

Biochimie  
Mme Botti et Mme Tchillian  
Le 22/10/07  
Defresne Diane

**TD N° 3 DE BIOCHIMIE**  
**LES ANTICORPS 2**

# DOMAINE D'UTILISATION DES ANTICORPS IN VITRO ET IN VIVO

## **B) Utilisation des Anticorps in vitro**

- dosages Elisa (enzyme linked immunosorbent assay) :  
indirect et  
sandwich
- Western blot

## **C) Utilisation des anticorps in vivo**

- a. Limit d'utilisation des ACM murins
  - b. Ingénierie des anticorps
  - c. domaines d'utilisation des ACM, recombinaison in vivo
- IV. exemple de thérapie ciblée avec des ACM humanisés en oncologie (cancer du sein)
- approche anti-récepteur HER2
  - approche anti-Antigénique

## Rappel :

Dans la structure de base d'un anticorps il y a trois particularités :

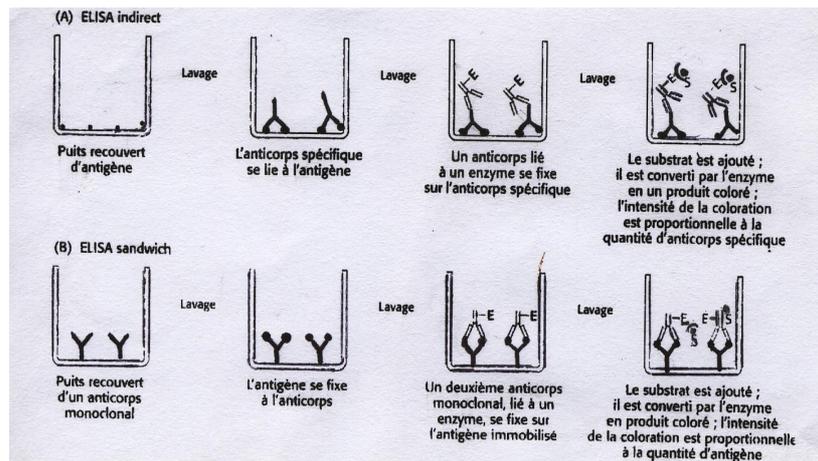
- la fonction de reconnaissance avec le déterminant antigénique au niveau des zones hypervariables (séquence très spécifique de chaque épitope) ces régions sont appelées plus couramment des CDRs
- La fonction effectrice est révélée lors de l'association du complexe anticorps/antigène. Elle permet la phagocytose, l'activation du complément ou, la cytotoxicité cellulaire. Cette fonction effectrice est portée par les deux domaines en c-terminal des deux chaînes lourdes qui correspondent au fragment Fc
- Réponse polyclonale est une réponse physiologique, car les antigènes possèdent toujours plusieurs épitopes pour chaque épitopes s'associe un anticorps spécifique. Une réponse monoclonale a toujours une réponse maligne. C'est un lymphocyte qui hyper-prolifère par rapport aux autres, ce qui entraîne une hypersécrétion d'un seul anticorps que l'on appelle anticorps monoclonaux

### A. Utilisation des anticorps in vitro

Réaction Anticorps/Antigène est très spécifique. Cette spécificité est utilisée pour élaborer plusieurs techniques :

- soit pour la recherche de la présence d'un anticorps
- soit pour la recherche de la présence d'un antigène

#### a. Dosage Elisa



Le dosage Elisa permet de détecter puis de doser toutes molécules à l'état de traces, à condition de disposer d'anticorps, généralement monoclonaux, spécifique à cette molécule. Les anticorps monoclonaux peuvent provenir d'animaux. Le complexe formé étant à l'état de trace, on procède à un marquage enzymatique pour le visualiser.

Il existe 2 méthodes :

indirecte : c'est un immuno-dosage qui permet de détecter et de doser un anticorps  
sandwich : c'est un immuno-dosage qui permet de détecter et de doser un antigène

- **Indirect :**

Protocole :

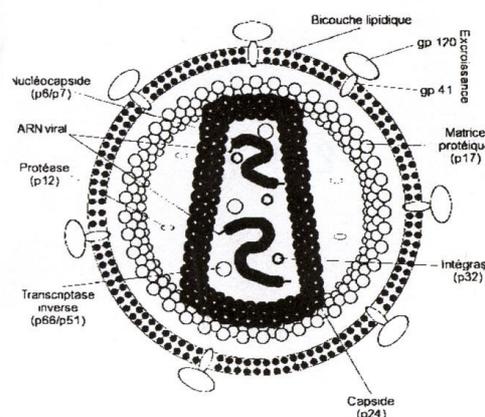
1. On met au fond d'un puits un antigène ou une solution antigénique spécifique de l'anticorps qui nous intéresse.
2. On procède à un lavage qui va permettre éliminer l'antigène non fixé au fond du puits.
3. On ajoute l'anticorps spécifique de l'antigène, on a alors formation d'un complexe anticorps/antigène non visualisable.
4. Un 2<sup>ème</sup> lavage élimine tous ce qui n'a pas été fixé sur l'antigène.
5. Ajout d'un deuxième anticorps appelé anticorps secondaire, qui est spécifique d'un déterminant qui est présent sur la partie constante des chaînes lourdes du 1<sup>er</sup> anticorps. Ce 2<sup>nd</sup> anticorps va être affublé d'un marquage enzymatique.
6. On procède à un 3<sup>ème</sup> lavage pour enlever tous anticorps 2<sup>nd</sup> non fixé
7. Ajout du substrat spécifique de l'enzyme présent sur le 2<sup>nd</sup> anticorps. Ce substrat n'est pas en lui-même coloré mais au moment où le substrat se fixe sur le site actif de l'enzyme, la solution se colore

L'intensité de la coloration sera fonction de la quantité de complexe formé, on parle de dosage quantitatif.

Pour le chercheur l'anticorps utilisé sera par exemple le sérum de l'individu, et l'antigène est un virus qui a contaminé ce sujet

Application de l'Elisa indirecte :

Pour le dépistage du SIDA on utilise comme antigène le virus VIH, ce virus est un rétrovirus, c'est à dire que son matériel génétique est de l'ARN. Ce virus va ainsi pouvoir incorporer son matériel génétique dans l'ADN grâce à la transcriptase inverse qui va convertir l'ARN du virus en ADN.



Un rétrovirus est constitué d'une enveloppe et d'une nucléocapside qui contient le matériel génétique du VIH. On retrouve sur l'enveloppe certaine protéine comme la gp120 et la gp41, ainsi que sur la nucléocapside tel que la protéine p24.

Si un rétrovirus infecte l'organisme humain, ce dernier va réagir contre toutes les protéines présentes dans la structure du rétrovirus en reconnaissant les zones immunogènes de celles-ci. Le virus du VIH a des protéines membranaires qui lui sont spécifiques mais certaines protéines ne le sont pas comme par exemple les protéases, les intégrases, et les transcriptases inverses. Lors d'un dépistage d'un rétrovirus donné, on peut donc avoir des réactions croisées avec un autre rétrovirus, puisque la spécificité anticorps/antigène n'est pas absolue (on peut donc avoir de faux positif).

Au fond du puits je vais mettre toutes les protéines virales du rétrovirus (les protéines enzymatiques, les protéines de la matrice, les glycoprotéines de l'enveloppe, les protéines de la nucléocapside). Ensuite l'anticorps déposé va correspondre à l'échantillon sanguin du patient. Si l'individu est infecté, son sang possédera les anticorps spécifiques au rétrovirus donc on aura formation d'un complexe antigène/ anticorps et la solution aura changée de couleur. Mais comme deux antigènes différents peuvent avoir un épitope en commun donc on procède toujours deux tests Elisa:

- Si les doubles tests donnent un seul résultat positif on refait un test si les deux sont positifs on soumet l'échantillon sanguin à un autre test.
- si un sujet est négatif il faut se méfier du résultat car tout dépend du moment où il a été infecté, en effet les anticorps n'apparaissent qu'après la 6<sup>ème</sup> semaine

Autre méthode de dépistage des primo-infections : recherche la présence protéine p24

- **Sandwich :**

Le dosage sandwich ne peut se faire qu'à condition que la molécule antigénique doit comporter deux déterminants antigéniques pour lesquels on dispose d'anticorps monoclonaux spécifiques.

Protocole :

Le puits est recouvert d'un anticorps monoclonal et se trouve en excès

1<sup>er</sup> lavage pour éliminer les anticorps non fixés

On dépose notre antigène ou notre solution antigénique, s'il y a reconnaissance, le complexe anticorps/antigène apparaît

Ajout du 2<sup>nd</sup> anticorps monoclonal qui lui est en excès, marqué et spécifique d'un épitope différent du premier. L'antigène dans ce dosage est ainsi pris en sandwich entre deux anticorps monoclonaux.

Ajout un substrat. On observera une coloration de la solution si les deux complexes antigène/anticorps se sont formés

L'intensité de la coloration sera fonction de la quantité d'antigènes présents

Ces immuno-dosages sont utilisés pour détecter :

- des marqueurs tumoraux,
- des isoenzymes pour rechercher l'évolution d'un infarctus,
- des hormones,
- des vitamines,
- de stupéfiants,

- d'anticorps bactérien, viraux ...

Tous Elisa positif doit être vérifié par une autre méthode : le Western blot

### **b. Western blot**

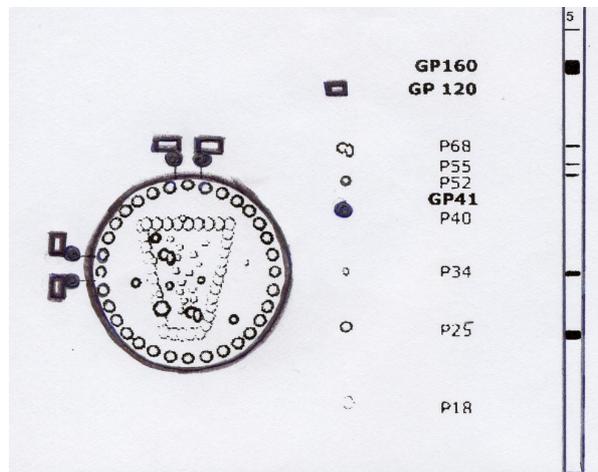
#### Protocole :

Le Western blot consiste à séparer des protéines sur un gel de polyacrylamide (PAG). La migration sur ce gel se fait en présence de SDS qui est un agent dénaturant et en présence de  $\beta$  mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures. Ces protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire. Puis on réalise un transfert sur un feuillet de nitrocellulose sous l'action d'un courant électrique. Ensuite on déposera sur le feuillet des anticorps secondaires qui seront marqués par fluorescence ou, par radioactivité ou, enzymatiquement. Ce test révélera ainsi les protéines qui auront une affinité particulière pour ces anticorps marqués.

#### Application :

- Dépôt de toutes les protéines du rétrovirus sur le gel PAG
- Migration selon leur poids moléculaire
- Dépôt d'anticorps primaire ou de la formule sanguine d'un patient détecté positif
- Dépôt des 2<sup>nd</sup> anticorps marqués spécifiques de la partie constante des 1<sup>er</sup> anticorps

Ce test permet de révéler la relation entre les protéines du rétrovirus et les anticorps du donneur



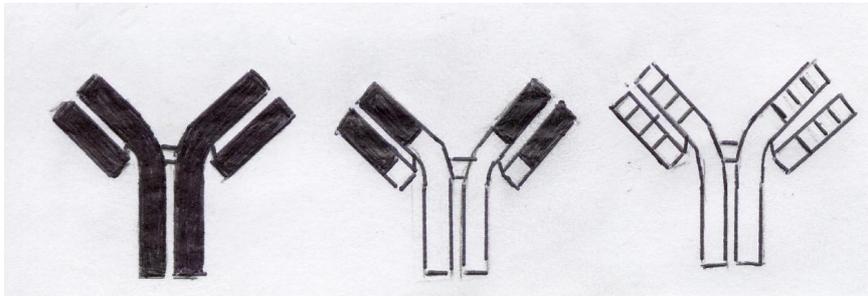
On déclare que le test ELISA est positif si en Western blot on a au moins deux bandes correspondant à deux glycoprotéines différentes présentes sur l'enveloppe et s'il y a au moins une bande correspondant à une protéine interne du rétrovirus, ex : protéine p25. Si on observe qu'une seule bande l'individu est un faux positif.

L'intensité de la coloration est lue par électrophotomètre.

Elisa donne un résultat global sans préciser sur quelle protéine s'est fixé anticorps par contre le western blot indique que l'individu possède des anticorps contre une certaine protéine. Malgré que ce dernier soit très efficace il est peut utiliser puisqu'il est très coûteux. Pour les dons du sang on ne fait qu'un seul Elisa faute de moyen.

# 1. Utilisation des anticorps in vivo

## I. Limite d'utilisation des ACM murins



Les anticorps monoclonaux sont en général fabriqués par des animaux : les rats ou les souris. Si on injecte des anticorps monoclonaux d'origine murin à l'homme, cette injection déclenche une réaction de HAMA, c'est à dire que l'organisme humain va fabriquer des anticorps contre les anticorps murins, car il reconnaît comme étranger cet anticorps murin. Ainsi les anticorps murins sont éliminés de l'organisme. Un anticorps peut donc être un antigène vis à vis d'une autre espèce étant donné qu'on trouve des déterminants antigéniques aussi bien sur la partie constante que sur la partie variable. De plus ces anticorps murins n'ont pas une fonction effectrice Fc identique à celle des anticorps humains, donc les anticorps murins auront du mal à se fixer sur les récepteurs du fragment Fc. L'utilisation des anticorps murins n'est donc pas faisable chez l'homme.

## II. Ingénierie des anticorps

On va donc utiliser la technique des hybridomes pour faire des anticorps monoclonaux humains. Théorique c'est possible mais dans la pratique on ne peut pas injecter n'importe quoi à un homme, de plus les hybridomes ne sont pas stables chez l'homme. Cependant en 1986 on a utilisé des anticorps monoclonaux murins pour tous mécanismes de rejet de greffe.

Grâce à l'essor de la technologie, on a été capable de modifier les anticorps monoclonaux murins en construisant des gènes qui étaient capables de synthétiser des anticorps recombinants dans lequel la partie constante venait d'une espèce et la partie variable d'une autre espèce. On a réalisé des combinaisons d'anticorps dans le but de supprimer le plus possible la réponse HAMA.

Les premiers anticorps recombinants sont les anticorps chimériques, où la partie variable humaine a été remplacée par celle d'origine murine. Ces anticorps sont donc 70% humain et 30% murin, cependant la réponse HAMA est encore présente.

D'autres anticorps recombinants ont été synthétisés : les anticorps humanisés. Chez ceux-ci au lieu de greffer la partie variable on ne va y incorporer que les parties hypervariables (CDR) d'origine murines. Moins de 10% de ces anticorps est d'origine murine. Par conséquent la réaction HAMA est très affaiblie et la réponse effectrice est

optimisée, elle correspond à une réponse effectrice de type humain. Donc ces anticorps sont efficaces.

Il existe aussi des anticorps monoclonaux humains, mais ils sont rarement utilisés. Pour les fabriquer on fait appel à des animaux transgéniques, chez qui on a supprimé tous leurs gènes Ig et on les a remplacés par de gènes Ig humains, mais c'est une technologie rare.

Chaque anticorps monoclonal a un nom générique, ce dernier nous indiquant son mécanisme de fabrication. Si cet anticorps se termine par :

- MOMAB : totalement murin
- XIMAB : chimérique
- ZUMAB : humanisé, ex : Trastuzumab, Bevacizumab (utilisée contre le cancer du sein)
- MUMAB : humanisé

### **III. Domaine d'utilisation des ACM, recombinants in vivo**

Dans une pathologie il est très important d'identifier une cible pour que les anticorps monoclonaux y agissent en tant que médicament. Les anticorps humanisés sont utilisés dans les traitements :

- D'imagerie médicale pour les diagnostics de tumeur à un stade relativement précoce
- D'immunoradiothérapie : on va cibler la douleur en mettant le composé radioactif sur l'anticorps monoclonal et ce dernier va servir de transporteur spécifique
- De rhumatologie
- De transplantation d'organes
- D'infectiologie
- De cardiologie
- D'allergologie, dans les asthmes sévères
- D'oncologie, notamment dans les cancers du sein

(Ce qui est au-dessus n'est pas à savoir)

L'approche par l'immunothérapie est de plus en plus rependue dans les traitements des cancers, mais elle se fera toujours en association avec la chimiothérapie.

### **IV. Exemple de thérapie ciblée avec des ACM humanisés en oncologie (cancer du sein)**

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, c'est la première cause de mortalité dans les pays occidentaux avant 65ans. Il est en progression constante, mais heureusement on en meurt moins car il y a des dépistages et de nouveaux traitements. Tous les cancers du sein ne sont pas traitables par les anticorps monoclonaux, ex : les cancers du sein di-hormonaux sont traités d'une autre façon. 20 à 30% des cancers du sein sont particulièrement agressif et surtout ils évoluent très souvent vers une situation métastatique. Ces cancers sont nommés HER2 + (HER: human epidermal growth factor receptor).

Chez les femmes atteintes de ces cancers, l'un des facteurs de croissance est surexprimé. Le récepteur de ce facteur de croissance est codé par le gène HER2 (ou erbB2 ou

HER2/neu) situé sur le chromosome 17. HER2 est aussi appelé erbB2 puisqu'il a une homologie avec le gène erbB2 qui est le virus de la grippe aviaire, ou HER2/neu car il a une homologie avec un gène du neuroblastome chez le rat.

Le récepteur HER2 fait partie de la famille de 4 récepteurs :

- HER1 qui a pour ligand le facteur EGF : facteur de croissance épidermique
- HER2 dont on ne connaît pas le ligand, c'est un récepteur orphelin
- HER 3  
ont pour ligand des facteurs de différenciations
- HER4

### **Mode d'action :**

Lors que le ligand se fixe sur son récepteur, celui-ci se dimérise puis on observe une autophosphorylation de son domaine intracellulaire. Seul HER3 ne subit pas de phosphorylations car il n'a pas de domaine intracellulaire. L'autophosphorylation va entraîner une cascade de signalisation :

- cascade des MAP kinases ou,
- cascade de la PI3 Kinase

Cette cascade va aboutir à la transcription de gènes dans le noyau qui vont être traduits en protéines, celles-ci vont intervenir à différents niveaux :

- survie de la cellule
- prolifération cellulaire
- de la mobilité de la cellule
- du processus d'invasion des autres tissus, ex : la production du facteur VEGF qui est un facteur angiogénique indispensable pour la création de nouveaux vaisseaux

Le partenaire préférentiel pour la dimérisation, c'est HER2 avec les 3 autres récepteurs, on parle d'hétéro-dimérisation.

Un signal extracellulaire qui s'exprime de façon continue, du à une surexpression de HER2, peut engendrer une transformation maligne notamment de type mammaire.

Cette amplification se résume à deux causes :

- Surexpression protéique
- Intoxication génique

Pour repérer si un cancer du sein HER2+, on va devoir détecter par :

- L'immunohistochimie détecte les protéines récepteurs surexprimés ou,
  - L'hybridation de l'ADN : FISH qui détecte l'amplification génique de HER2
- (Ce qui est au-dessus n'est pas à savoir)

HER2 est une cible idéale pour les anticorps monoclonaux, notamment pour le Trastuzumab (nom générique) ou l'Herceptine (nom commercial) qui est humanisé à 95%. Celui-ci se fixe sur la partie extracellulaire du récepteur HER2 ainsi toute dimérisation est impossible, donc pas de conduction de signal. Le fait que l'anticorps humanisé soit fixé, on a une augmentation de l'internalisation et de la dégradation du récepteur. S'il n'y a pas de signal il n'y a pas de facteur angiogénique produit donc on empêche le mécanisme de l'angiogénèse.

La fonction Fc des anticorps humanisés peut venir se fixer sur le récepteur Fc des cellules cytotoxiques et induire une cytotoxicité.

### **Quelques dates :**

**2000** : l'utilisation du traitement par des anticorps monoclonaux humanisés a été faite pour des cancers du sein en condition métastatique, ça a renforcé l'efficacité de la chimiothérapie.

**2006** : l'utilisation de ce traitement pour les cancers du sein HER2 pour les situations précoces. On observe des résultats surprenant de survie globale et sans rechute.

Pour certain individu il y aurait une cardiotoxicité donc les femmes présentant un risque cardiaque ne suivront pas ce traitement.

### **Autre méthode :**

- Inhibiteurs des tyrosines kinases, on va ainsi bloquer l'autophosphorylation. Ce traitement est utilisé sur des femmes résistantes à l'Herceptine
- blocage de l'angiogenèse : en asphyxiant la tumeur pour qu'il ne reçoive plus d'apport en oxygènes et en nutriments, et en synthétisant des anticorps monoclonaux anti-angiogénique : l'Avastine (nom commercial) ou le Bevacizumab (nom générique) qui aura pour cible le facteur VEGF

### **Ce traitement a été homologué :**

En 2005 pour les cancers colorectal

En 2006 pour les cancers des poumons

En avril 2007 pour les cancers du sein métastatique

Actuellement il traite l'efficacité et la tolérance de Avastine vis à vis des cancers du sein a un stade précoce

(Ce qui est au-dessus n'est pas à savoir)

