, et la membrane est découpée en bandelettes stockées à température ambiante.

On dépose les surnageants dans les puits d'une plaque ELISA (50µL), ou on place une bandelette dans 1 mL de surnageant. Cette incubation est suivie de lavages et de dépôt d'anticorps anti-anticorps de souris couplés à la peroxydase pour la technique ELISA, et à la phosphatase alcaline pour la technique en dot blot (anticorps secondaire Bioatlantic dilué au 1/1000^e). La révélation est réalisée à l'aide du substrat adapté pour chaque enzyme (OPD (o-phénylène diamine) pour ELISA et 5-bromo-4-chloro-indolylphosphate pour le Dot Blot ; produits Sigma).

III.2.5 Production d'anticorps

Comme nous l'avons dit, la caractérisation d'anticorps nécessite des quantités importantes d'immunoglobulines. Pour produire un anticorps monoclonal, deux procédés peuvent être utilisés :

- Culture cellulaire : les cellules sont cultivées dans des bioréacteurs de dimensions variées pouvant aller de quelques dizaines de millilitres à plusieurs centaines de litres. Cette production de masse fournit des surnageants de culture dans lesquels les anticorps sont dilués (20 à 50 µg/mL), mais peuvent être concentrés par précipitation en fin de cycle, ou par filtration tangentielle, ce qui a l'avantage de permettre des productions en flux continu.

Les cellules sont cultivées en milieu complet (RPMI 1640, L-glutamine 2mM, sodium de pyruvate 1mM, pénicilline 200UI/mL, streptomycine 100 UG/mL, FCS 10% ; produits Gibco) dans un petit volume (flask de 5 mL) avec suivi de la croissance cellulaire. Lorsque la quantité de cellules et le taux de viabilité (> 80%) le permettent, les cellules sont alors cultivées dans un volume plus important (du double ou du deux tiers). Ce procédé est répété jusqu'à avoir la quantité de surnageant désiré. Les cellules sont éliminées du surnageant par centrifugation lorsque le taux de viabilité est inférieur à 20%.

- Liquide d'ascite : les cellules (5×10^7 par souris) sont injectées dans la cavité intra péritonéale de souris de même lignée, préalablement traitées avec un agent favorisant l'implantation des hybridomes en provoquant une inflammation (injection des cellules 10 à 14 jours après traitement). Cet agent peut être de l'huile minérale comme le pristane, ou un mélange plus complexe comme du Freund, utilisé entre autre lors des immunisations. Lorsque cette tumeur ne forme pas une masse solide, un liquide d'ascite envahit l'abdomen de la souris et est recueilli par ponction. Cette solution est très riche en anticorps, de l'ordre de 1 à 9 mg/mL, mais contient de nombreuses protéines plasmatiques contaminantes telle que l'albumine, et également d'autres anticorps produits par la souris hôte.

Dans ce travail, la première solution a été utilisée pour des productions pilotes de 50 mL de surnageants de cultures. A partir de ces surnageants vont être sélectionnés un ou deux anticorps possédant les caractéristiques requises qui pourront être produits en liquide d'ascite. Les rendements de production sont également des paramètres pouvant intervenir dans le choix d'un anticorps en raison des conséquences économiques.

III.2.6 Clivage protéolytique

Les anticorps utilisés en immuno-toxico-thérapie sont généralement injectés sous forme de fragment $F(ab')_2$ ou Fab. Pour déterminer les conséquences de cette fragmentation sur les anticorps obtenus, des anticorps purifiés ont été clivés par digestion enzymatique à la papaïne. Brièvement, 5 mg d'anticorps sont mélangés avec 0,15 mg de papaïne (soit 3%, Sigma P-3125) en présence de β -mercapto-éthanol (7,5mM) et d'EDTA (6,25mM). Après incubation à 37°C pendant 6 heures, 10mM d'iodoacétamide sont ajoutés pour stopper la réaction. Les fragments Fab obtenus sont ensuite purifiés par chromatographie sur protéine A.

III.3 Purification

III.3.1 Etape de purification

Une technique de chromatographie par affinité précédée d'une précipitation ou d'une chromatographie par exclusion est utilisée pour purifier les anticorps en fonction du type de production d'anticorps et de la pureté recherchée.

Les surnageants sont précipités à l'aide de sulfate d'ammonium à une concentration finale correspondant à 50% de saturation (291 g/L). Le sel est ajouté progressivement dans l'échantillon avant d'être mis sous agitation à 4°C pendant une nuit. Après centrifugation (10000 g pendant 20 min), le culot est remis en suspension avec un volume minimum de PBS puis dialysé contre du PBS. Les bains de dialyse (2 à 3 litres) sont remplacés toutes les deux heures, et le réactif de Nessler est utilisé pour contrôler l'absence de sulfate d'ammonium dans le bain de dialyse (en règle générale, trois bains sont suffisants).

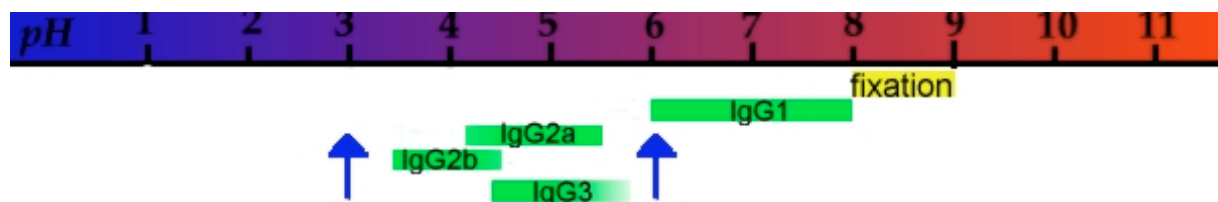
Pour la purification de liquide d'ascite, une colonne de PD10 prête à l'emploi ou une colonne de Sephadex G25 est utilisée pour délipider l'échantillon. La colonne est équilibrée avec 5 volumes de tampon glycine, ou tampon A, composé de glycine 1,5M et de NaCl 3M ajusté à pH 8,9 à l'aide de NaOH. On dépose le liquide d'ascite centrifugé (5 min, 3 000 tours/min) sur la colonne préparée et on élue avec le tampon A. On suit l'absorbance en sortie de colonne à 280 nm, et lorsque celle-ci commence à augmenter, on collecte le liquide jusqu'à

ce que la DO descende en dessous de 0,2. La solution est de nouveau centrifugée et le surnageant contenant les anticorps est prélevé pour être déposé sur une colonne de protéine A.

Quelle que soit la méthode utilisée, l'étape suivante est une chromatographie d'affinité sur protéine A ou G, permettant ainsi d'obtenir une pureté supérieure à 95%. Les protéines A ou G sont des protéines extraites de micro-organismes, *Staphylococcus aureus* pour la protéine A et *Streptococcus* pour la protéine G, capables de fixer les anticorps au niveau de la région Fc. Cependant, cette fixation dépend de la sous-classe des immunoglobulines. Comme l'illustre la Figure 16, les IgG1 ont une faible affinité pour la protéine A nécessitant un tampon de haute force ionique (tampon glycine 1,5M NaCl 3M pH8,9). Pour les autres sous classes, un tampon à plus faible force ionique est suffisant pour les fixer (tampon glycine 0,1 M pH8). En pratique, on utilisera toujours le tampon de haute force ionique, surtout si la détermination isotypique n'a pas été réalisée. Pour décrocher les immunoglobulines, un tampon citrate 0,1M pH6 est requis pour les IgG1 alors qu'une solution plus acide permet d'éluer les autres types.

Figure 16 : Schéma de fixation et d'élution des immunoglobulines sur la protéine A en fonction de leur classe.

D'après [98]. En jaune, la gamme de pH de fixation, en vert l'élution. Les flèches bleues indiquent le pH des solutions d'élution



Les anticorps concentrés par précipitation au sulfate d'ammonium sont dilués en tampon A avec un ratio 1/3 (les anticorps issus de liquide d'ascite sont déjà dans ce tampon). Les échantillons sont déposés sur une colonne chromatographique de protéine A-céramique, préalablement équilibrée en tampon A, capable de fixer 30 mg d'immunoglobulines par mL. La colonne est lavée en tampon A jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm en sortie de colonne soit proche de zéro et stable. Une première élution est réalisée avec du tampon citrate pH6, ou tampon B (acide citrique 0,1M ajusté à pH6 à l'aide de NaOH), et des fractions de 1mL sont récoltées. Si l'anticorps à purifier est de classe IgG1, l'absorbance augmente fortement puis diminue lentement jusqu'à atteindre la ligne de base. Dans le cas contraire, on peut observer une légère augmentation de l'absorbance et un retour rapide à la ligne de base. Une seconde élution permet de décrocher les anticorps encore fixés sur la protéine A en utilisant une

solution d'acide citrique à pH3, ou tampon C (acide citrique 0,1M ajusté à pH3 à l'aide de NaOH). Après retour de l'absorbance à la ligne de base, la colonne est soit lavée avec du tampon A si une autre purification doit être réalisée, soit avec du PBS + NaN_3 0,01% pour être stockée à +4°C. Le pH des anticorps purifiés est ajusté à des valeurs physiologiques par ajout de tampon Tris 1M pH9, puis les solutions d'anticorps sont dialysées contre de l'eau physiologique deux fois, puis contre du PBS (2L). La concentration en anticorps est déterminée en sortie de dialyse par mesure de l'absorbance à 280 nm ($\epsilon = 1,34 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

III.3.2 Concentration et de contrôle des anticorps

Les anticorps sont concentrés par filtration tangentielle au moyen de Vivaspin[®] dont la taille des pores est de l'ordre de 10 kDa. Après ajout des anticorps dans le compartiment supérieur des vivaspins et une centrifugation de 10 min à 3 000 tours/min, la concentration des anticorps est de nouveau évaluée par mesure d'absorbance. Si la valeur mesurée est inférieure à 1mg/mL, les anticorps sont de nouveau centrifugés. Un conservateur, de l'azote de sodium à 0,09%, est ajouté afin d'empêcher la pousse bactérienne.

La pureté des anticorps est contrôlée par électrophorèse en présence de SDS (Figure 17). Des gels de petite taille (8 cm x 8 cm) ont été utilisés, permettant la migration rapide des échantillons (2h à 20mA). Le gel comporte une zone de concentration (3% d'acrylamide) et une zone de séparation des protéines (10% d'acrylamide). L'échantillon déposé sur le gel est composé de 8 μg d'anticorps, de 5 μL de tampon de charge (Bleu de bromophénol 0,1% en glycérol 50%), et de 5% final de SDS. Avant dépôt, les échantillons sont chauffés pendant 3 min à 100°C au bain-marie. Les échantillons sont immédiatement déposés et le champ électrique, permettant la migration des protéines, est maintenu jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol hors du gel. Le gel est coloré par du bleu de Coomassie pendant une heure, puis décoloré pour identifier les bandes protéiques. La composition des solutions et des tampons nécessaires est rapportée dans le Tableau 6.

Figure 17 : Contrôle de pureté des anticorps en SDS PAGE

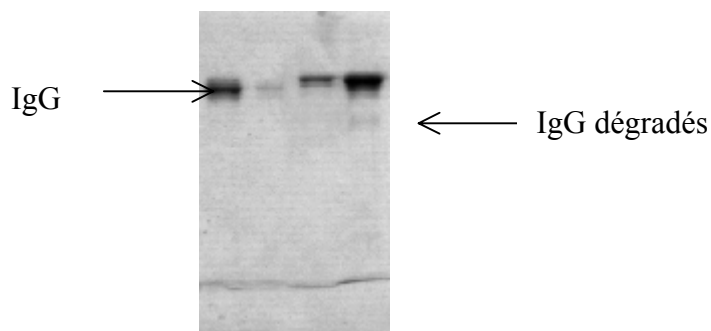


Tableau 6 : Composition des gels de polyacrylamide et des tampons utilisés pour l'analyse des anticorps purifiés

Gel	Séparateur 10% (10mL)	Concentrateur 3% (2,5mL)
H ₂ O milli Q (mL)	4	1,575
Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (mL)	2,5	
Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (mL)		0,625
Acryl-Bisacrylamide 30%-0,8% (mL)	3,35	0,250
SDS 10% (μL)	100	25
Persulfate 10% (μL)	30	25
TEMED (μL)	4	1,25
Tampon d'électrophorèse	Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 1% final. pH ajusté à 8,3 avec de l'HCl	
Tampon de coloration	Bleu de Coomassie (Brillant blue R) 0,025% (w/v), acide acétique 10% et propanol 25%	
Tampon de décoloration	acide acétique 10	

III.4 Techniques immunochimiques

III.4.1 Détection des anticorps

Pour suivre l'évolution de la réponse immunitaire en fonction du nombre d'injections d'immunogènes et détecter les anticorps présents dans les surnageants de cultures, deux techniques ont été employées, l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et le RIA (Radio Immuno Assay)

III.4.1.1 Technique ELISA

L'ELISA est la technique la plus simple et la plus rapide pour repérer les anticorps anti-haptène, et son principe est schématisé en Figure 19. Il s'agit en outre de la méthode utilisée en routine pour sélectionner les anticorps au cours de la fusion.

Une microplaque Nunc Maxisorb est sensibilisée avec l'antigène désiré. Ce dernier est dilué en tampon carbonate 0,1M pH8,6 à une concentration finale de 10µg/mL et réparti dans les puits de la microplaque (50µL par puits). La plaque est ensuite incubée une nuit à +4°C ou 1 heure à +37°C. Avant de saturer les puits à l'aide d'une solution de TBS-gélatine 1% (200µL par puits), la plaque est lavée en TBS-Tween 20 0,05% (3 lavages manuels, 2 lors de l'utilisation d'un laveur de plaque). L'incubation est réalisée à 37°C pendant une heure, puis la plaque est de nouveau lavée comme précédemment avant d'être stockée à +4°C entourée d'un film plastique.

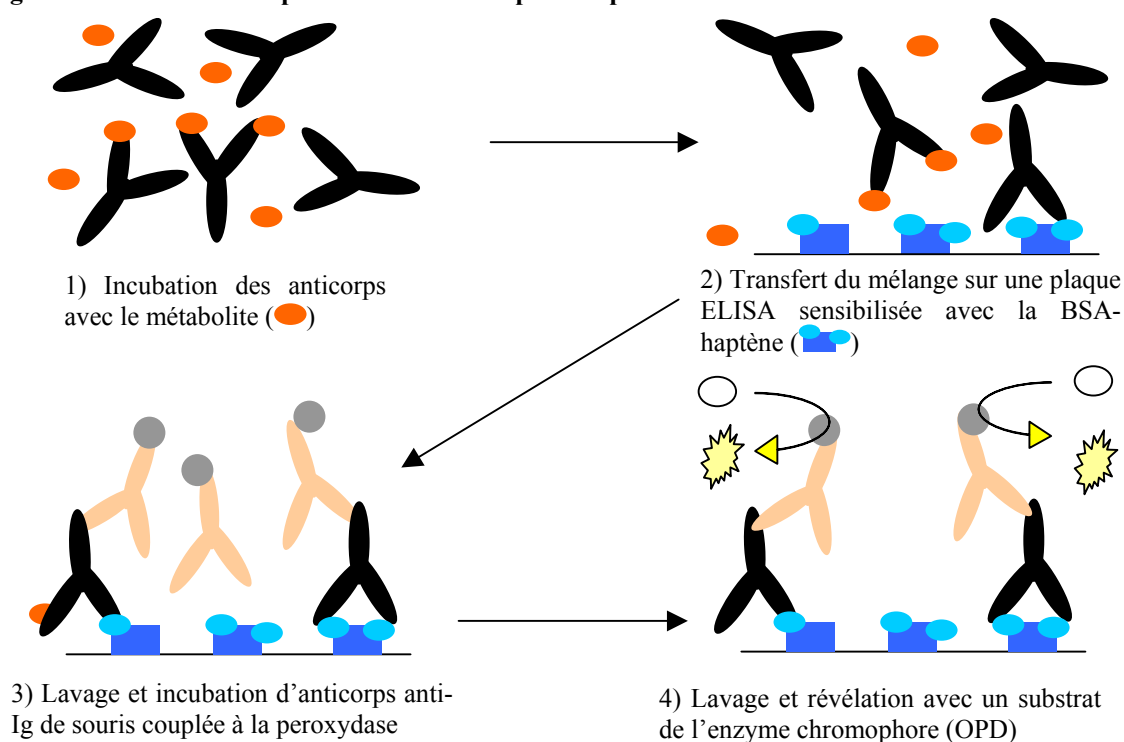
Les échantillons (surnageant de culture, sérum, ou anticorps purifié) sont dilués, en TBS-gélatine 0,1% lors du titrage des solutions, ou utilisés au pur dans le cas d'un contrôle. 50µL de la solution à tester sont déposés dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée, puis la plaque est placée dans une étuve pendant 1 heure à +37°C. Avant l'incubation avec l'anticorps anti-Ig de souris couplée à la peroxydase, les puits sont lavés en TBS-Tween 20 à 0,05% (3 lavages manuels, 2 lors de l'utilisation d'un laveur de plaque). L'anticorps anti-globuline de souris (BioAtlantic, 4 mg/mL) est dilué au 1/1 000^e dans une solution de TBS-gélatine 0,1%, et 50µL par puits sont déposés pendant 1 heure à +37°C, à l'obscurité. Après lavage, le réactif de révélation est préparé : dans un tampon citrate 0,1M pH5 (diluant OPD), une pastille d'OPD de 5 mg est ajoutée pour 5 mL de diluant et 2µL d'H₂O₂. 100µL de solution sont déposés par puits, et la plaque est mise à l'obscurité pendant 10 min, puis la réaction est arrêtée par ajout de 50µL par puits d'une solution d'H₂SO₄ 1N. La lecture des densités optiques est réalisée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Pour déterminer le titre en ELISA, on trace la courbe de la densité optique (DO) en fonction de la dilution. Le titre est défini comme l'inverse de la dilution à partir de laquelle la DO est inférieure à trois fois la valeur du bruit de fond (soit une DO inférieure à 0,2).

III.4.1.2 Compétition ELISA

Brièvement, on pré-incube les surnageants à tester avec un métabolite pour lequel on souhaite connaître la réaction croisée, puis on dépose ce mélange dans les puits d'une plaque ELISA sensibilisée avec l'immunogène. Le reste de l'expérience est semblable à un test ELISA classique, et on exprime les résultats en pourcentage de réaction croisée en divisant l'intensité de la DO obtenue en présence de métabolite par celle obtenue en absence de métabolite (Figure 18).

Figure 18 : Schéma descriptif d'un test de compétition par ELISA



III.4.1.3 Technique RIA

La technique RIA est une technique immunométrique indirecte relativement longue, qui nécessite des équipements et du matériel particuliers, ainsi que des quantités importantes de sérums. Toutes les expériences de RIA ont été réalisées par le laboratoire de la société DAS, sous la responsabilité de Frédéric Koralewski.

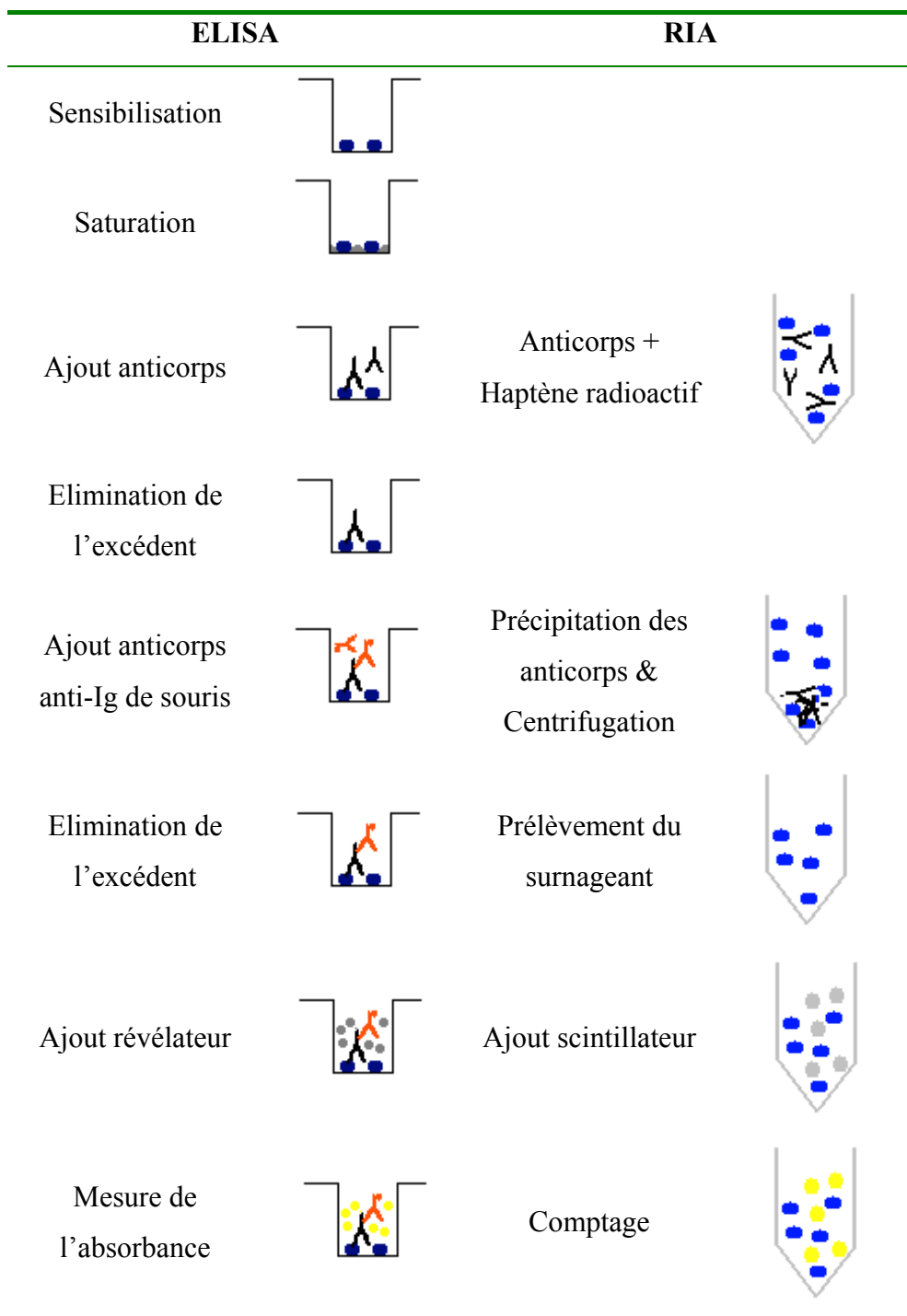
Une quantité fixe de métabolite marqué au tritium (^3H) est mise en présence de différentes dilutions de sérums à analyser. Il se forme alors un complexe anticorps / ^3H -

métabolite qui est précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium concentrée. Par centrifugation, on sépare le complexe formé du métabolite marqué qui n'a pas été fixé. On quantifie alors le ^3H -métabolite présent dans le surnageant à l'aide d'un compteur à scintillation ; plus la quantité d'anticorps spécifiques est élevée, moins on détectera de ^3H -métabolite dans le surnageant.

Les échantillons sont dilués par un automate (MultiProbe), puis 100 μL sont mélangés avec 150 μL de PBS, 200 μL de traceur (métabolite marqué) et 50 μL de sérum. Le mélange est agité puis incubé pendant 2 heures à température ambiante. Pour précipiter les anticorps, 500 μL d'une solution de sulfate d'ammonium saturée est ajouté. Après 10 min d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé à 3 300 tours/min pendant 15 min à 4°C. 3 mL de liquide scintillant (Ultima-Gold) sont ajoutés à 500 μL de surnageant. Le comptage de la radioactivité est réalisé après une incubation de 12 heures à température ambiante.

Pour nos travaux, les métabolites marqués ont été la cocaïne (^3H -cocaïne, ou Levo-(-)-[benzoyl-3,4- $^3\text{H}(\text{N})$], concentration 1 mCi/mL) et la méthamphétamine (^3H -méthamphétamine, ou méthamphétamine HCl, concentration 3 mCi/mL), synthétisés par la société NEN (France).

Figure 19 : Schéma de principe de l'ELISA et du RIA



III.4.2 Détermination des constantes d'affinité

III.4.2.1 Généralités

La détermination des constantes d'affinité entre un anticorps et un antigène, généralement comprises entre 10^5 M^{-1} et 10^{12} M^{-1} [94], permet de mieux comprendre les mécanismes d'interaction au niveau moléculaire. Les forces d'interaction mises en jeu dans la reconnaissance des antigènes sont dues à des liaisons faibles : liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, liaisons de Van Der Waals et liaisons ioniques[71]. C'est la combinaison de ces forces qui assure la stabilité du complexe antigène / anticorps, et explique également la réversibilité des réactions. Comme illustré dans la Figure 20, ces forces ont des rayons d'action et des énergies faibles, ce qui nécessite une complémentarité parfaite entre les deux protagonistes pour obtenir une affinité optimale.

Figure 20 : Forces d'interactions

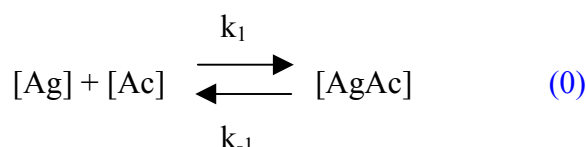
D'après [99]

Force	Distance moléculaire (en Å)	Energie moyenne en kcal/mole
Liaison Hydrogène	2 à 3	3 à 7
Liaison Ionique	2,8	3 à 10
Force de Van der Waals	3 à 4	1 à 2
Liaison hydrophobe		1 à 2

Ces mécanismes d'interaction reposant sur des lois de la thermodynamique peuvent être évalués expérimentalement par différentes méthodes, telle que l'ELISA, le RIA ou encore le BIAcore

III.4.2.2 Rappel sur la réaction antigène anticorps

La réaction antigène anticorps peut être définie par la loi d'action de masse :



Où Ag est l'antigène sous forme libre, Ac l'anticorps sous forme libre et AcAg le complexe anticorps-antigène ; k_1 et k_{-1} correspondent aux constantes de vitesse d'association et de dissociation. On peut établir la relation suivante :

$$\frac{d[AcAg]}{dt} = k_1[Ac][Ag] - k_{-1}[AcAg]$$

A l'équilibre de la réaction, l'équation devient:

$$k_1[Ac][Ag] = k_{-1}[AcAg]$$

$$\text{d'où, } \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[AcAg]}{[Ac][Ag]} = K_A \quad (1)$$

On définit ici K_A comme la constante d'affinité à l'équilibre qui s'exprime en L/mol. La constante de dissociation à l'équilibre K_D est l'inverse de K_A , et est exprimée en mol/L.

Expérimentalement, on peut déterminer la constante de dissociation à l'aide de la relation de Scatchard :

$$([Ac]_0 - [Ac]) = \frac{([Ag]_0 - ([Ac]_0 - [Ac]))}{K_D} \times [Ag]$$

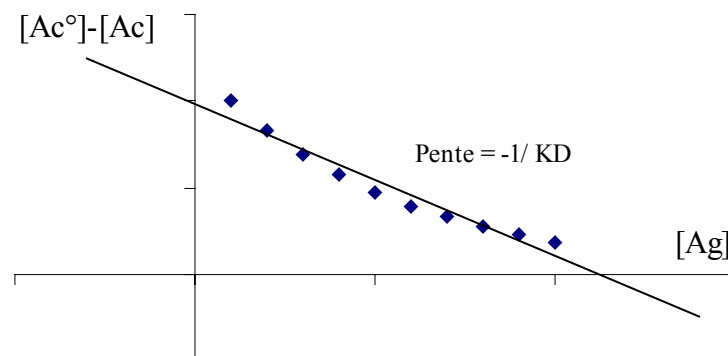
$$\text{d'où } ([Ac]_0 - [Ac]) = \frac{([Ag]_0 - ([Ac]_0 - [Ac]))}{K_D} \times ([Ag]_0 - ([Ac]_0 - [Ac]))$$

Où $[Ac]_0$ est la concentration totale d'anticorps et $[Ac]$ la concentration en anticorps libre,

et $[Ag]_0$ est la concentration totale en antigène et $[Ag]$ la concentration en antigène libre

Il suffit alors de tracer la droite $([Ac]_0 - [Ac]) = f([Ag]_0)$ (2) pour déterminer la valeur du K_D , comme l'illustre la Figure 21.

Figure 21 : Représentation de Scatchard



Il s'agit de la modélisation la plus simple d'interaction entre un anticorps et un antigène. En effet, le calcul utilisé associe une molécule d'antigène pour une molécule d'anticorps, or un anticorps est au moins bivalent. Néanmoins, l'équation de Scatchard peut être utilisée dans le cas d'un mélange homogène, comme c'est le cas avec des anticorps monoclonaux ; l'équation devient, dans le cas d'une immunoglobuline à n sites de liaisons :

$$([Ac]_0 - [Ac]) = \frac{n \times ([Ag]_0 - ([Ac]_0 - [Ac]))}{K_D} \times ([Ag]_0 - ([Ac]_0 - [Ac]))$$

En traçant la droite d'équation (2), on déterminera la constante de dissociation et la valence de l'anticorps.

Pour mieux rendre compte des relations mises en jeu dans la reconnaissance antigène-anticorps, la notion d'avidité a été introduite. Elle est liée aux facteurs influençant la stabilité du complexe : l'affinité des sites de fixation de l'anticorps, la valence de l'anticorps mais aussi de l'antigène (cas d'épitopes multiples) et également aux forces d'interaction participant à la stabilité des complexes formés. L'avidité peut être assimilée à une constante d'affinité fonctionnelle. Ce phénomène pourra être rencontré dans cette étude avec les haptènes couplés, mais pas avec les métabolites libres du fait de leur taille.

III.4.2.3 Détermination de l'affinité par la méthode ELISA

L'utilisation de la méthode ELISA pour mesurer l'affinité d'un anticorps pour un antigène peut être réalisée par différents protocoles dont les principes sont communs. La méthode la plus employée et la plus précise est celle qui a été décrite par Friguet [100], puis corrigée par Stevens [101] et Seligman [102].

Cette méthode, rapide et ne nécessitant ni molécule marquée ni anticorps purifié, repose sur des hypothèses et des conditions particulières pour une estimation fiable : tout d'abord, la concentration en anticorps doit être proche, voire plus faible que la valeur de la constante de dissociation. C'est pourquoi il est nécessaire de choisir une concentration en anticorps totaux le plus faible possible, évaluée à l'aide d'une expérience préliminaire (titration de l'anticorps). D'autre part, il doit exister une variation linéaire entre le signal (absorbance du test ELISA), et la quantité d'anticorps. On pourra alors écrire la relation suivante : $\frac{[Ac]}{[Ac]_0} = \frac{A}{A_0}$, où A est l'absorbance et A_0 l'absorbance en absence d'antigène.

La méthode permet de déterminer une constante d'affinité entre deux composés en phase liquide à l'aide d'une réaction en phase solide. Pour que la mesure soit juste, il faut s'assurer qu'il n'y a pas de réajustement de l'équilibre en phase solide lors du dépôt du mélange sur la plaque ELISA. Cela signifie qu'une partie infime et négligeable des anticorps totaux présents en phase liquide est captée par les antigènes fixés en phase solide.

Ces deux limitations (concentration en anticorps et conservation des équilibres), qui sont liées à la concentration en antigène, à la concentration en anticorps et à l'avidité de l'anticorps pour l'antigène fixé, ont été vérifiées expérimentalement par Friguet et al [100]. Cependant, cette méthode ne permet pas de définir avec précision des constantes d'affinité supérieures à 10^{10} M^{-1} .

On peut ré-écrire l'équation (1) obtenue à partir de la loi d'action de masse ainsi :

$$K_D = \frac{a(i_0 - x)}{x} \text{ et } x = \frac{a(i_0 - x)}{K_D}$$

On définit x comme la concentration du complexe antigène-anticorps à l'équilibre, a comme la concentration en antigène libre et i_0 la concentration initiale d'anticorps.

Soit f la fraction d'anticorps lié tel que $f = x / i_0$, et a_0 la concentration initiale en antigène ($a_0 = a + x$). On peut écrire alors :

$$\frac{x}{i_0} = f = \frac{(a_0 - f \times i_0)(i_0 - f \times i_0)}{K_D \times i_0} = \frac{(a_0 - f \times i_0)(1 - f)}{K_D}$$

$$a_0 = \frac{f \times K_D}{(1 - f)} + f \times i_0$$

$$\text{d'où, } K_D = \frac{a_0(1 - f)}{f} - i_0(1 - f)$$

Si i_0 est négligeable devant le rapport a/f (ou $a_0 > 10 i_0$), alors on peut simplifier l'équation précédente pour obtenir :

$$K_D = \frac{a_0(1 - f)}{f}$$

Dans la méthode de Friguet, nous devons nous assurer qu'il existe une relation linéaire entre la quantité d'anticorps et l'absorbance mesurée :

$$f = \frac{x}{i_0} = \frac{[AgAc]}{[Ac]_0} = \frac{[Ac]_0 - [Ac]}{[Ac]_0}$$

$$f = 1 - \frac{[Ac]}{[Ac]_0}, \text{ or } \frac{[Ac]}{[Ac]_0} = \frac{A}{A_0}$$

Donc $f = 1 - \frac{A}{A_0}$

Cependant cette formule ne tient pas compte de la bivalence des IgG et a été corrigée par Stevens [101]. Ainsi, si f exprime la probabilité qu'un site antigénique soit occupé par un inhibiteur, alors $1-f$ est la probabilité contraire (le site est libre). On a alors trois possibilités P :

- L'anticorps a fixé deux molécules d'antigène, alors $P = f^2$
- L'anticorps est totalement libre, alors $P = (1-f)^2$
- L'anticorps est lié à une seule molécule, alors $P = 2f(1-f)$

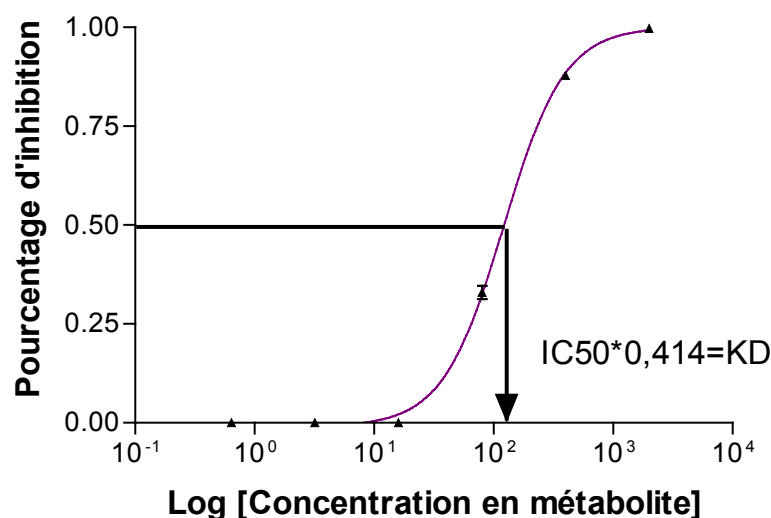
Pour qu'un anticorps réagisse en ELISA, il faut qu'il y ait au moins un site antigénique de libre, donc $P = 2f(1-f) + (1-f)^2 = 1-f^2$; et $f = i/i_0$

D'où $f = \sqrt{1 - \frac{A}{A_0}}$

En traçant la courbe $1 - (A/A_0) = f(a_0)$ (Figure 22), on peut déterminer le K_D . En particulier, à 50% d'inhibition $f = \sqrt{0,5}$, donc $K_D = 0,414 a_0$

Expérimentalement, les anticorps sont incubés en présence de différentes concentrations d'antigène (solutions mères à 4 mg/mL ou 2 mg/mL) pendant 1h15 pour atteindre l'équilibre, avant de déposer les mélanges sur une plaque ELISA, préalablement activée avec l'antigène. Le reste de la procédure est un ELISA classique. Lors de l'incubation hors plaque ELISA, s'il y a formation d'un complexe antigène-anticorps, l'anticorps ne se fixera pas sur la plaque et sera éliminé lors du lavage. Ainsi, plus la coloration du puits sera faible, plus l'antigène aura inhibé la fixation de l'anticorps sur la plaque. Un pourcentage d'inhibition peut alors être calculé pour chaque concentration d'antigène utilisée ($1 - (A/A_0)$), permettant de calculer l'affinité du couple antigène-anticorps :

La courbe $(1 - (A/A_0)) = f([métabolite])$ est tracée à l'aide du logiciel Prism (version 2.01) en utilisant un modèle sigmoïdal (équivalent à une équation logistique à 4 paramètres), dont la concentration en métabolite à 50% d'inhibition (IC_{50}) est extraite.

Figure 22 : Exemple de détermination du K_D par la méthode ELISA

III.4.2.4 Détermination de l'affinité par la technique RIA

Il s'agit de la technique de référence pour la détermination de constantes d'affinités de soluté soluble. Dans cette technique, les antigènes ou les anticorps doivent être marqués par un élément radioactif. En effet, on mesure la radioactivité émise par les échantillons à la fin de l'expérience pour calculer les constantes d'affinité du complexe antigène-anticorps. Ce marquage peut être réalisé à l'aide d'un composé externe comme de l'iode 125 (^{125}I) utilisé pour le marquage d'anticorps, ou bien en substituant un atome par son isotope radioactif comme du carbone 14 (^{14}C) ou du tritium (^3H). Cette dernière solution a l'avantage de ne modifier ni l'anticorps ni l'antigène, et d'assurer par ce fait aucune perturbation des forces mises en jeu dans la réaction anticorps-antigène. Dans notre cas, il s'agit de la cocaïne qui est marquée à l'aide de tritium (^3H -cocaïne).

L'affinité est calculée d'après la technique décrite par Muller [103] : on mélange 50 μL de molécule inhibitrice non marquée (ou froides) à différentes concentrations avec 200 μL d'antigène radioactif (ou traceur) à une concentration fixe. Ce mélange est alors incubé pendant 2 heures avec 100 μL d'anticorps, dilué à une concentration où 50% du traceur est fixé (titration préalable). Les molécules inhibitrices vont déplacer l'équilibre de fixation de l'anticorps avec l'antigène marqué :

Soit b la fraction d'antigène marqué fixé à l'anticorps, on peut alors écrire les relations suivantes :

$$[\text{AcAg}] = b[\text{Ac}]_0 \text{ et } [\text{Ag}] = [\text{Ag}]_0 - [\text{AgAc}] = [\text{Ag}]_0 - b[\text{Ag}]_0$$

d'où $[Ag] = (1-b)[Ag]_0$

L'équation (1) donnée par la loi d'action de masse devient :

$$K_A = \frac{b}{(1-b)[Ac]} \text{ ou } [Ac] = \frac{b}{(1-b)K_A}$$

Quand la quantité d'antigène fixé est inhibée à 50% par un inhibiteur (ou l'antigène non marqué, noté I), si 0,5b est la fraction des molécules d'antigène A telle que $A = Ag + I$, on peut écrire la relation suivante :

$[A-Ac] = 0,5[A]_0 = 0,5b([Ag]_0 + [I]_0)$, où A-Ac est la concentration totale en complexe anticorps-antigènes totaux (Ag+I). Donc, la concentration an antigène libre est :

$$[A] = [A]_0 - [A-Ac] = [Ag]_0 + [I]_0 - 0,5b([Ag]_0 + [I]_0)$$

$$[A] = (1-0,5b)([Ag]_0 + [I]_0)$$

L'équation d'action de masse peut être ré-écrite ainsi :

$$K_A = \frac{[A-Ac]}{[A][Ac]}, \text{ d'où } K_A = \frac{0,5b}{(1-0,5b)[Ac]}$$

La concentration en anticorps totaux peut s'écrire comme $[Ac]_0 = [A-Ac] + [Ac]$

$$\text{Donc, } [Ac]_0 = [A-Ac] + \frac{0,5b}{K_A - 0,5bK_A}$$

$$\text{D'où, } \frac{b}{(1-b)K_A} = [A-Ac] + \frac{0,5b}{K_A - 0,5bK_A}$$

$$\text{Donc, } K_A = \frac{1}{([I]_0 - [Ag]_0)(1 - 1,5b + 0,5b^2)} \quad (3)$$

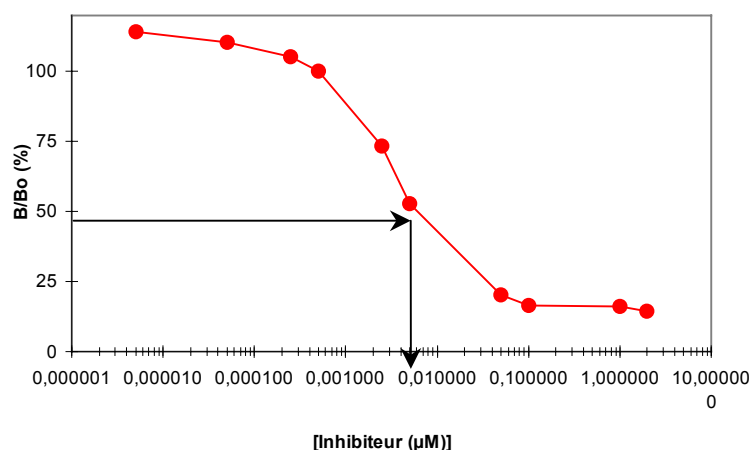
La résolution de cette équation est obtenue grâce au calcul la concentration en antigène donnant 50% de la réponse (IC_{50}), calculé à partir de la courbe théorique d'équation $y = y_{\max} / (1 + (I/IC_{50}))$, où y représente le pourcentage d'inhibition.

Cas particulier : Lorsque 50% d'antigène est fixé en absence d'inhibiteur, l'équation devient :

$$K_A = \frac{8}{3([I]_0 - [Ag]_0)}, \text{ où } [I]_0 \text{ est la concentration en antigène donnant 50\% de la réponse}$$

(IC_{50}).

On peut alors définir la réactivité croisée comme le pourcentage du rapport de la concentration en cocaïne et de la concentration en inhibiteur lorsque la fixation maximale est diminuée de 50%.

Figure 23 : Exemple de détermination du K_A par la méthode RIA

Remarque : L'équation (3) qui ne prend pas en compte la bivalence des anticorps de type IgG, a été modifiée par Winzor [104] en utilisant la correction de Stevens ($1-f^2$). Ainsi à 50% d'inhibition, $b = \sqrt{0,5}$ et l'équation permettant le calcul de la constante d'association devient :

$$K_A = 5 / ([IC_{50}] - [Ag]_0)$$

Cette correction n'a pas été prise en compte dans le calcul d'affinité RIA, ce qui entraîne une sous estimation de K_A d'un facteur 1,87.

III.4.2.5 Détermination de l'affinité par mesure directe en Biacore

La troisième technique utilisée pour déterminer les constantes cinétiques fait appel à un procédé physique, le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR, surface plasmon resonance). Un antigène, ou ligand, est fixé sur une matrice de dextran, elle-même associée à une fine couche d'or reposant sur une lame en verre. Lors du passage d'une solution d'anticorps à proximité d'antigène immobilisé, on mesure en temps réel, à l'aide d'un faisceau lumineux polarisé, les changements d'indice de réfraction générés au voisinage de la surface métallique (Figure 24). Les variations d'indice, exprimées en unité de résonance (RU), sont proportionnelles à la masse des molécules adsorbées à la surface, et leurs mesures au cours du temps sont représentées graphiquement par un sensorgramme. On définit trois phases successives lors de la conduite d'une expérience :

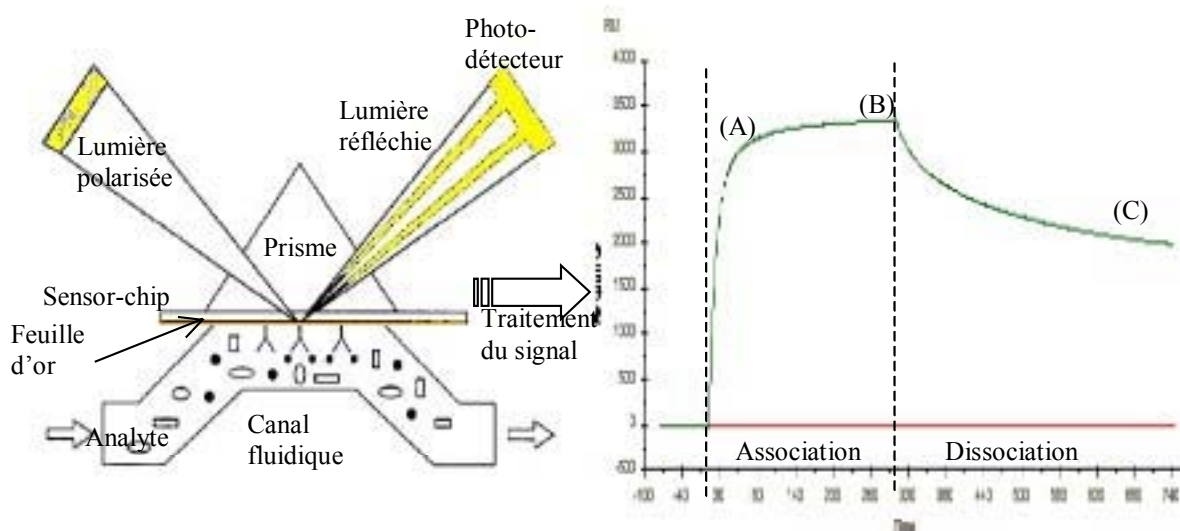
1. Une phase d'adsorption. L'échantillon, appelé analyte, est injecté à flux continu sur la surface où le ligand a été immobilisé. Pendant cette phase on observe

l'association de l'anticorps sur l'antigène, plus la quantité d'anticorps lié est forte, plus le signal est élevé.

2. Une phase de désorption. L'échantillon est remplacé par du tampon, provoquant la dissociation du complexe analyte-ligand, de façon progressive.
3. Une phase de régénération au cours de laquelle le passage d'une solution acide accélère la dissociation et permet de retrouver une surface semblable à celle du début de l'expérience.

Figure 24 : Principe de la résonance plasmonique de surface

A gauche, le système optique ; à droite le signal traité. (A) injection : $dR/dt = k_a C(R_{\max} - R) - k_d R$; (B) équilibre : $dR/dt = 0$; (C) post injection : $dR/dt = -k_d R$. D'après [105]



Les interactions analyte/ligand, ou anticorps/antigène, mis en jeu dans ce procédé découlent de la loi d'action de masse. Ainsi, on peut écrire

$$\frac{d[AcAg]}{dt} = k_1[Ac][Ag] - k_{-1}[AcAg]$$

Dans ce système, la réponse R mesurée est proportionnelle à la formation du complexe antigène-anticorps, et la réponse maximale $R_{\max}$ pouvant être mesurée correspond à la quantité maximale totale d'antigène lié à la surface. Dans ces conditions, si on définit que la concentration en anticorps C fixé correspond à la différence de réponse $R_{\max} - R$, alors l'équation précédente devient :

$$\frac{dR}{dt} = k_1 \times C \times R_{\max} - (k_1 \times C + k_{-1})R \quad (A)$$

La courbe dR/dt en fonction de R est une droite de pente $-k_{obs}$ égale à $-(k_1C+k_{-1})$. Les constantes k_1 et k_{-1} peuvent être alors déterminées expérimentalement par l'étude des sensogrammes d'associations lors du passage d'anticorps à différentes concentrations : les points k_{obs} en fonction de la concentration en anticorps définissent une droite dont la pente est k_1 .

L'intégration de la formule (A) entre 0 et t donne l'équation suivante

$$R = \frac{k_1 \times R_{\max} \times C}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad \text{ou} \quad \ln \frac{dR}{dt} = \ln(k_a \times C \times R_{\max}) - k_{obs}t \quad (A)$$

Pour calculer k_{-1} , il faut que k_1C soit très grand devant k_{-1} . Cette condition n'est généralement pas validée, la détermination de k_{-1} est obtenue lors de la phase de dissociation, quand l'analyte n'est plus injecté. Le complexe lié à la surface se dissocie suivant la réaction d'ordre zéro suivante :

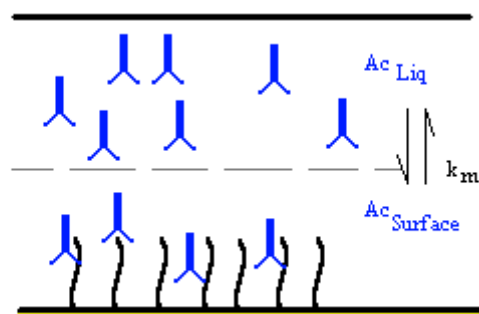
$$\frac{dR}{dt} = -k_{-1}R$$

L'intégration de cette formule donne

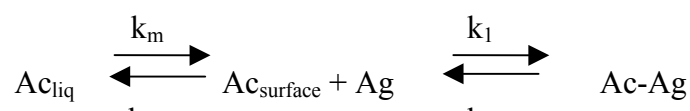
$$R = R_0 e^{-k_d(t-t_0)} \quad \text{ou} \quad \ln \frac{R_0}{R} = k_d(t-t_0) \quad (B)$$

Ces calculs supposent que les hypothèses suivantes soient vérifiées :

1. La re-fixation des anticorps élués est négligeable. Cette condition dépend de la quantité d'antigène disponible, de la densité antigénique et de la quantité totale d'anticorps fixé. Pour arriver à ce résultat, la quantité d'antigène fixé sera la plus faible possible.
2. La fixation des anticorps est gouvernée par les mêmes énergies de fixation, c'est-à-dire que l'antigène est équitablement accessible et on considère que les complexes formés sont monovalents. Donc la détermination des constantes d'affinité pour un anticorps par cette méthode sera systématiquement une approximation des valeurs réelles.
3. Dans la technique utilisée, l'anticorps est apporté par un système de microfluide. De ce fait, on doit vérifier que la diffusion de l'anticorps au voisinage de l'antigène n'est pas modifiée (Figure 25).

Figure 25 : Représentation schématique du transport d'analyte.

On peut schématiser le système de la manière suivante :



Où k_m est la vitesse de transport entre la phase liquide et la phase solide de l'anticorps, et inversement et, on considère que la constante de vitesse est identique dans les deux directions ($k_m = k_{-m}$).

Si l'effet dû au transport de masse est beaucoup plus rapide que la formation du complexe ($k_m \gg k_1$), alors la quantité d'anticorps en phase liquide est identique à celle en phase solide. Donc pour que le transport de masse soit négligeable, on prendra soin d'avoir la plus faible quantité d'antigène fixé et de réaliser les expériences avec un débit d'injection élevé.

En pratique, les expériences sont réalisées avec un BIAcore 2000 dans l'unité INSERM U437 (Nantes) sous la responsabilité de P Vusio, Ingénieur INSERM. Les immobilisations sont effectuées sur une sensor-chip CM5 pour les haptènes-BSA par couplage chimique (EDC-NHS). Les haptènes sont couplés à un débit de 5 μ l/min en injectant 35 μ l d'EDC-NHS, puis 35 μ l l'haptène à 0,5 à 20 μ g/ml dans 10mM acétate de sodium pH 3,25 ; et enfin 35 μ l Ethanolamine-HCl 1M pH 8.5. L'ensemble des immobilisations réalisées est répertorié dans le Tableau 7. Le tampon de travail (ou Running Buffer) est une solution de HBS-EP composée de 0,01 M HEPES pH 7,4 ; 0,15 M NaCl, 3mM EDTA et de 0,005% polysorbate 20 (v/v).

Tableau 7 : Conditions d'immobilisation et intensité de couplage exprimé en RU.

	Molécule	Concentration	Débit	Immobilisation
Immobilisation forte	BSA	20µg/ml	5 µl/mn	7427 RU
	BSA-H3'	20 µg/ml	5 µl/mn	9525 RU
	BSA-MET1	20 µg/ml	5 µl/mn	14282 RU
	BSA	1 µg/ml	5 µl/mn	1264 RU
	BSA-MET1	1 µg/ml	5 µl/mn	3903 RU
Immobilisation faible	BSA	0,5 µg/ml	5 µl/mn	1065 RU
	BSA-H3'	0,5 µg/ml	5 µl/mn	305 RU
	BSA-MET1	1 µg/ml	5 µl/mn	525 RU
	BSA-MET1'	1 µg/ml	5 µl/mn	339 RU

Les expériences cinétiques sont réalisées à 40 µl/min en injectant des gammes de Fab et d'IgG de 0,5 à 200 µg/ml pendant 300s pour l'association et 300s pour la dissociation. La régénération est effectuée avec un pulse de 30s ou 1 min avec une solution de Glycine-HCl 10 mM pH 1,8.

Toutes les courbes sont soustraites du canal témoin (BSA) avant d'être analysées (au moins 5 courbes) à l'aide du logiciel BIAevaluation 3.0 (Figure 26.). Les constantes d'association sont calculées en même temps que les constantes de dissociation à l'aide de modèle mathématique. Comme indiqué dans le Tableau 8, le début et la fin de chaque phase d'association et de dissociation n'ont pas été pris en compte (perturbation du signal par mise en route des pompes, par exemple).

Tableau 8 : Données sélectionnées pour la modélisation des sensorgrammes.

Phase		Association		Dissociation	
Evènement	Début de la phase (# injection)	Intervalle des valeurs utilisées pour la modélisation	Début de la phase (= fin de l'injection)	Intervalle des valeurs utilisées pour la modélisation	
Temps en sec	0	[30 ; 290]	300	[320 ; 600]	

Lors des mesures sur sensor-chip fortement immobilisées, le modèle de transport de masse inclus dans le logiciel a été utilisé. Ce modèle corrige l'effet de transport de masse en

utilisant les équations suivantes : $\frac{dR}{dt} = \frac{k_a \times C(R_{\max} - R) - k_d R}{1 + k_a \frac{G(R_{\max} - R)}{MTC}}$ et $MTC = \sqrt[3]{\frac{D^2 f}{0,3 h^2 w l}}$

Où G est un facteur de conversion de la concentration de surface en réponse, MTC le coefficient de transport de masse, D la diffusion de l'analyte (m²/s), f le débit volumétrique (m³/s), et h, w, l la hauteur, la longueur et la largeur du canal fluidique.

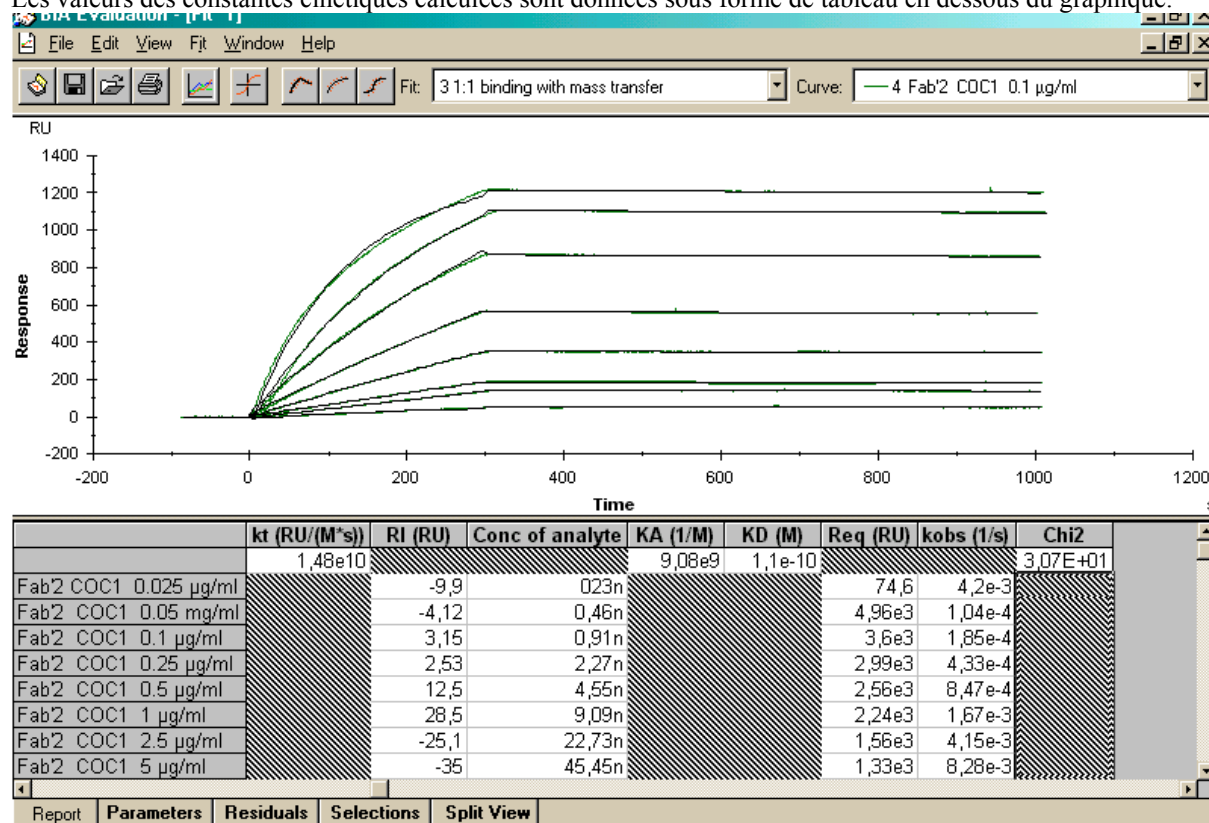
Le choix de ce modèle s'est appuyé sur le Chi² donné par le logiciel, traduisant la fidélité de la modélisation : Cette valeur était la plus faible par rapport aux différents modèles testés (plus cette valeur tend vers zéro, plus le modèle est juste). Pour une modélisation de données idéales, le Chi calculé doit être du même ordre de grandeur que le bruit de fond (typiquement inférieur à 2 RU), mais en pratique, une valeur de Chi inférieure à 10 sera considérée comme acceptable [106].

Dans ce modèle, les constantes de vitesse d'association et de dissociation (k_a et k_d) ont été calculées globalement pour toutes les courbes (contrainte globale), alors que la réponse maximale (RU_{max}) a été calculée pour chacune (contrainte locale).

Le modèle de Langmuir a été utilisé lors d'analyses avec des sensor-chips faiblement immobilisées. Il a été utilisé en imposant le calcul local des vitesses d'association et de dissociation et de la réponse maximale, ce qui revient exactement à réaliser les calculs donnés dans les équations (A) et (B) précédentes.

Figure 26 : Détermination des constantes cinétiques du CocAB à l'aide du logiciel BIAevaluation.

Les sensorgrammes expérimentaux sont en vert, et les courbes théoriques calculées à partir des données en noir. Les valeurs des constantes cinétiques calculées sont données sous forme de tableau en dessous du graphique.



III.4.2.6 Détermination des constantes d'affinité par mesure indirecte en BIAcore

Pour déterminer avec précision les constantes d'affinités, nous avons réalisé des tests de compétition par BIAcore pour certains anticorps, inspirés des travaux de Nieba et al [107]. Ces tests sont similaires dans leur principe à ceux réalisés en ELISA : les anticorps concentrés à 6,6 nM sont pré-incubés avec des concentrations variables de métabolite pendant 1h15 à 37°C, puis le mélange injecté sur la sensor chip immobilisée avec l'haptène couplé à la BSA. A noter que les métabolites ont été dissous dans du tampon de travail pour limiter l'effet du tampon (saut de signal lié à la composition du tampon, ou effet Bulk).

Les cinétiques d'association et de dissociation sont enregistrées puis traitées avec le logiciel BIAevaluation pour déterminer les constantes d'affinité : plaçons-nous dans le cas le plus simple d'un anticorps monovalent, soit K_i la constante d'inhibition telle que :

$$K_i = \frac{[Ac][I]}{[AcI]}$$

Cette équation est équivalente à $K_i = \frac{([Ac]_0 - [AcI]) \times ([I]_0 - [AcI])}{[AcI]}$

D'autre part, on peut calculer K_i à l'aide de la relation suivante :

$k_{obs} = k_{obs^\circ} ([Ac]/[Ac]_0)$ où k_{obs° est égale à k_{obs} en l'absence d'inhibiteur.

Ce qui équivaut à :

$$k_{obs} = k_{obs^\circ} \times \frac{1}{[Ac]_0} \times ([Ac]_0 - [AcI])$$

$$\text{Donc, } k_{obs} = k_{obs^\circ} \times \frac{1}{[Ac]_0} \times ([Ac]_0 - (\frac{[Ac]_0 + [I]_0 + K_i}{2}) + \sqrt{(\frac{[Ac]_0 + [I]_0 + K_i}{2})^2 - [I]_0[Ac]_0}) \quad (4)$$

Si on considère un anticorps bivalent, on peut appliquer la stratégie proposée par Stevens en ELISA, et k_{obs} devient :

$$k_{obs2} = (1 - f^2) \times k_{obs^\circ}$$

$$\text{D'où, } 1 - f = 1 - \sqrt{1 - \frac{k_{obs2}}{k_{obs^\circ}}}$$

$$\text{Donc, } k_{obs} = (1 - \sqrt{1 - \frac{k_{obs2}}{k_{obs^\circ}}}) \times k_{obs^\circ}$$

En modifiant l'équation (4), k_{obs2} peut être calculé directement à l'aide du calcul :

$$k_{obs2} = k_{obs^\circ} \times \left[1 - \frac{1}{4[Ac]_0^2} \times \left(\frac{2[Ac]_0 + [I]_0 + K_i}{2} - \sqrt{\left(\frac{2[Ac]_0 + [I]_0 + K_i}{2} \right)^2 - 2[I]_0[Ac]_0} \right) \right]$$

La constante de dissociation peut être calculée plus simplement par un raisonnement analogue à celui du test de compétition par ELISA. En effet, on peut considérer que la réponse maximale mesurée en fin de phase d'association est équivalente à celle de l'absorbance mesurée en ELISA, et dans ce cas, la courbe $1 - (RU_{max}/RU_{max^\circ}) = f([I]_0)$ permet de déterminer le K_D du complexe anticorps/ métabolite en solution.

III.5 Recherche de réactivités croisées avec cellules sanguines

Les anticorps obtenus ont pour but d'être injectés par voie intraveineuse, il ne doit donc pas y avoir de réactivité croisée avec les constituants du sang. Pour contrôler ces faits, nous avons réalisé des tests en cytométrie de flux (CMF) sur les cellules sanguines humaines (globules rouges, globules blancs et plaquettes) pour démontrer l'absence de réactivité des anticorps avec ces cellules. Les cellules sanguines ont été incubées avec du surnageant de culture pendant une heure à 37°C, puis, après lavage pendant 30 minutes, un anticorps anti-globuline de souris couplé à un fluorochrome (FITC) a été ajouté. Les conditions expérimentales pour chaque cellule sont présentées dans le Tableau 9.

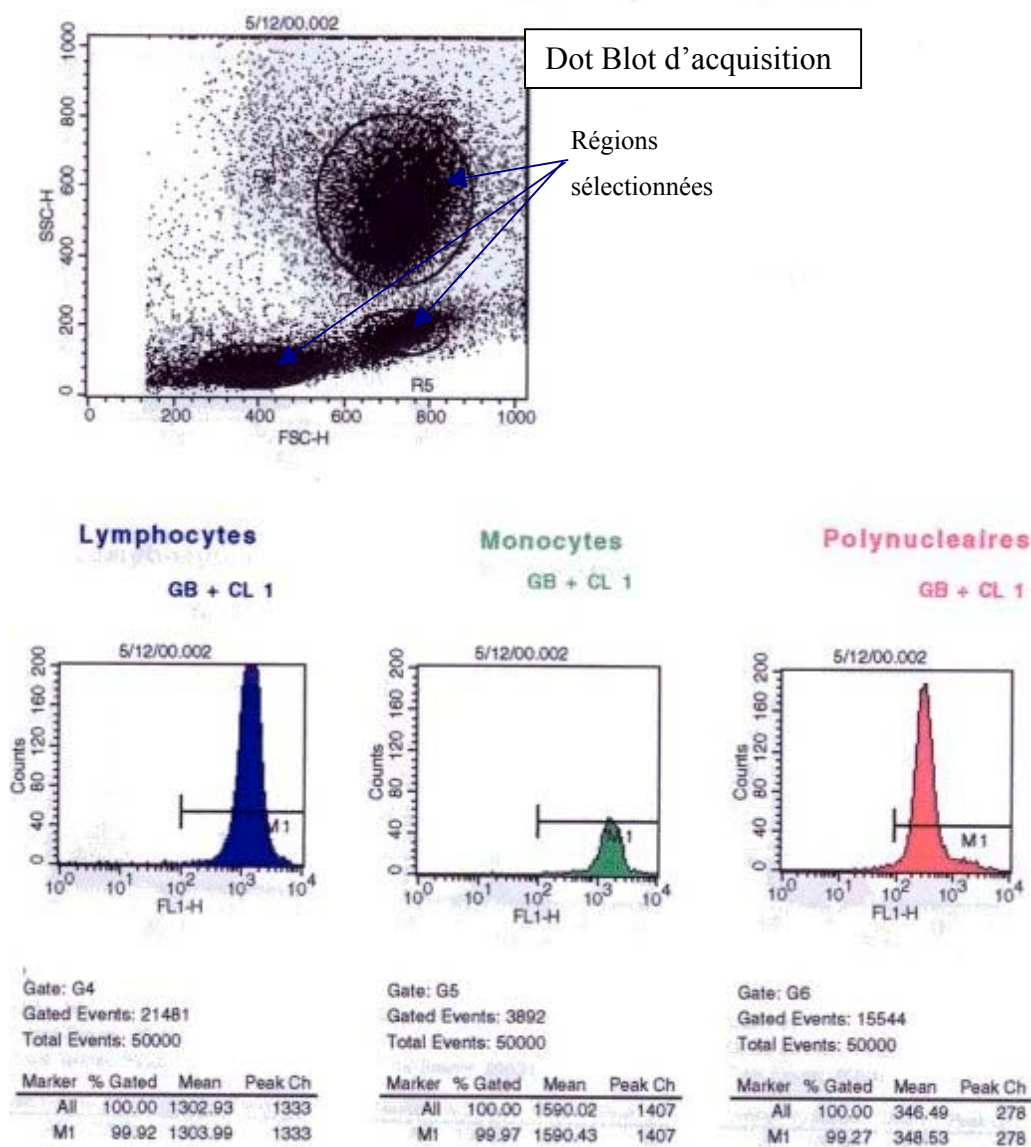
Tableau 9 : Conditions expérimentales pour l'analyse de cellules par CMF

	GLOBULES ROUGES	GLOBULES BLANCS	PLAQUETTES
Quantité de cellules	5 µL d'une suspension à 10 %	100 µL du buffy-coat Exempt de G.Rouges PBS SAB 5%	5 10 ⁶ Soit : 10 µL d'une suspension à 5 10 ⁸ /mL
Ac à tester	50 ou 100 µL	50 ou 100 µL	50 ou 100 µL
Témoin positif	Anti-CD 55 F20-5D12 dilué au 1/50	Anti-classe I F41-1E3 surnageant au pur	Anti-GP IIIa F12-7C7 surnageant au pur
Solution de lavage	PBS 0,2 % BSA	PBS 0,2 % BSA	PBS EDTA 1 mM 0,2% BSA
Temps de centrifugation	2 min à 750 g	5 min à 400 g	10 min à 1900g
Ac secondaire	50 µL dilué en eau Phy ou PBS	100 µl Dilué en PBS SAB 5 %	50 ou 100µL
Solution de lavage	PBS 0,2 % BSA	PBS 0,2 % BSA	PBS EDTA 1 mM 0,2% BSA
Remise en suspension des cellules pour la lecture	200 µL	500 µL	200 µL

Après un dernier lavage, les cellules sont passées devant un faisceau laser dont les déviations sont analysées et traitées informatiquement. Les cellules peuvent être ainsi différenciées suivant leur taille, leur granulométrie, et leur intensité de fluorescence (mis à part la fluorescence naturelle de la cellule, une intensité détectée sera révélatrice d'une réaction croisée). Les données sont représentées sous forme d'histogramme qui donne la distribution du nombre de cellules étudiées en fonction de l'intensité du signal, comme l'illustre la Figure 27.

Figure 27 : Exemples d'histogrammes obtenus lors de l'analyse de cellules en cytométrie de flux

Analyse de globules blancs par cytométrie en flux. En dessous du Dot Blot d'acquisition, les histogrammes correspondants aux trois régions sélectionnées. Le marqueur M1 indique le seuil de fluorescence positive. Les données statistiques (Moyenne de fluorescence,...) sont indiquées en dessous des histogrammes



IV Résultats

IV.1 Anticorps monoclonaux anti-cocaïne

L'obtention d'anticorps polyclonaux anti-cocaïne fonctionnels a permis de sélectionner l'haptène et de préciser les caractéristiques des anticorps monoclonaux recherchés. Ces spécifications, présentées dans le Tableau 10, ont été dictées par les mêmes contraintes que celles définies pour le CocAB.

Tableau 10 : Spécifications des anticorps monoclonaux anti-cocaïne

Métabolites	Pourcentage de réaction croisée
Cocaïne ($K_a > 10^8 \text{ M}^{-1}$)	100
Ethyl Cocaïne	≥ 100
Norcocaïne	10
Benzoylecgonine	< 1
Ecgonine métyl ester	< 1
Ecgonine	< 1

IV.1.1 Immunisation

L'immunisation des souris, à l'aide de l'immunogène TT-H₃' a été réalisée par le laboratoire d'hormonologie du CER en Belgique.

La technique ELISA, nécessitant moins de sérums que la méthode RIA, avec un seuil de détection plus faible, a été utilisée pour analyser les sérums prélevés après la première injection afin de contrôler l'induction d'anticorps anti-haptène. De plus, la technique RIA ne permettait pas de discriminer les variations de réponses entre les animaux. Par la suite, seule la technique RIA a été employée pour suivre l'évolution des réponses d'immunisation, notamment parce que la mesure du titre était réalisée avec la cocaïne libre et non pas avec l'haptène H₃' (comme c'est le cas en ELISA).

Le tableau ci-après présente les résultats obtenus pour les dix souris immunisées. En RIA, le titre a été défini comme étant l'inverse de la dilution donnant 50% de la réponse maximale. Dans certains cas, ce critère ne permettait pas de définir le titre avec précision, malgré la détection d'une réponse avec les premières dilutions des sérums. Les résultats

obtenus avec les sérums des souris avant immunisation étaient négatifs vis-à-vis de l'haptène H₃' et de la cocaïne.

Figure 28 : Titre des sérums des souris immunisées par TT H₃' durant les différentes immunisations.

Les titres obtenus par ELISA avec BSA-H₃' sont indiqués en italique.

Titre	Souris											
	DAS13	DAS14	DAS15	DAS16	DAS17	DAS18	DAS19	DAS20	DAS21	DAS22	DAS23	DAS24
Prélèvement n° 1	<i>2000</i>	<i>64000</i>	<i>8000</i>	<i>64000</i>	<i>32000</i>	<i>64000</i>	<i>64000</i>	<i>64000</i>	<i>128000</i>	<i>32000</i>	<i>64000</i>	<i>64000</i>
	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	15	28	11	>80
Prélèvement n° 2	<20	<20	<20	<20	32	20	<20	50	160	80	40	230
Prélèvement n° 3	<20	<20	<20	<20	32	20	<20	50	200	80	40	230
Prélèvement n° 4	<40	<40	<40	<40	<40	256	90	115	218	84	91	108

On constate que tous les animaux répondent, et que cette réponse augmente avec le nombre d'injections, bien qu'une hétérogénéité soit observée entre les souris. Ainsi, nous avons pu sélectionner deux souris pour produire des anticorps monoclonaux, les souris DAS18 et DAS24. La souris DAS 18 a été sélectionnée en raison d'un titre élevé pour la cocaïne mesurée dans son sérum lors du 4^e prélèvement. La souris DAS 24 est l'animal dont le titre en RIA est le plus élevé jusqu'au 3^e prélèvement. La chute du titre au prélèvement n°4 peut être due à une erreur de mesure, ou au développement d'une tolérance vis-à-vis de l'haptène H₃'. Dans les deux cas, il nous semblait intéressant d'utiliser cette souris pour la production d'anticorps monoclonaux.

Par ailleurs, nous avons conservé les splénocytes des souris DAS 20 et DAS 21 en prévision d'une seconde fusion cellulaire. Ces quatre souris ont reçu une dernière injection, ou « boost », avant d'être sacrifiées pour extraire les splénocytes nécessaires à la production d'anticorps monoclonaux.

IV.1.2 Fusion

Pour le programme cocaïne, deux fusions (une pour chaque souris sélectionnée) ont été réalisées en même temps suivant la méthode décrite par Loirat [108] avec 50 10⁶ splénocytes par souris. Les splénocytes prélevés sur la souris DAS18 et fusionnés avec le partenaire de fusion ont été répartis sur 5 plaques de culture à fond plat de 96 puits numérotées de 1 à 5, et de 6 à 10 pour les cellules issues de la souris DAS24. Les hybridomes viables colonisent les puits en une dizaine de jours, et le surnageant de culture des puits

poussés a été analysé par ELISA pour détecter la sécrétion d'anticorps (étape de criblage). Par convention, le nom des clones positifs en anticorps est composé du numéro de fusion (ici F244), puis du numéro de plaque et enfin du puits ; ce qui donne par exemple F244-4D8.

A l'issue de ce premier criblage, dit criblage primaire, 98% des puits ensemencés ont été analysés, et la positivité a été obtenue sur 10% des puits testés. Après amplification, 19 clones, soit 2% des puits testés, se sont révélés être spécifiques de l'haptène H₃'. Des tests de compétition avec différentes drogues ont été réalisés pour définir les hybridomes devant être clonés. Les drogues utilisées pour ces premiers essais ont été la cocaïne et la nor-cocaïne, deux molécules toxiques pour l'organisme, et la benzoylecgonine qui est le métabolite non toxique majoritaire (80%) de la cocaïne. Le choix des hybridomes devant être clonés a été dicté par l'affinité élevée pour la cocaïne et la nor-cocaïne, ou préférentiellement une affinité élevée pour la cocaïne et moyenne pour la nor-cocaïne. En effet, l'action des anticorps doit être principalement dirigée contre la cible majeure, la cocaïne. Dans tous les cas, les anticorps ne devaient avoir qu'une réactivité croisée limitée pour la benzoylecgonine.

Le Tableau 11 présente l'ensemble des résultats obtenus avec les 19 hybridomes spécifiques de l'haptène.

Tableau 11 : Hybridomes isolés lors du criblage primaire

Fusion N°244		Criblage après amplification					
Hybridomes		Criblage initial	24 puits				
		96 puits	Pourcentage d'inhibition ([I]=1 mg/ml)				
Identification	ELISA BSA-H3'	ELISA BSA-H3'	Cocaine Chlorhydrate (CC)	Norcocaine (Norc)	Benzoecgonin (BE)	Dilution limite	
(1)	4A8	0,821	1,463	2	7	7	X
	7C5	0,719	1,017	11	10	12	
	5A8	1,245	>2	31	0	6	
	2H6	1,319	1,447	96	37	0	
(2)	3B10	1,281	>2	93	43	0	X
	2F1	1,475	>2	99	47	0	X
	3D10	1,262	>2	96	53	0	X
	5A11	1,547	>2	100	59	7	X
(3)	2C10	0,931	2	92	71	8	
	4D8	1,168	1,85	99	90	0	X
	4E8	1,205	1,413	100	94	0	
	5F9	1,489	1,214	98	99	1	X
(4)	5B3	1,485	>2	95	33	39	X
	5D11	1,302	>2	99	71	52	
	2C5	1,36	>2	99	71	84	
	4G6	1,04	1,159	100	83	87	
	1B3	1,423	>2	73	0	90	
	5H12	1,589	>2	100	88	92	
	3F6	1,349	>2	100	89	95	

Les 19 hybridomes pré-sélectionnés peuvent être regroupés en 4 groupes :

- Ceux n'ayant pas de réactivité croisée pour les 3 composés testés, donc étant spécifique de l'haptène H₃'. C'est le cas des hybridomes 4A8, 7C5, et du 5A8. (groupe (1)).
- Ceux possédant une réactivité croisée trop importante (supérieure à 10%) pour la benzoylecgonine (groupe (4)).
- Ceux possédant une affinité forte pour la cocaïne, et moyenne pour la nor-cocaïne. C'est le cas des hybridomes 3B10, 2F1, 3D10 et 5A11 (groupe (2)).
- Ceux possédant une affinité élevée à la fois pour la cocaïne et la nor-cocaïne, comme les hybridomes 5F9, 4E8 ou 4D8 (groupe (3)).

Tous les hybridomes ont été congelés en azote liquide, mais seulement 9 ont été sélectionnés pour clonage en dilution limite : 4A8, 3B10, 2F1, 3D10, 5A11, 4D8, 4E8, 5F9 et 5B3.

Cette étape aurait pu être envisagée pour deux autres clones, le 2H6 et le 2C10, mais leurs caractéristiques semblaient redondantes avec ceux déjà en cours. En effet, les cellules ne poussant pas à la même vitesse, certains clones, comme le 5B3, ont été mis en dilution limite avant les tests de compétition, ceci pour ne pas perdre un clone intéressant.

Au sein des hybridomes choisis, le clone 4A8, considéré comme exclusivement spécifique de l'haptène H₃', a été inclus pour servir de témoin en vue des expériences ultérieures d'efficacité.

Sur les 9 hybridomes mis en dilution limite (DL), trois ont été perdus à la première DL (4E8, 5H9 et 4A8), un quatrième en DL2 (2F1), et un cinquième au cours de la DL3 (3D10). La perte supérieure à 50% des hybridomes souligne l'instabilité d'une fusion cellulaire tant que la cellule n'est pas monoclonale.

Des productions pilotes d'anticorps en surnageant ont alors été réalisées avec les 4 hybridomes restant (3B10, 4D8, 5B3 et 5A11) afin de disposer de matériel en quantité suffisante pour caractériser les anticorps obtenus et sélectionner le ou les candidats potentiels à des essais *in vitro* supplémentaires et *in vivo*.

La détermination de l'isotype de chaque anticorps a été la première caractérisation. Le Tableau 12 présente les résultats obtenus par la technique ELISA, et confirmés par Blot, avec les quatre anticorps anti-cocaïne produits en surnageant de culture.

Tableau 12 : Isotype des anticorps anti-cocaïne produits

Anticorps	Isotype
3B10	M
4D8	G1
5A11	Indéterminé (G1 + G2a)
5B3	G1

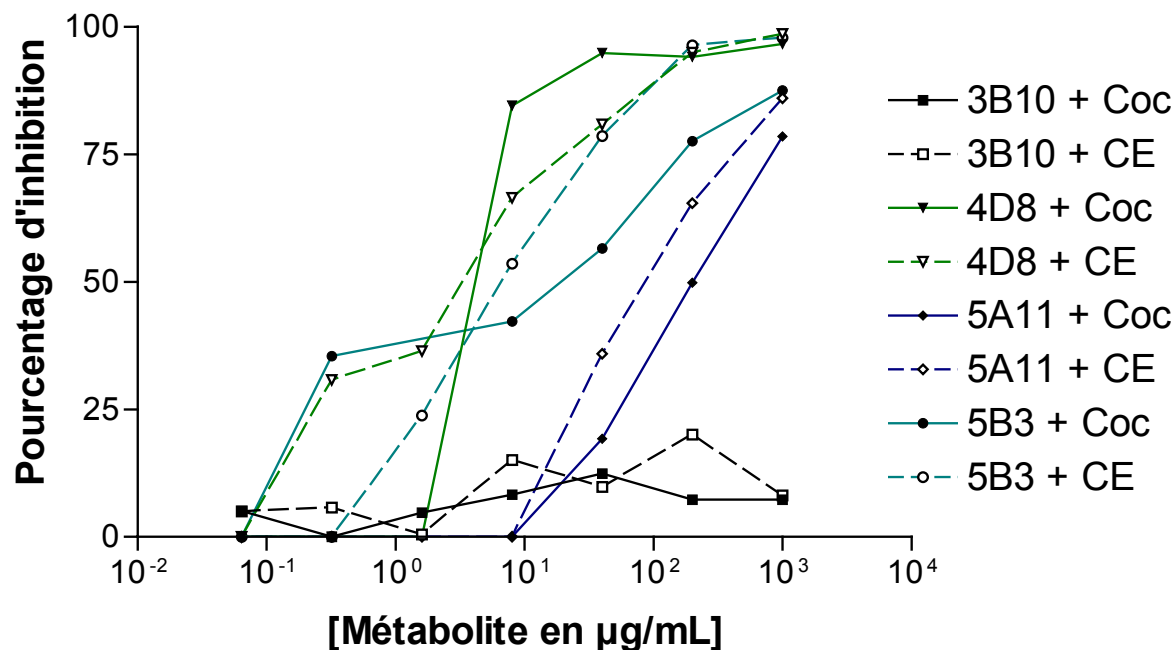
Des tests de compétition avec la cocaïne chlorhydrate et la coca-éthylène ont été réalisés, parallèlement à la détermination des isotypes, sur les quatre surnageants produits. La coca-éthylène a été préférée à la nor-cocaïne en raison des effets plus nocifs de la coca-éthylène, et du nombre croissant de prises de cocaïne accompagnées d'alcool. Les résultats sont présentés dans le Graphique 1.

Mis à part l'anticorps 4D8, les pourcentages d'inhibition obtenus avec la cocaïne sont très différents de ceux déterminés lors du criblage primaire : L'anticorps 3B10 ne semble plus reconnaître la cocaïne (7,32% avec 1mg/mL de cocaïne contre 93% avant clonage), le 5A11 a une affinité diminuée de plus de 20% (78,5% à 1mg/mL lors des tests de compétition) et le 5B3 de 8% (87,52% à 1mg/mL).

Pour expliquer ces résultats, des erreurs de mesure dans les deux tests n'expliquent pas la perte d'affinité totale de l'anticorps 3B10. Lors des tests de compétition à l'étape du criblage primaire, nous avons un mélange d'anticorps présent dans le surnageant issu de différentes cellules, or le processus de clonage a éliminé les hybridomes non spécifiques de l'haptène. Il est raisonnable de penser que la ou les cellules produisant les anticorps d'intérêt n'ont pas été sélectionnées lors des différentes étapes de clonage, mais seulement celles sécrétrices d'anticorps spécifique de l'haptène H₃'. Pour preuve, la détermination isotypique révélait que le surnageant 3B10 contenait initialement des IgM, des IgG 1, 2a et 2b, alors que l'hybridome cloné n'exprime plus que des IgM.

Graphique 1 : Test de compétition par ELISA des anticorps produits en surnageant avec la cocaïne (Coc) et la cocaéthylène (CE).

[Ac] = 10^{-8} à 10^{-9} M



Jusqu'à présent, l'activité des anticorps vis-à-vis de la coca-éthylène n'avait pas été explorée. Cette expérience a permis de montrer que, pour tous les anticorps, la reconnaissance de la coca-éthylène est meilleure que celle de la cocaïne. Ce résultat avait été également mis en évidence lors de la mise au point des anticorps polyclonaux.

Les deux anticorps possédant la plus forte affinité pour la cocaïne, le 4D8A4A4 et le 5B3C6C3, ont été sélectionnés pour la détermination précise des constantes d'affinité.

Les anticorps produits sont destinés à être injectés dans un organisme humain, par voie intraveineuse. Des études destinées à vérifier la non réactivité des anticorps vis-à-vis les cellules sanguines ont été réalisés par cytométrie de flux en parallèle des tests ci-dessus. Le Tableau 13 présente les résultats obtenus avec les deux anticorps sélectionnés (4D8 et 5B3), mais également avec les deux autres anticorps isolés et caractérisés (3D10 et 5A11).

Tableau 13 : Etude par cytométrie de flux de l'action des anticorps anti-cocaïne sur les cellules sanguines humaines.[Ac] = 1 à 5 10^{-7} M

Anticorps	Moyenne fluorescence				
	Lymphocytes	Monocytes	Polynucléaires	Érythrocytes	Plaquettes
Témoin négatif	8,89	23,41	35,83	3,38	2,11
Témoin Positif	1302,93	1590,02	346,49	58,59	230,73
3D10	9,51	23,29	20,9	3,66	5,23
4D8	8,81	23,28	20,66	3,85	2,59
5A11	41,4	73,45	33,52	3,23	3,21
5B3	9,17	23,13	19,72	4,65	3,89

Les anticorps 4D8 et 5B3 ne réagissent pas avec les cellules sanguines humaines comme le montrent les valeurs de moyennes de fluorescence équivalentes à celles des témoins. Par contre, l'anticorps 5A11 non sélectionné réagit avec deux populations de globules blancs (lymphocytes et monocytes). Ainsi, l'haptène H3' pourrait induire des anticorps nocifs pour un organisme humain. En conséquence, ces tests devront être réalisés pour chaque lot de CocAB produit, d'où l'intérêt des anticorps monoclonaux.

IV.1.3 Production et purification

La purification des anticorps sélectionnés a été mise en place pour permettre d'une part la détermination des constantes d'affinité avec précision, et d'autre part, pour envisager leur exploitation possible.

Les deux techniques présentées précédemment ont été utilisées pour la production des anticorps. Deux raisons peuvent être données pour expliquer l'usage de ces techniques. La production d'anticorps par liquide d'ascite est peu coûteuse, mais cette méthode est considérée comme traumatisante pour l'animal et devrait être interdite dans quelques années. De plus, pour un usage thérapeutique, la production d'anticorps par surnageant de culture est très vivement conseillée.

La production de liquide d'ascite a été obtenue à partir de 5 souris par anticorps, pristanées une semaine précédemment, et recevant $5 \cdot 10^6$ cellules par voie intra-péritonéale.

Les liquides d'ascites provoqués par un même hybridome sont prélevés et mélangés jusqu'à l'euthanasie des animaux, avant d'être purifiés.

Après purification, la quantité d'anticorps purifiés permet d'établir les rendements de production en fonction de la méthode employée. Ces données, synthétisées dans le Tableau 14, mettent en évidence la grande difficulté à produire l'anticorps 4D8, quelle que soit la méthode envisagée : bien que la quantité d'anticorps 4D8 produite en surnageant est supérieure à celle du 5B3, ces valeurs sont très inférieures aux quantités normalement attendues (20 µg/mL minimum, soit 5 fois moins). Seul l'anticorps 5B3 peut être produit en quantité importante grâce à la technique du liquide d'ascite.

Tableau 14 : Rendement de production des anticorps 4D8 et 5B3 en fonction de la méthode utilisée

	Surnageant de culture	Liquide d'ascite
4D8 (ou DAS-m244 4D8A4A4)	4,75 µg / mL	0,65 mg / souris (0,9 mg / mL d'ascite)
5B3 (ou DAS-m244 5B3C6C3)	2,2 µg / mL	8,85 mg / souris (2,68 mg / mL d'ascite)

IV.1.4 Caractérisation des anticorps obtenus

IV.1.4.1 Affinité et réactions croisées

L'utilisation de l'immunothérapie pour la neutralisation *in vivo* de la cocaïne nécessite des anticorps de forte affinité. La détermination des constantes d'affinité a été réalisée par les méthodes décrites précédemment.

L'affinité des anticorps pour la cocaïne a pu être évaluée par tests de compétition ELISA, et par mesure directe en RIA ; en BIAcore, seule l'affinité pour l'haptène H₃' a été mesurée (Tableau 15).

Tableau 15 : Constantes d'affinité (M^{-1}) des anticorps sélectionnés pour la cocaïne mesurées par différentes méthodes

Pour BIAcore, affinité pour l'haptène couplé à la BSA., $[Ac] = 0,2 \cdot 10^{-9}$ à $50 \cdot 10^{-9} M$. Technique RIA, $[Ac] = 1,3 \cdot 10^{-8} M$. Technique ELISA, $[Ac] = 2 \cdot 10^{-8} M$.

	ELISA	RIA	BIAcore
4D8 (ou DAS-m244 4D8A4A4)	$1,4 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^8$	$2,46 \cdot 10^{12}$
5B3 (ou DAS-m244 5B3C6C3)	$1,8 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^7$	$8,99 \cdot 10^{10}$
CocAB (F(ab') ₂ polyclonal)		$3,7 \cdot 10^9$	$9,01 \cdot 10^{10}$

Les résultats présentés soulignent les limites et difficultés de chaque méthode. En effet, pour définir avec précision une constante d'affinité par des tests de compétition par ELISA, un grand nombre de précautions doit être pris, en particulier que la concentration en inhibiteur doit être supérieure à celle en anticorps ($[I]_{tot} > 10[Ac]_{tot}$). Cette condition a été respectée puisque les anticorps ont été utilisés à une concentration de l'ordre de $2 \cdot 10^{-8} M$, et les concentrations en antigènes entre $3,3 \cdot 10^{-3} M$ et $1,6 \cdot 10^{-6} M$. Malgré les précautions prises, l'équilibre de la réaction en phase liquide est perturbé par l'haptène H_3' fixé sur la plaque ELISA, entraînant ainsi une sous estimation de la valeur de l'affinité des anticorps pour la cocaïne. En effet, nous pouvons constater une diminution d'affinité d'un facteur 10^3 entre les résultats par RIA et ceux obtenus par ELISA. A l'opposé, on constate une différence d'affinité obtenue de l'ordre de $10^2 - 10^4$ entre les tests RIA et BIAcore en faveur de ce dernier.

Des écarts aussi importants ne sont généralement pas observés entre les techniques RIA, ELISA et BIAcore. En RIA, la molécule utilisée a été la cocaïne tritiée, alors que pour les autres techniques, les mesures sont réalisées avec l'haptène (couplé à la BSA), ce qui pourrait en partie expliquer l'écart entre les valeurs obtenues. On peut également supposer que ces écarts proviennent d'une saturation trop importante des surfaces solides (chips ou puits ELISA), en partie à cause d'un taux de couplage élevé de l'haptène sur la BSA (supérieur à 20 molécules par protéine). De ce fait, des phénomènes d'avidité pourraient également entraîner des erreurs dans les mesures (quantité d'anticorps fixé par haptène sur-évaluée).

Pour vérifier ces deux dernières hypothèses, des fragments Fab ont été générés à partir d'anticorps 4D8 purifié, et une immobilisation plus faible en BSA- H_3' a été réalisée pour de

nouvelles mesures par la méthode BIAcore. On observe qu'une immobilisation faible de la sensor chips en BSA-H₃' est suffisante pour éliminer les phénomènes d'avidité comme le montrent les résultats présentés dans le Tableau 16. En effet, les valeurs déterminées par BIAcore sont comparables à celle observée en RIA, et dans ce cas la bivalence de l'anticorps ne perturbe pas les mesures. Il est toutefois surprenant que les affinités mesurées dans ces conditions avec l'haptène soient équivalentes à celle de la cocaïne libre.

Lors les tests de compétition ELISA où la concentration en antigène fixé est restée la même (soit 10 µg/mL), l'affinité du fragment Fab est comparable à celle de l'anticorps natif. En général, on constate une légère diminution de l'affinité du fragment pour l'antigène, ce qui confirmerait l'hypothèse d'un excès d'antigène fixé sur la plaque.

Tableau 16 : Détermination de l'affinité de l'anticorps 4D8 sous forme IgG ou Fab à l'aide de la technique ELISA (cocaïne) et du BIAcore à faible immobilisation (BSA-H₃').

Technique BIAcore modèle de Langmuir, [Fab] = 1 10⁻⁸M à 2 10⁻⁶M et [IgG] = 3,3 10⁻⁸M à 1,3 10⁻⁶M.

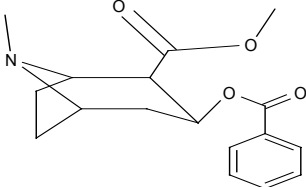
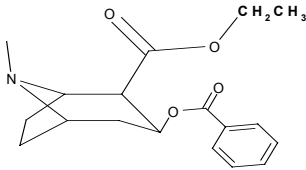
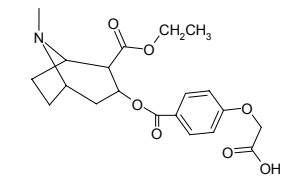
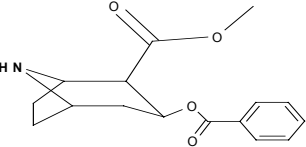
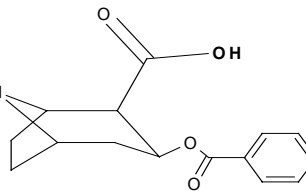
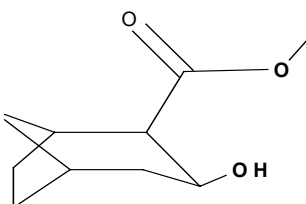
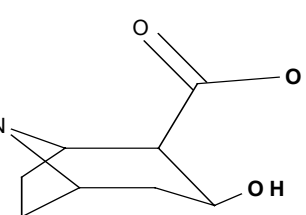
Technique ELISA, [Fab] = 2 10⁻⁹ M et [IgG] = 2,6 10⁻⁹ M et [Cocaïne] = 3 10⁻³ M à 2 10⁻⁷ M

	ELISA	BIAcore
IgG 4D8	5 10 ⁵	9,16 10 ⁷
Fab 4D8	1,1 10 ⁶	1,0 10 ⁸

Les anticorps monoclonaux produits lors de cette fusion ont des affinités équivalentes ou proches de celles initialement attendues (10⁸ M⁻¹), mais en dessous de celle du CocAB (3,7 10⁹ M⁻¹). Les réactivités croisées vis-à-vis des autres métabolites de la cocaïne ont été déterminées à la fois par la technique RIA (Tableau 17) et par compétition en ELISA. Compte tenu de la perturbation des équilibres en phase liquide, les données obtenues en ELISA ne sont pas présentées. Toutefois, aucune réactivité croisée des anticorps avec la benzoylecgonine et la nor-cocaïne n'a été mise en évidence par ELISA (avec une concentration maximale en métabolite de 1 mg/mL final, soit 3 mM environs). Par contre, l'affinité plus élevée pour la coca-éthylène que pour la cocaïne a pu être constatée pour les deux anticorps par cette technique, mais de façon moindre que la RIA. Les compétitions par ELISA peuvent être utilisables pour la discrimination des hybridomes d'intérêt lors de la fusion en évaluant le profil de réactivité des anticorps sécrétés, mais sa mise en place pour la détermination exacte des constantes d'affinité nécessite des mises au point qui n'ont pas été réalisées pour le programme anti-cocaïne.

Tableau 17 : Affinités relatives des anticorps monoclonaux anti-cocaïne exprimées en pourcentage

Les groupements différents de la cocaïne sont indiqués en gras. Données obtenues par technique RIA.

	Structure	4D8 (DAS-m244 4D8A4A4)	5B3 (DAS-m244 5B3C6C3)
Cocaïne (affinité (M^{-1}))		100 ($1,4 \cdot 10^8$)	100 ($3,69 \cdot 10^7$)
Cocaéthylène		1100	380
Haptène H ₃ '		1385	496
Norcocaïne		33	3,22
Benzoylecgonine		0	6,60
EME		0,152	0,150
Ecgonine		0,008	0

Les anticorps obtenus, bien que différents, présentent le même profil de réactivités croisées : forte affinité pour la cocaïne et la coca-éthylène, affinité faible ou très limitée pour les autres composés (benzoylecgonine, ester méthylique d'ecgonine, norcocaïne et ecgonine). Ces caractéristiques découlent de la structure de l'haptène H₃' qui est une molécule de coca-éthylène à laquelle a été ajouté un groupement carbonate. Dans cette structure, la fonction acide est masquée comme dans la cocaïne et la coca-éthylène. Cette fonction est un élément majeur permettant de les différencier de la benzoylecgonine.

Les molécules présentées ci-dessus, dont les masses moléculaires sont de l'ordre de 300 Da, sont suffisamment petites pour interagir totalement avec le paratope de l'anticorps. Les résultats de compétition permettent de déterminer les éléments impliqués dans l'établissement des forces stabilisant le complexe antigène-anticorps. En effet, lorsque le noyau aromatique n'est plus présent, l'affinité chute, suggérant l'existence d'un sous-site à caractère hydrophobe. De plus, l'apparition d'une fonction acide à pH neutre dans la benzoylecgonine entraîne la formation d'une charge négative défavorable à la formation du complexe antigène anticorps. Enfin, la présence d'une amine tertiaire sur la structure de la cocaïne doit contribuer à stabiliser la molécule à l'intérieur du site de reconnaissance, comme le suggère la faible réactivité croisée des anticorps vis-à-vis de la norcocaïne. La présence d'un méthyle induit un encombrement stérique supplémentaire impliqué dans la reconnaissance.

IV.1.4.2 Discussion

Au moins trois anticorps anti-cocaïne non catalytiques sont décrits dans la littérature, les anticorps 3P1A7 et MM0240PA présentés par Paula et al [109], et sans doute le mieux caractérisé, l'anticorps GNC92H2 obtenu par Janda et al [62]. Dans le Tableau 18, les principales caractéristiques des anticorps précédemment cités sont comparées à celles des anticorps obtenus au cours de ce travail. Les anticorps 4D8 et 5B3 ont une affinité pour la cocaïne comprise dans la moyenne de celles rapportées ici, mais supérieure à celle de l'anticorps GNC92H2 (10^7 M^{-1} , affinité déterminée par RIA). Cet aspect est intéressant car l'efficacité de cet anticorps à neutraliser *in vivo* la cocaïne chez le rongeur a été démontrée. En ce qui concerne les réactions croisées avec les autres métabolites de la cocaïne, les anticorps obtenus dans ce travail ont le même profil que le GNC92H2, même si aucune donnée n'a pu être obtenue concernant la réactivité de cet anticorps avec la coca-éthylène. Les deux anticorps décrits par Paula ont des profils un peu particuliers, l'anticorps 3P1A7 a une

affinité faible à la fois pour la benzoylecgonine et la coca-éthylène, et l'anticorps MM0240PA reconnaît de façon importante la coca-éthylène mais également la benzoylecgonine. L'absence d'informations sur la structure des haptènes ne permet pas des comparaisons plus poussées. A notre connaissance, ces deux anticorps ne sont pas destinés à un usage thérapeutique, même si un anticorps dénommé MO240 provenant de la même société que le MM0240PA (American Qualex) a été utilisé avec succès dans des études chez le rat [110].

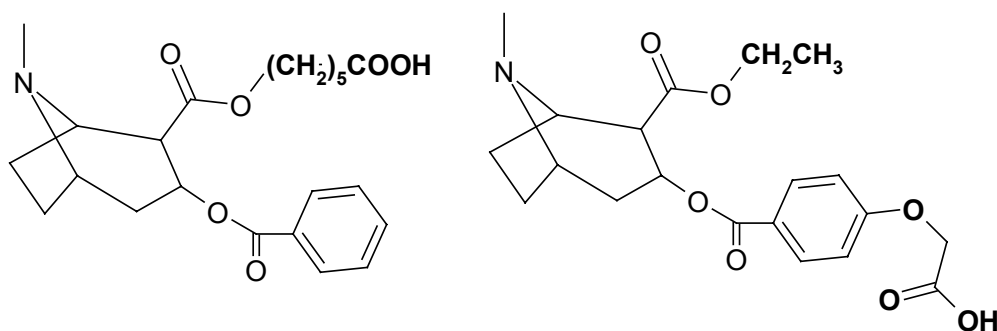
Tableau 18 : Comparaison des caractéristiques des anticorps obtenus avec des anticorps publiés

Mesures réalisées par la méthode RIA. Références articles

Anticorps	3P1A7	MM0240PA	GNC92H2	DASm244- 4D8A4A4	DASm244- 5B3C6C3	CocAB
K_A en M^{-1}	$4,5 \cdot 10^9$	$9,1 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^9$
Réactivité croisée (%)						
Cocaïne	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Coca-éthylène	25,58	224,49		1100,00	380,00	276,00
Benzoylecgonine	1,57	78,57	1,00	0,05	6,60	0,11
Ester Méthylique d'ecgonine	0,09	0,22	0,01	0,20	0,15	0,07
Ecgonine	0,01	0,19	<< 0,01	0,01	0,05	0,01

La résolution cristallographique d'une molécule de cocaïne piégée dans un fragment Fab d'anticorps humanisé GNC92H2 par l'équipe de Larsen [111] peut permettre de mieux comprendre les différences de réactivités croisées entre les anticorps précédemment cités. Par exemple, il existe une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'amine et le groupement méthyle ester, absent de la cocaïne HCl, qui stabilise la molécule à l'intérieur du site. La comparaison des réactivités croisées a mis en évidence le rôle important du groupement benzoate, Larsen a montré que ce groupement est orienté vers l'extérieur du site et limite le taux recouvrement à 95%. La cocaïne est emprisonnée dans une poche électro négative avec une seule liaison hydrogène avec l'anticorps GNC92H2, par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. L'affinité supérieure des anticorps 4B8 et 5B3 pour la cocaïne pourrait être due à des liaisons hydrogènes supplémentaires grâce à une meilleure reconnaissance du groupement benzoate (couplage de l'haptène H_3' par ce groupement), et/ou une orientation différente de la cocaïne à l'intérieur du site de reconnaissance, induite par l'haptène utilisé (Figure 29)

Figure 29 : Structure de l'haptène H3' (à droite) et de l'haptène GNC (haptène de l'anticorps GNC92H2, à gauche)



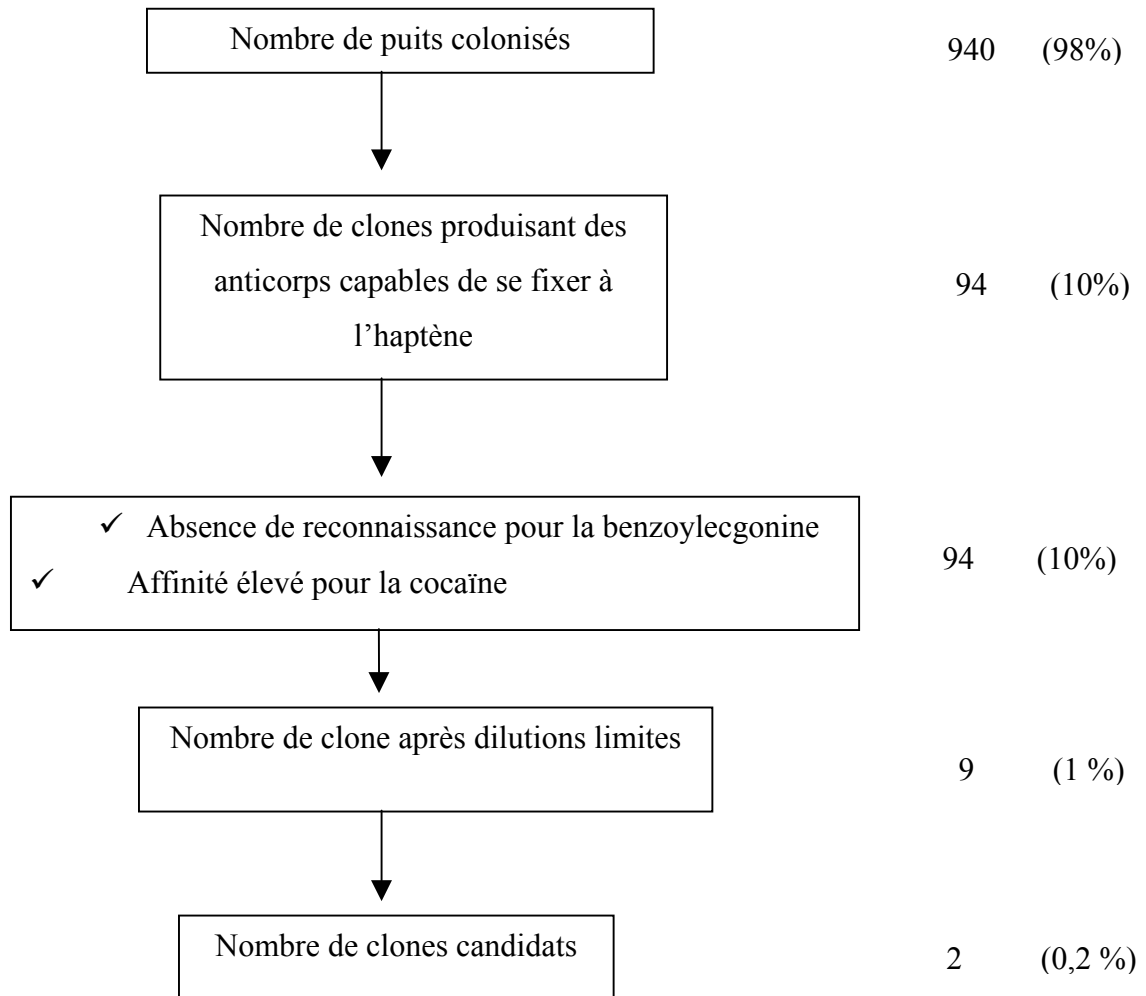
IV.1.5 Conclusion

Suite au développement d'anticorps polyclonaux anti-cocaïne (CocAB), la recherche d'anticorps monoclonaux chez la souris a été exécutée. A partir du même haptène et de la même protéine porteuse, l'immunoconjugué TT-H₃' a été injecté à dix souris qui ont toutes produit des anticorps spécifiques de la cocaïne. Deux souris ont été sélectionnées pour recueillir les splénocytes nécessaires à la fusion cellulaire avec le partenaire de fusion SP₂/0. 98% des puits ensemencés ont été criblés pour isoler les cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques (Figure 30). Sur les 10% de puits positifs, les surnageants de culture de 19 hybridomes ont été analysés par test de compétition pour permettre le clonage des cellules exprimant les anticorps d'intérêt. Ainsi, la technique de dilution limite a été réalisée sur neuf hybridomes pour obtenir des cellules monoclonales. A l'issue de cette étape, la production pilote de quatre anticorps a été réalisée pour définir le ou les anticorps pouvant être testés *in vivo*. La caractérisation de ces anticorps a permis de définir deux candidats, l'anticorps DASm244-4D8A4A4 ou 4D8, et l'anticorps DASm244-5B3C6C3 ou 5B3.

Les deux candidats ont des affinités égales ou proches de 10⁸ M⁻¹ comme souhaité au début du projet. Les réactivités croisées des anticorps sont également conformes à celles attendues, avec une spécificité plus grande pour la coca-éthylène que la cocaïne, et très faible pour le métabolite majoritaire non toxique, la benzoylecgonine. Ces caractéristiques sont compatibles avec l'utilisation de ces anticorps en immunothérapie, avec une préférence pour l'anticorps 4D8. Des expériences préliminaires aux tests d'efficacité *in vivo* ont montré que les deux candidats ne présentaient pas de réactions croisées avec les cellules sanguines. De plus, des anticorps de plus faibles affinités, comme l'anticorps GNC92H2, ont montré leur efficacité à neutraliser la cocaïne injectée chez l'animal ; c'est pourquoi nous pouvons

supposer que les deux anticorps obtenus peuvent inhiber le passage de la cocaïne dans le cerveau par la capture de la drogue dans la circulation sanguine, et créer un gradient permettant son reflux des organes vers le système circulatoire. Néanmoins, ces hypothèses nécessitent d'être vérifiées par des expériences chez l'animal.

Figure 30 : Bilan général de la production d'anticorps anti-cocaïne à l'aide de l'haptène H₃'



IV.2 Anticorps anti-méthamphétamine

La méthamphétamine et ses dérivés sont au second rang mondial des drogues stimulantes les plus consommées. Comme pour la cocaïne, il n'y a pas de médicaments spécifiques pour bloquer les actions de ces drogues. Devant les résultats très encourageants obtenus avec la cocaïne, la société DrugAbuse Sciences a décidé de rechercher des anticorps anti-méthamphétamine pour proposer des antidotes adaptés.

IV.2.1 Travaux antérieurs

IV.2.1.1 Domaine diagnostique

Les premiers anticorps anti-méthamphétamine décrits depuis 20 ans ont été obtenus pour détecter et quantifier la méthamphétamine présente dans le sang et les urines par des méthodes RIA [112]; [113] ou ELISA [114], et récemment par électrophorèse capillaire [115]. Ces techniques utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ont permis d'atteindre, avec de bonnes précisions, des sensibilités de l'ordre de 20 ng/mL, et des limites de détection inférieures à 1ng. Ces techniques sont peu à peu remplacées par la spectrométrie de masse et de la chromatographie en phase gazeuse (CG-MS, LS-MS-MS,...) qui ont l'avantage d'identifier en une seule expérience un nombre plus important de composés chimiques, avec une meilleure précision.

IV.2.1.2 Domaine thérapeutique

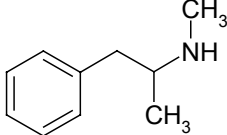
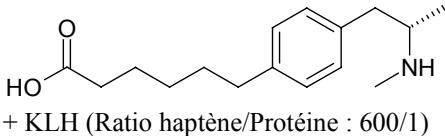
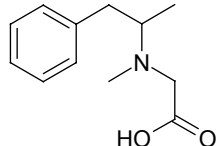
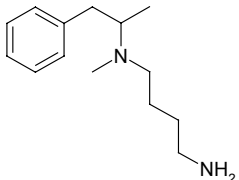
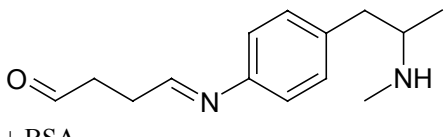
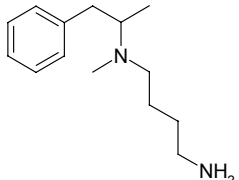
Le développement d'anticorps anti-méthamphétamine pour usage thérapeutique est assez récent puisque le premier article traitant du sujet a été publié en 2001 par KA Byrnes-Blake et al [116]. La stratégie de l'immunisation active semble avoir été remplacée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour moduler les effets de la méthamphétamine, mais le même haptène a été utilisé dans les deux cas.

Le Tableau 19 présente l'ensemble des haptènes utilisés pour la production d'anticorps anti-méthamphétamine pour le domaine diagnostique ou thérapeutique. Deux stratégies principales

existent pour créer un haptène anti-méthamphétamine : modifier la molécule au niveau de l'amine ou modifier le noyau aromatique qui la compose.

Tableau 19 : Haptènes publiés pour la développement d'anticorps anti-méthamphétamine.

Meth : Méthamphétamine

Nom (Application)	Structure	Résultats	Réf
Molécule de méthamphétamine			
(+) METH (Thérapeutique)	 + KLH (Ratio haptène/Protéine : 600/1)	Contre (+)-Meth : Polyclonaux de rat $K_d \sim 10^{-5} M$ Monoclonaux de souris $K_d = 2,5 \cdot 10^{-7} M$ Monoclonaux de souris $K_d = 11 \cdot 10^{-9} M$	[116]; [117]; [118]; [119]
N-Carboxyméthylméthamphétamine (Diagnostic)	 + BSA (Ratio haptène/Protéine : 10-20/1)	Polyclonaux de lapins $IC_{50_{Meth}} = 5,3 \cdot 10^{-7} M$	[113, 120]
MABA (Diagnostic)	+ BSA	Contre Meth : Monoclonaux de souris $K_d = 2 \cdot 10^{-6} M$	[121]
MA-BSA (Diagnostic)	 + BSA	Contre Meth : $K_d = 4 \cdot 10^{-8} M$	[122]
p-amino-Méthamphétamine glutaraldehyde (Diagnostic)	 + BSA	Monoclonaux de souris $IC_{50_{Meth}} = 6,6 \cdot 10^{-8} M$	[123]
MABA (Diagnostic)	 +CM-Chitine (Ratio haptène/protéine : 30/1)	Polyclonaux de lapin	[124]

IV.2.1.3 Objectif

L'ajout d'un groupement méthyle sur l'amine de l'amphétamine permet de créer la méthamphétamine, mais d'autres groupements tels que des groupements hydroxyles ou thiols peuvent être greffés, permettant la formation de composés plus ou moins toxiques dont les structures sont très proches. De plus, ces molécules sont fréquemment synthétisées dans des laboratoires clandestins, et les produits finaux ainsi obtenus sont souvent contaminés par des co-produits de synthèse. Ainsi, les anticorps monoclonaux doivent être capables de fixer le plus grand nombre de ces molécules toxiques, mais comme ils sont destinés à être injectés, ils ne doivent pas agir sur les molécules endogènes, comme les neurotransmetteurs. Les critères d'acceptabilité ont alors été les suivants :

1. L'affinité pour la méthamphétamine doit être au moins égale à 10^8 M^{-1} (Cf. II.2.2);
2. Les réactivités croisées pour les dérivées d'amphétamines, telle que l'ecstasy, doivent être les plus élevées possibles ;
3. Les anticorps produits ne doivent pas reconnaître les métabolites endogènes, tel que l'adrénaline, la dopamine, etc.

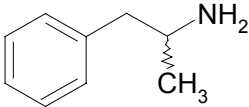
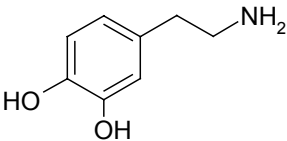
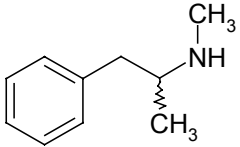
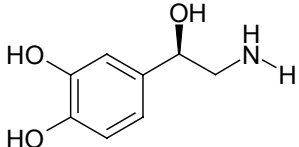
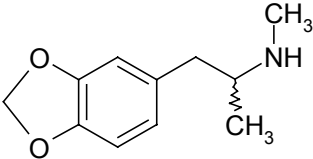
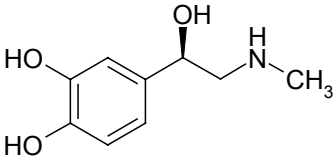
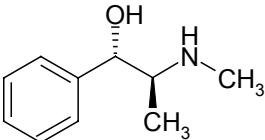
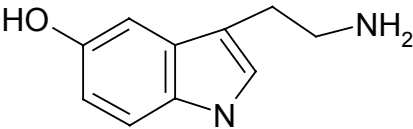
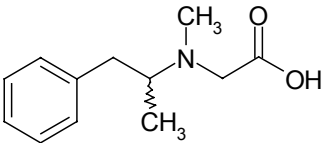
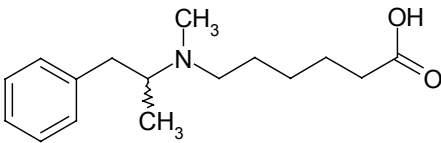
IV.2.2 Anticorps monoclonaux

IV.2.2.1 Stratégie employée

La comparaison des structures des drogues et des molécules endogènes est à l'origine de la synthèse des premiers haptènes (Tableau 20). D'une part, les molécules endogènes possèdent des hydroxyles phénoliques sur le noyau aromatique, et ne comportent pas de substituant entre l'amine et le noyau aromatique, sauf dans certain cas où un groupement hydroxyle est présent sur le carbone en β de la chaîne latérale. Cet hydroxyle peut également être présent sur des molécules de synthèse et n'a pas constitué pour nous un élément discriminateur important. Ainsi, la stratégie adoptée a été la modification de la méthamphétamine par l'intermédiaire de l'amine secondaire. L'haptène Met1 a été obtenu par l'ajout d'un groupement carboxylique composé de deux carbones, et l'haptène Met2 par un groupement carboxylique à 5 atomes de carbone. L'ajout de cette fonction acide est nécessaire pour fixer les haptènes sur les protéines porteuses à l'aide de la réaction des

anhydrides mixtes. La variation du nombre de carbone entre les deux haptènes se justifie par le fait que le bras de liaison influence l'affinité et surtout la spécificité des anticorps générés à l'aide de l'immunogène créé. Ainsi, les anticorps obtenus par l'utilisation d'un immunoconjugué en position N de la méthamphétamine présentent des activités dirigées vers cette région [121].

Tableau 20 : Structures comparées des molécules endogènes et de drogues

Drogues		Molécules endogènes	
Nom	Structure	Nom	Structure
Amphétamine		Dopamine	
Méthamphétamine		Noradrénaline	
Ecstasy		Adrénaline	
Ephédrine		Sérotonine	
Haptènes anti-méthamphétamine :			
Met1		Met2	

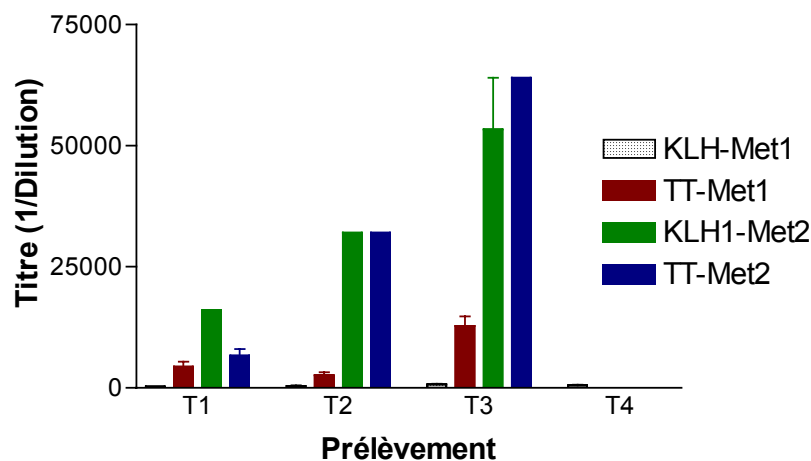
Les haptènes synthétisés ont été couplés à trois protéines porteuses différentes par la réaction chimique aux anhydrides mixtes : la BSA pour les tests ELISA, la KLH et la TT pour les immunisations. La nature de la protéine porteuse influence l'immunisation (présentation de l'haptène), mais ces effets ne sont pas prédictifs ; c'est pourquoi il nous a semblé important d'inclure la KLH comme protéine porteuse, d'autant que cette protéine est la plus utilisée.

IV.2.2.2 Immunisation

Pour l'haptène Met1, 5 souris ont été immunisées avec KLH-Met1 et 5 autres avec TT-Met1, tandis que deux fois trois souris ont été utilisées pour l'haptène Met2 (3 pour KLH-Met2 et 3 pour TT-Met2). Des prélèvements sanguins sont réalisés dès la première injection, trois à quatre jours après l'immunisation des animaux. Les résultats du titrage par technique ELISA des sérums prélevés sont résumés dans la Figure 31.

Figure 31 : Evolution du titre en anticorps dans le sérum de souris Balb/c immunisées en fonction de l'immunogène.

Moyenne des réponses mesurées obtenues par immunogène.



Quel que soit l'immunogène utilisé, des anticorps spécifiques ont été obtenus pour chaque souris, même si les réponses ne sont pas identiques entre les souris, ni entre les immunogènes. La KHL-Met1 n'a pas induit une réponse très élevée même après quatre injections, tandis que les autres ont généré des titres élevés en anticorps dès le premier rappel. Pour chaque fusion, la souris possédant le titre le plus important a été sélectionnée pour extraire les splénocytes nécessaires à la fusion cellulaire après une ultime injection (Boost).

IV.2.2.3 Fusion

La recherche d'anticorps anti-méthamphétamine a été exécutée à partir de plusieurs fusions. Pour l'haptène Met1, trois fusions ont été réalisées, et une unique fusion pour l'haptène Met2, à partir d'une ou de deux souris afin de pouvoir remplir 10 plaques de culture (960 puits au total). Ces fusions, présentées dans le Tableau 21 et détaillées dans les

paragraphes suivants, n'ont pas été réalisées au même moment, ce qui explique que les fusions Met1 sont au nombre de trois. Elles diffèrent principalement par les souris utilisées (la quantité de splénocytes est limitée à 10^9 maxi par souris), mais surtout par la composition du milieu de fusion employé. En effet, le milieu de culture contient un facteur de croissance des hybridomes, appelé feeder, qui est, classiquement au laboratoire de biotechnologie, du surnageant de culture de cellule P388-D1[125]. Ce réactif qui est produit sur place, sans dosage des facteurs de croissance, peut être différent d'un lot à l'autre, et peut être remplacé par la co-culture des hybridomes en présence de macrophages ou de thymocytes,

Tableau 21 : Fusions anti-méthamphétamine à partir des haptènes Met1 et Met2

N° de fusion	Immunogène	Nbre de puits ensemencés	Nbre de puits testés	Nbre de puits positifs	Nbre de clones mis en DL	Facteur de croissance
243	TT-Met1	960	855	30	8	P388D1
249	TT-Met1	960	940	510	12	P388D1
258	TT-Met1	960	303	103	17	Macrophages
Total		2880	2098	643	37	
246	KLH-Met2	480	627	22	4	P388D1
	TT-Met2	480		66	6	

A Fusion Met1 n°243

La fusion Met1 n°243 est la première réalisée pour la recherche d'anticorps anti-méthamphétamine avec utilisation de P388 comme feeder. Les immunisations à l'aide de l'immunogène KLH-Met1 n'ayant pas donné des résultats satisfaisants, seule la souris possédant le meilleur titre avec l'injection de TT-Met1 a été utilisée. Après fusion avec des myélomes SP₂/o, le milieu est réparti dans 10 plaques de culture 96 puits (n° 1 à 10).

La pousse cellulaire obtenue a été très bonne (89%), mais le nombre de clones positifs relativement faible (4%). Sur les 30 hybridomes positifs, huit ont été sélectionnés pour être clonés.

Le choix des clones mis en DL a reposé sur la détermination des isotypes : les anticorps ne possédant qu'un seul isotype ont été privilégiés, avec une préférence pour les immunoglobulines exclusivement IgG1 (13,3% des clones positifs et 50% de ceux mis en DL). Deux cellules sécrétrices d'anticorps de type IgG2b exclusif (soit 16% hybridomes

positifs) ont également été mises en dilution limite en raison d'une réponse élevée lors des tests ELISA ($DO > 2,5$). Deux autres hybridomes dont l'isotype n'a pas pu être déterminé ou n'ayant pas un isotype IgG1 pur ont également été choisis. Le clivage d'anticorps par protéolyse est possible avec tous les isotypes, mais les immunoglobulines de type IgG1 sont les plus adaptées. En effet, il est probable que les anticorps isolés seront administrés sous forme de fragments Fab ou $F(ab)_2$ dans le cas d'un usage thérapeutique.

Le clonage des huit hybridomes a conduit à la production de 12 clones cellulaires pour lesquels 50 mL de surnageant de culture a été produit pour permettre leurs caractérisations.

B Fusion Met1 n°249 et 258

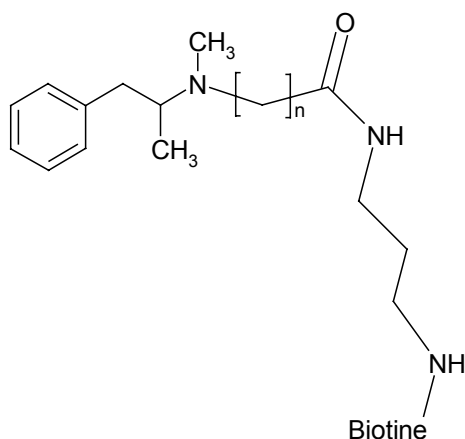
Les fusions Met1 n°249 et 258 ont été effectuées après l'obtention des premiers résultats des fusions Met1 et Met2. Seuls des splénocytes provenant de souris immunisées avec TT-Met1 ont été fusionnés, et des tests de compétition par ELISA ont permis de sélectionner les hybridomes devant être mis en dilution limite.

Pour la fusion 249, les splénocytes ont été extraits sur deux souris hyper-immunisées, et du surnageant de P388 a servi de feeder. Le taux de pousse cellulaire obtenue a été de 97,9%, avec un 54% de puits positifs. Seuls les puits possédant une réponse très forte en ELISA (supérieure à 1) ont été amplifiés soit 9,6% (49 puits).

Avec les surnageants d'amplification, des tests de compétition ont été réalisés pour identifier les hybridomes les plus intéressants. Les clones ont été sélectionnés par rapport à la réactivité croisée des surnageants vis-à-vis de la méthamphétamine, de l'ecstasy et d'un métabolite de l'ecstasy, le HMMA, concentrés à 100 μ g/mL. Une affinité élevée pour la méthamphétamine et / ou l'ecstasy ont été les critères principaux de sélection. De plus, seuls les hybridomes présentant une réactivité croisée faible ou nulle pour le métabolite HMMA ont été mis en dilution limite.

A l'issue de ces tests, 12 hybridomes ont été mis en dilution limite. Aucun clone stable n'a pu être mis en évidence, sans doute à cause d'un changement de lot de P388 au cours de la première dilution limite.

Pour ne pas avoir de problèmes de stabilité, la fusion 258 a été réalisée en présence de macrophage à partir de splénocytes provenant de deux souris différentes. Le criblage primaire a été réalisé par ELISA avec la BSA-Met1, comme dans les autres fusions, mais également avec une molécule de méthamphétamine biotinylée (Figure 32).

Figure 32 : Haptène biotine 1

Cette molécule a été développée dans le but de favoriser la fixation des anticorps grâce à la présentation d'une molécule « libre ». En effet, la BSA doit générer des encombrements stériques limitant l'accessibilité à l'haptène.

Des tests de compétition avec de la méthamphétamine à 100µg/mL et les surnageants d'amplification ont permis de sélectionner les hybridomes pour les étapes de clonages. Sur les 960 puitsensemencés, 68% ont poussé et 45% se sont révélés positifs ; 5%, soit dix sept hybridomes ont été mis en dilution limite. Les étapes de clonage ont aboutit à l'obtention de 6 clones différents.

C Fusion Met2

Les souris immunisées avec la KLH-Met2 ou la TT-Met2 ont très bien répondu, c'est pour-quoi la souris possédant le plus fort titre pour chaque immunogène a été sélectionnée. Les cellules fusionnées provenant de la souris KLH-Met2 ont été réparties dans les plaques 1 à 6, et celles issues de la souris TT-Met2 dans les plaques 7 à 10. Sur les 960 puitsensemencés, 627 ont été testés et 88 se sont révélés positifs, avec une majorité issue de la souris TT-Met2 (66 pour TT-Met2 et 22 pour KLH-Met2).

Des tests de compétition à l'aide de l'haptène libre (Met2) et d'ecstasy, réalisés sur les surnageants d'amplification, ont permis de sélectionner 10 hybridomes devant être clonés. A l'issue des étapes de clonages, six hybridomes différents ont été obtenus, dont la moitié issue de souris immunisées avec TT-Met2. Une production pilote en surnageant a été réalisée pour permettre la caractérisation des anticorps.

D Bilan des fusions Met1 et Met2

Concernant les immunogènes, la protéine porteuse TT semble plus favorable à l'obtention d'anticorps anti-haptène que la KLH. Cette même constatation a déjà été observée lors de la sélection de l'haptène anti-cocaïne H₃', mais à notre connaissance, aucune étude comparative n'a été réalisée à ce jour avec ces deux protéines. Si cette observation venait à être confirmée, on pourrait supposer que cette « supériorité » provient du caractère de super antigène de la TT qui n'a pas été mis en évidence chez la KLH. En effet, les super-antigènes sont des molécules susceptibles de se lier à des molécules de classe II du CMH, qui peuvent activer des lymphocytes T, indépendamment du peptide reconnu par leur TCR en association avec la molécule du CMH de la cellule présentatrice.

Malgré des pousses cellulaires importantes, le nombre de clones obtenus reste limité, la principale limitation provenant de la difficulté à stabiliser les hybridomes après criblage primaire. Néanmoins, 18 clones différents, dont l'isotype de chacun est donné dans le Tableau 22, ont été obtenus et produits en surnageant pour être caractérisés.

Tableau 22 : Isotype des anticorps anti-méthamphétamine obtenus avec les haptènes Met1 et Met2.

Indét : Indéterminé

Haptène/ Fusion	Anticorps	Isotype	Haptène/ Fusion	Anticorps	Isotype	Haptène/ Fusion	Anticorps	Isotype
Met1 / 243	3A10A6A2 3A10E5E7	IgG1	Met2 / 246	6G5G3H1	IgG2b	Met1 / 258	6C12F2A6	IgG2a
Met1 / 243	5B3B2B7 5B8G1H3	IgG2b	Met2 / 246	10H2E1E7	IgG1	Met1 / 258	1G8E3E4	IgG1
Met1 / 243	6B1F7H4 6B1H8H10	Indét	Met2 / 246	6G7H6F4	IgG2b	Met1 / 258	10F2E6G9	IgG2B
Met1 / 243	6H5D1C4 6H5E1G12	IgG2b	Met2 / 246	8F6G5E3	IgG1	Met1 / 258	4B12F10H4	IgG2b
Met1 / 243	7D4F11E1 7D4G11C11	IgG1	Met2 / 246	9D10F11C9	IgG1	Met1 / 258	6C12F2F7	IgG2a
Met1 / 243	10H10E1H4 10H10E2B12	IgG1	Met2 / 246	4B8C7A8	IgG1	Met1 / 258	5H9	IgG2b

On peut constater une forte proportion d'anticorps issus de la fusion F258 de type non-IgG1. Cela est sans doute dû au nombre élevé d'injections utilisées (supérieur à 5) propice au changement de classe (IgM -> IgG1 -> IgG2a -> IgG2b -> IgG3).

IV.2.3 Caractérisation des anticorps obtenus

IV.2.3.1 Réactions croisées avec différentes molécules

Pour déterminer quels sont les anticorps les plus intéressants, nous avons réalisé des tests de compétitions par ELISA avec différentes molécules (Tableau 23). Pour chaque test, la molécule fixée sur les plaques ELISA a été l'haptène couplé à la BSA correspondant à l'immunogène ayant permis l'obtention de l'anticorps testé.

Tableau 23 : Molécules utilisées pour la caractérisation des anticorps anti-méthamphétamine

Code	Molécule	Formule	Code	Molécule	Formule
A	Méthoxy méthamphétamine		I	Nor épinéphrine	
B	Méthoxy amphetamine		J	Dopamine	
C	Ephédrine		K	Epinéphrine	
D	Méthamphétamine		L	Hydroxyméthoxy- phénytylamine	
E	Ecstasy		M	Méthyle pseudo éphédrine	
F	Méthylthio amphetamine		N	Amphétamine	
G	Ethyl- amphetamine		O	HMMA	
H	Nor-Ephédrine		P	S-(+)- Méthamphétamine	

Pour chaque molécule, nous avons déterminé la concentration permettant d'inhiber à 50% la fixation de l'anticorps sur la plaque ELISA (IC₅₀). Pour pouvoir comparer les anticorps entre eux, nous avons défini une réactivité relative, exprimée en pourcentage, en divisant l'IC₅₀ de chaque métabolite par l'IC₅₀ de la méthamphétamine. Les résultats obtenus sont présentés par fusion pour plus de clarté. Toutes les molécules n'ont pas été testées avec

l'ensemble des anticorps, soit parce que le produit n'était pas disponible, soit parce que les affinités mesurées en ELISA ont révélé le faible intérêt de l'anticorps.

A Anticorps issus de la fusion 243 (Met1)

Les résultats obtenus avec les premiers anticorps anti-méthamphétamine sont présentés dans le tableau ci après.

Tableau 24 : Réactions croisées des anticorps issus de la fusion 243

La réactivité croisée pour la méthamphétamine racémique (D) est indiquée en gras. Celle des métabolites endogènes en italique sur fond grisé.

Molécule	3A10A6A2	3A10E5E7	6H5D1C4	6H5E1G12	5B8G1H3	5B8C2C7	10H10E14	10H10E2B12	6B1F7F4	6B1H8H10
Met1	44	20	148	61	16	8	4	40	40	40
Met2	105	105	1015	431	295	738	148	1477	1477	1477
A	3	4	11	3	225	113	11	113	1126	1126
B	34	36	23		21	11	5	53	53	53
C	14	14	38	28	69	69	3	35	69	69
D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E	83	66	11	9	10	5	5	48	48	48
F	110	32	224	136	23	11	6	57	113	57
G	95	30	211	80	21	11	11	107	107	53
H	2	16	1	0						
I	2	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>						
J	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>						
K	3	2	<i>0</i>	<i>0</i>						
L	0	2	97	34						
M	1	0	1	0						
N	181	986	55	39						
O	50	0	2	2						
P	14	16	123	96						

Les profils de réactivité des anticorps sont conformes aux critères que nous nous étions fixés : réactivité importante sur les drogues mais faible vis-à-vis des métabolites I, J, K (catécholamines endogènes) , et M, O, H.

Tous les anticorps obtenus, excepté l'anticorps 6H5D1C4, reconnaissent mieux la méthamphétamine que l'haptène Met1 seul, alors que l'haptène Met2 est au moins aussi bien reconnu, voir mieux que cette drogue. Cela s'explique probablement par la présence d'un

carboxylate à proximité de l'amine dans Met1 qui, à cause de la présence de la charge négative diminue l'affinité. Dans Met2, cette charge est plus éloignée, et l'augmentation de l'affinité pour certains anticorps (6H5D1C5, 5B8C2C7, 10H10E2B12, 6B1...) s'explique probablement par la participation du bras espaceur à l'affinité. Pour éviter cette interaction de charge, il aurait été préférable d'utiliser des esters de Met1 et de Met2.

Les substitutions au niveau du noyau aromatique (A, B, E, F, K, L) entraînent une diminution importante de l'affinité pour la plupart des anticorps comme pouvait le suggérer la structure des haptènes ; cependant quelques anticorps (6B1F7F4, 6B1H8H10, 10H10E2B12) possèdent une certaine tolérance. Quelques résultats sont peu cohérents, comme l'illustre les affinités différentes pour B et F pour les anticorps 3A10A6A2 ou 6H5D1C4 (qui ne peuvent pas totalement être expliquées par des propriétés électroniques différentes du soufre et de l'oxygène n'expliquent pas), ce qui montre les limites de cette approche.

De plus, ces résultats suggèrent qu'en utilisant un haptène racémique, nous générons des anticorps doués de stéréosélectivité vis-à-vis de la méthamphétamine. En effet, les anticorps 3A10 reconnaissent peu l'isomère S alors que le mélange racémique est bien reconnu, ce qui suggère une préférence pour l'isomère R. Sachant que les deux énantiomères n'ont pas la même toxicité, cet aspect aurait pu être pris en compte pour la synthèse des molécules.

Sur la base de ces tests, les anticorps les plus intéressants sont le 10H10E2B12, les 6B1 et l'anticorps 5B8G12 en raison des réactivités croisées élevées pour une majorité de drogues. Cependant, cette présentation des résultats masque la faible reconnaissance de la méthamphétamine pour ces anticorps (IC_{50} de l'ordre de $5 \cdot 10^{-2}$ M à $5 \cdot 10^{-3}$ M suivant les anticorps). Ceci explique pourquoi les métabolites endogènes (I, J, K) n'ont pas été testés. Par contre, les anticorps 3A10 et 6H5 ont des IC_{50} pour la méthamphétamine inférieure à 10^{-4} M et sont donc les candidats les plus intéressants de cette fusion.

B Anticorps issus de la fusion 258 (Met1)

Concernant les réactivités croisées, les anticorps obtenus lors de la fusion 258 présentent les mêmes profils que ceux déjà obtenus (Tableau 25). Cependant, deux anticorps (6C12) reconnaissent de façon importante des métabolites endogènes comme la noradrénaline et l'adrénaline (K et I). Pour ces anticorps, les groupements hydroxyles présents

sur le noyau aromatique et la chaîne carbonée doivent établir des liaisons hydrogènes avec les acides aminés présents dans le site de reconnaissance.

Tableau 25 : Réactions croisées des anticorps issus de la fusion 258

La réactivité croisée pour la méthamphétamine racémique (D) est indiquée en gras. Celle des métabolites endogènes en italique sur fond grisé.

Molécule	10F2E6G9	1G8E4E3	4B12F10H4	5H9F10B12	6C12F2A6	6C12F2F7
D	100	100	100	100	100	100
E	0	28	0	0	0	0
F	116	13	118	112	438	80
G	114	109	111	206	80	113
H	0	0	0	0	0	0
I	<i>44</i>	<i>9</i>	<i>13</i>	<i>12</i>	<i>269</i>	<i>1287</i>
J	0	0	0	0	0	0
K	8	7	13	76	25	249
L	0	0	0	0	0	0
M	5	91	7	7	4	10
N	42	12	75	166	37	59
O	0	1	0	37	0	0
P	85	36	90	128	91	147

Sur la base de ces tests, aucun anticorps de spécificité plus intéressant que ceux obtenus avec la fusion 243 n'a pu être mis en évidence.

C Anticorps issus de la fusion 246 (Met2)

Les réactivités croisées des anticorps anti-Met2 (Tableau 26) permettent de distinguer deux types d'anticorps, des anticorps spécifiques à la méthamphétamine comme le 6G5 ou le 9D10, et des anticorps plus « polyvalents » comme le 8F6. Néanmoins, l'haptène Met2 est le composé le mieux reconnu, tandis que la Met1 n'est presque pas reconnue pour la majorité des anticorps. Les sites de reconnaissance semblent être sensibles à la présence de groupement alkyl sur l'amine, en particulier l'anticorps 8F6. Cet anticorps, du fait de sa faible spécificité, est probablement un anti bras-espaceur. Enfin, la présence de substituant sur le

noyau aromatique ne semble plus constituer un élément majeur dans la reconnaissance des drogues. A noter que contrairement anticorps anti-met1, il n'y a pas d'incohérence entre les affinités relatives obtenus avec les composés B et F (lorsque la valeur de B est faible, celle de F également et inversement).

Tableau 26 : Réactions croisées des anticorps anti-Met2

La réactivité croisée pour la méthamphétamine racémique (D) est indiquée en gras. Celle des métabolites endogènes en italique sur fond grisé.

	4B8C7A8	6G5G3H1	6G7H6F4	8F6G5E3	9D10F11C9	10H2E1E7
Met1	4	16	10	81	7	5
Met2	1846	3600	4103	16411	2790	3692
A	13	26	26	225	44	327
B	2	21	13	107	9	4
C	1	13	9	69	6	3
D	100	100	100	100	100	100
E	15	107	12	96	9	15
F	11		14	113	1	8
G	25	21	13	533	74	28
H	2	15	10	79	0	3
I	3	28	<i>18</i>	<i>141</i>	9	6
J	2	<i>16</i>	<i>10</i>	<i>79</i>	0	3
K	3	27	<i>17</i>	<i>139</i>	0	6
L	2	17	11	85	0	3
M	1	15	9	75	52	3
N	2	42	13	107	0	4

IV.2.3.2 Réactivités avec les cellules sanguines humaines

Une recherche d'activité croisée avec les cellules sanguines a été réalisée pour l'ensemble des anticorps présentés ci-dessus. Aucune activité dirigée contre ces cellules n'a pu être mise en évidence, ce qui permet d'envisager les essais *in vivo* pour les anticorps sélectionnés.

IV.2.3.3 Détermination des constantes d'affinité

Les techniques RIA et BIAcore ont été utilisées en complément des tests de compétition pour déterminer les constantes d'affinités. Les anticorps présentant des affinités peu élevées en ELISA n'ont pas été testés en RIA ou en BIAcore (comme les anticorps 10H10 ou 6B1 de la fusion 243). Les résultats sont présentés dans le Tableau 27. Les données RIA ont été obtenues en utilisant de la méthamphétamine tritiée (^3H -méthamphétamine), pour les analyses par BIAcore, la BSA-Met1 a été fixée sur une chips CM5, ou une chips SA a été employée pour l'utilisation de l'haptène biotine. Les tests de compétition en ELISA ont été réalisés comme indiqué précédemment.

Tableau 27 : Constantes d'affinités des anticorps anti-méthamphétamine (en M^{-1})

\$: Mesure réalisée avec une immobilisation faible. Condition BIAcore : $[\text{Ac}] = 0,1 \text{ nM}$ à 20 nM ; Condition RIA : $[\text{Ac}] = 10$ à 60 nM ; Condition ELISA : $[\text{Ac}] = 0,1$ à 4 nM .

Haptène	Anticorps	ELISA	RIA	BIAcore	
				BSA-Met1	Haptène Biotine ^{\$}
Met1	3A10A6A2	$1,3 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^7$
	3A10E5E7	$1,6 \cdot 10^5$			
	6H5D1C4	$4,1 \cdot 10^4$	$8,0 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$
	1G8E4E3	$1,6 \cdot 10^4$		$8,1 \cdot 10^9$	$1,98 \cdot 10^6$
	4B12F2F10	$2,9 \cdot 10^3$		$3,6 \cdot 10^{8\$}$	$5,33 \cdot 10^8$
	5H9F10B12	$2,4 \cdot 10^3$		$9,0 \cdot 10^8$	
	6C12F2A6	$3,2 \cdot 10^3$		$4,2 \cdot 10^9$	$5,5 \cdot 10^8$
	6C12F2F7	$2,0 \cdot 10^3$		$4,4 \cdot 10^9$	$4,95 \cdot 10^8$
	10F2	$3,2 \cdot 10^3$		$2,0 \cdot 10^9$	
Met2	4B8C7	$1,4 \cdot 10^5$			
	6G5	$1,5 \cdot 10^4$			
	6G7	$2,3 \cdot 10^4$			
	8F6	$2,9 \cdot 10^3$			
	9D10	$8,1 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^8$	
	10H2	$7,2 \cdot 10^4$			

Les valeurs mesurées sont différentes suivant la technique utilisée, comme nous l'avons déjà souligné lors de la caractérisation des anticorps anti-cocaïne. Les conditions

utilisées ont été identiques, et ces résultats sont cohérents avec les remarques déjà formulées. L'affinité pour l'haptène met1 (analyses BIAcore) est sensiblement supérieure à celle de la méthamphétamine (donnée RIA), ce qui ne peut pas provenir de la présence du bras espaceur : les tests d'inhibition ont montré une affinité supérieure pour la méthamphétamine pour tous les anticorps. Une sensibilisation trop importante de la sensor chip pourrait être à l'origine de ces différences.

On peut constater que l'affinité de l'anticorps 3A10A6A2 est plus élevée que celle de l'anticorps 6H5D1C4 par la technique ELISA (environ 30%), alors qu'en RIA et en BIAcore ce rapport est inversé. Lors de l'utilisation de l'haptène biotine comme ligand en analyse BIAcore, l'affinité de l'anticorps 6H5D1C4 a été trouvée supérieure à celle de l'anticorps 3A10A6A2 (respectivement 10^8 M^{-1} et $1,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Les différences observées entre les résultats ELISA et les autres pourraient provenir de l'affinité plus élevée de l'anticorps 6H5 pour l'haptène Met1 que l'anticorps 3A10 : l'équilibre en phase liquide lors des tests de compétition ELISA serait déplacé de façon plus importante pour l'anticorps 6H5. Ce phénomène ne serait pas observé en BIAcore soit parce que l'immobilisation est suffisamment faible et/ou le débit d'injection suffisamment élevé (40 $\mu\text{L}/\text{min}$, soit 0,13 sec de temps de contact) pour limiter les effets de transport de masse et déplacer l'équilibre phase liquide / phase solide.

Pour conclure, les anticorps caractérisés semblent posséder des affinités élevées pour la méthamphétamine (de l'ordre de 10^7 à 10^8 M^{-1}).

IV.2.3.4 Caractérisations complémentaires

Les anticorps issus de la fusion 243 ont été les premiers à avoir été caractérisés, ce qui a permis de sélectionner des candidats potentiels pour des essais d'efficacité chez l'animal. Ce choix a reposé sur les profils de réactivité, mais principalement sur la valeur de l'affinité des anticorps pour la méthamphétamine. Ainsi, l'anticorps 6H5D1C4 a été le candidat privilégié, mais l'anticorps 3A10A6A2 a également été testé en raison de son profil de réactivité. Le tableau suivant résume les principales caractéristiques de ces deux anticorps.

Tableau 28 : Principales caractéristiques des deux anticorps sélectionnés par DAS

	DAS-m234 6H5D1C4	DASm-243 3A10A6A2
Affinité pour la méthamphétamine (données RIA en M^{-1})	$8 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^6$
Réactivité croisée avec la méthamphétamine racémique (%)	100	100
Réactivité croisée avec la S-(+)- méthamphétamine (%)	123	14
Réactivité croisée avec l'ecstasy (%)	11	83

Des productions en surnageants de culture et en liquide d'ascite ont été réalisées pour déterminer les rendements de production. Les résultats présentés dans le tableau ci-après permettent d'envisager une exploitation industrielle de ces clones.

Tableau 29 : Rendement de production en fonction de la méthode utilisée

	Surnageant de culture	Liquide d'ascite
3A10 (ou DAS-m243 3A10A6A2)	35 μg / mL	64 mg / souris (6,4 mg / mL d'ascite)
6H5 (ou DAS-m243 6H5D1C4)	17 μg / mL	21 mg / souris (2 mg / mL d'ascite)

A partir des anticorps purifiés, nous avons réalisé le clivage protéolytique en fragment Fab de l'anticorps 6H5. Des expériences en RIA et en BIAcore, pour évaluer les conséquences du clivage au niveau de la reconnaissance de l'antigène ont été réalisées. L'ensemble des résultats est présenté ci-après.

Tableau 30 : Comparaison des affinités mesurées en RIA ou en BIAcore (M^{-1}) pour l'anticorps 6H5 sous forme d'IgG ou de Fab

Condition Biacore : Sensor-chips fortement immobilisée, [Fab]= 5nM à 200nM et [IgG]= 0,6nM à 33,3 nM ; Chi2 Fab = 24 et Chi2 IgG = 3,63. Condition RIA : [IgG] = 66 nM ; [Fab] = 200 nM..

	Fab	IgG
Méthamphétamine	$1,7 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^7$
Ecstasy	$1 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^6$
BIAcore (BSA-Met1)	$1,4 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^9$

Les affinités des Fab sont inférieures à celles des IgG pour la méthamphétamine et l'haptène Met1, ce qui pourrait être lié au changement de valence entre l'IgG et le Fab. Les affinités mesurées sont toujours plus élevées par la méthode BIAcore que par la méthode RIA, ce qui pourrait traduire un phénomène d'avidité dans les mesures par BIAcore avec l'IgG et/ou l'influence de la structure de l'haptène (BIAcore). Cette hypothèse est renforcée par les résultats de l'affinité pour l'ecstasy : les fragments Fab reconnaissent aussi bien l'ecstasy que l'IgG.

Pour tenter de mieux comprendre ce phénomène, des tests complémentaires ont été réalisés en RIA. La présentation des données sous forme de réactivités croisées déforme l'analyse des résultats : la reconnaissance pour des composés autres que la méthamphétamine n'est pas toujours modifiée, comme le montrent les résultats obtenus avec le composé G. Il semblerait que plus les modifications de structure sont proches de l'amine, plus l'IC50 est grand. Tout ce passe comme si le clivage du groupement Fc avait augmenté les contraintes pour la reconnaissance de la méthamphétamine au voisinage de l'atome d'azote.

Figure 33 : Ic50 (μM) déterminés pour différents métabolites et réactivités croisées (en %) vis-à-vis de la méthamphétamine pour l'anticorps 6H5D1C4 suivant sa forme.

Condition RIA : [IgG] = 66 nM ; [Fab] = 200 nM.

Composé	Fab		IgG	
	IC 50	%	IC 50	%
E	0,094	643	0,131	24
G	0,030	2782	0,035	89
H	9,506	6	10,7	0,29
I	ND	ND	ND	ND
J	1262	0,05	835	0
K	2300	0,03	1574	0
N	0,022	1987	0,632	5

Des études complémentaires (étude structurale telle que la cristallographie de complexe Fab-méthamphétamine et Fab-ecstasy) doivent être envisagées pour confirmer cette hypothèse.

IV.2.3.5 Conclusion

La méthamphétamine est une molécule neurotoxique dont il existe de nombreux dérivés tout aussi dangereux pour l'organisme. La conception des haptènes Met1 et Met2 a permis l'immunisation, puis l'isolement d'anticorps anti-méthamphétamine (Figure 34). Les profils de réactivités croisées sont compatibles avec les attentes initialement énoncées, mais les affinités mesurées sont en dessous des critères d'acceptabilité. (une affinité supérieure à 10^8 M^{-1} souhaitée, environ $8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ obtenue par technique RIA). Même si d'après Chappey [126] il est difficile d'obtenir des anticorps d'affinités très supérieures compte-tenu de la masse moléculaire faible de la méthamphétamine (150 g/mol), la conception de nouveaux haptènes pourrait permettre d'améliorer ce facteur. Une raison supplémentaire provient du fait que les molécules de type ecstasy ne sont pas très bien reconnues, ce qui peut être un problème pour le développement de produits commerciaux. Cependant, la conception des haptènes et les anticorps obtenus ont permis le dépôt d'un brevet enregistré à l'office européen des brevets sous le numéro 02290169.8- [127].

Enfin, l'immunisation à partir d'haptènes racémiques produit des anticorps dirigés contre les deux formes. Puisque la forme S est plus toxique, il est nécessaire de prévoir la conception d'antigènes également stéréospécifiques dans l'espoir d'induire des anticorps de haute affinité spécifique de la S(+)-méthamphétamine, et de façon plus générale des composés de forme S.

Figure 34 : Bilan général de la production d'anticorps anti-méthamphétamine à l'aide des haptènes Met1 et Met2

	Haptène Met1	Haptène Met2
Nombre de puits colonisés	2098 (73 %)	627 (65 %)
Nombre de clones produisant des anticorps capables de se fixer à l'haptène	643 (30 %)	88 (14%)
✓ Reconnaissance de la méthamphétamine	37 (1,8 %)	10 (1 %)
Nombre de clone après dilutions limites	18 (0,8%)	6
Nombre de clones candidats	2	0

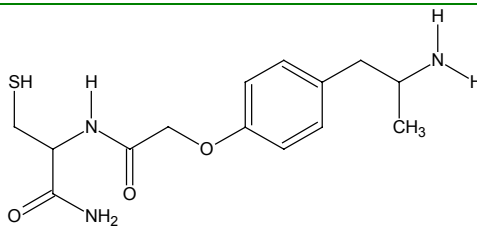
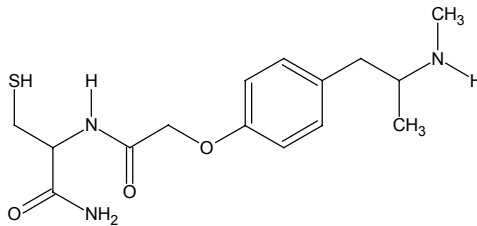
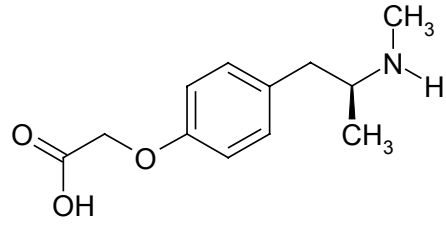
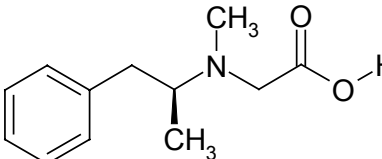
IV.3 Obtention de nouveaux anticorps anti-méthamphétamine à l'aide d'haptènes optimisés

IV.3.1 Présentation des haptènes

Les haptènes Met1 et Met2 ont permis l'obtention d'anticorps anti-méthamphétamine, mais les molécules de type ecstasy ne sont pas bien reconnues. Pour élargir le spectre de reconnaissance, de nouveaux haptènes (Met3, Met4 et Met5) ont été synthétisés avec des modifications du noyau aromatique de la méthamphétamine (Tableau 31).

Tableau 31 : Nouveaux haptènes pour produire des anticorps anti-méthamphétamine

SMCC : succinyl ; AM : Anhydride Mixte

Haptène	Structure	Méthode de couplage	Protéine porteuse
Met3		SMCC	KLH
Met4		SMCC	KLH
Met5		AM	TT
Met1'		AM	TT

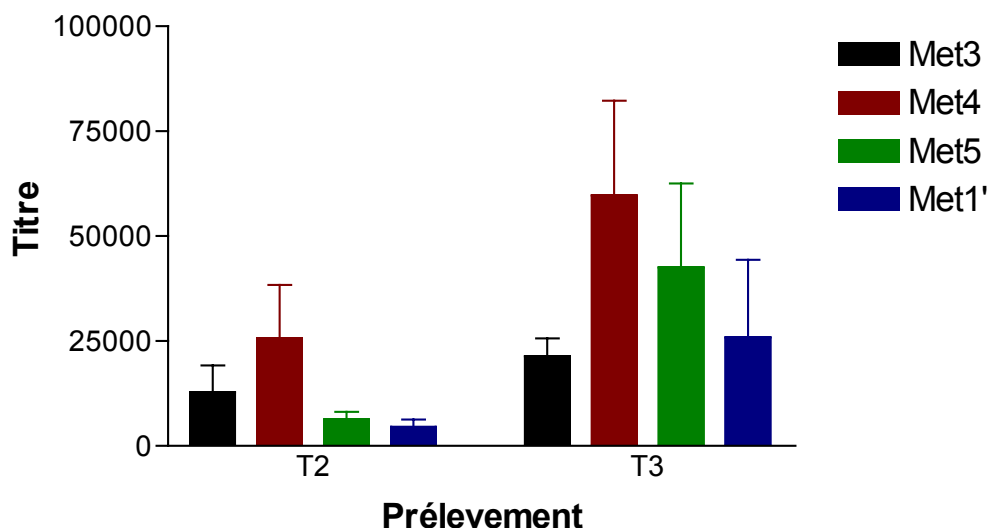
De plus, nous avons pu constater que l'immunisation de souris à l'aide d'un haptène racémique permettait d'obtenir des anticorps doués de stéréosélectivité. L'haptène Met1' a été synthétisé à partir de la S-(+)-méthamphétamine, le composé le plus toxique des deux stéréoisomères, dans le but de vérifier si, à partir de l'immunisation avec un seul énantiomère, les anticorps produits étaient préférentiellement dirigés contre cette forme.

IV.3.1.1 Immunisation

Trois souris ont été immunisées par immunogène selon la méthode décrite dans le chapitre matériel et méthodes. Pour les haptènes Met5 et Met1', le délai entre la première et la seconde injection a été allongé à trente jours, ceci afin d'augmenter les chances d'obtenir des anticorps de type IgG. Le contrôle des immunisations, par titrage en ELISA des sérums prélevés, a permis de montrer que toutes les souris produisaient des anticorps spécifiques, quelque soit l'haptène injecté.

Figure 35 : Comparaison des titres des sérums de souris immunisées à l'aide des haptènes Met3, Met4, Met5 et Met1' après les injections 2 et 3

Moyenne des réponses mesurées obtenues par immunogène.

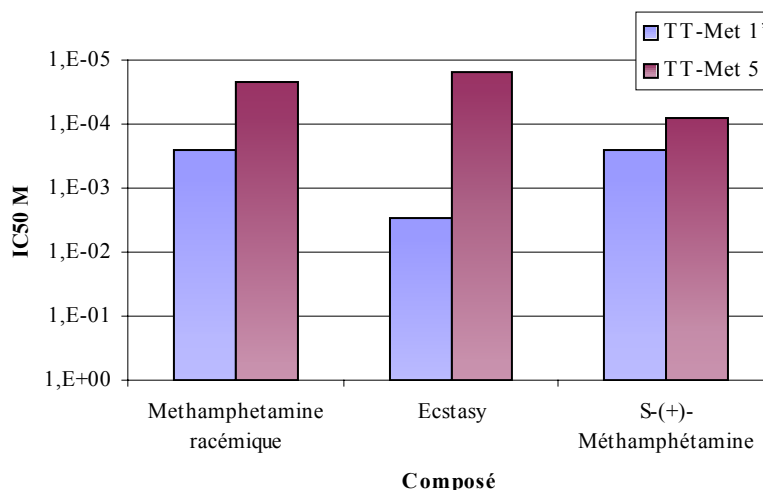


Des tests de compétition ont été réalisés sur les sérums des souris immunisées avec les haptènes Met1' et Met5. Comme l'illustre la Figure 36, Les sérums issus de l'immunisation par l'haptène Met1' sont plus spécifiques de la méthamphétamine. Ces résultats sont conformes avec les résultats obtenus avec l'haptène Met1. Les sérums issus des souris immunisées avec l'haptène Met5 ont des affinités plus élevées pour les métabolites par rapport à ceux issus de souris Met1'. De plus, l'affinité pour l'ecstasy est nettement

supérieure à celle obtenue avec les anticorps anti-haptènes Met1', ce qui justifie la stratégie utilisée pour élargir la tolérance vis-à-vis des substituants sur le noyau aromatique de la méthamphétamine, comme indiqué par divers auteurs.

Les souris possédant un sérum à plus forte affinité ont été sélectionnées pour la fusion. Ainsi, la souris Met1' choisie pour la fusion possédait un sérum dont l'affinité apparente pour la méthamphétamine racémique était de $1,4 \cdot 10^{-4}$ M, pour la S-(+)-méthamphétamine de $1,9 \cdot 10^{-4}$ M, et pour l'ecstasy de $1,9 \cdot 10^{-3}$ M. L'affinité apparente du sérum de la souris Met5 pour la méthamphétamine racémique a été mesurée à $7,2 \cdot 10^{-7}$ M, pour la S-(+)-méthamphétamine de $4,68 \cdot 10^{-5}$ M et pour l'ecstasy de $4,7 \cdot 10^{-6}$ M.

Figure 36 : Moyenne des IC_{50} (en M) mesurée par ELISA des sérums de souris prélevés à T3



IV.3.1.2 Fusions

Mis à part l'haptène Met5, une seule fusion composée de 6 plaques 96 puits a été réalisée pour chaque immunogène, comme l'illustre le Tableau 32.

Tableau 32 : Fusions anti-méthamphétamine à partir des haptènes Met3, Met4, Met5 et Met1'.

N° de fusion	Haptène	Nbre de puits ensemencés	Nbre de puits testés	Nbre de puits positifs	Nbre de clones mis en DL	Facteur de croissance
256	Met3	480	380	19	0	Macrophage
257	Met4	480	446	42	0	Macrophage
273	Met1'	480	420	43	6	P388D1
274	Met5	480	336	7	2	P388D1
277	Met5	480	393	4	3	Thymocyte

Lors des fusions à partir des souris immunisées par les haptènes Met3 et Met4, nous avons obtenu des pousses cellulaires semblables à celles obtenues lors des fusions précédentes. Des puits ont été détectés positifs, mais les tests de compétition à l'aide des surnageants d'amplification ont révélé que les anticorps produits ne reconnaissent que très peu la méthamphétamine et l'ecstasy (maximum 50% avec 100µg/mL de métabolite). En conséquence, aucun clone n'a été mis en dilution limite. La raison de cet échec peut provenir du bras de liaison entre la méthamphétamine et la protéine porteuse, ce qui expliquerait la détection de signaux positifs (anticorps anti-bras).

Deux fusions ont été réalisées pour l'haptène Met5. En effet, la première fusion a permis de mettre 6 clones en dilution limite, mais aucun n'a pu être stabilisé. Une seconde fusion à l'aide des splénocytes prélevés sur la même souris et congelés a été réalisée en utilisant des thymocytes comme feeder. Des récents essais au sein du laboratoire ont montré l'intérêt de ces cellules, mais également que leur utilisation semble incompatible avec l'emploi de splénocytes congelés, cela pourrait être la raison pour laquelle nous n'avons pas obtenu de clone lors cette seconde fusion.

Seule la fusion Met1' a permis d'obtenir des anticorps monoclonaux. Avec une pousse cellulaire excellente (87,5%), la quantité de cellules positives a été modeste (10 %). Des tests de compétition, avec les composés (R,S)-méthamphétamine, (S)-méthamphétamine et ecstasy à 50µg/mL, ont permis d'isoler 6 hybridomes, et après les étapes de clonage, seulement deux clones (4 sous clones) ont été obtenus.

IV.3.2 Caractérisation des anticorps

Tous les anticorps obtenus avec l'haptène Met1' sont de type IgG1, sans doute grâce à un délai plus long entre la première et la deuxième immunisation que ceux pratiqués au sein du laboratoire de biotechnologie.

IV.3.2.1 Tests de compétition par ELISA

Les test de compétition par ELISA ont été réalisés avec les quatre anticorps anti-Met1' isolés (Tableau 33).

Tableau 33 : Réactivité croisée des anticorps anti-met1' par technique ELISA

La réactivité croisée pour la méthamphétamine racémique (D) est indiquée en gras. Celle des métabolites endogènes en italique et sur fond grisé.

Code	Molécule	4B12A2D7	4B12A2B7	2D9D1B11	2D9A4C2D4
D	(S,R)-Méthamphétamine	100	100	100	100
E	Ecstasy	38	31	0	0
F	Méthylthio amphétamine	50	36	36	35
G	Ethyl-Amphétamine	109	118	127	104
H	Nor-Ephédrine	0	0	0	0
<i>I</i>	<i>Nor-Epinéphrine</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>J</i>	<i>Dopamine</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>K</i>	<i>Epinéphrine</i>	<i>62</i>	<i>44</i>	<i>22</i>	<i>21</i>
L	Hydroxyméthoxyphenetylamine	19	0	0	0
M	Méthyl pseudo Ephédrine	<u>2663</u>	<u>1817</u>	<u>805</u>	<u>972</u>
N	Amphétamine	66	46	48	66
O	Dihydroxymétamphétamine				
P	S-Méthamphétamine	692	341	259	261

Tous les anticorps isolés sont spécifiques de la S-(+)-méthamphétamine, comme le montre la comparaison des réactivités croisées entre les composés D et P. D'autre part, les métabolites endogènes comme la dopamine ou la nor-épinéphrine ne sont pas reconnus, du moins à des concentrations inférieures à 2 mg/mL. La réactivité croisée pour l'épinéphrine n'est pas négligeable pour les trois anticorps, suggérant une interaction du groupement hydroxyle avec des acides aminées du paratope (formation de liaisons hydrogènes).

On constate que tous les anticorps ont une forte réactivité croisée avec la méthylpseudo-éphédrine (souligné dans le tableau), alors que ceci n'a jamais été observé avec l'haptène racémique Met1. Sachant que la molécule de méthyl-pseudo-éphédrine utilisée est de forme (1S,2S), on peut supposer que cette configuration est compatible avec le site de reconnaissance des anticorps, mais est également propice à l'établissement de liaisons supplémentaires stabilisant le complexe. L'utilisation d'une méthyl-pseudo-éphédrine de forme (1R,2S) aurait pu préciser le rôle du groupement hydroxyle dans ce phénomène.

IV.3.2.2 Analyse BIAcore

Suite aux résultats des tests de compétition ELISA, l'anticorps 4B12 a été purifié à partir de 30 mL de surnageant pour être ensuite analysé par BIAcore. Dans un premier temps, une mesure directe a été réalisée sur une sensor-chip faiblement immobilisée avec les haptènes Met1 et Met1'. Dans l'incapacité de réaliser de nouveaux tests RIA, nous avons expérimenté les tests de compétition BIAcore pour confirmer les valeurs déterminées. Afin de pouvoir valider ce modèle, l'anticorps 6H5D1C4, issu de la fusion 243, a également subi les mêmes tests.

A Détermination de l'affinité par mesure directe

Les essais antérieurs ont permis de définir les conditions nécessaires pour déterminer de façon optimale les constantes cinétiques (Cf. taux d'immobilisation). De ce fait, les sensorgrammes obtenus ont été modélisés à la fois avec le modèle de transport de masse comme les expériences précédentes, mais également avec le modèle de Langmuir (Cf. matériel et méthodes). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 34 : Résultats des constantes cinétiques déterminées par BIAcore.

Les données modélisées à partir du modèle de transport de masse sont indiquées en italique et fond grisé, pour les autres, les résultats ont été obtenus avec le modèle de Langmuir.

Anticorps	BSA-Met1		BSA Met1'	
	KA (M)	Chi2	KA (M)	Chi2
IgG 6H5	<i>1,08 10⁹</i>	<i>269</i>	<i>7,12 10⁹</i>	<i>20,7</i>
	6,51 10 ⁸	165	4,12 10 ¹⁰	15,3
Fab 6H5	<i>2,81 10⁶</i>	<i>121</i>	<i>2,27 10⁶</i>	<i>15</i>
	6,83 10 ⁶	79,6	6,35 10 ⁶	13,9
IgG 4B12	<i>3,24 10¹⁰</i>	<i>93,1</i>	<i>1,62 10¹²</i>	<i>10,9</i>
	1,25 10 ¹¹	76	2,59 10 ⁹	12,4

L'immobilisation de la sensor-chip avec de faible quantité d'haptène biotine permet de limiter, voire d'éliminer les effets de transport de masse (Chi2 plus faible pour le modèle de Langmuir). L'utilisation du modèle de transport de masse n'est, dans ce cas, plus adapté, et

son utilisation induit des erreurs pouvant être importantes. L'affinité de l'anticorps 4B12 avec la BSA-Met1' est l'exemple le plus marquant : une affinité de l'ordre de 10^{12} M^{-1} semble improbable. La bivalence de l'anticorps semble être responsable de ces erreurs puisque aucune différence significative n'est observable entre les deux modèles lors des mesures sur le fragment Fab. On constate également que les mesures d'affinité réalisées pour le fragment Fab avec une sensor chip fortement immobilisée sont équivalentes à celle obtenues avec une immobilisation faible.

Conformément aux tests d'inhibition ELISA, l'anticorps 6H5 fixe de manière aussi bien l'haptène Met1 et l'haptène Met1', résultat compatible avec une absence de stéréospécificité, ou d'une stéréospécificité R, pour cet anticorps. Seule une expérience de compétition avec l'isomère R aurait pu permettre de préciser sa stéréospécificité. Si on considère qu'il n'y a pas d'effet de transport de masse, comme suggéré par les résultats obtenus avec l'anticorps 6H5 (résultats obtenus proches des données RIA), l'anticorps 4B12 ne posséderait pas non plus de stéréospécificité, ce qui est contradictoire avec les tests ELISA. Néanmoins, ces résultats permettent de conclure que les anticorps 6H5 et 4B12 possèdent des affinités proches vis-à-vis de la méthamphétamine de l'ordre de 10^8 à 10^9 M^{-1} .

B Détermination de l'affinité par compétition BIAcore

Les calculs n'ont pas pu être réalisés à l'aide de la courbe $k_{\text{obs}}=f([I])$. Par contre, les résultats obtenus en utilisant la méthode de calcul d'ELISA sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau 35 :Détermination de l'affinité (M-1) par compétition BIAcore et méthode de calcul ELISA

Anticorps	Méthamphétamine racémique	(+)-méthamphétamine	Affinité relative de la S-(+)- méthamphétamine
IgG 4B12	$3,01 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	206
IgG 6H5	$4,7 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^7$	98
Fab 6H5	$1,68 \cdot 10^8$		

Les résultats obtenus sont conformes avec les tests de compétition par ELISA. En effet, ces expériences mettent en évidence le fait que l'anticorps 4B12 reconnaît préférentiellement la S-(+)-méthamphétamine, et que pour l'anticorps 6H5 aucune différence n'est observable.

L'affinité de l'anticorps 6H5 pour la méthamphétamine racémique par la méthode RIA a été évaluée à $8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Celle mesurée par la présente méthode est de moitié inférieure à celle attendue ($4,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), néanmoins, cette méthode pourrait être une solution alternative aux mesures RIA.

IV.3.3 Conclusion

Quatre nouveaux haptènes ont été synthétisés pour répondre à trois questions posées suite aux résultats obtenus avec les haptènes Met1 et Met2 :

- ✓ La création d'haptène par modification du noyau aromatique de la méthamphétamine permet-il de générer des anticorps anti-ecstasy ?
- ✓ L'injection d'haptène stéréo-spécifique favorise-t-elle la formation d'anticorps dirigés préférentiellement contre l'un des isomères ?
- ✓ Peut-on obtenir des anticorps anti-méthamphétamine d'affinité supérieure à 10^8 M^{-1} ?

Les expériences réalisées ont permis de répondre à deux des trois questions. Malgré l'échec des fusions à partir des souris immunisées par Met3 et Met4, l'haptène Met5 a permis de mettre en évidence l'intérêt des modifications du noyau aromatique de la méthamphétamine pour l'obtention d'anticorps dirigés contre les molécules de type ecstasy. Cette conclusion provient des résultats des tests de compétition réalisés sur les sérums hyper-immunisés puisque aucun anticorps n'a pu être cloné. Cependant, ces résultats sont en accord avec les données publiées.

L'haptène stéréospécifique Met1' a permis d'obtenir 4 sous clones spécifiques de la (+)-méthamphétamine. Les caractéristiques des anticorps obtenus ne permettent pas l'utilisation de molécules pour un usage thérapeutique (réactivité croisée trop importante pour l'épinéphrine). Cependant, l'utilisation de l'haptène Met1' semble préférable pour l'obtention d'anticorps d'intérêt, en particulier grâce à la stéréospécificité des anticorps générés. L'utilisation d'haptène dérivé de la (+)-méthamphétamine a déjà été publié par Byrnes-Blake [116] pour la génération d'anticorps stéréospécifiques. La même équipe a obtenu des anticorps monoclonaux murins d'affinités proches de celles obtenues dans ce travail ($K_A = 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$). Des essais *in vivo* ont permis de montrer que cet anticorps était capable de produire un effet antagoniste spécifique suite à l'injection de méthamphétamine.

Ainsi, de nouvelles fusions avec l'haptène Met5 devraient permettre d'obtenir des anticorps dirigés contre les molécules de type ecstasy, avec des affinités supérieures à 10^8 M^{-1} . L'utilisation de l'haptène Met1' pour de nouvelles fusions devrait également permettre l'isolement d'anticorps de haut intérêt, avec des affinités sans doute de l'ordre de 10^8 M^{-1} .

V Discussion

V.1 Anticorps anti-drogue

L'obtention d'anticorps anti-cocaïne et anti-méthamphétamine, deux molécules de faible poids moléculaire, a fait l'objet de ce travail. La conception des haptènes a été essentielle pour la réussite d'un tel projet, mais également le choix de la protéine porteuse nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire. Dans les paragraphes suivants, les stratégies employées pour la création d'haptènes anti-méthamphétamine seront commentées, puis la discussion portera sur les anticorps obtenus et leur utilité dans la lutte contre les intoxications aiguës, avant d'aborder les problèmes d'affinité.

V.1.1 *Stratégie de conception des immunogènes*

Au cours de ce travail, six haptènes différents ont été synthétisés en utilisant deux stratégies différentes :

- ✓ modification de l'amine de la méthamphétamine donnant les haptènes Met1, Met2 et Met1',
- ✓ modification du noyau aromatique de la méthamphétamine avec l'obtention des haptènes Met3, Met4 et Met5

Dans la première stratégie, la différenciation des haptènes provient de la longueur de la chaîne carbonée permettant la fixation de la molécule sur la protéine porteuse, mais également de l'orientation du groupement méthyle sur le carbone asymétrique. Des anticorps ont pu être obtenus à l'aide des trois haptènes, et leur caractérisation nous permet de conclure sur l'intérêt des structures choisies. Avec un bras espaceur à chaîne carbonée courte, comme c'est le cas pour les haptènes Met1 et Met1', une partie de l'haptène pourrait en partie être masquée par la protéine porteuse après couplage. C'est l'hypothèse émise par Tuomola [128] pour expliquer l'échec de l'obtention d'anticorps spécifique de la 3-méthylindole (131,2 Da) à partir d'haptènes à bras carboné court. Nous n'avons pas rencontré ces problèmes, même si l'haptène Met1 couplé à la KLH n'a pas permis d'obtenir des sérums de titre élevé spécifiques. Ainsi, plusieurs auteurs, dont Tuomola, préconisent l'utilisation d'haptène à chaîne carbonée longue, avec le risque d'induire des anticorps spécifiques du bras de l'haptène, incapables de reconnaître convenablement les métabolites cibles. L'étude des haptènes publiés (cf. tableau 10) tend à démontrer l'avantage des haptènes à longue chaîne

pour l'obtention d'anticorps de forte affinité (de l'ordre de 10^{-8} M^{-1} pour des chaînes carbonées supérieures à 3, contre 10^{-5} M^{-1} pour un nombre de carbone inférieur à 3). Un seul anticorps anti-Met2 a été caractérisé par RIA (9D10), et les affinités déterminées par ELISA sont plus élevées pour la méthamphétamine que celles obtenues avec l'haptène Met1. Au moins une seconde fusion devrait être réalisée avec cet haptène pour confirmer ces résultats, mais sans doute en utilisant un énantiomère (de forme S) plutôt qu'un mélange racémique.

La stéréospécificité des anticorps induite par l'injection d'haptène non racémique a pu être testée avec l'haptène Met1', mais également avec la molécule Met5. Nos résultats, qui sont en parfait accord avec les travaux de Byrnes-Blake et Mc Millan ([116, 119, 118]), démontrent que pour augmenter les chances d'obtenir des anticorps spécifiques de la S-(+)-méthamphétamine, il est nécessaire d'immuniser avec des haptènes conservant la stéréospécificité de la molécule. D'une façon générale, les caractéristiques de la molécule cible (stéréo-isomérisation, charges électriques, hydrophobicité, ...) doivent être préservées au maximum lors de l'élaboration de l'haptène [128] [129]. La stéréochimie S de la méthamphétamine a été conservée dans la structure de la molécule Met5, et les anticorps obtenus, présents dans le sérum des souris immunisées, semblent être stéréosélectifs, mais plutôt en faveur de la forme R. Cela provient sans doute du fait que le couplage à la protéine porteuse a été réalisé au niveau du noyau aromatique, ce qui diminue l'influence du carbone asymétrique pour la stabilisation de la molécule dans le site de fixation ([130, 113, 121]).

La stratégie de couplage sur le noyau aromatique de la méthamphétamine a été adoptée pour l'obtention d'anticorps dirigés contre l'ecstasy ou des molécules proches de sa structure. Seul l'haptène Met5 a permis d'obtenir des anticorps, mais aucun n'a pu être stabilisé. Néanmoins, les essais réalisés sur les sérums des souris ont permis de montrer le choix judicieux de cette stratégie. De nouvelles fusions devront être réalisées pour mieux évaluer la pertinence de ces haptènes sur les réactivités croisées mais également sur l'affinité des anticorps produits. En effet, l'haptène Met5 est composé d'un bras court qui, d'après l'analyse des résultats avec les molécules Met1 et Met2 et les données bibliographiques, ne devrait pas permettre d'obtenir des anticorps d'affinité supérieure à 10^{-8} M^{-1} .

Les résultats obtenus avec les molécules Met3 et Met4 peuvent être liés à un bras trop long, ou à des caractéristiques physico-chimiques trop différentes de la méthamphétamine. De plus, ces haptènes ont été couplés avec la KLH et non pas avec la TT, protéine qui semble mieux adaptée pour l'obtention d'anticorps anti-drogue. Conclure que seuls les haptènes sont responsables de l'échec des fusions alors qu'un nombre limité de splénocytes ont été

fusionnés lors d'une unique fusion est difficile. Même si les chances de succès sont faibles avec ces molécules, une autre fusion aurait pu être réalisée pour confirmer ces résultats.

Pour conclure sur les haptènes, les deux stratégies testées dans ce travail ont donné des résultats en accord avec ceux déjà publiés. Il semblerait que l'obtention d'anticorps de forte affinité peut être réalisée avec des haptènes possédant un bras de liaison simple et long, comme une chaîne carbonée de 3 à 5 carbones terminée par un groupement carboxylique. D'autre part, pour augmenter les chances d'isoler des anticorps stéréospécifiques, il est préférable de concevoir un haptène conservant cette caractéristique. Enfin, il semble improbable d'obtenir des anticorps de haute affinité à la fois spécifiques de la méthamphétamine et de l'ecstasy sans réactions croisées avec les métabolites. En effet, de tels anticorps devraient avoir une certaine plasticité de reconnaissance au niveau du noyau aromatique.

La conception d'un immunogène est le résultat du couplage d'un haptène et d'une protéine porteuse. Dans ce travail, nous avons utilisé deux protéines différentes pour l'immunisation des souris. Le rôle de cette protéine est essentiel pour l'obtention d'anticorps car elle conditionne la présentation de l'haptène au système immunitaire. Ainsi, cette molécule influence le titre en anticorps présents dans les sérums prélevés, mais également la spécificité des anticorps produits et sans doute leurs affinités. Fasciglione et al [131] ont montré que la nature de l'haptène devait influencer le choix de la protéine porteuse. Ainsi, lorsque l'haptène est une molécule hydrophobe, ce qui est le cas ici, la protéine est un élément critique car elle peut moduler le titre et la spécificité des anticorps, mais également l'efficacité de la fusion et le nombre de clones spécifiques. D'autres protéines porteuses pourraient également être testées afin d'améliorer les résultats, comme le Pam₃-Cys-T_H présenté par Moran et al [132] et qui est présenté comme plus efficace pour la production d'anticorps monoclonaux spécifiques que les protéines porteuses conventionnelles que sont la BSA ou la KLH.

Les haptènes anti-drogues développés au cours de ces travaux se sont révélés efficaces en terme de spécificité, mais les affinités des anticorps obtenus par la méthode de référence (RIA) sont légèrement inférieures aux attentes de la société DAS. D'après les travaux de Chappey, compte tenu de la taille de la méthamphétamine, des affinités de l'ordre de 10^9 - 10^{10} M⁻¹ semblent improbables. Dans ces conditions, le profil de spécificité est le seul paramètre que nous pouvons améliorer. Il est probable que les haptènes anti-méthamphétamine, utilisés

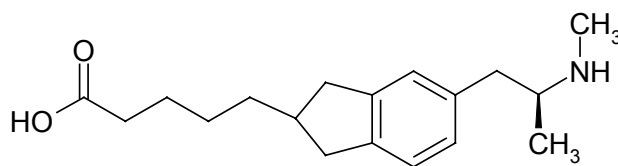
dans des conditions différentes, peuvent générer des anticorps de plus haut intérêt pour le domaine thérapeutique, mais de nouvelles fusions seront nécessaires pour en faire la démonstration.

Si on se réfère aux travaux de Mc Millan [118], les anticorps anti-méthamphétamine obtenus devraient posséder une réelle capacité à diminuer les effets d'abus de molécules de type méthamphétamine. Une autre étude par la même équipe avec un anticorps de plus forte affinité ($K_D = 11$ nM, soit 20 fois plus faible que le précédent [119]) a confirmé ces premiers résultats. D'après les résultats RIA, l'anticorps 6H5 devrait posséder les caractéristiques nécessaires (dont $K_D = 12,5$ nM en RIA) pour neutraliser dans la circulation sanguine les composés de type méthamphétamine.

L'avantage majeur des anticorps produits est le spectre de molécules reconnues, conséquence des réactivités croisées élevées pour des composés toxiques de même famille ; cette observation étant principalement vraie pour les anticorps anti-méthamphétamine. Les spécificités des anticorps obtenus dans ce travail semblent être différentes de celles déjà existantes ; ainsi ces anticorps peuvent devenir des outils de choix.

L'utilisation de fragment d'anticorps pourrait être envisagée pour augmenter, entre autre, le volume de distribution. L'anticorps 6H5, candidat pour les premiers essais chez l'animal, présente une modification de ses affinités pour les drogues lors du clivage en fragment Fab. Ces résultats nécessitent des expériences complémentaires afin de comprendre ces changements. Avec un poids moléculaire de 50kDa, ce fragment pourrait franchir des compartiments, rentrant ainsi en compétition avec les transporteurs à dopamine ou à sérotonine. L'amphétamine ou l'ecstasy ont des affinités de l'ordre du micro molaire (EC_{50} 0,13 μ M pour N et 1,14 μ M pour E avec DAT [133]) donc des affinités cent fois plus faibles que les anticorps. La majeure partie de ces drogues devraient être neutralisée par les anticorps produits, et/ou diminuer la quantité de drogues fixées sur ces transporteurs.

De nombreux essais *in vivo* sont indispensables pour orienter ce programme de recherche soit vers une exploitation de ces anticorps, soit vers la recherche de nouveaux candidats, comme des anti-ecstasy. En utilisant la structure de l'ecstasy comme base, une chaîne carboxylique pourrait être ajoutée sur le carbone du groupement méthylènedioxy. Cette construction permettrait de générer de fortes contraintes pour la reconnaissance du noyau aromatique, tout en permettant une certaine liberté dans la nature des composés N-substitués. Pour limiter les réactions croisées avec des molécules telles que l'épinéphrine ou la dopamine, les deux atomes d'oxygène devront être remplacés par des carbones.

Figure 37 : Proposition d'haptène anti-ecstasy

Une alternative à la recherche d'anticorps polyvalents serait l'emploi d'un cocktail d'anticorps monoclonaux dont le spectre d'action recouvrerait l'ensemble des métabolites toxiques ; mais avec des affinités plus élevées. Dans la mesure où certains anticorps sont difficiles à produire (ou coûteux comme l'anti-cocaïne 4D8 par exemple), une stratégie anti-récepteur pourrait être utilisée : M Ho et M Segre [134] ont récemment fait part de l'obtention d'anticorps anti-transporteur à dopamine, antagoniste de la cocaïne. Ces anticorps, sous forme de scFv, se fixent sur les récepteurs spécifiques de la cocaïne contenus dans le transporteur à dopamine, inhibant ainsi sa fixation sans empêcher celle de la dopamine.

Deux autres approches peuvent être envisagées pour valoriser soit les anticorps obtenus, soit les haptènes synthétisés. L'utilisation d'anticorps anti-drogues pourrait être envisagée pour l'aide à la désintoxication. Plusieurs équipes ont travaillé sur la conception de vaccins dans ce but, principalement contre la cocaïne [62, 135, 110, 63]. Dans ce cas, des anticorps de moyenne affinité pourraient être administrés pendant la durée de la thérapie pour limiter les effets d'une rechute. Dans ce cas, la solution à plus long terme pourrait être d'utiliser les haptènes pour immuniser les patients.

Le développement de réactifs diagnostiques peut être envisagé pour valoriser des anticorps produits : les produits, dit de « test rapide » ou « de terrain » disponibles dans le commerce, offrent des limites de sensibilités de l'ordre de plusieurs centaines de ng/mL [136-138], ce qui correspond à l'IC₅₀ de la plupart des anticorps obtenus au cours de ce travail. L'utilisation des anticorps issue de ce travail permettrait de détecter de telles drogues et d'atteindre des limites de sensibilités supérieures. Les domaines d'utilisation de ces réactifs peuvent aller de l'aide à l'identification de stupéfiants pour les médecins urgentistes à la détection de drogue dans l'organisme d'automobiliste. Cette voie est plus facilement envisageable avec les anticorps anti-méthamphétamine qu'avec les anticorps anti-cocaïne : les tests immunochimiques utilisés pour détecter la cocaïne utilisent en général la benzoylecgonine comme molécule de référence, ceci en raison de sa durée de vie plus importante dans l'organisme [136]. Les anticorps ont été sélectionnés sur la faible

reconnaissance pour cette molécule, ce qui limite l'intérêt des anticorps 4D8 et 5B3, et nécessite la recherche de nouveaux clones, comme le 3F6 et 5F12 par exemple (Tableau 11). Dans le cas de la détection de molécules de type méthamphétamine, la conception des haptènes a permis d'obtenir des anticorps dont le spectre des molécules reconnues est large, ce qui augmente les chances de pouvoir détecter des composés peu utilisés ou nouveaux à ce jour. Par contre, cette plasticité risque d'être responsable de faux positifs, paramètre devant être pris en compte dans la conception et le développement de tests rapides avec ces anticorps. Cependant, le caractère monoclonal de chacun devra contribuer à limiter ce risque.

V.1.2 Méthodes de détermination de la constante d'affinité

Au cours de ce travail, nous avons utilisé différentes méthodes pour mesurer l'affinité de nos anticorps et pour déterminer leurs réactivités croisées : des mesures directes avec la drogue cible (cocaïne ou méthamphétamine) avec les expériences RIA, ou des mesures indirectes avec la drogue cible et/ou l'haptène avec les tests ELISA et BIAcore. De grandes différences ont été observées dans les résultats obtenus qui peuvent découler d'approximations et d'erreurs d'expérimentation. : par exemple, les calculs RIA ont été réalisés à l'aide de la méthode de Muller qui ne prend pas en compte la bivalence des IgG, ce qui induit une sous estimation des affinités calculées. Pour les affinités mesurées à l'aide du BIAcore, la dissociation des anticorps a presque toujours été très lente, et la régénération de la sensor-chip difficile (utilisation d'une solution acide à pH1,8). Ce phénomène a été propice à un vieillissement prématuré de la sensor-chip, mais également à des constantes de dissociations pouvant être surévaluées.

D'autres paramètres physico-chimiques peuvent avoir contribué à accentuer ces différences. Ainsi, les mesures RIA ont été réalisées à température ambiante (20°C) alors qu'en ELISA, toutes les incubations ont été effectuées à 37°C pour mimer la réaction dans un organisme humain. La différence de température lors des mesures de l'affinité pourrait contribuer à l'écart des valeurs mesurées : la constante d'affinité peut être définie à l'aide de l'énergie libre (ΔG), de la température (T) et de la constante de Boltzmann (k) : $\Delta G/kT = -\ln(K_A)$. Dans le cas où une constante d'affinité égale à 10^8 M^{-1} mesurée à 20°C serait déterminée à 37°C, on obtiendrait alors une constante égale à $3,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, soit une diminution d'un tiers environ.

Des écarts plus importants ont été constatés, essentiellement entre les expériences ELISA et RIA. Ceci est sans doute la conséquence du non respect des conditions établies par Friguet. Une sensibilisation trop importante des plaques ELISA, due à un taux de couplage trop élevé (plus de 20 molécules H3' par molécule de BSA, plus de 200 molécules Met1' par molécule de BSA,...) pourrait être le facteur essentiel de l'erreur de détermination. L'objectif principal de ces mesures réalisées en ELISA était de déterminer les profils de spécificités des anticorps au cours et après fusion, ce qui explique que l'optimisation de ces tests pour des mesures d'affinité n'a pas été réalisée.

Lors des dernières fusions, la quantité de matériel nécessaire aux tests RIA n'étant pas assez importante, nous nous sommes orientés vers l'utilisation du système BIAcore, principalement en raison de la simplicité d'obtention des constantes d'affinité. Après une première série de mesures sur des chips activées avec une quantité d'antigènes élevés, des constantes d'association ont pu être définies pour plusieurs anticorps par mesures directes. Les écarts constatés avec les données obtenues par RIA peuvent s'expliquer par l'utilisation d'haptène fixé (pour le BIAcore), et de la drogue cible en solution (cocaïne ou méthamphétamine). De plus, le choix du traitement mathématique utilisé influence également les valeurs obtenues, ce qui nécessite une compréhension des mécanismes mis en jeu dans cette technique pour le traitement judicieux des données.

Nous avons expérimenté des tests de compétition en BIAcore pour définir les constantes d'association avec les drogues en solution. Les résultats obtenus sont proches de ceux obtenus avec la technique RIA. D'autres mesures par cette méthode devraient permettre de confirmer que les tests de compétition en BIAcore peuvent être une technique plus sensible de substitution à la méthode RIA.

Enfin, il est regrettable ne pas avoir disposé de drogue de forme R, en particulier pour la méthamphétamine, ce qui aurait permis de conclure sans ambiguïté sur la stéréospécificité des anticorps obtenus.

L'affinité d'un complexe antigène-anticorps ne préjuge pas de l'efficacité d'un anticorps à capturer l'antigène dans un milieu complexe comme le sang, ni ne permet d'évaluer quelle sera la capacité de cet anticorps à diminuer les effets de la drogue. Seules des études *in vivo* pourront définitivement valider l'utilisation des anticorps produits lors de ces travaux pour un usage thérapeutique, même si tout porte à croire que leurs affinités seront suffisantes.

VI Conclusion

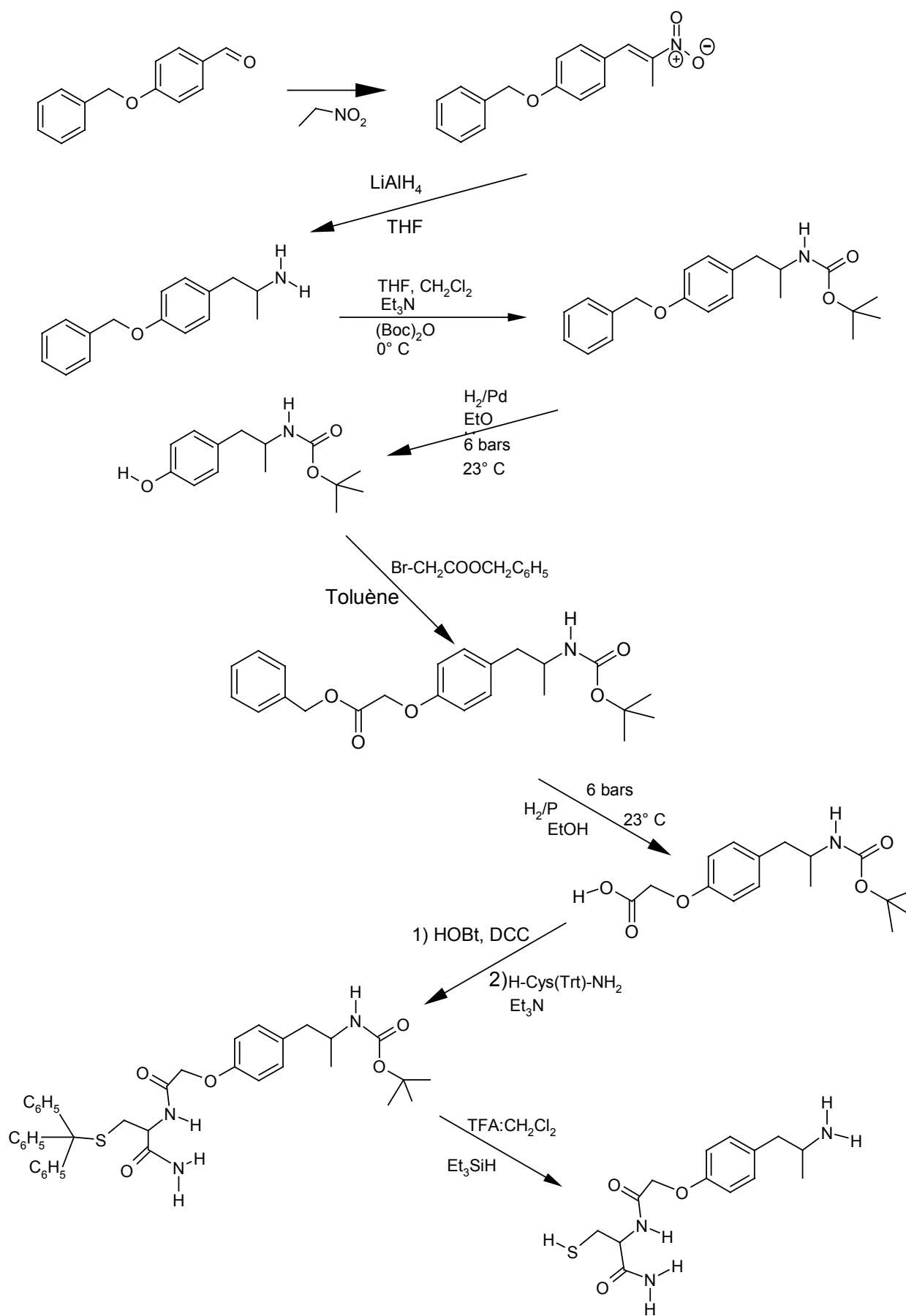
La société Drugabuse Sciences a souhaité développer des anticorps neutralisant pour le traitement des intoxications aiguës à la cocaïne et à la méthamphétamine. Après les résultats encourageant obtenus avec un anticorps polyclonal de cheval (CocAB), la recherche d'anticorps monoclonaux murins a été initialisée. La fusion cellulaire, réalisée à partir de splénocytes prélevés sur des souris hyper-immunisées avec l'immunogène TT-H₃', a permis d'obtenir plusieurs clones potentiellement intéressants. Seuls quatre hybridomes ont pu être clonés, mais l'affinité des anticorps sécrétés n'a été jugée suffisante que pour deux clones, le DAS-m246-4D8A4A4 et le DAS-m246-5B3C6C3. La caractérisation complète de ces deux anticorps a permis de mettre en évidence la supériorité du 4D8 compte-tenu des profils de réactivité croisée, mais un problème de production de ces anticorps (faible rendement) semble limiter leur développement.

L'obtention d'anticorps anti-méthamphétamine a fait l'objet de la seconde partie de ce travail et a permis le dépôt d'un brevet européen (N° 02290169.8-). Six haptènes différents ont été synthétisés pour obtenir des anticorps de haute affinité, possédant un spectre large sans toute fois réagir avec les métabolites endogènes. Une première stratégie a consisté à modifier la méthamphétamine et à la coupler à une protéine porteuse par l'intermédiaire de la fonction amine (haptène Met1, Met2 et Met1'). Le couplage de cette molécule au niveau du noyau aromatique a été la seconde stratégie employée (haptène Met3, Met4 et Met5). Aucun anticorps n'a été obtenu par cette seconde méthode, même si des tests d'inhibition avec le sérum des souris immunisées ont révélé l'intérêt de cette stratégie pour l'obtention d'anticorps anti-ecstasy. L'immunisation avec les haptènes Met1 et Met2 sous forme racémique peut induire des anticorps stéréosélectifs. Compte tenu que l'isomère S de la méthamphétamine, et d'une façon générale de toutes les drogues de cette famille est plus toxique que l'isomère R, nous avons étudié les conséquences de l'immunisation avec un composé de forme S (haptènes Met1' et Met5). Conformément à nos attentes, les anticorps obtenus se sont révélés spécifiques de la S-(+)-méthamphétamine. Toutefois, ne disposant pas des composés de forme R, nous ne pouvons pas conclure de manière précise sur l'énantiospécificité des anticorps monoclonaux.

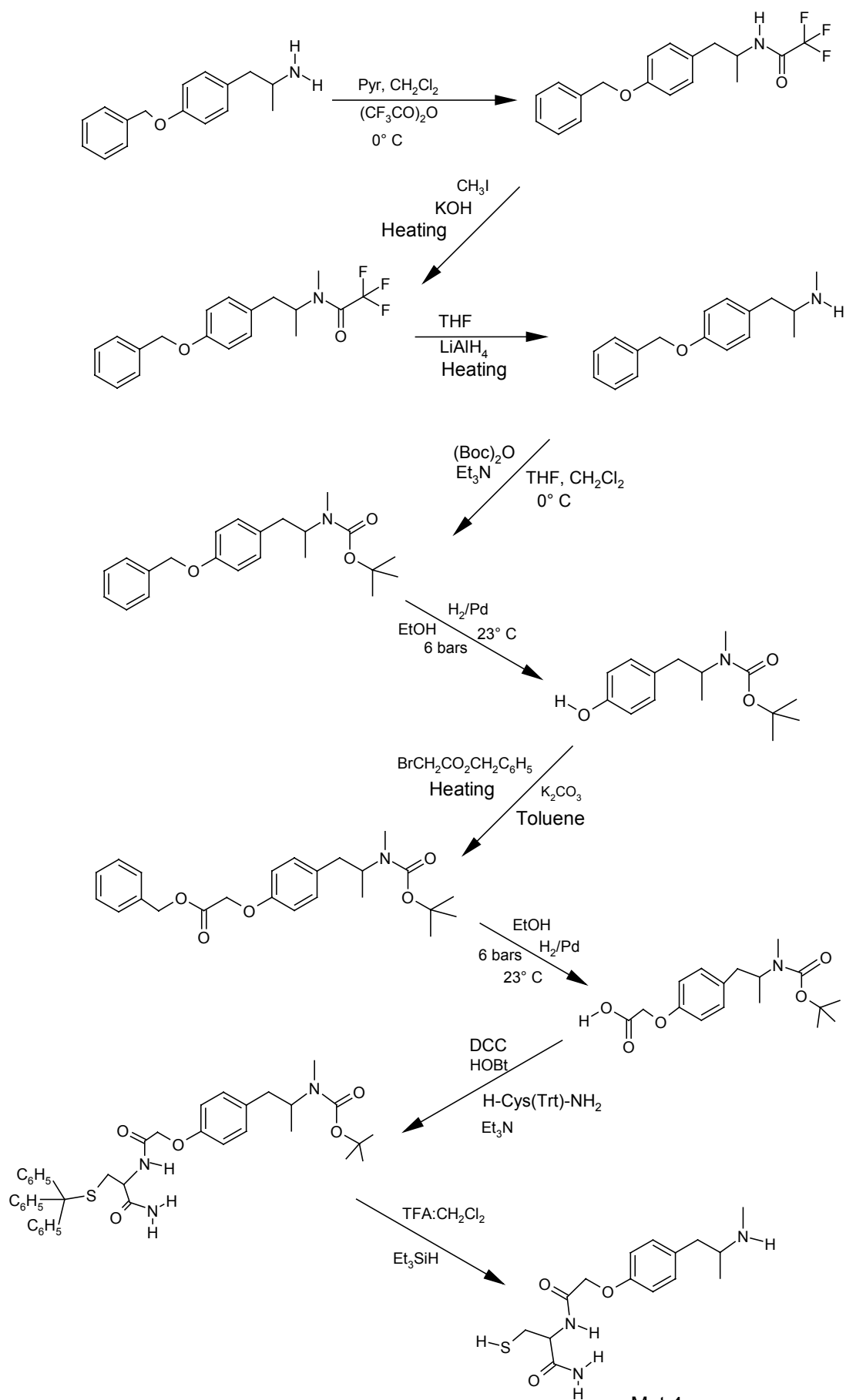
L'affinité des anticorps pour les drogues a été déterminée par diverses techniques, avec parfois des variations importantes. Néanmoins, les anticorps obtenus dans ce travail ont des affinités proches de 10^8 M^{-1} , affinité maximale possible pour des molécules cibles de cette tailles (< 350 Da, d'après Chappey et al [126]). Bien que l'efficacité *in vivo* n'a pas encore été testé, la comparaison avec les propriétés des anticorps publiés souligne leur intérêt (affinité plus élevée, et/ou profil de réactivité supérieure,...) et préjuge de leur efficacité dans un

organisme vivant : avec des profils de réactivités croisées comme ceux obtenus au cours de ce travail, ces anticorps devrait permettre de neutraliser des molécules toxiques peu courantes ou nouvelles de même famille. Cette propriété peut être utilisée également pour le développement de réactifs de diagnostic rapide, où les affinités élevées de nos anticorps devraient permettre une diminution du seuil de sensibilité des tests.

VII Annexe

Met3 :

Met 3

Met4 :

VII.2 Couplages

VII.2.1 Méthode des anhydrides mixtes

La protéine porteuse est mise en solution dans de l'eau. Après dissolution complète, du dioxane est ajouté doucement (V/V). Il se forme un précipité qui est solubilisé à l'aide de quelques gouttes de soude 1N, puis le pH est ajusté à 10,4.

L'haptène à coupler est dissous dans 1 mL de dioxane, puis à froid est rajouté de la triéthylamine (20 μ L / mL de dioxane) et du chloroformiate d'isobutyl (11 μ L / mL de dioxane).

Les solutions d'haptènes et de protéines porteuses sont mélangées dans des portions indiquées dans le tableau ci-dessous. Après une période d'incubation de 30 min sous agitation, le mélange est dialysé contre de l'eau miliQ avant d'être lyophilisé.

Tableau 36 : Présentation des quantités de produits nécessaires pour le couplage des haptènes sur les protéines porteuses.

Protéine Porteuse	Molécules d'haptène / molécule de protéine porteuse
KLH	50 / 1
TT	300 / 1
BSA	30 / 1

VII.2.2 Méthode avec le succinidyl-maléimide

3 mg de SMCC (succinidyl-4(N-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate) est dissous dans 100 μ L de diméthylformamide (DMF). 60 μ L de cette solution sont ajoutés goutte à goutte à 20 mg de KLH dissous dans 2mL de PBS, puis le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 1h. La solution est ensuite purifiée par filtration sur colonne PD10.

A 2mL de KLH activée et purifiée sont ajoutés 10mg d'haptène dissous dans du PBS 1mM EDTA pH7,2. Le mélange est agité par inversion pendant 3h30 à température ambiante puis à 4°C pendant 15H. Les échantillons sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion à l'aide d'une colonne PD10.

VIII Références bibliographiques

1. Sueur C., Benezech A., Deniau D., Lebeau B., and Ziskind C., *Les substances hallucinogènes et leurs usages thérapeutiques. Revue de la littérature. Partie 1.* Revue documentaire Toxibase, 1999. **4**: p. 1-28.
2. OEDT, *Rapport annuel sur l'état du phénomène de la drogue dans l'Union européenne - 2001.* 2001, Luxembourg: Office des publications officielles des Communautés européennes. 59p.
3. U.N. O.D.C.C.P., *World Drug Report 2000.* Oxford University Press ed. 2000: Oxford New York. 180p.
4. OFDT, *Drogues et dépendances. Indicateurs et tendances 2002.* 2002, Paris: OFDT.
5. *The Merck index.* 10th edition ed. 1983, Rahway, N.J., USA: Merck & CO., Inc. 2000.
6. Christophersen A.S., *Amphetamine designer drugs - an overview and epidemiology.* Toxicol. Lett., 2000. **112-113**: p. 127-131.
7. Bondareva T.S., Young R., and Glennon R.A., *Central stimulants as discriminative stimuli. Asymmetric generalization between (-)ephedrine and S(+)-methamphetamine.* Pharmacol. Biochem. Behav., 2002. **74**: p. 157-62.
8. Burgess C., O'donohoe A., and Gill M., *Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity.* Eur. Psychiatry, 2000. **15**: p. 287-294.
9. Hegadoren K.M., Baker G.B., and Bourin M., *3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans.* Neurosci. Biobehav. Rev., 1999. **23**: p. 539-553.
10. Sueur C., Benezech A., Lebeau B., and Ziskind C., *Les substances hallucinogènes et leurs usages thérapeutiques. Revue de la littérature. Partie 2.* Revue documentaire Toxibase, 2000. **1**: p. 1-36.
11. Spitzer M., Franke B., Walter H., Buechler J., Wunderlich A.P., Schwab M., Kovar K.A., Hermle L., and Gron G., *Enantio-selective cognitive and brain activation effects of N-ethyl-3,4- methylenedioxyamphetamine in humans.* Neuropharmacology, 2001. **41**: p. 263-271.
12. Préterre A., *la cocaïne en chirurgie dentaire. Recherches expérimentales.* 1887.
13. Viau G., *De l'Anesthésie locale obtenue par les injections sous-gingivales de Cocaïne et d'acide phénique...* 1886.
14. De Backer A., De Keulenaer B., Mortelet K.J., and Ros P.R., *The body packer syndrome.* Jbr-Btr, 2002. **85**: p. 312.
15. Furnari C., Ottaviano V., Sacchetti G., and Mancini M., *A fatal case of cocaine poisoning in a body packer.* J. Forensic Sci., 2002. **47**: p. 208-10.

16. Matysiok J.C., *Les addictions. Dépendances, toxicomanies : repenser la souffrance psychique*. Armand Colin ed. Collection U. 2002. 272p.
17. Goodman A., *Addiction: definition and implications*. Br. J. Addict., 1990. **85**: p. 1403-8.
18. Kraemer T. and Maurer H.H., *Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivatives*. Ther. Drug. Monit., 2002. **24**: p. 277-89.
19. Kalasinsky K.S., Bosy T.Z., Schmunk G.A., Reiber G., Anthony R.M., Furukawa Y., Guttman M., and Kish S.J., *Regional distribution of methamphetamine in autopsied brain of chronic human methamphetamine users*. Forensic Sci. Int., 2001. **116**: p. 163-169.
20. Brunnenberg M. and Kovar K.A., *Stereospecific analysis of ecstasy-like N-ethyl-3,4-methylenedioxymphetamine and its metabolites in humans*. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 2001. **751**: p. 9-18.
21. Ramamoorthy Y., Yu A.M., Suh N., Haining R.L., Tyndale R.F., and Sellers E.M., *Reduced (+/-)-3,4-methylenedioxymphetamine ("Ecstasy") metabolism with cytochrome P450 2D6 inhibitors and pharmacogenetic variants in vitro*. Biochem. Pharmacol., 2002. **63**: p. 2111-9.
22. Meyer A., Mayerhofer A., Kovar K.A., and Schmidt W.J., *Enantioselective metabolism of the designer drugs 3,4-methylenedioxymphetamine ('ecstasy') and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ('eve') isomers in rat brain and blood*. Neurosci. Lett., 2002. **330**: p. 193-7.
23. Green A.R., Mehan A.O., Elliott J.M., O'shea E., and Colado M.I., *The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymphetamine (MDMA, "ecstasy")*. Pharmacol. Rev., 2003. **55**: p. 463-508.
24. Ferreira S., Crumb W.J., Jr., Carlton C.G., and Clarkson C.W., *Effects of cocaine and its major metabolites on the HERG-encoded potassium channel*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001. **299**: p. 220-226.
25. Brzezinski M.R., Spink B.J., Dean R.A., Berkman C.E., Cashman J.R., and Bosron W.F., *Human liver carboxylesterase hCE-1: binding specificity for cocaine, heroin, and their metabolites and analogs*. Drug. Metab. Dispos., 1997. **25**: p. 1089-1096.
26. Labib R., Turkall R., and Abdel-Rahman M.S., *Endotoxin potentiates the hepatotoxicity of cocaine in male mice*. J. Toxicol. Environ. Health. A., 2002. **65**: p. 977-93.

27. Toennes S.W., Thiel M., Walther M., and Kauert G.F., *Studies on metabolic pathways of cocaine and its metabolites using microsome preparations from rat organs*. Chem. Res. Toxicol., 2003. **16**: p. 375-81.
28. Cesaro P., Keravel Y., Ollot H., Peschanski M., and Sindou M., *Neuroanatomie fonctionnelle, de la cellule aux comportements*. 1993: ANPP. 272p.
29. Fix J., *Neuroanatomie*, ed. Bref E. 1996: DeBoeck Université. 116p.
30. Dautzat M., *Manuel de physiologie cardio-vasculaire intégrée*. 2002: Sauramps médical. 197 p.
31. Wallace T.L., Gudelsky G.A., and Vorhees C.V., *Neurotoxic regimen of methamphetamine produces evidence of behavioral sensitization in the rat*. Synapse, 2001. **39**: p. 1-7.
32. Winek C.L., Wahba W.W., Winek C.L., Jr., and Balzer T.W., *Drug and chemical blood-level data 2001*. Forensic Sci. Int., 2001. **122**: p. 107-23.
33. Cappon G.D., Pu C., and Vorhees C.V., *Time-course of methamphetamine-induced neurotoxicity in rat caudate- putamen after single-dose treatment*. Brain Res., 2000. **863**: p. 106-111.
34. Guilarte T.R., *Is methamphetamine abuse a risk factor in parkinsonism?* Neurotoxicology, 2001. **22**: p. 725-731.
35. Taffe M.A., Weed M.R., Davis S., Huitron-Resendiz S., Schroeder R., Parsons L.H., Henriksen S.J., and Gold L.H., *Functional consequences of repeated (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys*. Neuropsychopharmacology, 2001. **24**: p. 230-239.
36. Liechti M.E., Gamma A., and Vollenweider F.X., *Gender differences in the subjective effects of MDMA*. Psychopharmacology (Berl), 2001. **154**: p. 161-168.
37. Lyles J. and Cadet J.L., *Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms*. Brain Res. Brain Res. Rev., 2003. **42**: p. 155-68.
38. Smith M.P., Hoepping A., Johnson K.M., Trzcinska M., and Kozikowski A.P., *Dopaminergic agents for the treatment of cocaine abuse*. Drug Discov. Today, 1999. **4**: p. 322-332.
39. Frantz K.J., Hansson K.J., Stouffer D.G., and Parsons L.H., *5-HT(6) receptor antagonism potentiates the behavioral and neurochemical effects of amphetamine but not cocaine*. Neuropharmacology, 2002. **42**: p. 170-180.

40. Sabol K.E., Roach J.T., Broom S.L., Ferreira C., and Preau M.M., *Long-term effects of a high-dose methamphetamine regimen on subsequent methamphetamine-induced dopamine release in vivo*. Brain Res., 2001. **892**: p. 122-129.
41. Jayanthi S., McCoy M.T., Ladenheim B., and Cadet J.L., *Methamphetamine causes coordinate regulation of Src, Cas, Crk, and the Jun N-terminal kinase-Jun pathway*. Mol. Pharmacol., 2002. **61**: p. 1124-1131.
42. Colado M.I., Camarero J., Mechan A.O., Sanchez V., Esteban B., Elliott J.M., and Green A.R., *A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain*. Br. J. Pharmacol., 2001. **134**: p. 1711-23.
43. Carroll F.I., Lewin A.H., Abraham P., Parham K., Boja J.W., and Kuhar M.J., *Synthesis and ligand binding of cocaine isomers at the cocaine receptor*. J. Med. Chem., 1991. **34**: p. 883-6.
44. Moore K.A., Mozayani A., Fierro M.F., and Poklis A., *Distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning*. Forensic Sci. Int., 1996. **83**: p. 111-119.
45. Arora H., Owens S.M., and Gentry W.B., *Intravenous (+)-methamphetamine causes complex dose-dependent physiologic changes in awake rats*. Eur. J. Pharmacol., 2001. **426**: p. 81-87.
46. Varner K.J., Ogden B.A., Delcarpio J., and Meleg-Smith S., *Cardiovascular responses elicited by the "binge" administration of methamphetamine*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002. **301**: p. 152-9.
47. Henry J.A., *Metabolic consequences of drug misuse*. British Journal of Anaesthesia, 2000. **85**: p. 136-42.
48. Hollander J.E., Levitt M.A., Young G.P., Briglia E., Wetli C.V., and Gawad Y., *Effect of recent cocaine use on the specificity of cardiac markers for diagnosis of acute myocardial infarction*. Am. Heart J., 1998. **135**: p. 245-52.
49. Vasica G. and Tennant C.C., *Cocaine use and cardiovascular complications*. Med. J. Aust., 2002. **177**: p. 260-2.
50. Al Sahli W., Ahmad H., Kheradmand F., Connolly C., and Docherty J.R., *Effects of methylenedioxymethamphetamine on noradrenaline-evoked contractions of rat right ventricle and small mesenteric artery*. Eur. J. Pharmacol., 2001. **422**: p. 169-174.

51. Mccance-Katz E.F., Kosten T.R., and Jatlow P., *Concurrent use of cocaine and alcohol is more potent and potentially more toxic than use of either alone--a multiple-dose study*. Biol. Psychiatry, 1998. **44**: p. 250-259.
52. Bunney E.B., Appel S.B., and Brodie M.S., *Electrophysiological effects of cocaethylene, cocaine, and ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001. **297**: p. 696-703.
53. Esteban B., O'shea E., Camarero J., Sanchez V., Green A.R., and Colado M.I., *3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose*. Psychopharmacology (Berl), 2001. **154**: p. 251-260.
54. Shankaran M., Yamamoto B.K., and Gudelsky G.A., *Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT*. Synapse, 2001. **40**: p. 55-64.
55. Buchert R., Obrocki J., Thomasius R., Vaterlein O., Petersen K., Jenicke L., Bohuslavizki K.H., and Clausen M., *Long-term effects of 'ecstasy' abuse on the human brain studied by FDG PET*. Nucl. Med. Commun., 2001. **22**: p. 889-897.
56. Darvesh A.S., Shankaran M., and Gudelsky G.A., *3,4-Methylenedioxymethamphetamine produces glycogenolysis and increases the extracellular concentration of glucose in the rat brain*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002. **301**: p. 138-44.
57. Zhang J., Zhang D., and Xu M., *Identification of chronic cocaine-induced gene expression through dopamine d1 receptors by using cDNA microarrays*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2002. **965**: p. 1-9.
58. Deng X., Cai N.S., Mccoy M.T., Chen W., Trush M.A., and Cadet J.L., *Methamphetamine induces apoptosis in an immortalized rat striatal cell line by activating the mitochondrial cell death pathway*. Neuropharmacology, 2002. **42**: p. 837-45.
59. Li H., Xu L., Dunbar J.C., and Dhabuwala C.B., *Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in rat testes*. Urology, 2003. **61**: p. 646-50.
60. Sun H., Shen M.L., Pang Y.P., Lockridge O., and Brimijoin S., *Cocaine metabolism accelerated by a re-engineered human butyrylcholinesterase*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002. **301**: p. 710-716.

61. Bosron W.F., Dean R.A., Brzezinski M.R., and Pindel E.V., *Human liver cocaine carboxylesterases*. NIDA Res. Monogr., 1997. **173**: p. 27-34.
62. Carrera M.R., Ashley J.A., Zhou B., Wirsching P., Koob G.F., and Janda K.D., *Cocaine vaccines: antibody protection against relapse in a rat model*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2000. **97**: p. 6202-6206.
63. Kosten T.R., Rosen M., Bond J., Settles M., Roberts J.S., Shields J., Jack L., and Fox B., *Human therapeutic cocaine vaccine: safety and immunogenicity*. Vaccine, 2002. **20**: p. 1196-1204.
64. Tellier C., *Exploiting antibodies as catalysts: potential therapeutic applications*. Transfus. Clin. Biol., 2002. **9**: p. 1-8.
65. Baird T.J., Deng S.X., Landry D.W., Winger G., and Woods J.H., *Natural and artificial enzymes against cocaine. I. Monoclonal antibody 15A10 and the reinforcing effects of cocaine in rats*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2000. **295**: p. 1127-1134.
66. Briscoe R.J., Jeanville P.M., Cabrera C., Baird T.J., Woods J.H., and Landry D.W., *A catalytic antibody against cocaine attenuates cocaine's cardiovascular effects in mice: a dose and time course analysis*. Int. Immunopharmacol., 2001. **1**: p. 1189-1198.
67. Kuhar M.J., Carroll F.I., Bharat N., and Landry D.W., *Anticocaine catalytic antibodies have no affinity for RTI compounds: Implications for treatment*. Synapse, 2001. **41**: p. 176-178.
68. Mets B., Winger G., Cabrera C., Seo S., Jamdar S., Yang G., Zhao K., Briscoe R.J., Almonte R., Woods J.H., and Landry D.W., *A catalytic antibody against cocaine prevents cocaine's reinforcing and toxic effects in rats*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1998. **95**: p. 10176-10181.
69. Deng S.X., De Prada P., and Landry D.W., *Anticocaine catalytic antibodies*. J. Immunol. Methods, 2002. **269**: p. 299-310.
70. Larsen N.A., Turner J.M., Stevens J., Rosser S.J., Basran A., Lerner R.A., Bruce N.C., and Wilson I.A., *Crystal structure of a bacterial cocaine esterase*. Nat. Struct. Biol., 2002. **9**: p. 17-21.
71. Revillard J., ed. *Immunologie*. 4e ed. 2001, De Boeck & Larcier s.a.: Bruxelles. 595p.
72. Roitt I., Brostoff J., and Male D., eds. *IMMUNOLOGY*. 3th ed. 1993, Fiona Foley, by Mobsy: Hong Kong. 230p.
73. Kernbaum S., *Dictionnaire de Médecine*. 5e ed, ed. Médecine-Sciences. 1994, Paris: Flammarion.

74. Scherrmann J.M., *Drug delivery to brain via the blood-brain barrier*. Vascul. Pharmacol., 2002. **38**: p. 349-54.
75. Reff M.E., Hariharan K., and Braslawsky G., *Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies*. Cancer Control, 2002. **9**: p. 152-166.
76. Campbell P. and Marcus R., *Monoclonal antibody therapy for lymphoma*. Blood. Rev., 2003. **17**: p. 143-52.
77. Weir A.N.C., Nesbitt A., Chapman A.P., Popplewell A.G., Antoniow P., and Lawson A.D.G., *Formatting antibody fragments to mediate specific therapeutic functions*. Biochemical Society Transactions, 2002. **30**: p. 512-516.
78. Megarbane B., Benyamina M., and Baud F., *Immunothérapie spécifique antidigitalique*. Réanimation, 2002. **11**: p. 540-547.
79. Collier B.S., *Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions*. Thromb. Haemost., 2001. **86**: p. 427-43.
80. Mcmillin G.A., Owen W.E., Lambert T.L., De B.K., Frank E.L., Bach P.R., Annesley T.M., and Roberts W.L., *Comparable effects of DIGIBIND and DigiFab in thirteen digoxin immunoassays*. Clin. Chem., 2002. **48**: p. 1580-4.
81. Valdes R., Jr. and Jortani S.A., *Monitoring of unbound digoxin in patients treated with anti-digoxin antigen-binding fragments: a model for the future?* Clin. Chem., 1998. **44**: p. 1883-5.
82. Hardin J.S., Wessinger W.D., Proksch J.W., and Owens S.M., *Pharmacodynamics of a monoclonal antiphenacyclidine Fab with broad selectivity for phenacyclidine-like drugs*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998. **285**: p. 1113-1122.
83. Hardin J.S., Wessinger W.D., Wenger G.R., Proksch J.W., Laurenzana E.M., and Owens S.M., *A single dose of monoclonal anti-phenacyclidine IgG offers long-term reductions in phenacyclidine behavioral effects in rats*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002. **302**: p. 119-26.
84. Devys-Grosclaude A., *Etude cinétiques de vecteurs immunospécifiques radiomarqués dans un modèle in vitro de sphéroïdes multicellulaires : évaluation des techniques en deux et trois temps*, in *Faculté des Sciences et des Techniques*. 1998, Université de Nantes: Nantes. 194p.
85. Le Doussal J.M., Gruas-Guyon A., Martin M., Gautherot E., Delaage M., and Barbet J., *In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate*. J. Nucl. Med., 1989. **30**: p. 1358-1366.

86. Le Doussal J.M., Gruas-Guyon A., Martin M., Gautherot E., Delaage M., and Barbet J., *Targeting of Indium 111-Labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: imaging of tumors hosted in nude mice.* Cancer Res., 1990. **50**: p. 3445-3452.
87. Barbet J., Delaage M., and Le Doussal J.M., *Affinity enhancement immunological reagents for in vivo detection and killing of specific target cells*, in 096829. 1987, Immunotech Partners: Marseilles, FR.
88. Mitchell M.S., *Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer.* Int. Immunopharmacol., 2003. **3**: p. 1051-9.
89. Haddad R., Colevas A.D., Krane J.F., Cooper D., Glisson B., Amrein P.C., Weeks L., Costello R., and Posner M., *Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study.* Oral. Oncol., 2003. **39**: p. 724-7.
90. Sherrmann J.M., Sandouk P., Redureau M., Galons H., Hiance M., Kaplan S.A., Pouletty P., and Smith D.E., *Inhibition of cocaine brain uptake and facilitation of cocaine efflux from brain by systemic specific antibody.* Not published, 1998.
91. Takasato Y., Rapoport S.I., and Smith Q.R., *An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat.* Am. J. Physiol., 1984. **247**: p. H484-93.
92. International P., *COC-AB - Pharmacokinetics and immunoneutralisation in the beagle dog.* 2000, Drug Abuse Sciences SAS. 76p.
93. Harris J.R. and Markl J., *Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review.* Micron, 1999. **30**: p. 597-623.
94. Harlow E. and Lane D., *ANTICORPS, un manuel de laboratoire.* Editions Pradel ed. 1991, Paris: Ed Médicales Internationales. 726p.
95. Kohler G. and Milstein C., *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 1975. **256**: p. 495-7.
96. Carroll W.L., Mendel E., and Levy S., *Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcript.* Mol.Immunol., 1988. **25**: p. 991-995.
97. Duan L. and Pomerantz R.J., *Elimination of endogenous aberrant kappa chain transcripts from sp2/0- derived hybridoma cells by specific ribozyme cleavage: utility in genetic therapy of HIV-1 infections.* Nucleic Acids Res., 1994. **22**: p. 5433-5438.
98. Peters J. and Baumgarten H., eds. *Monoclonal Antibodies.* Sringer laboratory. 1992, Springer-Verlag: Berlin. 488p.
99. Rawn J., *Biochemistry.* International edition ed. 1989, Burlington: Neil Patterson Publishers. 1105p.

100. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., and Goldberg M.E., *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen- antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*. J. Immunol. Methods, 1985. **77**: p. 305-319.
101. Stevens F.J., *Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody*. Mol. Immunol., 1987. **24**: p. 1055-1060.
102. Seligman S.J., *Influence of solid-phase antigen in competition enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) on calculated antigen-antibody dissociation constants*. J. Immunol. Methods, 1994. **168**: p. 101-110.
103. Muller R., *Determination of affinity and specificity of anti-hapten antibodies by competitive radioimmunoassay*. Methods Enzymol., 1983. **92**: p. 589-601.
104. Winzor D.J., Bowles M.R., Pentel P.R., Schoof D.D., and Pond S.M., *Adaptation of the Muller method to allow quantitative characterization of the affinity and cross-reactivity of antibodies by competitive radioimmunoassay*. Mol. Immunol., 1991. **28**: p. 995-1001.
105. Malmqvist M. and Karlsson R., *Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins*. Curr. Opin. Chem. Biol., 1997. **1**: p. 378-83.
106. *BIAevaluation 3.0 Software Handbook*. 1997: Biacore AB. 226.
107. Nieba L., Krebber A., and Pluckthun A., *Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics*. Anal. Biochem., 1996. **234**: p. 155-65.
108. Loirat M.J., Gourbil A., Frioux Y., Muller J.Y., and Blanchard D., *A murine monoclonal antibody directed against the Gerbich 3 blood group antigen*. Vox Sang., 1992. **62**: p. 45-48.
109. Paula S., Tabet M.R., Keenan S.M., Welsh W.J., and Ball W.J., Jr., *Three-dimensional structure-activity relationship modeling of cocaine binding to two monoclonal antibodies by comparative molecular field analysis*. J. Mol. Biol., 2003. **325**: p. 515-30.
110. Kantak K.M., Collins S.L., Lipman E.G., Bond J., Giovanoni K., and Fox B.S., *Evaluation of anti-cocaine antibodies and a cocaine vaccine in a rat self-administration model*. Psychopharmacology (Berl), 2000. **148**: p. 251-262.
111. Larsen N.A., Zhou B., Heine A., Wirsching P., Janda K.D., and Wilson I.A., *Crystal structure of a cocaine-binding antibody*. J. Mol. Biol., 2001. **311**: p. 9-15.

112. Mason P.A., Law B., and Moffat A.C., *Amphetamine radioimmunoassay: chemical tuning of specificity*. J. Immunoassay, 1983. **4**: p. 83-98.
113. Inayama S., Tokunaga Y., Hosoya E., Nakadate T., and Niwaguchi T., *Preparation of a specific antibody to methamphetamine*. Chem. Pharm. Bull.(Tokyo), 1977. **25**: p. 838-840.
114. Moore F.M.L., Jarvie D.R., and Simpson D., *Comparaison of polyclonal and monoclonal assays for routine screening of urines for amphetamines*. Ann. Clin. Biochem., 1996: p. 78-81.
115. Choi J., Kim C., and Choi M.J., *Immunological analysis of methamphetamine antibody and its use for the detection of methamphetamine by capillary electrophoresis with laser- induced fluorescence*. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 1998. **705**: p. 277-282.
116. Byrnes-Blake K.A., Carroll F.I., Abraham P., and Owens S.M., *Generation of anti-(+)methamphetamine antibodies is not impeded by (+)methamphetamine administration during active immunization of rats*. Int. Immunopharmacol., 2001. **1**: p. 329-338.
117. Owens S.M., Carroll F.I., and Abraham P., *Monoclonal antibody anagonits for treating medical problems associated with d-amphetamine like drugs*. 2002, WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION.
118. Mcmillan D.E., Hardwick W.C., Li M., and Owens S.M., *Pharmacokinetic antagonism of (+)-methamphetamine discrimination by a low-affinity monoclonal anti-methamphetamine antibody*. Behav. Pharmacol., 2002. **13**: p. 465-73.
119. Byrnes-Blake K.A., Laurenzana E.M., Carroll F.I., Abraham P., Gentry W.B., Landes R.D., and Owens S.M., *Pharmacodynamic mechanisms of monoclonal antibody-based antagonism of (+)-methamphetamine in rats*. Eur. J. Pharmacol., 2003. **461**: p. 119-28.
120. Inayama S., Tokunaga Y., Hosoya E., Nakadate T., and Niwaguchi T., *The radioimmunoassay for methamphetamine*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1977. **25**: p. 840-842.
121. Usagawa T., Nishimura M., Uda T., and Nakahara Y., *Preparation of monoclonal antibodies against methamphetamine*. J. Immunol. Methods, 1989. **119**: p. 111-115.
122. Nam K.S., Kim J.W., Choi M.J., Han M.Y., Choe I.S., and Chung T.W., *Production and characterization of monoclonal antibody that simultaneously recognizes methamphetamine and its major metabolite*. Biol. Pharm. Bull., 1993. **16**: p. 490-492.

123. Terazawa K., Ji L.Y., Takatori T., Aoki K., Hirose Y., and Kuroiwa Y., *Development of monoclonal antibodies reactive with methamphetamine raised against a new antigen*. J. Immunoassay, 1991. **12**: p. 277-292.
124. Tokura S., Hasegawa O., Nishimura S., Nishi N., and Takatori T., *Induction of methamphetamine-specific antibody using biodegradable carboxymethyl-chitin*. Anal. Biochem., 1987. **161**: p. 117-22.
125. Nordan R.P., Pumphrey J.G., and Rudikoff S., *Purification and NH₂-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1*. J. Immunol., 1987. **139**: p. 813-817.
126. Chappey O., Debray M., Niel E., and Scherrmann J.M., *Association constants of monoclonal antibodies for hapten: heterogeneity of frequency distribution and possible relationship with hapten molecular weight*. J. Immunol. Methods, 1994. **172**: p. 219-225.
127. Pouletty P., Kusmierck J., Koralewski F., Galons H., Blanchard D., Gadjou C., and Danger Y., *New amphetamine derivatives, antibodies against them and pharmaceutical compositions containing them*, in EPO. 2002: France.
128. Tuomola M., Harpio R., Mikola H., Knuuttila P., Lindstrom M., Mikkala V.M., Matikainen M.T., and Lovgren T., *Production and characterisation of monoclonal antibodies against a very small hapten, 3-methylindole*. J. Immunol. Methods, 2000. **240**: p. 111-124.
129. Pauillac S., Naar J., Branaa P., and Chinain M., *An improved method for the production of antibodies to lipophilic carboxylic hapten using small amount of hapten-carrier conjugate*. J. Immunol. Methods, 1998. **220**: p. 105-14.
130. Faraj B.A., Israili Z.H., Kight N.E., Smissman E.E., and Pazdernik T.J., *Specificity of an antibody directed against d-methamphetamine. Studies with rigid and nonrigid analogs*. J. Med. Chem., 1976. **19**: p. 20-25.
131. Fasciglione G.F., Marini S., Bannister J.V., and Giardina B., *Hapten-carrier interactions and their role in the production of monoclonal antibodies against hydrophobic haptens*. Hybridoma, 1996. **15**: p. 1-9.
132. Moran E., O'keeffe M., O'connor R., Larkin A.M., Murphy P., and Clynes M., *Methods for generation of monoclonal antibodies to the very small drug hapten, 5-benzimidazolecarboxylic acid*. J. Immunol. Methods, 2002. **271**: p. 65-75.

133. Bankson M.G. and Cunningham K.A., *3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as a unique model of serotonin receptor function and serotonin-dopamine interactions*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001. **297**: p. 846-852.
134. Ho M. and Segre M., *Inhibition of cocaine binding to the human dopamine transporter by a single chain anti-idiotypic antibody: its cloning, expression, and functional properties*. Biochim. Biophys. Acta, 2003. **1638**: p. 257-66.
135. Houghten R.A., Wilson D.B., and Pinilla C., *Drug discovery and vaccine development using mixture-based synthetic combinatorial libraries*. Drug Discov. Today, 2000. **5**: p. 276-285.
136. Desch G. and Cano Y., *Dispositifs de dépistage urinaire des stupéfiants*. 2001, College National de Biochimie des Hôpitaux (CNBH). p. 4.
137. Hersch R.K., Crouch D.J., and Cook R.F., *Field Test of On-Site Drug Detection Devices*. 2000, National Highway Traffic Safety Administration.
138. Makkai T., *Drug Use Monitoring in Australia (DUMA) : Drug Detection Testing*. 2000, Canberra: Australian Institute of Criminology.

Production of monoclonal antibodies against cocaine, methamphetamine and derived for human clinical applications

Yannic Danger

Abstract :

The number of overdose with cocaine or methamphetamine are in constant rising. Unfortunately, no specific medical treatment for the neutralisation of neurotoxic effects of these drug are available for the emergency treatment of patient. DrugAbuse Sciences, a biotech company dedicated to the medical treatment of dependencies, has developed a series of monoclonal antibodies to address this request.

During the first part of this study, we obtained some cocaine-specific mouse monoclonal antibodies using a patented hapten. Their characterization have demonstrated their high affinity for the cocaine (in the range of 10^8M), and also with the cocaethylene, a toxic metabolite formed when drug and alcohol are taken concomitantly. The low affinity for the inactive metabolites, as the benzoylecgonine, suggest that the antibodies can be used for *in vivo* immuno neutralisation.

Six additional hapten have been generated to obtain anti-methamphetamine antibodies. The coupling strategy was designed to obtain antibodies with high affinity (close to 10^8M). However the modification of the methamphetamine by aromatic ring did not allow to obtain stable monoclonal antibodies. The stereo-selectivity of the product antibodies had been also studied by mouse immunization with racemic hapten, or with S enantiomeric hapten. We were able to demonstrate that stereo-specific hapten provoke the formation of stereo-selective antibodies, and should be preferably used.

As a conclusion, in contrast with other antibodies reported in the literature, anti-cocaine and anti-methamphetamine obtained during this study are very good candidates for neutralisation of drugs within blood flow. Their potency should now be further investigated in animals with the goal to demonstrate their true ability to neutralise *in vivo* the drugs.

Keyword :

Monoclonal antibodies – Cocaine – Methamphetamine – antigen / antibody affinity

Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la cocaïne, la méthamphétamine et leurs dérivés pour utilisation en clinique humaine

Yannic Danger

Résumé :

Le nombre d'intoxications aiguës à la cocaïne ou à la méthamphétamine est en constante augmentation. Parallèlement, aucune médication spécifique capable de neutraliser les effets neurotoxiques de ces drogues n'est actuellement disponible pour traiter les patients admis dans les services d'urgence. La société DrugAbuse Sciences, spécialisée dans le traitement des dépendances, a entrepris le développement d'anticorps monoclonaux capables de neutraliser *in vivo* les substances toxiques, avec l'objectif d'utilisation chez l'homme dans les cas d'overdoses.

La première partie de ce travail a permis d'obtenir des anticorps monoclonaux murins spécifique de la cocaïne à partir d'un haptène breveté. Leur caractérisation a démontré leur forte affinité pour la cocaïne (de l'ordre de 10^8 M), mais également pour la coca-éthylène, composé plus toxique formé lors de l'ingestion de drogue et d'alcool. Les affinités pour les métabolites inactifs, tel que la benzoylecgonine, se sont révélées faibles, propriétés compatibles avec une utilisation thérapeutique.

Six haptènes ont été générés pour l'obtention d'anti-méthamphétamine. La stratégie de couplage par la fonction amine a permis d'obtenir des anticorps d'affinité élevée (proche de 10^8 M), alors que celle consistant à modifier la méthamphétamine au niveau du noyau aromatique n'a pas abouti à l'obtention d'anticorps monoclonaux stables. La stéréo-sélectivité des anticorps produits a également été étudiée en immunisant des souris soit avec des haptènes racémiques, soit avec des haptènes énantiomériquement purs de forme S. L'utilisation de ces derniers augmente les chances d'obtenir des anticorps dirigées contre la S-méthamphétamine, forme la plus toxique.

En conclusion, les propriétés des anticorps anti-cocaïne et anti-méthamphétamine produits au cours de cette thèse semblent compatibles avec l'objectif de neutralisation des drogues dans la circulation sanguine, et certains pourraient être de bons candidats pour mener des tests chez l'animal.

Mots-clés :

Anticorps monoclonaux – Cocaïne – Méthamphétamine – Affinité antigène/anticorps