



**HAL**  
open science

# Isolement de fragments d'anticorps recombinants neutralisant des toxines à partir de primates non humains et localisation de l'épitope d'un anticorps.

Arnaud Avril

► **To cite this version:**

Arnaud Avril. Isolement de fragments d'anticorps recombinants neutralisant des toxines à partir de primates non humains et localisation de l'épitope d'un anticorps.. Bactériologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT: 2013GRENV044 . tel-01557496

**HAL Id: tel-01557496**

**<https://theses.hal.science/tel-01557496>**

Submitted on 6 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie-immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Arnaud AVRIL**

Thèse dirigée par le **Dr. Jacques MATHIEU**

préparée au sein de l'**Unité de Biotechnologie des Anticorps de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

# **Isolement de fragments d'anticorps recombinants neutralisant des toxines à partir de primates non humains et localisation de l'épitope d'un anticorps.**

Thèse soutenue publiquement le **16 septembre 2013**,  
devant le jury composé de :

**M. Bertrand TOUSSAINT**

PUPH, Chef de groupe, UJF, La Tronche (Examinateur, Président)

**M. Michel POPOFF**

Dr., Chef de laboratoire, Institut Pasteur, Paris (Rapporteur)

**M. Philippe BILLIALD**

PR1, Chef d'équipe, EA4530, Paris (Rapporteur)

**M. Philippe THULLIER**

Chef d'unité, IRBA, La Tronche (Examinateur, encadrant)





# Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Messieurs Michel POPOFF, Philippe BILLIALD et Bertrand TOUSSAINT ainsi que Madame Emmanuelle VIGNE pour avoir accepté me mettre leurs connaissances au profit de l'évaluation de mes travaux de thèse.

Je tiens aussi à remercier :

Bertrand TOUSSAINT et Jean-Nicolas TOURNIER pour avoir été membres de mon comité de suivi de thèse.

Jacques MATHIEU pour m'avoir accueilli au sein du département de microbiologie et pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Philippe THULLIER pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de biotechnologie des anticorps.

Thibaut PELAT pour m'avoir accompagné tout au long de la thèse, tant lors des expérimentations que lors de la rédaction.

Mes remerciements vont bien sûr à ma famille et mes amis qui m'ont soutenu durant ces trois ans, qui ont su être toujours présents à mes côtés

Parmi les personnes que je tiens à remercier plus particulièrement il y a Dan, Kev, Charlène, Estelle, Siham, Delbey, Jeff, Aurélie et l'ensemble des VSSA du "caso".

J'aurais beaucoup de mal à faire une liste exhaustive de l'ensemble des personnes qui ont de près ou de loin contribué à la réussite du projet, scientifiquement et humainement, c'est pourquoi je tiens à remercier toutes les personnes qui n'auraient pas été citées ici mais qui l'auraient tout autant mérité.





*Ars longa, vita brevis*



# Table des matières

Liste des figures et tableaux .....	11
Glossaire.....	13
Préface.....	18
Introduction bibliographique.....	21
<b>1) Les anticorps .....</b>	<b>24</b>
1.1) Historique de la découverte des anticorps .....	24
1.2) Structure .....	26
1.2.1) La structure des anticorps.....	26
1.2.2) Les différentes classes d'anticorps.....	29
1.2.2.1) Les IgG .....	29
1.2.2.2) Les IgA .....	30
1.2.2.3) Les IgM .....	31
1.2.2.4) Les IgE .....	32
1.2.2.5) Les IgD .....	32
1.2.3) Fragments d'anticorps.....	33
1.3) Fonctions des anticorps .....	36
1.3.1) L'interaction anticorps/antigène .....	36
1.3.2) Les fonctions effectrices.....	39
1.3.2.1) L'activation de la voie du complément .....	39
1.3.2.2) Activation de la phagocytose par les anticorps (opsonisation) .....	40
1.3.2.3) La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.....	41
1.3.2.4) Récepteur Fc néonatal .....	42
1.4) Synthèse des anticorps .....	44
1.4.1) Génétique et diversité des anticorps .....	44
1.4.2) Diversité due aux réarrangements V-(D)-J.....	48
1.4.3) La flexibilité jonctionnelle .....	51
1.4.4) L'addition de nucléotides N et P .....	52
1.4.5) L'association combinatoire des chaînes légères et lourdes .....	54
1.4.6) L'hypermutation somatique .....	55
1.4.7) La commutation isotypique.....	59
<b>2) Biotechnologies des anticorps .....</b>	<b>62</b>
2.1) Historique de la sérothérapie .....	62
2.2) Les anticorps monoclonaux conventionnels : technologie des hybridomes .....	63
2.2) Les anticorps recombinants .....	70
2.2.1) Les différentes générations d'anticorps recombinants et leurs différentes spécificités.....	70
2.2.2) La 1 <sup>ère</sup> génération d'anticorps : les anticorps chimériques.....	72
2.2.3) La 2 <sup>ème</sup> génération d'anticorps : les anticorps humanisés .....	73
2.2.4) La 3 <sup>ème</sup> génération d'anticorps : les anticorps humains.....	79
2.2.4.1) Les souris transgéniques.....	79
2.2.4.2) Les technologies d'exposition de fragments d'anticorps.....	82
2.2.4.2.1) Les différents types de banques .....	82
2.2.4.2.1.1) Les banques naïves issues de lymphocytes B .....	82
2.2.4.2.1.2) Les banques naïves (semi-)synthétiques .....	83
2.2.4.2.1.3) Les banques immunes .....	84
2.2.4.2.1.4) Clonage et emballage des banques .....	85
2.2.4.2.2) La technologie d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages .....	86

2.2.4.2.2.1) Le phage M13 .....	86
2.2.4.2.2.2) Expression de protéines à la surface des phages .....	87
2.2.4.2.2.3) Déroulement du criblage .....	91
2.2.4.2.2.4) Limites de la technique d'exposition à la surface des phages .....	93
2.2.4.2.3) Les autres techniques d'exposition de fragments d'anticorps .....	94
2.2.4.2.3.1) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des levures .....	94
2.2.4.2.3.2) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des cellules de mammifères .....	96
2.2.4.2.3.3) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des cellules bactériennes .....	97
2.2.4.2.3.4) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des ribosomes .....	99
2.2.4.3) Technique utilisée dans notre laboratoire .....	100
2.3) Les anticorps de primates non-humains .....	101
2.3.1) Proximité entre les anticorps de primates et les anticorps humains .....	101
2.3.2) Limitations juridiques restreignant l'utilisation des anticorps de macaques .....	105
2.4) Les épitopes .....	106
2.4.1) Les épitopes T et les épitopes B .....	106
2.4.2) Localisation des épitopes T .....	109
2.4.3) Localisation de l'épitope d'un anticorps .....	109
2.4.3.1) Localisation des épitopes linéaires .....	110
2.4.3.2) Localisation des épitopes conformationnels .....	112
2.4.3.3) Compétition pour un même épitope .....	113
2.5) Ingénierie des anticorps .....	114
2.5.1) Les protéines similaires aux anticorps humains .....	114
2.5.2) Biodistribution des fragments d'anticorps .....	117
2.5.2.1) Influence du masse moléculaire sur la biodistribution .....	118
2.5.2.2) Approches permettant le ciblage du compartiment intracellulaire .....	119
2.5.2.3) Application de la biodistribution à l'imagerie .....	120
2.5.3) Maturation d'affinité .....	121
2.5.4) Ingénierie de la région Fc .....	124
2.5.4.1) Demi-vie et pharmacocinétique .....	124
2.5.4.2) Optimisation de l'activation du complément .....	127
2.5.4.3) Optimisation de l'activation de l'ADCC .....	128
2.5.4.4) Les anticorps bispécifiques .....	130
2.5.5) Utilisation des anticorps comme vecteurs thérapeutiques .....	136
<b>3) Le risque biologique provoqué .....</b>	<b>141</b>
3.1) Définitions .....	141
3.2) Historique .....	141
3.2.1) Les débuts du risque biologique provoqué .....	141
3.2.2) Les programmes de développement d'armes biologiques .....	143
3.2.2.1) Le programme français .....	144
3.2.2.2) Le programme soviétique .....	144
3.2.2.3) Le programme japonais .....	145
3.2.2.4) Le programme américain .....	147
3.2.2.5) Le programme irakien .....	147
3.2.2.6) Le programme anglais .....	148
3.2.2.7) Le programme sud-africain .....	149
3.2.3) Les conventions de non prolifération des armes biologiques .....	149
3.3) Classification actuelle des agents du risque biologique provoqué .....	151
3.4) Les menaces actuelles .....	153
<b>4) Le botulisme .....</b>	<b>162</b>
4.1) Généralité .....	162
4.1.1) Présentation générale du botulisme .....	162
4.1.2) Découverte du botulisme .....	162
4.2) Le pathogène : Clostridium botulinum .....	164
4.2.1) Diversité et classification .....	165

4.2.1.1) Classification physiologique historique.....	165
4.2.1.2) Classification génétique actuelle.....	167
4.2.2) Répartition géographique.....	169
4.3) Structure et fonction des toxines botuliques.....	170
4.3.1) Structure et fonction.....	170
4.3.2) Mécanismes d'action.....	175
4.3.2.1) Franchissement de la barrière intestinale.....	175
4.3.2.2) Reconnaissance des motoneurons et pénétration cellulaire.....	177
4.3.2.3) Endocytose.....	179
4.3.2.4) Translocation de la toxine dans le cytosol.....	179
4.3.2.5) Clivage des protéines cible.....	181
4.4) La maladie.....	183
4.4.1) Tableau clinique.....	183
4.4.2) Les différentes formes de botulisme.....	184
4.4.2.1) Le botulisme alimentaire.....	184
4.4.2.2) Le botulisme par infection et colonisation d'une blessure.....	186
4.4.2.3) Le botulisme infantile.....	186
4.4.2.4) Autres formes de botulisme humain.....	187
4.4.2.5) Cas vétérinaires.....	188
4.4.3) Epidémiologie.....	188
4.5) Cas particulier des toxines botuliques comme agent du bioterrorisme.....	189
4.6) Diagnostic clinique et dosage de la toxine botulique.....	192
4.6.1) Les tests in vivo.....	193
4.6.2) Les tests in vitro.....	194
4.7) Usage thérapeutique des toxines botuliques.....	196
4.7.1) Historique.....	196
4.7.2) Utilisation actuelle et limites.....	197
4.8) Traitement et prophylaxie du botulisme.....	198
4.8.1) La vaccination.....	198
4.8.2) La sérothérapie.....	200
4.8.3) Les anticorps neutralisants monoclonaux.....	202
4.8.3.1) Neutralisation de BoNT/A.....	202
4.8.3.2) Neutralisation de BoNT/B.....	205
4.8.3.3) Neutralisation de BoNT/E.....	206
4.8.4) Les inhibiteurs synthétiques.....	207
<b>Résultats.....</b>	<b>209</b>
Introduction générales aux travaux expérimentaux.....	210
<b>Article 1</b> : Isolement d'anticorps thérapeutiques à partir de primates non-humains.....	<b>212</b>
Préambule aux articles 2 et 3 et au projet d'article 4 : isolement de fragments d'anticorps neutralisant les toxines botuliques A, B et E dans le cadre du projet européen AntiBotABE.....	215
<b>Article 2</b> : Isolement de quatre scFv neutralisant la toxine botulique A en ciblant sa chaîne légère.....	<b>219</b>
<b>Article 3</b> : Isolement de quatre scFv neutralisant la toxine botulique E en ciblant sa chaîne légère.....	<b>222</b>
<b>Projet d'article en premier auteur</b> : Isolement d'un scFv neutralisant les sérotypes 1 et 2 de la toxine botulique A en ciblant sa chaîne lourde.....	<b>227</b>
<b>Article 5</b> : Localisation de l'épitope d'un fragment d'anticorps (scFv) neutralisant la toxine létale du bacille du charbon, dirigée contre LF mais réagissant aussi avec EF.....	<b>233</b>
<b>6) Perspectives et conclusion générale.....</b>	<b>238</b>
6.1) Contexte dans lesquels s'inscrivent mes travaux de thèse.....	238
6.1.1) La situation française.....	238
6.1.2) Contexte juridique.....	239
6.1.3) Contexte scientifique.....	241
6.2) Perspectives découlant des innovations apportées pendant mes travaux de thèse.....	242
6.2.1) Isolement d'anticorps à large spectre thérapeutique.....	242
6.2.2) Criblage des banques d'anticorps vis à vis d'un mélange de protéines.....	243

6.2.3) Production d'un nombre limité de scFv représentatifs de la diversité de l'ensemble des séquences	244
6.3) Perspectives à plus long terme	245
6.3.1) Identification et optimisation des mécanismes d'élimination des complexes anticorps-toxine .....	245
6.3.2) Allongement de la fenêtre thérapeutique.....	245
6.3.3) Localisation de l'épitope des anticorps isolés .....	246
6.3.4) Développement cliniques des anticorps isolés .....	248
6.3) Conclusion générale des travaux de thèse	251
<b>Annexes.....</b>	<b>253</b>
Article de revue : Développement d'anticorps dirigés contre les toxines du risque biologique provoqué .....	<b>254</b>
Présentations orales : .....	<b>259</b>
Communications affichées : .....	<b>259</b>
<b>Références.....</b>	<b>260</b>

# Liste des figures et tableaux

## Figures :

---

<b>Figure 1</b> : Profil électrophorétique des protéines sériques.	24
<b>Figure 2</b> : Représentation bioinformatique de la structure d'anticorps.	27
<b>Figure 3</b> : Représentation tridimensionnelle d'un anticorps.	27
<b>Figure 4</b> : Reconnaissance simultanée de deux antigènes identiques par une IgG.	30
<b>Figure 5</b> : Sécrétion des IgA.	31
<b>Figure 6</b> : Les principaux fragments d'anticorps.	36
<b>Figure 7</b> : Mesure de l'affinité.	37
<b>Figure 8</b> : Formation de complexes immuns.	38
<b>Figure 9</b> : Activation de la voie classique du complément.	40
<b>Figure 10</b> : Augmentation opsonine-dépendante de la phagocytose.	41
<b>Figure 11</b> : Recyclage des IgG et transfert de l'immunité passive au nourrisson.	44
<b>Figure 12</b> : Théorie de la chaîne latérale d'Ehrlich.	45
<b>Figure 13</b> : Théorie instructionniste telle que développée par Pauling.	46
<b>Figure 14</b> : Théorie de la sélection clonale développée par MacBurnet.	47
<b>Figure 15</b> : Différenciation des lymphocytes B.	49
<b>Figure 16</b> : Emplacement des séquences RSS dans au niveau des segments géniques.	51
<b>Figure 17</b> : Principe du mécanisme de flexibilité jonctionnelle.	52
<b>Figure 18</b> : Ajout des nucléotides P et N.	53
<b>Figure 19</b> : Phénomène d'exclusion allélique.	55
<b>Figure 20</b> : Désamination des nucléotides catalysée par l'AID.	56
<b>Figure 21</b> : Mutations induite par l'AID.	57
<b>Figure 22</b> : Répartition des hypermutations somatiques.	58
<b>Figure 23</b> : Mécanisme de commutation isotypique.	60
<b>Figure 24</b> : Production d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes.	66
<b>Figure 25</b> : Pression de sélection exercée par le milieu HAT sur les cellules.	67
<b>Figure 26</b> : Liste des anticorps monoclonaux murins disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.	70
<b>Figure 27</b> : Les différentes générations d'anticorps monoclonaux.	71
<b>Figure 28</b> : Liste des anticorps chimériques disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.	73
<b>Figure 29</b> : Principe de la germination.	76
<b>Figure 30</b> : Germination du Fab 35PA <sub>83</sub> .	76
<b>Figure 31</b> : Liste des anticorps humanisés disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.	79
<b>Figure 32</b> : Liste des anticorps humains disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.	82
<b>Figure 33</b> : Phage M13.	87
<b>Figure 34</b> : Carte du phagemide pHAL14.	90
<b>Figure 35</b> : Expression d'un fragment d'anticorps à la surface d'une levure.	96
<b>Figure 36</b> : Principe de la technique APEX.	98
<b>Figure 37</b> : Principe de la technique d'exposition à la surface des ribosomes.	100
<b>Figure 38</b> : Formule du H-score et du G-score.	102
<b>Figure 39</b> : Explication schématique du G-score et du H-score.	103
<b>Figure 40</b> : Apprêtement des antigènes et expression à la surface cellulaire après association aux molécules du CMH.	108
<b>Figure 41</b> : Présentation de l'antigène et activation des lymphocytes.	108
<b>Figure 42</b> : Les Affibody®.	115
<b>Figure 43</b> : Les DARPin.	116
<b>Figure 44</b> : Les anticorps de camélidés (HCAb) et de requins (IgNAR).	117
<b>Figure 45</b> : Influence de l'affinité et du masse moléculaire des anticorps sur la pénétration tumorale.	118



## Liste des figures et tableaux

<b>Figure 46</b> : Comparaison des résultats obtenus en imagerie PET-scan réalisée avec des diabody, minibody et scFv-Fc.	121
<b>Figure 47</b> : Interaction anticorps-bactérie-complément.	128
<b>Figure 48</b> : Glycosylation de l'asparagine 297.	130
<b>Figure 49</b> : Technologie des quadromas.	131
<b>Figure 50</b> : Mécanisme d'action du Catumaxomab.	132
<b>Figure 51</b> : Anticorps conjugué chimiquement à des scFv.	133
<b>Figure 52</b> : Anticorps "knobs-into-holes".	134
<b>Figure 53</b> : Tandem de scFv.	135
<b>Figure 54</b> : Dimérisation des anticorps grâce à un motif "leucine zipper".	135
<b>Figure 55</b> : Liste des anticorps conjugués disposant d'une autorisation de mise sur le marché.	138
<b>Figure 56</b> : Hypothèse décrivant la propagation de l'épidémie de peste noire en Europe au 14 <sup>ème</sup> siècle.	142
<b>Figure 57</b> : Vue aérienne du complexe de l'unité 731.	146
<b>Figure 58</b> : Photographie du dispositif de dispersion des spores du bacille du charbon utilisé par la secte Aum Shinrikyō.	155
<b>Figure 59</b> : Photographie des lettres contaminées par le bacille du charbon, envoyées en 2001 aux Etats-Unis d'Amérique.	155
<b>Figure 60</b> : Photographie d'un plan de <i>Ricinus communis</i> et de ses graines.	156
<b>Figure 61</b> : Observation au microscope électronique à transmission de la souche FE0507BLP de <i>Clostridium botulinum</i> .	165
<b>Figure 62</b> : Représentation du sérotype principal impliqué dans les cas de botulisme humain en fonction des zones géographique.	170
<b>Figure 63</b> : Représentation schématique de la toxine botulique et de la fonction principale de chaque domaine.	172
<b>Figure 64</b> : Structure cristallographique de la toxine botulique A.	172
<b>Figure 65</b> : Organisation génétiques des gènes codant la toxine botulique et les protéines accessoires.	174
<b>Figure 66</b> : Modèle hypothétique d'association des différentes protéines associées aux toxines botuliques.	174
<b>Figure 67</b> : Hypothèse de franchissement de la barrière intestinale par la toxine botulique.	176
<b>Figure 68</b> : Interaction entre BoNT/B et la surface cellulaire des motoneurones.	178
<b>Figure 69</b> : Modèle de translocation de la chaîne légère de BoNT/A au travers de la membrane endosomale.	181
<b>Figure 70</b> : Représentation des différentes étapes de l'action de la toxine botulique.	182
<b>Figure 71</b> : Chaîne agroalimentaire du lait aux Etats-Unis d'Amérique.	191
<b>Figure 72</b> : Conséquence de la contamination du lait par la toxine botulique.	191
<b>Figure 73</b> : Modélisation de l'interaction entre les anticorps S25, C25 et 3D12 et BoNT/A.	204
<b>Figure 74</b> : Etapes successives du projet AntiBotABE	218
<b>Figure 75</b> : Interaction d'un scFv et de la toxine botulique.	247

## Tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Délimitations des régions FR et CDR selon la nomenclature IMGT®.	28
<b>Tableau 2</b> : Caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines.	33
<b>Tableau 3</b> : Principales caractéristique des récepteurs Fc.	42
<b>Tableau 4</b> : Estimation de la diversité des immunoglobulines.	54
<b>Tableau 5</b> : Fréquences des mutations induites durant l'hypermutation somatique.	58
<b>Tableau 6</b> : Rôle des cytokines dans la régulation de l'expression des classes d'anticorps chez la souris.	60
<b>Tableau 7</b> : Caractéristiques biochimiques et physiologiques principales différenciant les cinq groupes de clostridies.	166
<b>Tableau 8</b> : Pourcentage d'homologie moyen entre les chaînes légères des sept sérotypes de toxines botuliques.	167
<b>Tableau 9</b> : Variation de la séquence en acides aminés au sein de chaque sérotype de toxine botulique.	168
<b>Tableau 10</b> : Principaux signes cliniques et symptômes causés par le botulisme.	184
<b>Tableau 11</b> : Etude épidémiologique des cas de botulisme survenus en France entre 1991 et 2009.	189
<b>Tableau 12</b> : Liste des membres du consortium AntiBotABE et budget qui leur est alloué.	216
<b>Tableau 13</b> : Liste des immunogènes, et sous-type(s) de toxine botulique que chaque banque doit neutraliser.	217
<b>Tableau 14</b> : Descriptif des essais cliniques.	249
<b>Tableau 15</b> : Bilan du projet AntiBotABE.	250

# Glossaire

## A

**ADCC** : *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AID** : *Activation-Induced cytidine Deaminase*, désaminase induite par activation

**APE** : *Apurinic/APyrimidinic Endonuclease*, endonucléase apurinique ou apyrimidique

**APEX** : *Anchored Periplasmic Expression*, expression ancrée dans le périplasme

**ARN** : Acide RiboNucléique

## B

**BCR** : *B-cell Receptor*, récepteur des cellules B

**BoNT** : Neurotoxine botulique

## C

**CAMR** : *Center for Applied Microbiology and Research*, centre pour la microbiologie appliquée et la recherche

**CAT** : *Cambridge Antibody Technology*

**CD** : *Cluster of Differentiation*, cluster de différenciation

**CDC** : *Centers for Disease Control*, centres pour le contrôle des maladies.

**CDR** : *Complementary Determining Region*, région déterminant la complémentarité

**CH** : *Constant Heavy*, région constante de la chaîne lourde

**CHO** : *Chinese Hamster Ovary*, cellules d'ovaire de hamsters chinois

**CI<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice médiane

**CL** : *Constant Light*, région constante de la chaîne légère

**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**CNRS** : Centre National pour la Recherche Scientifique

**CRSSA** : Centre de Recherche du Service de Santé des Armées

## D

**DARPin** : *Designed Ankyrin-Repeat Protein*, protéine conçue par des répétition d'ankyrines

**DDASS** : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales

**DGA** : Direction Générale de l'Armement

**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale médiane

## E

**EBV** : *Epstein Barr Virus*, virus d'Epstein Barr

**EDTA** : *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*, acide éthylène diamine tétra-acétique

**EF** : *Edema Factor*, facteur oedémateux

## Glossaire

**ELISA** : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, dosage d'immuno-absorption par enzyme liée

**ET** : *Edema Toxin*, toxine oedémateuse

## F

**Fab** : *Fragment antigen binding*, fragment de fixant l'antigène

**FBI** : *Federal Bureau of Investigation*, bureau fédéral d'investigation

**Fc** : Fragment cristallisable

**FcRn** : *Neonatal Fc Receptor*, récepteur Fc néonatal

**FDA** : *Food and Drug Administration*, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

**FR** : *Framework Region*, région charpente

**Fv** : Fragment variable

## H

**HA** : HAemagglutinine

**HAT** : *Hypoxanthine-Aminoptérine-Thymidine*

**HCab** : *Heavy Chain Antibody*, anticorps à chaîne lourde

**HGPRT** : *Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosylTransferase*, transférase des ribonucléotides phosphorylés adénine-guanine

**HLA** : *Human Leukocyte Antigen*, antigène des leucocytes humains

**HRP** : *HorseRadish Peroxidase*, peroxydase du raifort

**HSC** : *Human String Content*, région contenant des résidus humains

## I

**IFN** : Interféron

**Ig** : Immunoglobuline

**IgNAR** : *Immunoglobulin New Antigen Receptor*, nouveau récepteur de l'antigène de type immunoglobuline

**IL** : InterLeukine

**INN** : *International Nonproprietary Names*, dénomination commune internationale

**INTAS** : INTernational ASSociation for the promotion of cooperation with scientists from the independent states of the former Soviet Union, association internationale pour la promotion de la coopération avec les scientifiques issus des pays de l'ex URSS

**InVS** : Institut de Veille Sanitaire

**IRBA** : Institut de Recherche Biomédicale des Armées

## K

**K<sub>D</sub>** : Constante de Dissociation à l'équilibre

**KGB** : *Komitet Gossoudarstvennoï Bezopasnosti*, comité pour la sécurité de l'État

## L

**LABEX** : LABoratoire d'EXcellence

**LF** : *Lethal Factor*, facteur létal

## Glossaire

**LFB** : Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies

**LPS** : LipoPolySaccharide

**LT** : *Lethal Toxin*, toxine létale

## M

**MDCK** : *Madin-Darby Canine Kidney Cell*, cellules rénale de chien de Madin-Darby

**microPET** : *micro Positron Emission Tomography*, micro tomographie par émission de positron

## N

**NHEJ** : *Non-Homologous End Joining*, raccordement d'extrémités non homologues

**NIBSC** : *National Institut for Biological Standards and Controls*, institute national britannique pour la normalisation et les contrôles biologiques

**NSABB** : *National Science Advisory Board for Biosecurity*, Office américain chargé de la biosécurité

**NTNHA** : *Non Toxic Non HAemagglutinin*, protéine non toxique et non haemagglutinine

## O

**OMC** : Organisation Mondiale du Commerce

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ONU** : Organisation des Nations-Unis

## P

**PA** : *Protective Antigen*, antigène protecteur

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*, réaction de polymérisation en chaîne

**PDGRF** : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes

**PEG** : *PolyEthylene Glycol*

**pH** : potentiel Hydrogène

## R

**RAG** : *Recombination Activating Genes*, gènes d'activation de la recombinaison

**RSS** : *Recombination Signal Sequences*, séquence signal de recombinaison

## S

**scFab** : *single chain Fragment antigen binding*, fragment simple chaîne fixant l'antigène

**scFv** : *single chain Fragment variable*, fragment variable monocaténaire

**SNAP25** : *Synaptosomal-Associated Protein 25*, protéine associée au synaptosome 25

**SNARE** : *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*, protéine d'attachement au facteur soluble Sensible au N-éthylmaléimide

**SV40** : *Simian Virus 40*, virus simien 40

## T

**TAT** : *Trans-Activator of Transduction*,  
trans-activateur de la transduction

**TCR** : *T-Cell Receptor*, récepteur des  
cellules T

**TdT** : *Terminal deoxynucleotidyl  
Transferase*, transférase terminale de  
désoxynucléotides

**TGF** : *Transforming Growth Factor*,  
facteur de croissance de transformation

**TMB** : *TétraMéthylBenzidine*

**TUBS** : *Technische Universität of  
Braunschweig*, université technique de  
Braunschweig

## U

**UNG** : *Uracil-DNA Glycosylase*,  
glycosylase des uraciles de l'ADN

**URSS** : Union des Républiques Socialistes  
Soviétiques

**USAMRIID** : *United States Army Medical  
Research Institute of Infectious Diseases*,  
institut de recherche médicale sur les  
maladies infectieuses de l'armée des Etats-  
Unis d'Amérique

## V

**VAMP2** : *Vesicle-Associated Membrane  
Protein 2*, protéine membranaire associée à  
des vésicules 2

**VH** : *Variable Heavy*, domaine variable de  
la chaîne lourde

**VL** : *Variable Light*, domaine variable de  
la chaîne légère

## W

**WP** : *Work Package*, lot de travaux

# *Préface*

# Préface

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'Unité de Biotechnologie des Anticorps et des Toxines du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées. L'objectif de ces travaux est l'obtention et l'ingénierie d'anticorps neutralisant les toxines du risque biologique provoqué et la localisation de l'épitope de tels anticorps. En effet, les anticorps recombinants correspondent à la forme la plus moderne de la sérothérapie et ils sont une classe de molécules thérapeutiques actuellement en pleine expansion. Aujourd'hui 27 anticorps recombinants disposent d'une autorisation de mise sur le marché et plus de 200 sont en cours de développement. Bien que la production des anticorps recombinants soit délicate et coûteuse, ils présentent une bonne tolérance comparée aux petites molécules synthétiques dont 90% échouent lors des essais cliniques, principalement à cause de problèmes de tolérance ou de pharmacocinétique. Les anticorps recombinants sont donc particulièrement bien adaptés au traitement des maladies causées par les agents du risque biologique puisqu'il n'est nécessaire de ne produire que des quantités relativement limitées. Pour isoler de tels anticorps, au sein de notre unité nous utilisons une stratégie expérimentale consistant à construire des banques immunes de fragments d'anticorps, à partir de primates non humains immunisés avec des agents du risque biologique provoqué. Les fragments d'anticorps les plus réactifs vis-à-vis de l'antigène d'intérêt sont isolés par la technologie d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages. Des évaluations *in vitro* et *in vivo* sont réalisées afin de sélectionner les anticorps les plus neutralisants. Afin d'améliorer la tolérance des anticorps isolés, ceux-ci sont humanisés par la technique d'humanisation germinale.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une introduction générale dont l'objectif est de présenter le contexte scientifique et stratégique dans lequel c'est inscrit l'ensemble des travaux de thèse. Cette introduction est subdivisée en 4 chapitres :

- Dans le premier chapitre les aspects fondamentaux de l'immunologie ont été abordés. En particulier ce chapitre s'intéresse à la synthèse, la structure et à la fonction des anticorps et il replace plus globalement le rôle des anticorps dans la

## Préface

réponse immunitaire. Ce chapitre est repose à la fois sur une partie historique, qui retrace l'histoire de l'immunologie ainsi que sur l'état actuel des connaissances.

- Les notions abordées dans le premier chapitre sont reprises dans le deuxième chapitre portant sur la biotechnologie des anticorps. En effet parmi les nombreux champs d'application de l'immunologie, cette thèse a attiré aux anticorps recombinants, qui sont des molécules thérapeutiques et prophylactiques actuellement en pleine expansion. Après un historique de la sérothérapie, les techniques modernes d'obtention et d'ingénierie des anticorps sont présentées. Ce chapitre s'intéresse aussi aux anticorps non humains, et en particulier aux anticorps de primates non humains qui sont à la base des travaux expérimentaux réalisés dans cette thèse.
  
- Après les deux premiers chapitres qui détaillent les caractéristiques des anticorps qui en font des molécules thérapeutiques importantes, le troisième chapitre s'intéresse plus particulièrement au contexte stratégique de notre étude. En effet, notre laboratoire, militaire, a pour objectif la neutralisation des agents du risque biologique provoqué. Ce chapitre dresse un historique depuis les premières descriptions d'utilisations d'armes biologique, durant l'antiquité, jusqu'aux principaux aboutissements des programmes de développement d'armes biologiques mis en place lors du 20<sup>ème</sup> siècle. Par la suite, ce chapitre aborde l'ensemble des efforts mis en place par la communauté internationale pour interdire le développement et l'utilisation d'armes biologique. La dernière partie de ce chapitre est quand à elle consacrée aux menaces actuelles de militarisation ou d'utilisation bioterroriste des agents biologiques.
  
- Les trois premiers chapitres soulignent l'importance du développement d'outils permettant la prise en charge du risque biologique provoqué et ils mettent en évidence que les anticorps représentent des molécules de choix pour cette prise en charge. Ce quatrième et dernier chapitre présente l'un des principaux agents du risque biologique provoqué, les toxines botuliques, qui sont au cœur du travail expérimental de thèse. Ce chapitre détaille les caractéristiques de l'agent bactérien du botulisme et dresse le tableau clinique de la maladie qu'il engendre, le botulisme. Les données épidémiologiques du botulisme et les outils de diagnostic



## Préface

sont aussi présentés. Une partie de ce chapitre est consacrée à l'utilisation des toxines botuliques comme arme biologique, en se basant principalement sur leurs utilisations avérées ou suspectées. La dernière partie de ce chapitre est consacrée au traitement du botulisme, et elle présente en particulier les principaux anticorps isolés pour neutraliser les sérotypes A, B et E des toxines botuliques.

A la suite de cette introduction bibliographique, une partie résultats regroupe l'ensemble des travaux de revue et des travaux expérimentaux auxquels j'ai pris part. Les travaux de revues présentent le développement d'anticorps dirigés contre les toxines du risque biologique provoqués, ainsi que les résultats d'une analyse bioinformatique permettant de préciser quels primates non humains devaient être utilisés pour l'isolement de tels anticorps. Les résultats expérimentaux concerne particulièrement l'obtention de fragments d'anticorps recombinants neutralisant les toxines botuliques A et E, dans le cadre d'un projet européen appelé AntiBotABE. Des travaux de localisation de l'épitope d'un fragment d'anticorps recombinants neutralisant les toxines de *Bacillus anthracis* sont aussi présentés. Un descriptif de chacun des articles présentés a été réalisé en introduction de la partie résultats.

La dernière partie de ce manuscrit correspond à la conclusion et aux perspectives des travaux de thèse. Cette partie replace les travaux dans leurs contextes scientifiques et juridiques et présent ainsi les perspectives qui s'ouvrent à notre unité pour la poursuite de ces travaux. Cette partie se conclue par un tableau présentant l'état actuel d'avancement du projet AntiBotABE.

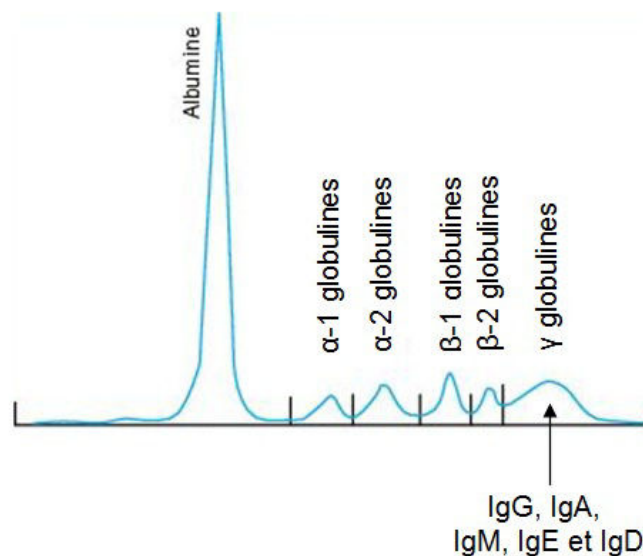
# *Introduction bibliographique*



*PARTIE 1 :*  
*Les anticorps*

## 1) Les anticorps

La superfamille des immunoglobulines comprend différentes protéines comme les anticorps, les CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), les TCR (T-Cell Receptor) ou encore les récepteurs de type CD4 ou CD8 (*Cluster of Differentiation*). Les anticorps sont aussi appelés  $\gamma$ -globulines car ils correspondent au cinquième pic du profil électrophorétique des protéines sériques (Figure 1). Les anticorps existent naturellement dans l'organisme, et ils ont un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'élimination spécifique des pathogènes. Leurs propriétés, qui seront détaillées dans ce manuscrit, en font également des outils de diagnostic, de recherche et de thérapie très importants. Les anticorps recombinants sont actuellement les molécules thérapeutiques issues des biotechnologies qui sont les plus utilisées.



**Figure 1 : Profil électrophorétique des protéines sériques.**

Les anticorps correspondent au cinquième pic d'une électrophorèse des protéines sériques. Ig : immunoglobulines. Adapté de Janeway *et al.* (Janeway, Murphy, Travers, & Walport, 2009)

### 1.1) Historique de la découverte des anticorps

Historiquement deux grands courants existaient parmi les immunologistes : la théorie cellulariste et la théorie humorale. La première, soutenue par Ilya Ilitch METCHNIKOV (1845-1916), émettait l'hypothèse que le moyen principal de défense contre les microbes reposait sur l'action des macrophages et des microphages (actuellement connu sous le nom de polynucléaires neutrophiles), qui éliminaient les microbes par phagocytose. Le courant

## Partie 1 : Les anticorps

humoraliste soutenait l'hypothèse selon laquelle des substances solubles présentes dans les fluides corporels étaient capables de reconnaître spécifiquement et d'éliminer les agents microbiens. Ces substances solubles correspondent principalement aux anticorps.

La première description scientifique des anticorps a été faite en 1890 par Emil-Adolf von BEHRING (1854-1917) et Shibasaburo KITASATO (1853-1931), dans la lignée des travaux de Pierre Paul Émile ROUX (1853-1933) et alexandre YERSIN (1863-1943) sur la toxine diphtérique. Behring, en recherchant des molécules chimiques permettant de guérir la diphtérie, s'est aperçu que les cobayes qui avaient survécu à la diphtérie devenaient alors résistants à cette maladie. De plus, des animaux sains, ayant reçu du sérum d'un animal infecté, survivaient à des injections du bacille ou de sa toxine pendant une durée limitée à environ deux semaines. Les résultats de Behring furent publiés le 4 décembre 1890 avec les résultats de Kitasato, portant sur les anticorps antitétaniques. Les deux auteurs postulèrent que le sérum des animaux survivant contenait des substances antitoxiques et ils venaient donc de pressentir l'existence des anticorps. Ces travaux ont valu à Behring le prix Nobel de physiologie et médecine en 1901. (Kantha, 1991; Simon, 2007) Behring développa alors la sérothérapie anti diphtérique en traitant des enfants à l'aide de sérum de moutons devenus résistants pour cette maladie. En réussissant à obtenir de grandes quantités de sérum à partir de moutons et chevaux immunisés, Roux et ses collaborateurs ont permis le développement de la sérothérapie en France dès 1894. (Opinel, 2007)

En 1897, Paul EHRLICH (1854-1915) proposa une théorie selon laquelle certaines cellules présentaient à leur surface plusieurs "chaines latérales", pouvant reconnaître spécifiquement les antigènes en raison de leurs configurations stéréochimiques, puis être sécrétées (*cf paragraphe "1.4.1) Génétique et diversité des anticorps"*). (Ehrlich, 1904) Ses travaux lui valurent de partager, avec Metchnikov, le prix Nobel de physiologie et médecine en 1908. (Piro, Tagarelli, Tagarelli, Lagonia, & Quattrone, 2008)

En 1898, Richard PFEIFFER (1858-1945) a mis en évidence la lyse de pathogènes par des cellules et les anticorps. En effet, il a constaté qu'en introduisant des vibrios cholériques dans la cavité péritonéale de cobayes immunisés contre le choléra, ceux-ci étaient détruits. Par contre, l'inoculation dans la cavité péritonéale de cobayes non immunisés provoquait une infection généralisée mortelle. Ne parvenant pas à réaliser son expérience *in vitro*, il en conclut que cette bactériolyse ne pouvait être le fait du sérum seul et qu'elle exige donc l'intervention de cellules. Metchnikoff appela ce phénomène, *phénomène de Pfeiffer*.

En 1900, Jules BORDET (1870-1961) visualisa pour la première fois les anticorps (qu'il appelait agglutinines) par un mécanisme d'agglutination, précipitation et hémolyse.

## Partie 1 : Les anticorps

(Bordet, 1899; Schmalstieg & Goldman, 2009) Ses travaux sur l'immunité lui valurent le prix Nobel de physiologie et médecine en 1919 et ont été à la base d'une nouvelle discipline, l'immunologie. (Raju, 1999)

Actuellement la sérothérapie utilisant des produits d'origine animale est peu utilisée. Elle est limitée à de rares indications cliniques qui ne disposent pas d'autre traitement, comme le botulisme ou certaines envenimations, dont le traitement ne nécessite pas l'injection répétée de sérum. Néanmoins on peut considérer que l'utilisation des anticorps recombinants thérapeutiques constitue une forme moderne de sérothérapie.

### 1.2) Structure

#### 1.2.1) La structure des anticorps

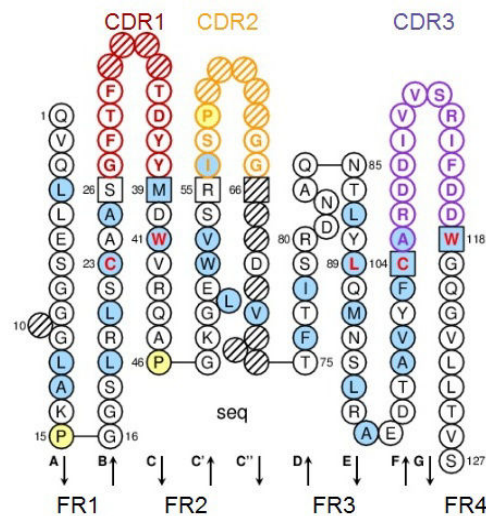
Le premier modèle de la structure des anticorps a été décrit à la fin des années 1950 par Rodney Robert PORTER (1917-1985) et Gerald EDELMAN (1929-), qui reçurent le prix Nobel de physiologie et médecine en 1972 pour leurs travaux. (Porter, 1958; Raju, 1999) Les anticorps sont des glycoprotéines de 150 à 190 kDa, formées de deux chaînes lourdes (de 50 à 70 kDa chacune) et de deux chaînes légères (de 25 kDa chacune). Des ponts disulfures relient les deux chaînes lourdes entre elles et les chaînes lourdes aux chaînes légères. On peut retrouver les anticorps sous forme soluble, dans le sérum et dans de nombreuses sécrétions, mais aussi sous forme membranaire à la surface de lymphocytes B (*B-Cell Receptor*, BCR).

Chez l'Homme, cinq classes d'anticorps sont décrites en fonction de l'isotype de leurs chaînes lourdes : les IgG (gamma), IgA (alpha), IgM (mu), IgE (epsilon) et IgD (delta). Les anticorps humains possèdent deux isotypes de chaînes légères : les chaînes kappa ( $\kappa$ ) et les chaînes lambda ( $\lambda$ ). Chaque anticorps ne possède qu'un isotype de chaîne légère, mais chaque classe d'anticorps peut être associée indifféremment à l'un de leurs deux isotypes. L'analyse des séquences des anticorps a permis de distinguer différentes régions : trois à quatre régions constantes C-terminales (CH1, CH2, CH3 et CH4 pour les chaînes lourdes et CL pour les chaînes légères) et un domaine variable N-terminal (VH pour les chaînes lourdes et VL pour les chaînes légères). La région charnière entre les régions CH1 et CH2 présente une flexibilité de 60 à 180° qui favorise l'interaction avec l'antigène. (Roux, Strelets, & Michaelsen, 1997; Roux, 1999)

Les régions dites variables sont principalement impliquées dans l'interaction avec l'antigène. Elles sont composées de deux feuillets  $\beta$  : un feuillet formé par les quatre brins A,

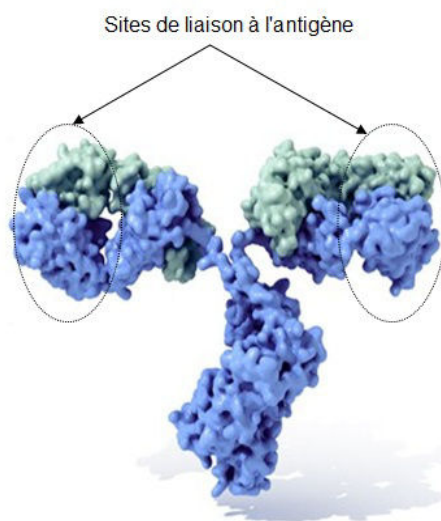
## Partie 1 : Les anticorps

B, E et D et un feuillet formé par les cinq brins C, C', C'', F et G (Figure 2). Ces deux feuillets sont maintenus parallèles grâce à un pont disulfure formé entre les brins B et F. Les neuf brins sont reliés entre eux par cinq coudes  $\beta$  (AB, CC', C''D, DE et EF) qui forment les régions charpentes (*Framework*, FR), qui sont principalement impliquées dans la structure de la molécule. Les trois boucles BC, C'C'' et FG, forment les trois régions hypervariables (*Complementary Determining Regions*, CDR), qui forment le site de fixation de l'antigène (Figure 2 et Figure 3). (M.-P. Lefranc *et al.*, 2003; Wofsy, Metzger, & Singer, 1962)



**Figure 2 : Représentation bioinformatique de la structure d'anticorps.**

Représentation en collier de perle de la séquence du domaine variable d'un anticorps isolé dans notre laboratoire. Modélisation à partir du site internet IMGT®.



**Figure 3 : Représentation tridimensionnelle d'un anticorps.**

Représentation globulaire d'un anticorps. Les chaînes lourdes sont représentées en bleu et les chaînes légères en gris. Les deux sites de liaison de l'antigène sur l'anticorps (paratope) sont identiques, et sont situés de part et d'autre de l'anticorps. (Biosingularity, 2013)



## Partie 1 : Les anticorps

Si la structure globale des anticorps est bien décrite, plusieurs nomenclatures délimitant les FR et CDR sont proposées, comme celles de Chothia, de Kabat ou d'IMGT®. (Chothia & Lesk, 1987; G. Johnson & Wu, 2001; M. P. Lefranc, 2001; M.-P. Lefranc *et al.*, 2003) Certaines nomenclatures numérotent les acides aminés de façon continue, sans tenir compte du nombre variable de résidus formant les CDR. Dans de telles numérotations, les débuts et fins des FR et CDR ne reçoivent pas le même numéro. La nomenclature IMGT® ne présente pas cet inconvénient et a été utilisée dans l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit. Elle est basée sur l'analyse de plus de 5 000 séquences et structures tridimensionnelles d'immunoglobulines et de TCR. Cette nomenclature présente l'avantage d'attribuer un numéro de position fixe aux résidus de début et fin des différentes régions (FR et CDR), puisqu'elle attribue une numérotation spécifique aux acides aminés surnuméraires des CDR (Tableau 1). Les acides aminés présentant des rôles clés pour la structure de l'anticorps reçoivent systématiquement le même numéro, comme les deux cystéines conservées qui sont impliquées dans la formation du pont disulfure intra domaine, et qui sont systématiquement positionnées aux emplacements 23 et 104. La position 41 est systématiquement attribuée à un résidu tryptophane conservé, et la position 89 correspond systématiquement à un aminé hydrophobe. Les acides aminés 23, 41, 89 et 104 ont un rôle structurel et fonctionnel particulier puisqu'ils servent de résidus d'ancrage et délimitent les FR et CDR. Pour tenir compte de la variabilité de la taille des CDR, la numérotation des acides aminés formant les CDR est extensible, grâce à un suffixe du type ".1, .2, .3, ...", et certaines positions peuvent ne pas être occupées dans le cas de CDR courts.

	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CDR2-IMGT	FR3-IMGT	CDR3-IMGT pour les gènes V germinaux	Pour les gènes réarrangés V-J et V-D-J	
						CDR3-IMGT germinal	CDR3-IMGT réarrangé	FR4-IMGT
<b>Numérotation des acides aminés</b>	1 --> 26 (C 23)	27 --> 38	39 --> 55 (W 41)	56 --> 65	66 --> 104 (a.a. hydrophobe 89 et C 104)	105 --> 116	105-->117 (112.1, 111.1,112.2, 111.2...)	118 --> 129
<b>Nombre d'acides aminés</b>	25-26 AA	5-12 AA	16-17 AA	0-10 AA	36-39 AA	2-12 AA	plus de 13 AA	10-12 AA

**Tableau 1 : Délimitations des régions FR et CDR selon la nomenclature IMGT®.**

Les mécanismes de réarrangements V(D)J sont détaillés au paragraphe "1.4.2) Diversité due aux réarrangements V-(D)-J". (M.-P. Lefranc *et al.*, 2003) .

## 1.2.2) Les différentes classes d'anticorps

Cinq classes d'anticorps sont actuellement décrites chez l'Homme, en fonction de l'isotype de leur chaîne lourde, et leur propriétés principales sont détaillées ci-dessous (Tableau 2). (Porter, 1958)

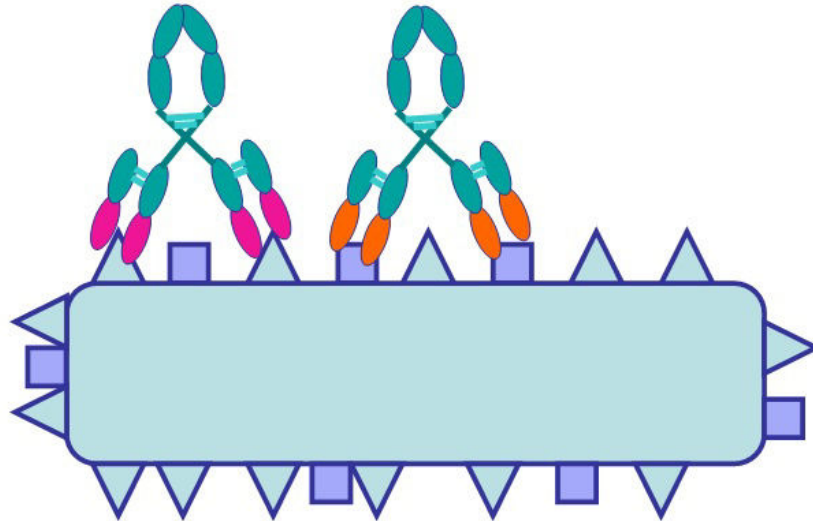
### 1.2.2.1) Les IgG

Les immunoglobulines d'isotype G (IgG) sont la classe majoritaire des anticorps solubles puisqu'elles représentent de 70 à 75 % des immunoglobulines totales mais elles sont aussi retrouvées dans le compartiment extravasculaire. Quatre sous-classes d'IgG sont décrites : IgG1 (66 %), IgG2 (23 %), IgG3 (7 %), IgG4 (4 %) (Tableau 2). Leur masse moléculaire est d'environ 146 kDa, à l'exception des IgG3 dont la masse moléculaire est de 170 kDa. Ce sont les immunoglobulines présentant la concentration sérique la plus élevée (jusqu'à 12 g.l<sup>-1</sup>) et la plus longue demi-vie (jusqu'à 21 jours pour les IgG1, IgG2 et IgG4). Les IgG disposent de deux sites de liaison de l'antigène sur l'anticorps (paratope), ce qui augmente l'affinité fonctionnelle (avidité) de l'anticorps par rapport à des molécules ne disposant que d'un seul site de fixation de l'antigène. L'avidité est un phénomène favorisé par la flexibilité de la région charnière, qui facilite l'interaction simultanée avec deux épitopes identiques, comme dans le cas du LPS (LipoPolySaccharide) présent à la surface des bactéries, ou des glycoprotéines présentes à la surface des virus, par exemple. (Figure 4) Cette liaison simultanée limite la dissociation des complexes anticorps-antigènes puisqu'il est nécessaire que tous les sites de liaison soient dissociés simultanément pour libérer l'antigène, or cette dissociation simultanée est rare.

Les IgG tiennent un rôle central dans la réponse immunitaire secondaire, en étant impliquées dans la neutralisation des toxines, des bactéries et des virus, mais elles ont aussi un rôle dans l'activation du complément et dans la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*, ADCC). Les IgG1, IgG3 et IgG4 sont les seules immunoglobulines qui peuvent franchir la barrière placentaire et ainsi conférer une immunité passive au fœtus. (Ellinger & Fuchs, 2012) Contrairement aux IgG4, les IgG3, et dans une moindre mesure les IgG1 et IgG2, sont impliquées dans l'activation du complément. Les IgG1 et IgG3 et plus faiblement les IgG2 et IgG4 peuvent aussi faciliter l'élimination du pathogène en interagissant avec les récepteurs du fragment Fc (FcγRI-a, FcγRII-a, FcγRIII-a,

## Partie 1 : Les anticorps

Fc $\gamma$ RIII-b et Fc $\gamma$ RIII-c) présents à la surface de certaines cellules phagocytaires (cf paragraphe "1.3.2.3) La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps"). L'affinité des IgG1 et IgG3 pour ces récepteurs est supérieure à celle des IgG4, et l'affinité des IgG2 pour ces récepteurs est faible.



**Figure 4 : Reconnaissance simultanée de deux antigènes identiques par une IgG.**

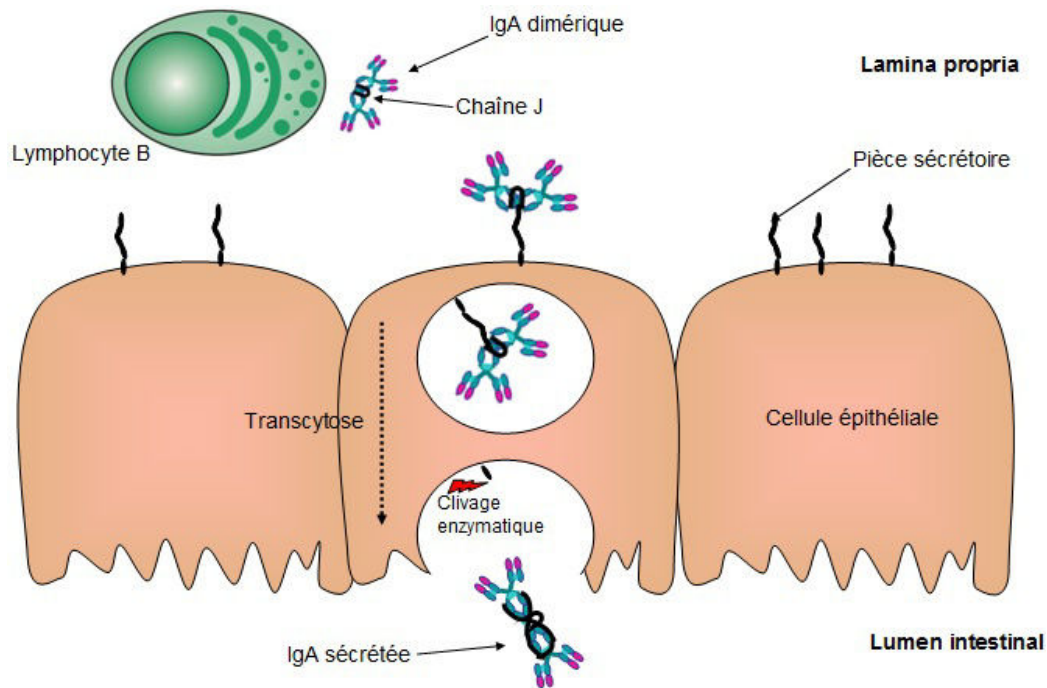
Certains pathogènes, comme les bactéries, expriment à leur surface plusieurs copies d'une même molécule ou protéine, formant ainsi des épitopes répétés, comme dans le cas du LPS par exemple. Les deux sites de liaison de l'antigène sur l'anticorps peuvent alors être engagés, et la dissociation simultanée des deux sites est rare.

### 1.2.2.2) Les IgA

Elles représentent de 15 à 20 % des immunoglobulines sériques et constituent la classe d'anticorps la plus abondante dans les sécrétions muqueuses (salive, larmes, colostrum, sécrétions trachéo-bronchiques et uro-génitales). Deux sous-classes sont décrites : les IgA1 (90 %) et IgA2 (10 %), toutes deux ayant une masse moléculaire de 160 kDa (Tableau 2). Les lymphocytes sécrétant les IgA sont principalement situés au niveau de tissus spécifiques dans les muqueuses (*Mucosal Associated Lymphoid Tissue*, MALT). Les IgA sont donc retrouvées dans les sécrétions muqueuses, et tiennent par conséquent un rôle important dans les étapes précoces de la défense contre les infections, contre les bactéries et virus (immunité locale), bien qu'elles soient incapables d'activer le complément. Si, chez l'Homme la majorité des IgA sont monomériques (160 kDa), dans 20 % des cas elles vont s'associer en dimères de 385 kDa grâce à la chaîne J, une chaîne peptidique de 15 kDa. Les régions Fc de ces dimères vont pouvoir interagir avec une affinité d'environ 8 nM avec un récepteur polymérique

## Partie 1 : Les anticorps

d'immunoglobulines, appelé pièce sécrétoire, présent à la surface des cellules épithéliales. Lors de la transcytose, les dimères d'IgA restent associés à la pièce sécrétoire, qui les protégera des clivages protéolytiques (Figure 5). (Brandtzaeg & Prydz, 1984; Kaetzel, Robinson, Chintalacharuvu, Vaerman, & Lamm, 1991)



**Figure 5 : Sécrétion des IgA.**

Les IgA dimérique sécrétées par le lymphocyte B interagissent avec la pièce sécrétoire, présent à la surface des cellules épithéliales. Lors de la transcytose cette chaîne reste associée au dimère d'IgA.

### 1.2.2.3) Les IgM

Les IgM représentent 10 % des immunoglobulines totales. Cette classe d'anticorps peut exister sous deux formes : une forme monomérique, à la surface des lymphocytes B immatures et une forme pentamérique, d'une masse moléculaire de 970 kDa, qui correspond à la forme sécrétée, principalement présente dans le compartiment intravasculaire (Tableau 2). Contrairement aux autres immunoglobulines, les IgM disposent de quatre régions constantes. Elles sont principalement impliquées dans la réponse immunitaire innée et ne subissent donc pas le processus de maturation d'affinité. Les IgM pentamériques sont associées par des ponts disulfures au niveau du fragment Fc et par la chaîne de jonction J. Une telle association pentamérique permet d'interagir simultanément avec 10 épitopes identiques au maximum ce qui peut conférer aux IgM une avidité élevée. Néanmoins, l'affinité de chaque site de fixation de l'anticorps est faible car les IgM n'ont pas subi le processus de maturation d'affinité. De

## Partie 1 : Les anticorps

plus, la région charnière des IgM n'est pas flexible ce qui limite l'interaction simultanée des deux sites de liaison contigus avec des antigènes ayant des motifs épitopiques répétitifs, et au total l'affinité fonctionnelle des IgM est médiocre. Leur demi-vie d'environ cinq jours. Sous la forme pentamérique, une molécule d'IgM peut ponter plusieurs récepteurs de la région Fc, et ainsi permettre une meilleure activation des cellules immunitaires impliquées dans l'élimination des pathogènes. Tout comme les IgG, les IgM peuvent activer la voie classique du complément.

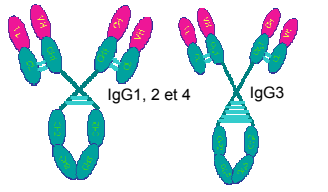
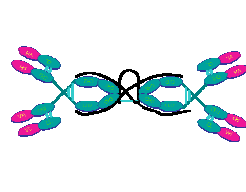
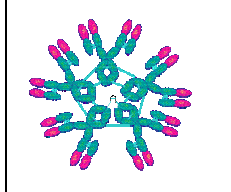
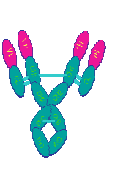
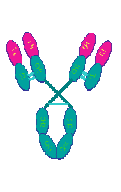
### 1.2.2.4) Les IgE

Les IgE sont présentes à de faibles concentrations dans le sérum, entre 20 et 300  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (Tableau 2). Elles peuvent être retrouvées à la surface des basophiles et des mastocytes grâce à l'interaction avec le récepteur Fc $\epsilon$ R, et leur demi-vie peut alors atteindre 21 jours alors qu'elle n'est que de deux jours environ sous forme soluble. Les IgE disposent de quatre régions constantes, mais elles sont dépourvues de région charnière et leur masse moléculaire est de 188 kDa. Ces immunoglobulines ont une affinité élevée pour les récepteurs Fc $\epsilon$ RI et Fc $\epsilon$ RII présents à la surface des mastocytes, des polynucléaires éosinophiles et des basophiles. Elles ont donc un rôle important dans les mécanismes de l'hypersensibilité immédiate en activant la libération de médiateurs chimiques impliqués dans les chocs anaphylactiques, comme l'histamine, ou dans d'autres phénomènes allergiques dont l'asthme. Elles sont incapables d'activer le complément mais leur présence à la surface des éosinophiles leur confère un rôle important dans l'immunité antiparasitaire.

### 1.2.2.5) Les IgD

Seule 1 % des IgD est sous forme soluble dans le sérum, et le reste est exprimé à la surface des lymphocytes B. Ces immunoglobulines ont une masse moléculaire de 184 kDa et leur demi-vie dans le sérum est de trois jours (Tableau 2). Les IgD exprimées à la surface des lymphocytes B sont responsables de l'activation cellulaire après contact avec l'antigène. Les fonctions biologiques des IgD solubles sont encore peu connues, mais on sait qu'elles sont incapables d'activer le complément et ne peuvent pas franchir la barrière placentaire. (Preud'homme *et al.*, 2000) Les fonctions biologiques des IgD présentes à la surface des lymphocytes seront détaillées au paragraphe 1.4.6) L'hypermutation somatique.

## Partie 1 : Les anticorps

Propriétés	Isotypes et sous-classes des immunoglobulines									
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	slgA	IgM	IgE	IgD
Isotype de la chaîne lourde	γ1	γ2	γ3	γ4	α1	α2	α1 ou α2	μ	ε	δ
Concentration sérique (g.l <sup>-1</sup> )	9	3	1	0,5	3	0,5	0,05	1,5	0,003	0,03
% des Ig totales	70 à 75				15 à 20 %			10	< 1 %	< 1 %
Masse moléculaire (kDa)	146	146	170	146	160	160	385	970	188	184
Demi-vie (jours)	21	20	7	21	6	6	ND	10	2	3
% de l'Ig dans le compartiment intravasculaire	45	45	45	45	42	42	traces	80	50	75
% en sucres	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3	7 à 11	7 à 11	7 à 11	12	12	9 à 14
Valence	2	2	2	2	2 à 4	2 à 4	2 à 4	2 à 10	2	2
Principales fonctions biologiques	Neutralisation des toxines, bactéries et virus				agglutination, neutralisation des bactéries, virus			agglutination, activation de la voie classique du complément	Neutralisation des parasites	Activation des lymphocytes B
Aptitude à activer la voie classique du complément	+	+/-	++	nulle	+/-	+/-	nulle	+++	nulle	nulle
Aptitude à se fixer aux FcγR	++	+/-	++	+	nulle	nulle	nulle	nulle	nulle	nulle
Schéma										

**Tableau 2 : Caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines.**

+++ : Très élevé ; ++ : élevée ; + : modérée ; +/- : faible. (Janeway *et al.*, 2009; Kindt, J. Goldsby, Richard A. Osborne, & Fridman, 2008; Strohl & Strohl, 2012)

### 1.2.3) Fragments d'anticorps

Des digestions enzymatiques peuvent être réalisées pour cliver les immunoglobulines en fragments de différentes natures. Une digestion ménagée par la papaïne clive l'anticorps au niveau de sa région charnière et va former deux fragments Fab indépendants ainsi qu'un fragment Fc, et ces travaux ont permis de caractériser le rôle fonctionnel de chaque domaine. Une digestion ménagée par la pepsine clive l'anticorps au niveau de la région CH2 de l'anticorps et forme un fragment F(ab')<sub>2</sub> (Figure 6), constitué des deux domaines variables (deux VH et deux VL) et de deux régions constantes CH1 reliées par des ponts disulfures, ainsi qu'un fragment pFc, qui correspond à la région CH3 et à une partie de la région CH2. Le fragment F(ab')<sub>2</sub> est donc pourvu de la capacité à reconnaître l'immunogène grâce à deux sites de fixation de l'antigène.

L'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis l'amplification des régions d'ADN codant les anticorps, rendant possible la synthèse de fragments d'anticorps recombinants. Les immunoglobulines entières sont le format thérapeutique le plus usuel car il permet d'interagir avec l'antigène et d'activer différentes fonctions effectrices, tout en possédant une longue demi-vie. Cependant, lors des phases de recherche *in vitro*, les

## Partie 1 : Les anticorps

fragments de petites tailles sont privilégiés car ils présentent l'avantage de pouvoir être produit efficacement par les cellules bactériennes. (Jeong, Jang, & Velmurugan, 2011; Miethe *et al.*, 2012)

Les fragments Fab (*Fragment antigen binding*) (Figure 6), de 50 kDa, sont un des formats d'anticorps les plus utilisés en laboratoire car ils comportent le domaine d'interaction avec l'antigène tout en conservant une conformation proche des immunoglobulines entières, par conservation du pont disulfure entre les régions CH1 et CL. (Poljak *et al.*, 1973) Les scFab (*single chain Fab*) sont des Fab comportant un peptide de liaison (*linker*) entre les deux domaines variables, en plus du pont disulfure qui les relie. Les scFab $\Delta$ C, sont pour leur part des scFab dépourvus des deux cystéines nécessaires à l'établissement du pont disulfure. (Hust *et al.*, 2007)

Les fragments Fv (Fragment Variable) sont eux d'une plus petite taille (25 kDa) et ne comportent que les deux domaines variables de l'immunoglobuline (Figure 6). (Inbar, Hochman, & Givol, 1972; Quintero-Hernández *et al.*, 2007) Bien que la petite taille de ce fragment permette une production optimale, l'absence de pont disulfure entre les deux domaines variables le rend instable. (Glockshuber, Malia, Pfitzinger, & Plückthun, 1990; Skerra & Plückthun, 1988) Afin d'optimiser la stabilité de ce fragment un peptide de liaison de 15 à 20 acides aminés (le plus souvent [Gly<sub>4</sub> Ser]<sub>3</sub>) ou un pont disulfure peuvent être introduits entre les régions VH et VL, formant un fragment appelé scFv (*single chain Fv*). (Ahmad *et al.*, 2012; Bird *et al.*, 1988; J.-X. Zhao *et al.*, 2010) Toutefois, le peptide de liaison peut introduire une contrainte conformationnelle qui n'est pas présente dans l'immunoglobuline entière. La suppression du peptide de liaison ou du pont disulfure lors de la conversion du scFv en immunoglobuline entière peut modifier la conformation du site de fixation de l'antigène et dégrader l'affinité pour l'antigène. Tout comme les Fv, les scFv peuvent aussi se dénaturer et à s'agréger une fois en solution, en particulier si des acides aminés hydrophobes sont exposés à la surface de la molécule. (Pedroso, Irún, Machicado, & Sancho, 2002; Wörn & Plückthun, 2001) Plusieurs paramètres influencent le taux de solubilisation et d'agrégation des scFv, dont le type bactérien choisi pour exprimer le scFv, la construction du plasmide (peptide de liaison et promoteur utilisé, par exemple), la température de solubilisation et la présence de détergent. Par exemple, Kudou *et al* (Kudou *et al.*, 2011) ont mis en évidence que l'augmentation progressive de la température à 45°C et l'addition de 2,5% de lauryl-L-Glu et d'hydro-chlorure d'arginine permettait de dissocier des agrégats de scFv et de faciliter leur repliement. Sun *et al* (Sun *et al.*, 2012), ont eux mis en évidence que le couplage du scFv à une molécule hydrophile comme NusA ou MBP permettait d'augmenter



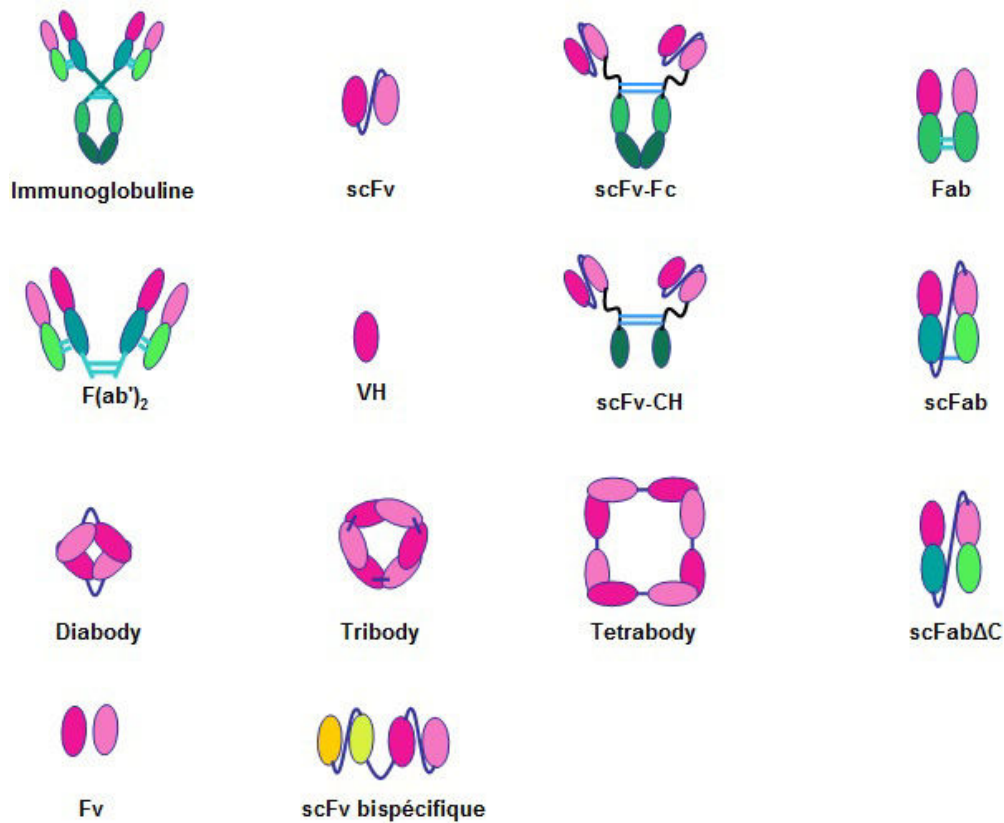
## Partie 1 : Les anticorps

la solubilité des scFv, en particulier lors de leur expression dans les cellules bactériennes Origami™ B(DE3)pLysS. Cette même équipe a aussi mis en évidence que l'ajout de 0,5 % de Tween20® dans le tampon permettait d'augmenter la solubilisation des scFv. La réduction du peptide de liaison à une taille de trois à 12 acides aminés empêche l'association "face à face" correcte des deux domaines variables (VH et VL) des scFv, contraignant ces derniers à s'associer entre eux de façon "tête-bêche" pour former des dimères de 60 kDa appelés *diabodies* (Figure 6). (P Holliger, Prospero, & Winter, 1993). De la même façon, des *triabodies* de 90 kDa (Iliades, Kortt, & Hudson, 1997) et des *tetrabodies* de 120 kDa (Todorovska *et al.*, 2001) pourraient même être obtenus en diminuant la taille du peptide de liaison à trois acides aminés et à moins de trois acides aminés, respectivement. Grâce à la présence de 2, 3 ou 4 sites de fixation de l'antigène, ces complexes peuvent bénéficier d'un phénomène d'avidité. (Adams, Schier, McCall, *et al.*, 1998; P. J. Hudson & Kortt, 1999) Cependant bien que ces fragments aient été observés dès 1998, aucun d'entre eux n'est utilisé couramment. Les scFv peuvent aussi être couplés aux régions CH3 pour former des scFv-CH ou aux régions CH2 et CH3, pour former des scFv-Fc. Ces deux formats d'anticorps ont une masse moléculaire plus élevée et une demi-vie suffisante pour réaliser des essais *in vivo*. Leur région Fc permet aussi d'activer les effecteurs cellulaires.

Des anticorps dont les deux sites de fixation de l'antigène interagissent avec des antigènes différents, ont été développés (Figure 6). Ces formats d'anticorps bispécifiques (*cf* paragraphe "2.5.4.4) *Les anticorps bispécifiques*"), comme les bio-scFv par exemple, ont un intérêt pour améliorer la biodistribution et l'élimination des antigènes, par exemple.



## Partie 1 : Les anticorps



**Figure 6 : Les principaux fragments d'anticorps.**

Les domaines variables sont représentés en violet et en rose. Les domaines constants sont représentés en bleu et en vert.

### 1.3) Fonctions des anticorps

Le principal rôle des anticorps est la neutralisation et l'élimination spécifique des pathogènes. Pour cela, le domaine variable va directement interagir avec l'antigène, et les régions constantes vont activer différentes fonctions effectrices.

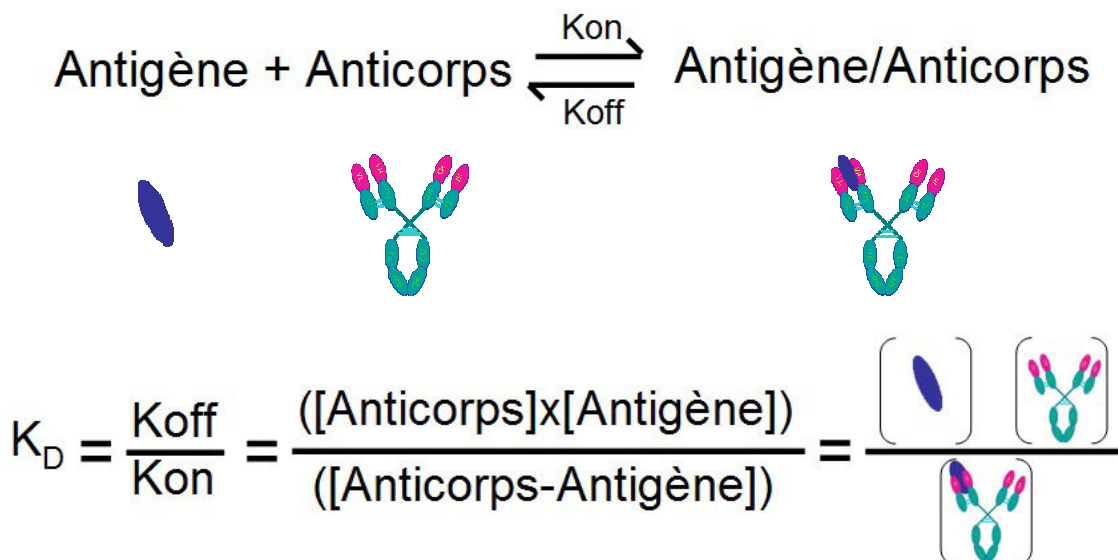
#### 1.3.1) L'interaction anticorps/antigène

Un immunogène est une substance qui est reconnue comme non-Soi par le système immunitaire, et qui induit l'activation de la réponse immunitaire dont la formation d'anticorps. Un antigène est une substance qui est reconnue par les anticorps mais qui n'induit pas forcément une réponse immunitaire, comme dans le cas des haptènes qui doivent être conjugués à une autre molécule (*carrier*) pour pouvoir activer la réponse immunitaire. Tous les immunogènes sont donc des antigènes mais la réciproque n'est pas vraie. Le paratope est la région de l'anticorps responsable de la reconnaissance de l'antigène, et l'épitope, ou

## Partie 1 : Les anticorps

déterminant antigénique, est la partie de l'antigène reconnue par l'anticorps. Certains antigènes ne possèdent qu'un seul épitope (antigène monovalent), alors que d'autres en possèdent plusieurs (antigène multivalent). Lorsque plusieurs épitopes sont présents sur une molécule ceux-ci peuvent être identiques (comme souvent dans le cas des polysaccharides) ou différents (protéines "complexes"). La valence est définie par le nombre de sites de fixation de l'antigène présents sur une molécule d'anticorps (égale à deux, dans le cas des IgG, et à 10, dans le cas des IgM pentamériques).

L'interaction entre chaque épitope et chaque site de fixation de l'antigène dépend des lois de la thermodynamique. Quatre types de liaisons non covalentes sont mis en jeu : les forces électrostatiques, les liaisons hydrogènes, les liaisons hydrophobes et les forces de Van der Waals. (Greenspan & Cooper, 1995) L'interaction entre l'antigène et l'anticorps est réversible et exothermique (libération de 40 à 60 kilojoules.mole<sup>-1</sup>). (He, Luo, & Li, 2007) L'affinité est la mesure indirecte de ces forces d'interaction. L'association et la dissociation des complexes anticorps/antigène est régie selon la loi d'action de masse (ou loi de Guldberg et Waage), qui permet de définir l'équilibre d'un système réactionnel. L'affinité de l'anticorps ( $K_D$ ) est définie comme le rapport de la constante de dissociation ( $K_{off}$ ) sur la constante d'association ( $K_{on}$ ) :  $K_D = K_{off}/K_{on}$  (Figure 7). L'affinité est un indicateur des vitesses d'association et dissociation, ainsi que de la stabilité du complexe anticorps/antigène. Les paramètres  $K_{off}$  et  $K_{on}$  peuvent être mesurés par différentes technologies comme la résonance plasmonique de surface (appareils Biacore® dans notre laboratoire, par exemple).

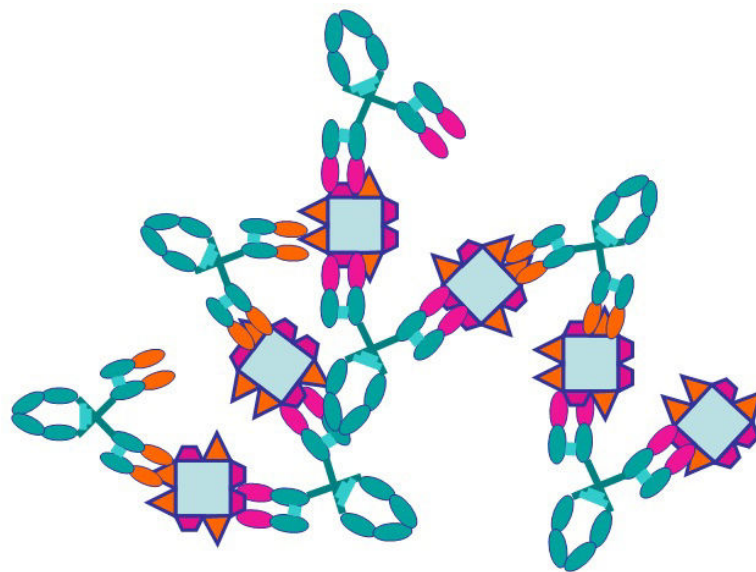


**Figure 7 : Mesure de l'affinité.**

[Anticorps] et [Antigène] représentent respectivement les concentrations molaires des anticorps et antigène sous forme soluble et [Anticorps-Antigène] représente la concentration molaire des complexes antigènes/anticorps.  $K_D$  représente l'affinité, exprimée en M,  $K_{on}$  représente la constante d'association, mesurée en  $M^{-1}.s^{-1}$ , et  $K_{off}$  représente la constante de dissociation, mesurée en  $s^{-1}$ .

## Partie 1 : Les anticorps

Comme les forces qui entrent en jeu dans l'interaction entre l'anticorps et l'antigène reposent sur l'établissement de liaisons faibles, et que la force de chaque liaison diminue avec le carré de la distance, une grande proximité entre le paratope et l'épitope est nécessaire pour permettre une interaction stable. Cette proximité entre l'antigène et l'anticorps a été confirmée par plusieurs études cristallographiques, et elle constitue la base de la spécificité de l'anticorps. (Davies & Cohen, 1996; Y. Li, Li, Smith-Gill, & Mariuzza, 2000; Padlan *et al.*, 1989) Ces études ont montré que l'épitope vient se loger entre les domaines variables des chaînes lourdes et légères, en interagissant principalement au niveau des CDR, et plus spécifiquement au niveau des CDR3. L'affinité de l'anticorps pour l'antigène est définie comme l'affinité entre un déterminant épitopique et l'un des deux sites de fixation de l'antigène. Ceci ne correspond à la réalité biologique de liaison des anticorps que dans le cas où l'antigène est une protéine soluble, présente à faible concentration. Comme les anticorps disposent de deux sites de fixation de l'antigène, des phénomènes d'avidité entrent en jeu. La formation de complexes associant plusieurs anticorps et antigènes (complexes immuns) va former un "réseau" limitant la diffusion des pathogènes et facilitant leur élimination en favorisant la phagocytose (Figure 8). (Dorrington & Klein, 1981; Greenspan, 2001)



**Figure 8 : Formation de complexes immuns.**

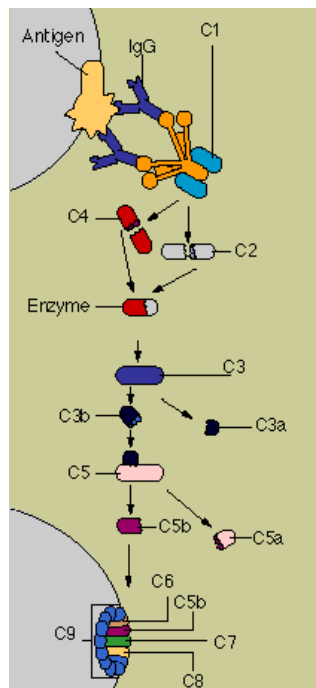
Les anticorps peuvent fixer simultanément plusieurs antigènes (carrés bleus) disposant d'épitopes identiques (triangles orange ou trapèzes violets), grâce à leurs deux sites de fixation de l'antigène. Les "réseaux" ainsi formés diffusent plus difficilement dans l'organisme et sont plus facilement éliminés par le système immunitaire.

### **1.3.2) Les fonctions effectrices**

Les interactions entre anticorps et antigènes ne permettent pas à elles seules d'éliminer le pathogène, et les anticorps présentent plusieurs fonctions effectrices qui vont permettre d'initier cette élimination.

#### **1.3.2.1) L'activation de la voie du complément**

Les complexes immuns comprenant des IgG1, IgG3 et IgM peuvent activer le complément par la voie dite "classique". (Gasque, 2004) La cascade d'activation du complément implique une trentaine de protéines sériques qui ont un rôle important dans la réponse immunitaire innée, en activant l'inflammation et la lyse du pathogène. Le complexe pentamoléculaire C1 se fixe au niveau d'un site localisé dans le CH2 des IgG et dans le CH3 des IgM, qui n'est accessible que lorsque l'anticorps s'est associé à un antigène. Le recouvrement d'un pathogène par plusieurs molécules d'anticorps et de complexes C1 (opsonisation) va activer une cascade d'activation impliquant d'autres molécules de la voie "classique". Finalement, les protéines C5 à C9 vont s'associer pour former le complexe d'attaque membranaire (Podack, Esser, Biesecker, & Müller-Eberhard, 1980), qui va former un canal dans la bicouche lipidique des pathogènes, permettant l'influx des fluides extracellulaires et la lyse des cellules qui avaient été reconnues par les anticorps (Figure 9). Les protéines du complément sont aussi impliquées dans l'inflammation grâce à la libération de médiateurs par les mastocytes et au chimiotactisme (attraction des cellules du système immunitaire au niveau de l'infection). (Ricklin, Hajishengallis, Yang, & Lambris, 2010)



**Figure 9 : Activation de la voie classique du complément.**

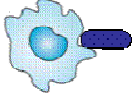
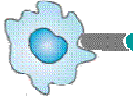
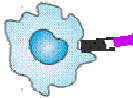
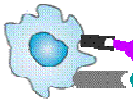
Le pontage d'un antigène par plusieurs anticorps va permettre aux complexes C1 d'interagir avec le domaine Fc d'IgG et des IgM. L'activation de ce complexe va engendrer une cascade d'activation de molécules du complément. *In fine* la formation du complexe d'attaque membranaire induira la lyse du pathogène. (Parham, 2005)

### 1.3.2.2) Activation de la phagocytose par les anticorps (opsonisation)

Les anticorps et le fragment C3b du complément sont des opsonines qui peuvent recouvrir une cible, respectivement de façon spécifique et non spécifique, et ainsi faciliter la phagocytose par les macrophages et neutrophiles. En l'absence d'opsonine, l'interaction entre les pathogènes et les phagocytes est faible. Les IgG peuvent interagir avec les récepteurs Fc présents à la surface des phagocytes, et donc agir comme des adaptateurs moléculaires qui facilitent la reconnaissance des pathogènes par ces cellules, permettant aux cellules immunitaires de s'affranchir d'une reconnaissance spécifique de chaque pathogène. (S. Greenberg, 1999; Indik, Park, Hunter, & Schreiber, 1995) Les cellules phagocytaires n'expriment pas de récepteur du fragment Fc spécifique des IgM, donc cette classe d'anticorps ne peut pas induire directement la phagocytose du pathogène. Cependant les IgM pentamériques disposent de cinq régions Fc, ce qui favorise le recrutement et l'activation du complément. Le complément activé se fixe alors à la surface des pathogènes et interagit avec des récepteurs spécifiques présents à la surface des phagocytes, permettant ainsi la

## Partie 1 : Les anticorps

phagocytose des pathogènes opsonisés. Si la fixation d'une seule classe opsonines est suffisante pour accroître la phagocytose, l'opsonisation simultanée par C3b et l'anticorps va engager les deux types de récepteurs à la surface des phagocytes (macrophages et polynucléaires neutrophiles) et permettre une optimisation de la phagocytose du pathogène (Figure 10). Dans le cas où les pathogènes sont phagocytés par les cellules dendritiques ils vont pouvoir être présentés aux lymphocytes, et donc activer la réponse immunitaire adaptative.

Cellule phagocytaire	Opsonine(s)	Adhésion
	Néan	+/-
	C3b	++
	Anticorps	++
	C3b + Anticorps	++++

**Figure 10 : Augmentation opsonine-dépendante de la phagocytose.**

En absence d'opsonines, la phagocytose est limitée. L'opsonisation par C3b et/ou des anticorps va augmenter la phagocytose.

### 1.3.2.3) La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

Trois classes de récepteurs pouvant interagir avec la région Fc des IgG1 et IgG3 ont été décrites (Tableau 3) : FcγRI (CD64), FcγRII -a, -b et -c (CD32 -a, -b et -c) et FcγRIII -a et -b (CD16 -a et -b). Ces récepteurs sont retrouvés à la surface des lymphocytes B, macrophages, éosinophiles, cellules dendritiques, monocytes, neutrophiles, mastocytes, cellules NK et basophiles. (Bryceson *et al.*, 2011; Schneider-Merck *et al.*, 2010; Sibénil, Dutertre, Fridman, & Teillaud, 2007) La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*, ADCC) est un mécanisme par lequel les anticorps vont activer des cellules cytotoxiques en se fixant aux récepteurs Fc présents à leur surface, et favoriser la lyse et l'apoptose des cellules ainsi ciblées. L'affinité des IgG pour ces

## Partie 1 : Les anticorps

récepteurs dépend de l'isotype : les IgG1 et IgG3 présentent les affinités les plus élevées, jusqu'à 20 nM. L'activation des cellules cytotoxiques, provoque la sécrétion des perforines, du granzyme B et des cytokines comme l'interféron gamma. La perforine va former un pore qui va permettre le passage du granzyme B dans le cytoplasme du pathogène procaryote ou eucaryote, et ainsi induire la dégradation de ses protéines. L'interféron gamma est une cytokine induisant l'apoptose des cellules eucaryotes, comme les cellules tumorales ou les cellules infectées par des virus, en augmentant la transcription du gène p53. Ces deux mécanismes vont agir de façon synergique pour induire l'apoptose du pathogène ou de la cellule infectée. (Casadevall & Pirofski, 2003; Raghavan & Bjorkman, 1996)

Dans le cas de pathogènes de grandes tailles, comme certains helminthes, l'ADCC va impliquer les IgE. Les IgE fixées à la surface d'un parasite vont pouvoir interagir avec le récepteur FcεRI à la surface des éosinophiles et induire leur dégranulation, et ainsi la lyse du pathogène. (Capron & Capron, 1994)

Récepteur	FCγRI (CD64)	FCγRIIa (CD32-a)	FCγRIIb (CD32-b)	FCγRIII-a (CD16a)	FCγRIIIb (CD16-B)	FCγRIIIc (CD32-C)
Motif lié	ITAM	ITAM	ITIM	ITAM	Aucun	ITAM
Exprimé par	Macrophages, eosinophiles, cellules dendritiques, neutrophiles activés par le G-CSF ou l'IFN-γ	Monocytes, macrophages, neutrophiles, eosinophiles, plaquettes, cellules dendritiques, cellules de Langerhans	Monocytes, macrophages, neutrophiles, eosinophiles, lymphocytes B, mastocytes, basophiles, cellules dendritiques	Cellules NK, macrophages, cellules dendritiques, eosinophiles, cellules T γδ, mastocytes, cellules de Langerhans, monocytes	Neutrophiles, eosinophiles activés par l'IFN-γ	Cellules NK
Affinité	(20 nM < K <sub>D</sub> < 30 nM) IgG1 = IgG3 > IgG4 >> IgG2	(300 nM < K <sub>D</sub> < 10 μM) IgG1 > IgG3 = IgG2 > IgG4	(5 μM < K <sub>D</sub> < 10 μM) IgG1 = IgG3 > IgG4	(100 nM < K <sub>D</sub> < 800 nM) IgG1 = IgG3	(900 nM < K <sub>D</sub> < 1 000 nM) IgG3 > IgG1	(5 μM < K <sub>D</sub> < 10 μM) IgG3 > IgG1 = IgG4 > IgG2
Effets principaux	Phagocytose, métabolisme oxydatif	Phagocytose, dégranulation des eosinophiles	Inhibition de la réponse immunitaire, inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes B	Activation de l'ADCC	Effet synergique avec FCγRIIa	Activation des cellules NK, activation de l'ADCC

**Tableau 3 : Principales caractéristique des récepteurs Fc.**

Principales cellules exprimant les récepteurs du fragment Fc, affinité du récepteur pour la région Fc et principaux effets induits par l'activation de ces récepteurs. ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ; ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif. (Janeway *et al.*, 2009; Strohl & Strohl, 2012)

### 1.3.2.4) Récepteur Fc néonatal

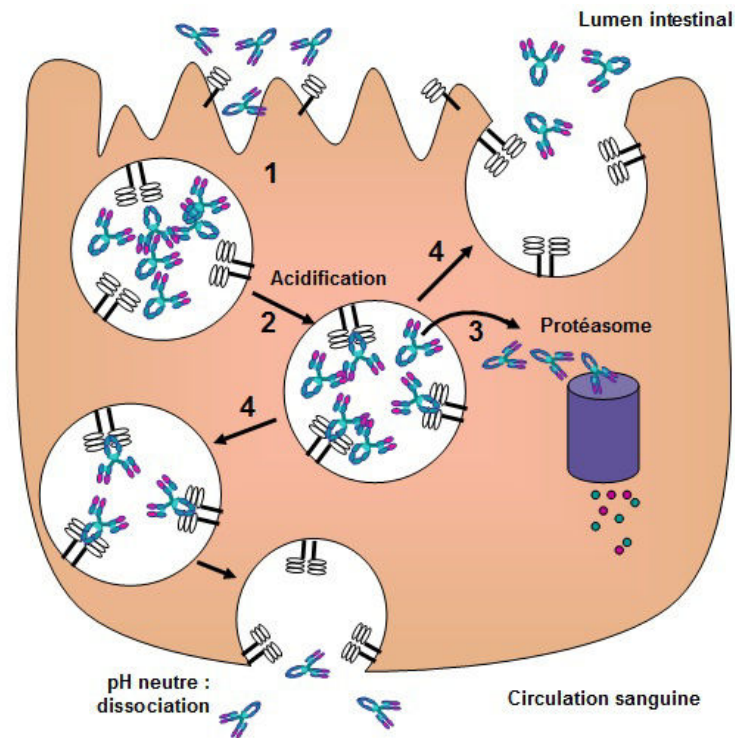
Le récepteur Fc néonatal (FcRn ou récepteur de Brambell) est un peptide de 62 kDa exprimé à la surface de très nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales intestinales ou les cellules phagocytaires. (Baker *et al.*, 2009) Il est composé de deux sous unités de β2-microglobuline et d'une chaîne alpha membranaire. (Simister & Mostov, 1989) Le récepteur Fc néonatal tire son nom du fait qu'initialement, il a

## Partie 1 : Les anticorps

été démontré qu'il était impliqué dans le passage transplacentaire des IgG de la mère vers son fœtus. (Ghetie & Ward, 2000; Roopenian & Akilesh, 2007) Il a aussi été mis en évidence que ce récepteur était présent à la surface des cellules intestinales du nouveau-né. Les IgG contenues dans le colostrum vont ainsi pouvoir franchir la barrière intestinale de l'enfant par transcytose puis rejoindre son compartiment vasculaire (Figure 11). Ce transfert confère au nourrisson une immunité passive pendant environ quatre semaines après la naissance, alors qu'il ne peut pas encore synthétiser ses propres anticorps.

Le récepteur néonatal a aussi un rôle dans l'augmentation de la demi-vie des IgG, en permettant leur recyclage. En effet les anticorps pénètrent naturellement dans les cellules, notamment par pinocytose, où ils sont dégradés par les protéases cellulaires. Cependant, à pH acide (pH <6,5) les résidus histidines de la région Fc des IgG sont protonés et peuvent établir des liaisons hydrogènes avec les résidus acides du FcRn, présents à la surface interne de la membrane des vésicules d'endocytose ou de pinocytose. (Gurbaxani & Morrison, 2006; Story, Mikulska, & Simister, 1994; Suzuki *et al.*, 2010) En conséquence, lors de l'acidification de ces vésicules, les IgG peuvent être fixées par le récepteur néonatal et être protégées de la dégradation protéolytique. Les IgG en excès, non fixées aux FcRn seront quant à elles détruites par la voie de dégradation lysosomale. (Brambell, Hemmings, & Morris, 1964; Junghans & Anderson, 1996) Lors du recyclage des membranes des vésicules d'endocytose, la membrane de ces vésicules va fusionner avec la membrane plasmique des cellules et exposer à nouveau les complexes IgG-FcRn sur la face externe de la membrane plasmique. Les complexes IgG-FcRn se retrouvent alors exposés au pH neutre (pH > 7,4) de la circulation sanguine, provoquant leur dissociation. Cette protection et ce recyclage des IgG après internalisation expliquent la longue demi-vie des IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> et IgG<sub>4</sub> (environ 21 jours). (Israel *et al.*, 1997; Tzaban *et al.*, 2009) Les IgG<sub>3</sub> dont l'un des résidus histidines est altéré ne peuvent pas se fixer au FcRn ce qui explique que leur demi-vie n'est que de cinq à sept jours. (Martin & Bjorkman, 1999; Vaughn & Bjorkman, 1998)





**Figure 11 : Recyclage des IgG et transfert de l'immunité passive au nourrisson.**

1) Les IgG peuvent pénétrer dans les cellules par pinocytose voire endocytose. 2) Lors de l'acidification de l'endosome, les IgG vont interagir avec les FcRn. 3) Les IgG non fixées aux FcRn vont être dégradées par le protéasome. 4) Les IgG qui ont interagi avec les FcRn vont être recyclées lors de la fusion de la vésicule à la membrane apicale ou à la membrane basale. Le pH neutre du sang permet la dissociation des IgG recyclées et leur retour dans la circulation sanguine.

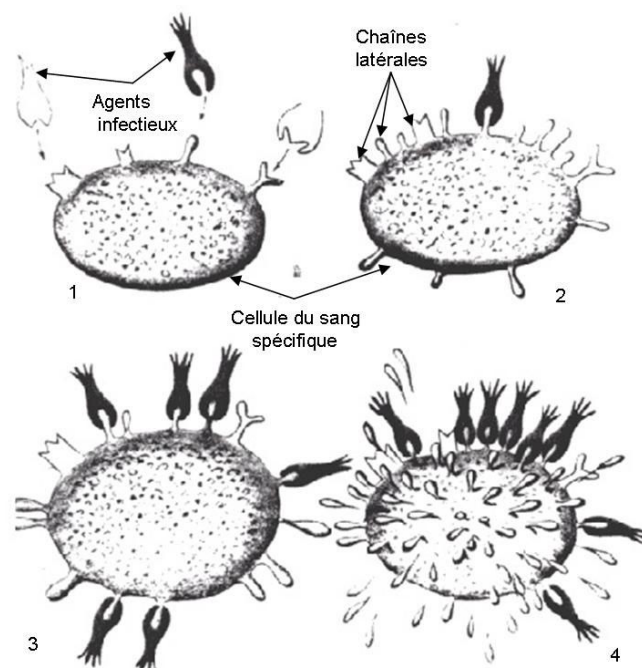
## 1.4) Synthèse des anticorps

### 1.4.1) Génétique et diversité des anticorps

Les anticorps peuvent interagir avec l'ensemble des antigènes naturels présents dans l'organisme bien que ceux-ci présentent des caractéristiques très différentes (taille, structure, masse moléculaire ou nature physico chimique, par exemple). (Van Regenmortel, 1989) Avec le développement de la chimie et de la biologie moléculaire, il est apparu que l'organisme pouvait synthétiser des anticorps interagissant avec des antigènes synthétiques, auxquels le genre humain n'avait jamais été exposé auparavant. Ce fait remarquable a permis de constater qu'à partir d'un génome de taille finie, l'organisme est capable de synthétiser des anticorps interagissant avec une quasi-infinité d'antigènes. Les anticorps ont ainsi bouleversé le dogme "un gène, une protéine" selon lequel un gène est transcrit en un seul ARN qui est alors traduit en une protéine unique. Ce paradoxe entre nombre fini de gènes et nombre potentiellement infini d'anticorps indique aussi que des mécanismes complexes doivent être à l'origine de la diversité génétique des anticorps.

## Partie 1 : Les anticorps

Historiquement, Paul EHRLICH (1854-1915) proposa en 1897 la théorie sélective selon laquelle les anticorps reconnaissent les antigènes en raison de leurs configurations stéréochimiques, et il a émis la théorie de la chaîne latérale (Figure 12). Selon cette théorie, certaines cellules sont susceptibles de se lier à des agents infectieux grâce à des molécules réceptrices spécifiques présentes à leur surface, appelées "chaines latérales", et qui correspondent à la notion actuelle d'anticorps. L'interaction avec plusieurs pathogènes engendrerait une augmentation de la synthèse de ces récepteurs de spécificité unique ("balles magiques"), dont une partie serait sécrétée dans le sang et pourrait "inactiver" sélectivement le pathogène. (Ehrlich, 1904)



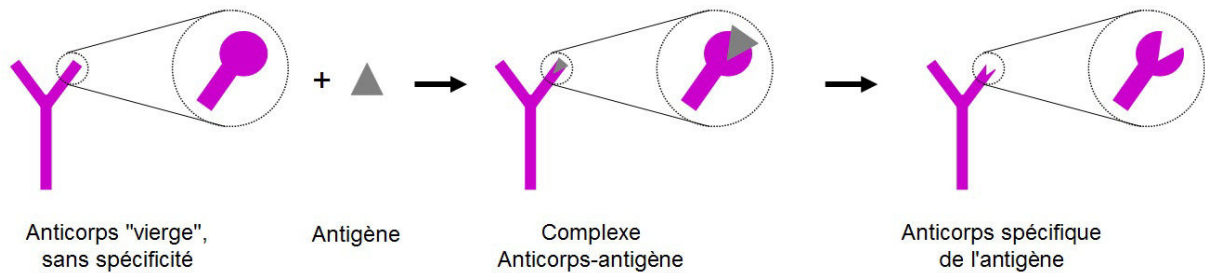
**Figure 12 : Théorie de la chaîne latérale d'Ehrlich.**

La fixation de plusieurs agents infectieux au niveau de récepteurs ("chaines latérales") présents à la surface de cellules spécifiques du sang (1 à 3) va augmenter l'expression de ces récepteurs à la surface de la cellule, et une partie de ceux-ci sera sécrétée dans le sang (4). (Ehrlich, 1904)

Dans les années 1930-1940 apparut la théorie dite instructive, selon laquelle l'antigène joue un rôle actif dans la détermination de la spécificité des anticorps. Cette théorie fut initiée dans les années 1930 par Friedrich BREINL (1888-1936) et Félix HAUROWITZ (1896-1988), puis elle a été reprise et redéfinie dans les années 1940 par Linus PAULING (1901-1994) avant d'être finalement réfutée dans les années 1960 avec l'avancée des connaissances sur l'ADN. Selon cette théorie, l'antigène est responsable de la spécificité des anticorps. En

## Partie 1 : Les anticorps

effet, Pauling pensait qu'initialement les anticorps étaient "vierges" mais que l'antigène interagissait de façon non covalente avec eux et leur imposaient une conformation complémentaire. (Figure 13)

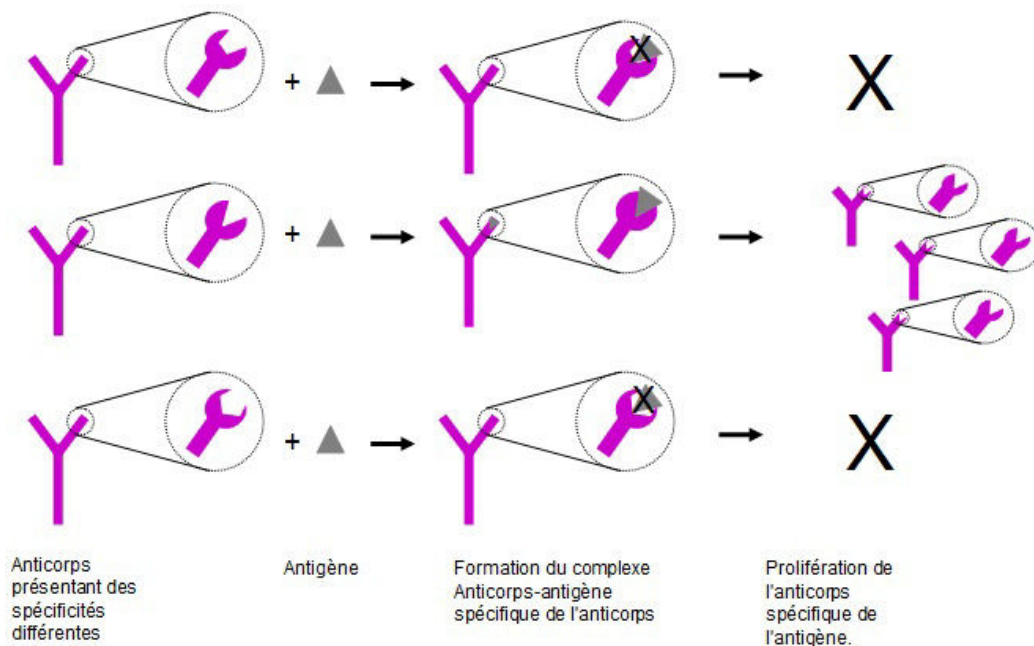


**Figure 13 : Théorie instructionniste telle que développée par Pauling.**

Avant l'interaction avec l'antigène, les anticorps ne sont spécifique d'aucune molécule. Après contact avec les antigènes, les anticorps deviennent spécifiques des antigènes avec lesquels ils ont interagi.

En 1955, Niels Kaj JERNE (1911-1994) proposa la théorie de la sélection naturelle des anticorps. (Jerne, 1955) Selon cette hypothèse, les anticorps dirigés contre tous les antigènes possibles sont présents dans l'organisme en faible quantité. Le contact avec l'antigène induirait non pas la formation des anticorps, mais seulement l'augmentation de la quantité des anticorps capables de se lier à cet antigène. En 1956, Frank MacFarlane BURNET (1899-1895) et David W. TALMAGE (1919-) s'intéressèrent séparément au modèle de Jerne et émirent la théorie de la sélection clonale et de la variation somatique. Selon cette théorie, un lymphocyte donné exprime des récepteurs membranaires spécifiques d'un antigène, dont la spécificité unique est déterminée avant la rencontre de l'antigène. La liaison de l'antigène à son récepteur cellulaire va induire uniquement la prolifération des cellules porteuses de ces récepteurs spécifiques, et la sécrétion de ces récepteurs (Figure 14). Les modèles actuels sont fondés en partie sur cette théorie mais elle n'explique pas les mécanismes biologiques conduisant à la diversité des anticorps. Pour les comprendre, il a fallu attendre 1983 et des travaux de Tonegawa, récompensés par le prix Nobel de physiologie et médecine en 1987. (Tonegawa, 1976, 1983)

## Partie 1 : Les anticorps



**Figure 14 : Théorie de la sélection clonale développée par Mac Burnet.**

Avant la rencontre avec l'antigène, des anticorps sont spécifique de l'ensemble des antigènes. Seul le clone sécréteur de l'anticorps ayant interagi avec l'antigène va proliférer et sécréter les anticorps spécifiques de l'antigène.

A ce jour, cinq mécanismes permettent d'expliquer la présence d'une très grande ("quasi-infinité") diversité dans la spécificité des anticorps, codés à partir d'un génome de taille finie. Les quatre premiers mécanismes sont indépendants de la présence de l'antigène, contrairement au dernier qui ne se produit qu'après stimulation antigénique :

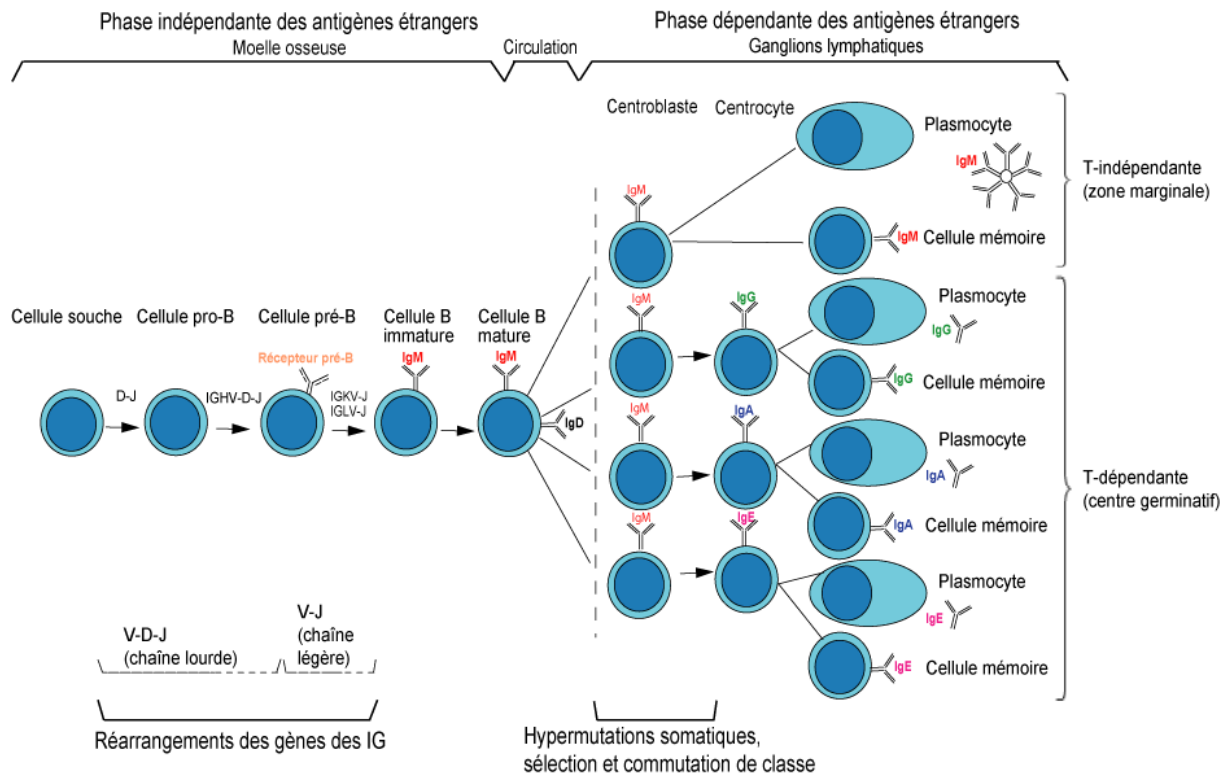
- les réarrangements des gènes codant les domaines variables,
- la flexibilité jonctionnelle,
- l'addition de nucléotides N et P,
- l'association combinatoire des chaînes légères et lourdes,
- les hypermutations somatiques.

Le séquençage du génome humain dans les années 1990 à 2000 (Venter *et al.*, 2001) a permis de mettre en évidence que sa taille est limitée à environ 2,85 milliard de nucléotides et contient "uniquement" 20 000 à 30 000 gènes, contrairement aux premières estimations qui évaluaient le nombre de gènes à plusieurs centaines de milliers. (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) Selon certaines estimations, le système immunitaire pourrait générer jusqu'à  $5.10^{15}$  anticorps différents grâce à ces différents mécanismes (pour un bilan, cf Tableau 4, p54). (Janeway *et al.*, 2009)

### 1.4.2) Diversité due aux réarrangements V-(D)-J

Le séquençage du génome a permis de mettre en évidence que les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$ , et les chaînes lourdes  $\gamma$  sont codées par des familles multi-géniques distinctes et situées respectivement sur les chromosomes humains 22, 2 et 14. Chacune des familles multi-géniques contient plusieurs séquences codantes, appelées segments géniques. La famille multi-génique codant les chaînes lourdes est composée des segments géniques V (pour *Variable*), D (pour *Diversity*), J (pour *Joining*) et C (pour *Constant*). Les familles multi-géniques codant les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  sont dépourvues du segment génique D. Les jonctions V-J et V-D-J se font au niveau des CDR3, ce qui explique la diversité élevée des séquences constituant cette région. (Gellert, 1997; Grawunder & Harfst, 2001) Les gènes V(D)J codent l'ensemble du domaine variable des immunoglobulines, mais les gènes V codent à eux seuls environ 85 % de cette région. Le réarrangement de l'ADN codant les gènes V(D)J a lieu lors de la maturation précoce des cellules B, avant tout contact avec l'antigène : les réarrangements D-J de la chaîne lourde ont lieu au stade pro-B et sont suivis des réarrangements V-DJ de la chaîne lourde, au stade pré-B (Figure 15). Les gènes C codent pour la région constante des immunoglobulines, et avant le réarrangement de l'ADN, ils sont éloignés de la région codant les gènes V(D)J. Sur l'ADN germinale, ils sont précédés en 5' par une courte séquence appelée peptide signal (ou encore *leader*, "L"), dont le rôle est uniquement de permettre aux chaînes lourdes et légères en cours de synthèse de sortir du réticulum endoplasmique. Après la traduction de l'ARN codant l'immunoglobuline, ce peptide est clivé.

## Partie 1 : Les anticorps



**Figure 15 : Différenciation des lymphocytes B.**

Ce schéma met en évidence les différents stades auxquels se font les réarrangements V(D)J. D'après IMGT (<http://www.imgt.org>)

Dans le cas des chaînes légères, 70 gènes V (40 gènes  $V\kappa$  et 30 gènes  $V\lambda$ ) et neuf gènes J (cinq gènes  $J\kappa$  et quatre gènes  $J\lambda$ ) ont été identifiés. Au sein des sous-types  $\kappa$  et  $\lambda$ , les segments géniques V et J peuvent s'associer indifféremment entre eux pour former un exon continu, permettant la génération de 320 ( $40 \times 5 + 30 \times 4$ ) chaînes légères différentes. Pour les chaînes lourdes, 40 gènes V, 25 gènes D et six gènes J ont été identifiés. Leur réarrangement peut donc former 6 000 ( $40 \times 25 \times 6$ ) chaînes lourdes différentes.

Les mécanismes permettant ces réarrangements génétiques dépendent de séquences spécifiques. Chaque segment génique est flanqué d'au moins une séquence spécifique appelée séquence signal de recombinaison (*Recombination Signal Sequences, RSS*), qui est impliquée dans la recombinaison. Ces séquences sont localisées à l'extrémité 3' de chaque segment génique V, à l'extrémité 5' de chaque segment génique J et de part et d'autre de chaque segment génique D (Figure 16). Il existe deux types de séquences RSS, et ces séquences sont composées de trois régions distinctes (Tonegawa, 1983) :

- Une région heptamérique de séquence consensus 5' CACAGTC3'.
- Une région nonamérique de séquence consensus 5' ACAAAAACC3'



## Partie 1 : Les anticorps

- Une région intercalaire de 23 pb (la séquence RSS est alors dite à deux tours d'hélice d'ADN), ou de 12 pb (la séquence RSS est alors dite RSS dite à un tour d'hélice d'ADN)

Les RSS à un tour ne peuvent s'associer qu'avec des RSS à deux tours et inversement (règle "12/23"). Dans le cas des chaînes lourdes, chaque segment D est flanqué en 5' et en 3' d'une séquence RSS à un tour, alors que les segments V et J sont flanqués d'une séquence RSS à deux tours. Les segments D ne peuvent donc se réarranger qu'avec l'extrémité d'un segment V compatible en 5' et d'un segment J compatible en 3'. Ce mécanisme de réarrangement empêche la survenue de réarrangements non fonctionnels (Figure 16). (Meek, Hasemann, & Capra, 1989)

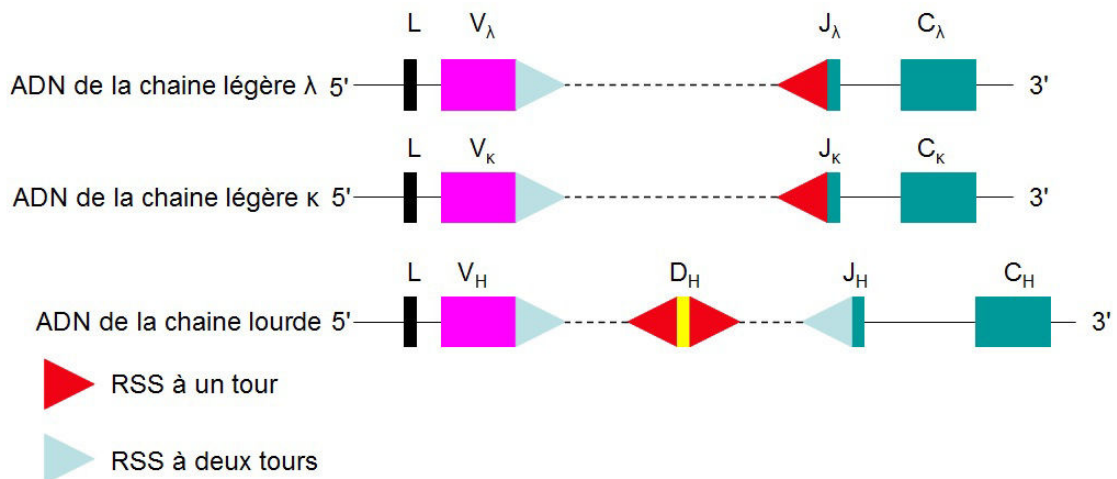
Les réarrangements de l'ADN au niveau de ces séquences comprennent cinq étapes et impliquent particulièrement i) la TdT (*Terminal Desoxynucleotidyl Transférase*), une enzyme exprimée au stade précoce du développement des lymphocytes B ; ii) RAG-1 et RAG-2 (*Recombination-Activating Gene*), deux enzymes catalysant le réarrangement et la recombinaison de l'ADN iii) NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*), un complexe de réparation de l'ADN qui fait intervenir notamment les protéines Ku, une protéine kinase et la nucléase Artemis. (Drouet *et al.*, 2006; Oettinger, Schatz, Gorka, & Baltimore, 1990; Schatz, Oettinger, & Schlissel, 1992) Les cinq étapes peuvent être simplifiées comme suit :

- 1) Les protéines RAG-1 et RAG-2 reconnaissent les séquences RSS et induisent leur chevauchement.
- 2) Les protéines RAG-1 et RAG-2 vont alors cliver l'ADN entre les séquences RSS et le gène.
- 3) Les extrémités libres générées lors du clivage vont se replier sur elles-mêmes pour former des extrémités en "épingle à cheveux". Les brins d'ADN sont maintenus par la protéine Ku.
- 4) La protéine Artemis clive "l'épingle à cheveux" au niveau d'un site aléatoire, formant des nucléotides palindromiques ("nucléotides P"). Des endonucléases simple brin vont supprimer quelques nucléotides.
- 5) Jusqu'à 15 nucléotides aléatoires (nucléotides "nucléotides N") peuvent ensuite être optionnellement ajoutés par la TdT, après les nucléotides P.
- 6) Les protéines kinases Ku70, Ku80 et Artemis, permettent la jonction des séquences codantes et des séquences signal, et leurs ligations.

Ce réarrangement de l'ADN va former un exon unique V(D)J, et va le rapprocher de l'ADN codant les gènes C. Ce réarrangement va rapprocher les gènes V(D)J et C et leur

## Partie 1 : Les anticorps

permettre d'être transcrits en un ARN primaire. Un mécanisme d'épissage de l'ARN primaire va supprimer les régions intergéniques situées entre les gènes C et permettre en particulier le mécanisme de commutation isotypique (cf paragraphe "1.4.7) La commutation isotypique"). L'ARN primaire épissé sera polyadénylé et formera ainsi l'ARNm. Finalement, cet ARNm sera traduit pour former les chaînes lourdes et les chaînes légères de l'anticorps.



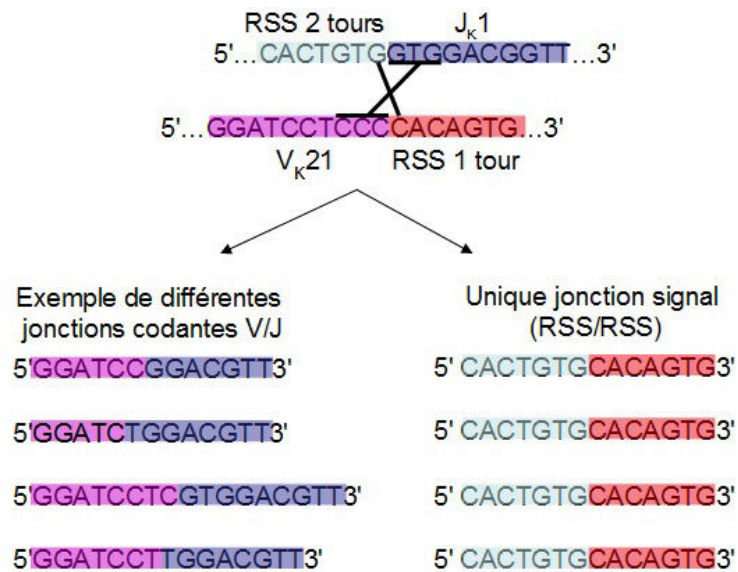
**Figure 16 : Emplacement des séquences RSS dans au niveau des segments géniques.**

Les RSS à 1 tour (rouge) ne peuvent s'associer qu'avec les RSS à 2 tours (bleu ciel). Les réarrangements des chaînes légères ne peuvent donc former que des exons uniques VH et les réarrangements des chaînes lourdes ne peuvent donc former que des exons uniques VDJ. (Kindt *et al.*, 2008)

### 1.4.3) La flexibilité jonctionnelle

Le mécanisme de flexibilité jonctionnelle intervient au stade pré-B. Au cours de la recombinaison, la jonction des séquences RSS entre elles se fait systématiquement en respectant la séquence initiale. Cependant, au niveau des brins codants, des endonucléases simples brins peuvent supprimer des nucléotides. Par conséquent, durant le mécanisme de réparation de l'ADN, la jonction de l'ADN des séquences codantes se fait de façon imparfaite. (Figure 17) Cette jonction aléatoire va introduire de la diversité au niveau de la jonction V-J pour les chaînes légères, et au niveau des jonctions V-D et D-J pour les chaînes lourdes. (Schlüssel, 2003; Sekiguchi & Ferguson, 2006) L'introduction de tels nucléotides peut provoquer un décalage du cadre de lecture, qui va induire de la diversité mais risque aussi de faire apparaître précocément des codons stop et de produire une immunoglobuline non fonctionnelle.





**Figure 17 : Principe du mécanisme de flexibilité jonctionnelle.**

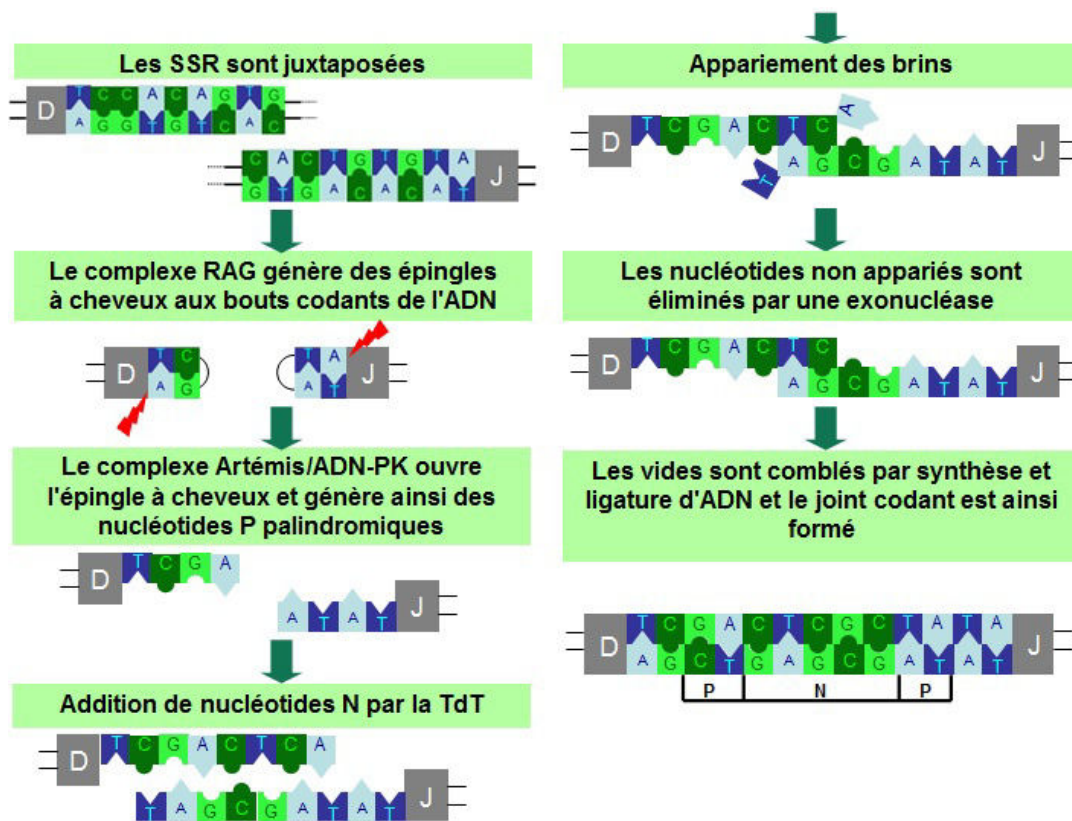
Alors que la jonction entre les séquences RSS est toujours parfaite, la jonction des gènes V (violet) et J (bleu marine) est imparfaite. Selon l'emplacement de la jonction V-J (rouge et bleu ciel) la séquence sera différente, introduisant ainsi de la diversité mais risquant de faire apparaître des codons stop prématurés. (Kindt *et al.*, 2008)

#### 1.4.4) L'addition de nucléotides N et P

Au stade pré-B, la recombinaison de l'ADN des immunoglobulines fait aussi intervenir un mécanisme d'addition et de suppression de nucléotides, qui va augmenter la diversité des anticorps. Lors du réarrangement V(D)J, le clivage de "l'épingle à cheveux" laisse un brin d'ADN monocaténaire libre, à la jonction d'un segment génique et d'une séquence RSS. (Fisk *et al.*, 1997) Jusqu'à 20 nucléotides vont éventuellement pouvoir être ajoutés aléatoirement par la TdT au niveau du brin d'ADN libre, sans qu'ils soient codés par une matrice ("nucléotides N", *Non-templated*). (Benedict, Gilfillan, Thai, & Kearney, 2000) Les nucléotides ajoutés vont former deux brins monocaténaires qui vont s'apparier sur une courte séquence, et les nucléotides non appariés situés aux extrémités des deux brins d'ADN seront clivés par des enzymes de réparation de l'ADN. Ces enzymes vont ensuite ajouter les nucléotides complémentaires et ligaturer l'ADN, pour obtenir une jonction double brin. Les nucléotides complémentaires de la séquence monocaténaire formée suite au clivage de "l'épingle à cheveux" vont former une séquence palindromique double brin de part et d'autre des nucléotides N, c'est pourquoi on parle de nucléotides palindromiques (nucléotides P) (Figure 18). La TdT est principalement exprimée durant le réarrangement des gènes codant la

## Partie 1 : Les anticorps

chaîne lourde, et son expression est plus faible durant le réarrangement des gènes codant la chaîne légère. Par conséquent les nucléotides N sont plus fréquents dans les chaînes lourdes que dans les chaînes légères. Des exonucléases peuvent exciser des nucléotides double brin au niveau de cette jonction, ce qui peut diminuer la taille du CDR3 jusqu'à une taille inférieure au segment codé par le gène D (Figure 18). (Lafaille, DeCloux, Bonneville, Takagaki, & Tonegawa, 1989; Nadel & Feeney, 1997)



**Figure 18 : Ajout des nucléotides P et N.**

L'introduction de nucléotides P et N diversifie la jonction entre les segments géniques pendant le réarrangement des gènes d'immunoglobulines. SSR : Séquence Signale de Recombinaison. (Janeway *et al.*, 2009)

L'ajout aléatoire de nucléotides par le mécanisme de flexibilité jonctionnelle a lieu au niveau des CDR3, ce qui augmente la diversité de cette région importante pour l'interaction avec les antigènes. Ces ajouts vont générer une multitude de séquences peptidiques différentes par leurs tailles et par leurs compositions. Ces différentes séquences protéiques vont permettre d'obtenir des CDR3 dont les structures tri-dimensionnelles sont diverses, et donc vont pouvoir s'adapter à des antigènes de conformations différentes. Cela explique que les CDR3 soient les régions les plus fortement impliquées dans l'interaction avec l'antigène.

Si les mécanismes de flexibilité jonctionnelle ont fait apparaître précocement des codons stop qui interrompent la traduction, la cellule B effectue un nouveau réarrangement sur l'allèle situé sur le chromosome homologue. Si ce deuxième réarrangement n'est pas

## Partie 1 : Les anticorps

productif, la cellule B entre en apoptose. (Yancopoulos & Alt, 1986) Seul environ 8 % des cellules pré-B de la moelle osseuse parviennent à maturité. (Kindt *et al.*, 2008)

### 1.4.5) L'association combinatoire des chaînes légères et lourdes

La spécificité d'un anticorps est liée à la conformation de son site de liaison de l'antigène, formé par les domaines variables des chaînes lourdes et légères. Le dernier niveau d'introduction de diversité au niveau des domaines variables des anticorps est donc la combinaison aléatoire d'une chaîne lourde avec une chaîne légère (brezinschek *j immunol* 1998). Les réarrangements V(D)J permettent de créer environ 320 chaînes légères et 6 000 chaînes lourdes. En théorie 1 920 000 (320 x 6 000) associations différentes peuvent donc avoir lieu (Tableau 4). Néanmoins ce nombre important d'association est à pondérer. En effet, chaque gène V, D et J n'est statistiquement pas utilisé à la même fréquence puisque certains des segments géniques, comme les VH1, VH2 et VH3, sont utilisés plus fréquemment que d'autres. (Davidkova, Pettersson, Holmberg, & Lundkvist, 1997; Huang, Stewart, Schwartz, & Stollar, 1992; Meffre, Chiorazzi, & Nussenzweig, 2001)

	Immunoglobuline	
	Chaînes lourdes	Chaînes légères $\kappa+\lambda$
Segments variables, V	40	70 (40 $\kappa$ et 30 $\lambda$ )
Segments de diversité, D	25	0
Lecture des segments D dans les 3 cadres de lecture	Rarement	Pas de gène D
Segments de jonction, J	6	9 (5 $\kappa$ et 4 $\lambda$ )
Jonctions avec nucléotides N et P	2 jonctions par chaîne (V-D et D-J)	Jonction dans 50 % des chaînes
Nombre de paires de gènes variables, V	1,9.10 <sup>6</sup>	
Diversité jonctionnelle	~3.10 <sup>7</sup>	
<b>Diversité totale</b>	<b>~5.10<sup>15</sup></b>	

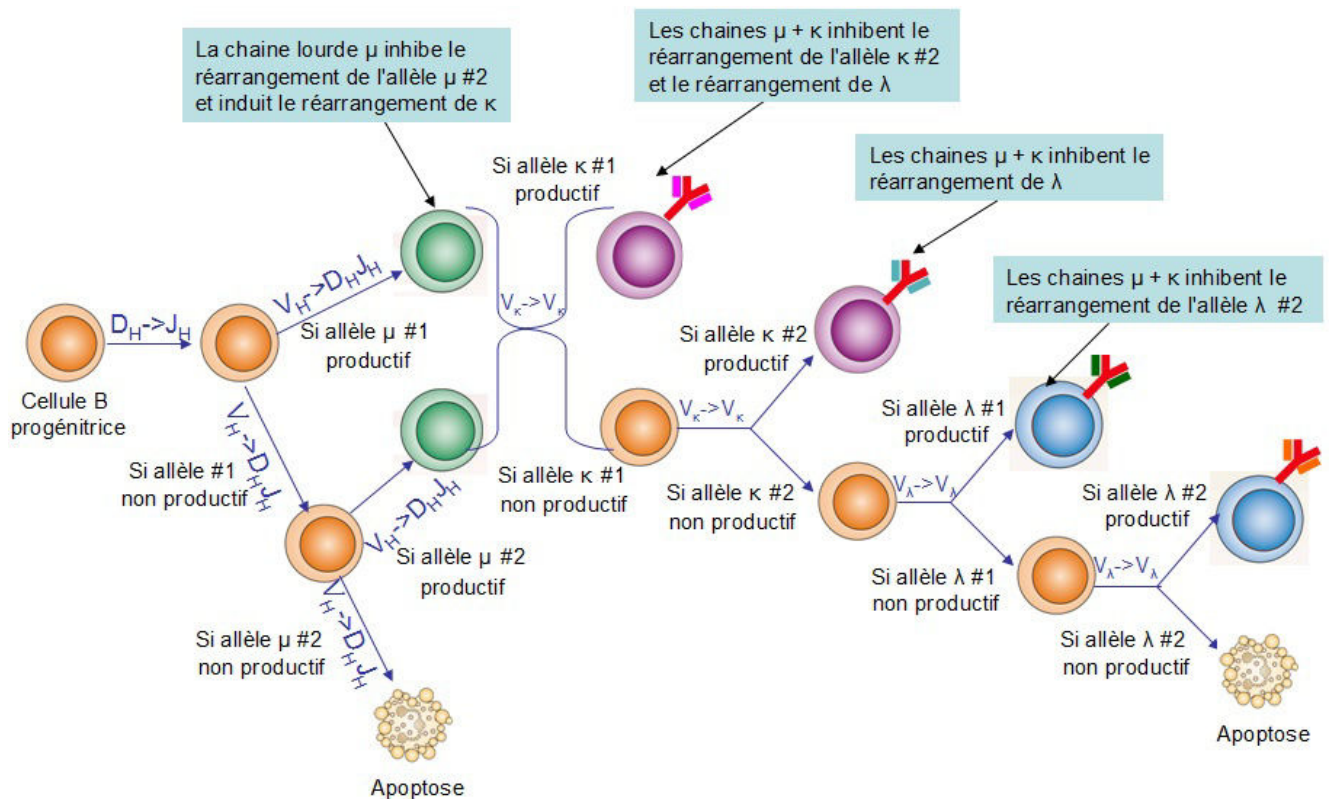
**Tableau 4 : Estimation de la diversité des immunoglobulines.**

Il est important de noter que cette figure ne tient pas compte des mécanismes d'hyper mutation somatique, qui permettent de dépasser cette diversité de 10<sup>15</sup> séquences. (Janeway *et al.*, 2009; Kindt *et al.*, 2008)

Comme toutes les cellules de l'organisme, les cellules B disposent du matériel génétique d'origine maternelle et d'origine paternelle. Malgré cette diploïdie, chez les individus hétérozygotes pour les gènes codant les immunoglobulines, les gènes V(D)J réarrangés d'un seul des deux chromosomes sont exprimés. Lorsqu'un réarrangement est

## Partie 1 : Les anticorps

fonctionnel, le phénomène d'exclusion allélique empêche tout nouveau réarrangement. Les cellules B n'exprimeront donc qu'une seule et unique combinaison VDJ, codant les chaînes lourdes, et VJ, codant les chaînes légères, et ne présenteront donc qu'une seule spécificité antigénique. (Brady, Steinel, & Bassing, 2010; Yancopoulos & Alt, 1986) Lorsqu'une chaîne lourde  $\mu$  est synthétisée, elle inhibe le réarrangement du deuxième allèle et active le réarrangement de la chaîne légère  $\kappa$ . Si la chaîne légère  $\kappa$  codée par le premier allèle est fonctionnelle, elle inhibe le réarrangement du deuxième allèle et elle s'assemble à la chaîne lourde pour former l'immunoglobuline fonctionnelle. Si le réarrangement des deux allèles  $\kappa$  n'est pas fonctionnel, le réarrangement du premier allèle  $\lambda$  est initié. Si le réarrangement des deux allèles  $\lambda$  n'est pas fonctionnel, la cellule B entre en apoptose (Figure 19).



**Figure 19 : Phénomène d'exclusion allélique.**

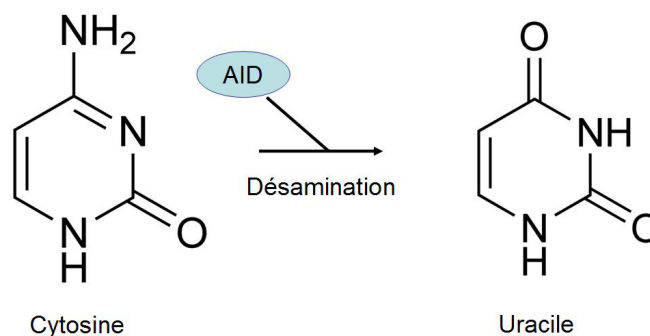
Ce processus permet, en cas de réarrangements non fonctionnels, d'effectuer le réarrangement du deuxième allèle. (Kindt *et al.*, 2008)

### 1.4.6) L'hypermutation somatique

Le phénomène d'hypermutation s'exerce après les phénomènes qui viennent d'être exposés, et après contact entre l'immunoglobuline réarrangée et un antigène (Figure 15). (Berek & Milstein, 1987; S. Kim, Davis, Sinn, Patten, & Hood, 1981) Avant contact avec

## Partie 1 : Les anticorps

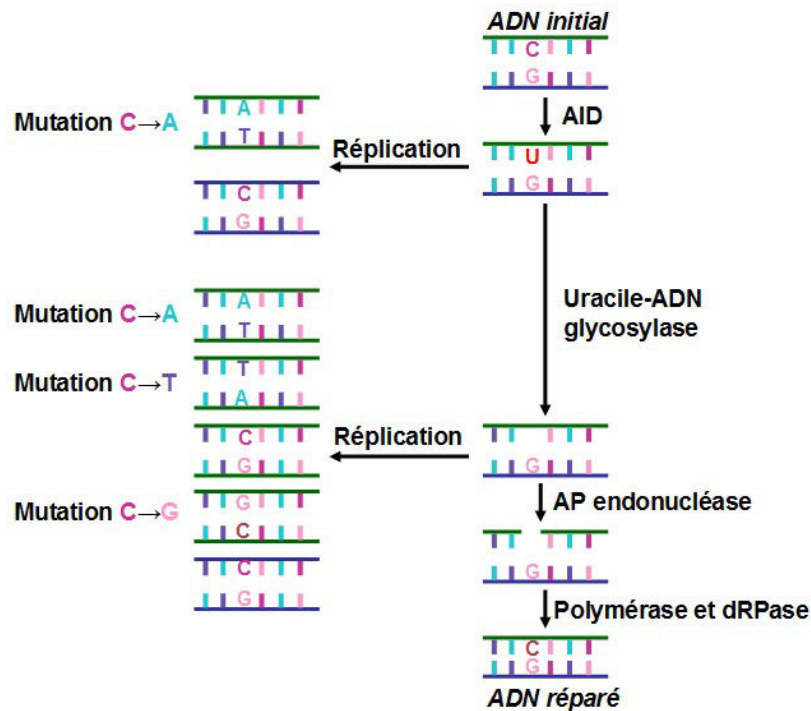
l'antigène, les cellules B immatures n'expriment à leur surface que des IgM et IgD (co-expression) et vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles seront ultérieurement stimulées par des cellules présentatrices de l'antigène. Le phénomène d'hypermutation somatique s'effectue après cette stimulation, au sein des centres germinatifs des follicules secondaires. Ces derniers sont formés à partir des follicules primaires, dans les jours suivant une stimulation antigénique qui a activé une réponse cellulaire B dépendante des cellules T. (MacLennan, 1994a, 1994b) Les centres germinatifs comportent des cellules T auxiliaires, des macrophages, des cellules dendritiques folliculaires et une zone où les lymphocytes B prolifèrent. (Bloom & Fawcett, 1975) L'interaction entre le CD40 de la cellule B et du CD40 ligand de la cellule T auxiliaire va activer la cellule B et induire l'expression de la protéine AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*). (Muramatsu *et al.*, 1999, 2000) Cette protéine va désaminer des cytosines du brin codant, situés au niveau d'une séquence d'ADN de 1 500 pb qui comporte l'intégralité du segment V(D)J. L'AID ne peut se fixer que sur un brin d'ADN monocaténaire ce qui implique que la double hélice soit temporairement déroulée au niveau de la séquence codant les domaines variables, ce qui est le cas lors de la transcription. Lorsqu'une cytosine est désaminée, sa structure chimique correspond alors à celle d'une uracile, qui est une base azotée uniquement présente dans l'ARN (Figure 20). L'introduction de telles désaminations dans l'ADN va donc provoquer l'activation des enzymes d'excision et réparation de l'ADN comme l'UNG (*Uracil-DNA Glycosylase*) et l'APE1 (*Apurinic/APyrimidinic Endonuclease 1*, AP endonucléase). (Pérez-Durán *et al.*, 2012) Selon que le brin servant de matrice pour la réparation de l'ADN est le brin muté ou non, des mutations seront ou non être introduites (Figure 21).



**Figure 20 : Désamination des nucléotides catalysée par l'AID.**

Lorsque le groupement amine d'une cytosine est supprimé, cette base azotée est transformée en uracile, normalement présente uniquement dans l'ARN.





**Figure 21 : Mutations induite par l'AID.**

La mutation initiale cytosine vers uracile va être détectée et réparée. Cependant, le mécanisme de réparation va pouvoir introduire ou non des erreurs lors de la réplication de l'ADN selon le brin qui est choisi comme matrice. Adapté de Neuberger *et al.* (Neuberger, Harris, Di Noia, & Petersen-Mahrt, 2003)

Le processus d'hypermutation somatique va induire un taux de mutation dans la séquence du domaine variable de l'ordre d'une mutation pour  $10^3$  nucléotides, au lieu d'un taux d'une mutation spontanée pour  $10^8$  nucléotides dans le reste du génome. (Poltoratsky, Goodman, & Scharff, 2000) La longueur approximative de la séquence d'ADN codant le domaine variable étant d'environ 1 500 pb, une mutation sera statistiquement induite par l'hypermutation somatique à chaque division cellulaire. Les paires A-T et C-G sont touchées à la même fréquence cependant au sein de la paire A-T, l'adénosine est plus fréquemment mutée (Tableau 5). (Di Noia & Neuberger, 2007; Neuberger *et al.*, 2003) Les mécanismes expliquant le taux élevé d'apparition de certaines mutations de transition (remplacement d'une base purique par une base pyrimidique, ou inversement) ne sont pas encore élucidés. Il a aussi été constaté que les nucléotides situés dans les CDR étaient plus fréquemment touchés par le mécanisme d'hypermutation somatique, que les nucléotides situés dans les FR (Figure 22). Ce mécanisme va donc permettre une maturation de l'affinité des anticorps, en introduisant des mutations aléatoires. L'hypermutation somatique affecte les lymphocytes B dans les centres germinatifs où les anticorps, exprimés à la surface des différents clones de lymphocytes B, entrent en compétition. Les cellules exprimant des anticorps dont l'affinité a été détériorée par l'introduction de mutations ne vont pas être stimulée par l'antigène, ne se diviseront pas et

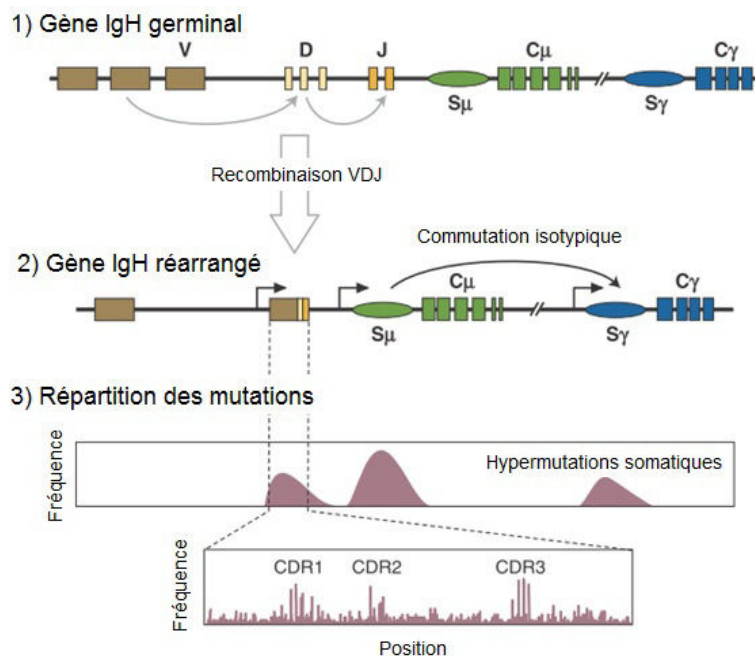
## Partie 1 : Les anticorps

entreront en apoptose. Au cours des divisions successives des cellules qui ne sont pas entrées en apoptose, le nombre de mutations hypersomatiques va s'accumuler et permettre l'amélioration de l'affinité des IgG, tandis que les IgG de moindre affinité ne seront plus sécrétées. (Berek & Milstein, 1987) Ce processus de maturation d'affinité successif permet au cours des rencontres avec l'antigène de ne sécréter que les immunoglobulines les plus affines.

		Pyrimidines		Purines		
		A	T	C	G	
Pyrimidines	T			7	4	13
	C	16			2	22
Purines	G	7	6			28
	A	3	12	22		37

**Tableau 5 : Fréquences des mutations induites durant l'hypermutation somatique.**

Les chiffres sont indiqués en pourcentage des mutations totales. Les chiffres en vert à droite correspondent à la fréquence à laquelle chacun des nucléotides est muté. Les valeurs en rouges représentent les mutations de transitions et les valeurs en noir les mutations de transversion. A : deoxyadénosine; T : deoxythymidine; C : deoxycytosine; G : deoxyguanosine. Mutation de transition : remplacement d'une base purique par une base pyrimidique, ou inversement. Mutation de transversion : remplacement d'une base purique par une base pyrimidique, ou d'une base pyrimidique par une base purique. Tiré de Javier *et al.* (Di Noia & Neuberger, 2007)



**Figure 22 : Répartition des hypermutations somatiques.**

Les CDR sont des zones plus fréquemment touchées par le mécanisme d'hypermutation somatique. Traduit de Javier *et al.* (Di Noia & Neuberger, 2007)

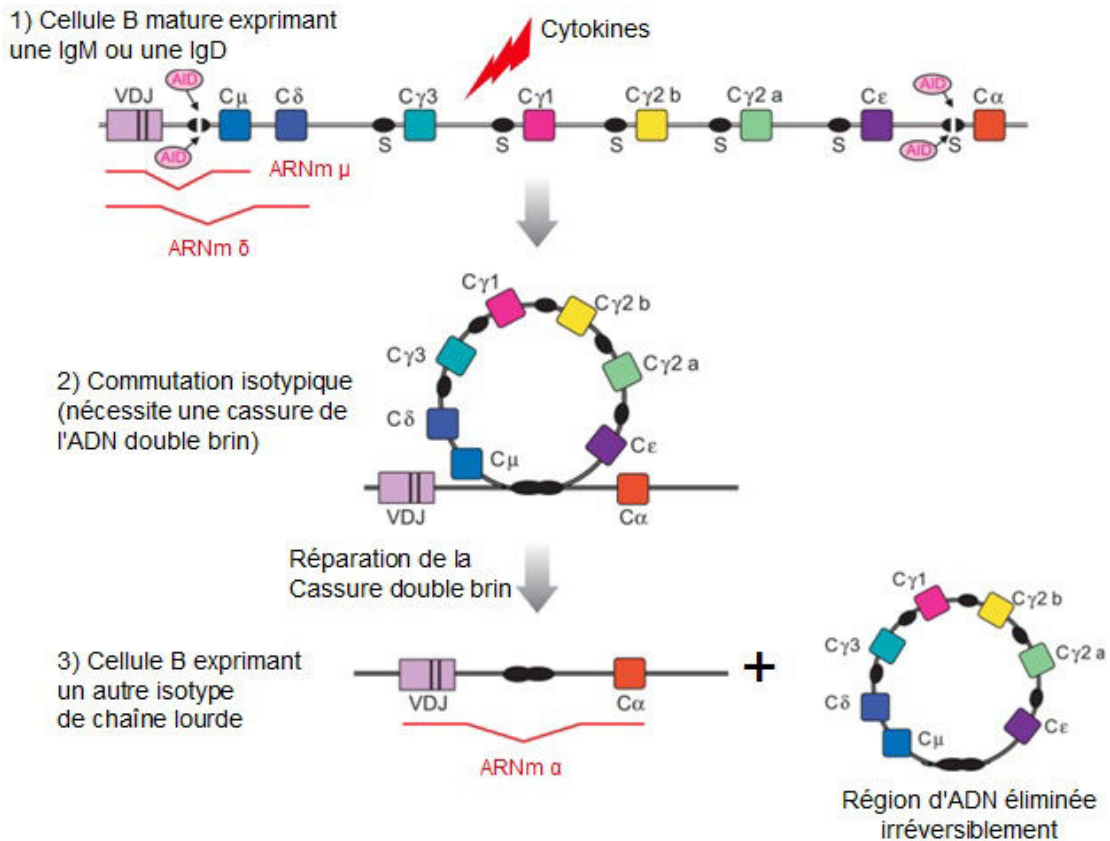
### 1.4.7) La commutation isotypique

Les cellules B matures n'expriment à leur surface que des immunoglobulines M et D, obtenues par un mécanisme de transcription alternatif. En l'absence de stimulation antigénique, tous les descendants de la cellule B exprimeront les mêmes domaines variables. Cependant, à la suite de la première stimulation antigénique, les cellules B peuvent subir un réarrangement supplémentaire au cours duquel le domaine variable de la chaîne lourde peut se réassocier à un segment génique  $C_H$  différent. Ce mécanisme, appelé commutation isotypique (ou commutation de classe), permet un changement des isotypes IgM et IgD vers les isotypes IgG, IgA ou IgE (Figure 23). Il n'intervient pas dans la diversification du domaine variable, mais il permet d'apporter un autre niveau de diversité aux anticorps. Ce mécanisme permet d'associer le domaine variable d'une chaîne lourde à différents isotype, pouvant ainsi conférer à l'anticorps des propriétés effectrices différentes. Ce phénomène implique une recombinaison irréversible de l'ADN, et dépend de l'action de l'AID. (Seidl, Whittall, Babaahmady, & Lehner, 2012) En l'absence de l'AID la commutation de classe est complètement bloquée et induit une forme d'immunodéficience appelée "syndrome hyper IgM de type 2". (Quartier *et al.*, 2004)

Sous le contrôle de différentes cytokines, majoritairement produites par les cellules T auxiliaires (comme l'IL-4, l'IFN $\gamma$  ou le TGF $\beta$ ), l'AID va désaminer certaines cytosines présentes au niveau de régions riches en résidus GC (région de 20 à 80 pb répétée sur 1 kb à 12 kb) situées en 5' de chaque segment génique C de chaîne lourde, à l'exception du segment  $C_\delta$ . Cette désamination va entraîner des cassures double brin, et la région d'ADN située entre ces cassures va être excisée, rapprochant ainsi l'exon réarrangé VDJ d'un segment génique C différent. (Kawanishi & Joseph, 1991; Janet Stavnezer & Kang, 2009) Lors de la transcription, l'exon VDJ sera donc associé à ce nouveau gène C, et la cellule B sécrètera un anticorps donc le domaine variable est inchangé mais dont l'isotype de la chaîne lourde sera différent. (Stavnezer *annu rev immunol* 2008) L'effet des cytokines chez l'Homme est encore peu connu mais des données existent chez la souris (Tableau 6). (J Stavnezer, 1996; Janet Stavnezer, Guikema, & Schrader, 2008) Ainsi l'IL-4 induirait une commutation de l'isotype  $C_\mu$  vers l'isotype  $C_{\gamma 1}$  puis  $C_\epsilon$ , l'IFN- $\gamma$  induirait une commutation vers l'isotype IgG $_3$  puis IgG $_{2a}$  et le TGF- $\beta$  induirait une commutation vers l'isotype IgG $_{2b}$  puis IgA.



## Partie 1 : Les anticorps



**Figure 23 : Mécanisme de commutation isotypique.**

Initialement la cellule B exprime des IgM et IgD par un mécanisme de transcription alternative. Sous l'influence des cytokines l'AID va initier un processus de cassure double brin. La délétion de la région ADN entre les cassures va engendrer la commutation isotypique. S : Site de recombinaison. Adapté de (Stavnezer annu rev immunol 2008)

Cytokines	IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgE	IgA
IL-4	Inhibe	Inhibe	Induit		Inhibe	Induit	
IFN- $\gamma$	Inhibe	Induit	Inhibe		Induit	Inhibe	
TGF- $\beta$	Inhibe	Inhibe		Induit			Induit

**Tableau 6 : Rôle des cytokines dans la régulation de l'expression des classes d'anticorps chez la souris.**

Des cytokines individuelles induisent (en vert) ou inhibent (en rouge) la production de certaines classes d'anticorps. La plupart des effets inhibiteurs sont probablement dus à l'orientation vers une classe différente. Ces données ont été obtenues chez la souris. (Janeway *et al.*, 2009)

*Partie 2 :*  
*Biotechnologie*  
*des anticorps*

## 2) Biotechnologies des anticorps

### 2.1) Historique de la sérothérapie

La vaccination conçue par Edward JENNER en 1796 a posé les premières bases de l'utilisation thérapeutique des mécanismes d'immunité, qui a ensuite été reprise et généralisée par Louis PASTEUR à partir de 1880. L'histoire de la sérothérapie remonte à 1888, quand Charles Robert RICHEL (1850-1935) et Jules HÉRICOURT (1850-1938) ont mis en évidence le rôle du sang, puis du sérum seul, comme vecteur de l'immunité. En effet, le sang de chiens inoculés avec *Staphylococcus pyosepticus* puis "*absolument rétablis*", conférait un état d'immunité "*plus complet que le sang de chiens intacts*". (Héricourt & Richet, 1888) Ils ont alors essayé d'étendre leur découverte à la tuberculose, mais aucun résultat probant n'a été obtenu. En Allemagne, en 1890, les travaux d'Emil Von BEHRING et de Shibasaburo KITASATO sur la diphtérie et sur le tétanos, apportèrent la preuve expérimentale du rôle du sérum dans le transfert de l'immunité (*cf paragraphe "1.1) Historique de la découverte des anticorps"*). (Kantha, 1991; Simon, 2007) Cependant, la sérothérapie antitétanique envisagée par Kitasato et Behring était inefficace sur les cas déclarés de tétanos, et ne pouvait donc être utilisée que de façon préventive, comme pour protéger les troupes dans les tranchées lors de la première guerre mondiale. En France, Pierre Paul Émile ROUX, appliqua ces nouvelles découvertes et développa en 1894, la sérothérapie thérapeutique antidiphtérique, qui permettait la guérison des personnes dont la diphtérie était déjà déclarée. A la suite de ce succès, la sérothérapie fut appliquée à de nombreuses autres pathologies, mais en l'absence d'études cliniques rigoureuses, permettant par exemple des comparaisons contre placebo, il est difficile de juger rétrospectivement de la réussite de chacune des sérothérapies employées. Néanmoins, il semble que les sérothérapies anti-pneumococcique, anti-pestueuse et anti-méningococcique aient permis de sauver de nombreuses vies. Pour encadrer l'usage de la sérothérapie, une loi relative à la vente et la distribution des sérums thérapeutiques a été instaurée le 25 avril 1895 en France. En 1895, Jules HÉRICOURT et Charles RICHEL ont essayé d'appliquer la sérothérapie au traitement des cancers en immunisant des animaux avec des extraits d'ostéosarcomes, puis en injectant les sérums ainsi obtenus à deux patients cancéreux. (Héricourt & Richet, 1895) Ces résultats furent prometteurs bien qu'ils ne permettaient pas "*d'empêcher l'infection cancéreuse de poursuivre son évolution*". Cette même année, Emile MARCHOUX (1862-1943) et Achille SCLAVO (1861-1930) développèrent la sérothérapie anti-charbonneuse puis en 1896, la sérothérapie anti-cholérique

## *Partie 2 : Biotechnologie des anticorps*

a été développée par Pierre Paul Émile ROUX, Ilya Ilitch METCHNIKOV (1845-1916) et alexandre SALIMBENI (1867-1942).

La sérothérapie comporte plusieurs limites. En particulier, Maurice ARTHUS (1862-1945) a décrit dès 1903, chez l'animal, les effets secondaires résultant d'une seconde injection de sérum (*phénomène d'Arthus*). Ces résultats furent repris complétés par Clemens von PIRQUET (1874-1929) et Bela SCHICK (1877-1967) en 1905. Dans certains cas, comme celui du typhus et de la rougeole, il était impossible d'obtenir des sérums d'origine animale, et l'emploi de sérums de convalescents a alors été envisagé. (Raynaud, 1896) En France, Robert DEBRÉ (1882-1978) a par exemple développé les collectes de sérums de personnes convalescentes de la rougeole afin de soigner les épidémies de rougeole qui sévissaient dans les crèches. (Debré, Joannon, & Bernard, 1926) A la fin des années 1930, le clivage des anticorps par la pepsine et la papaïne a permis d'obtenir des fragments d'anticorps d'origine animale qui étaient mieux tolérés que les anticorps entiers, puisque la région Fc animale était supprimée. Actuellement, ces fragments (F(ab')<sub>2</sub> et Fab) sont encore utilisés, par exemple pour le traitement des envenimations, des hépatites virales A et B, ou encore des oreillons. La tolérance de la sérothérapie a aussi été grandement améliorée par l'apparition des techniques de fractionnement des protéines sériques, qui ont permis de purifier les immunoglobulines. La découverte de la pénicilline par Alexander FLEMING (1881-1955) en 1928, à la suite des travaux d'Ernest DUCHESNE (1874-1912), a bouleversé le traitement des maladies infectieuses. Howard Walter FLOREY (1898-1968) et Ernst Boris CHAIN (1906-1979) ont pu la purifier et la produire en grande quantité en 1940, ce qui a permis son utilisation à grande échelle. La découverte et l'industrialisation des antibiotiques ont alors beaucoup diminué l'usage de la sérothérapie, qui engendrait davantage d'effets secondaires.

Avec l'apparition de phénomènes de résistance aux antibiotiques et avec l'avènement des techniques de biologie cellulaire puis moléculaire, ces 30 dernières années, la sérothérapie a connu un renouveau, et les anticorps se sont ré-imposés comme des molécules thérapeutiques efficaces et bien tolérées.

### **2.2) Les anticorps monoclonaux conventionnels : technologie des hybridomes**

En 1973, Jerrold SCHWABER (1947-) et Edward COHEN ont observé (Schwaber & Cohen, 1973) que la fusion de lymphocytes murins et humains permettait d'obtenir un clone

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

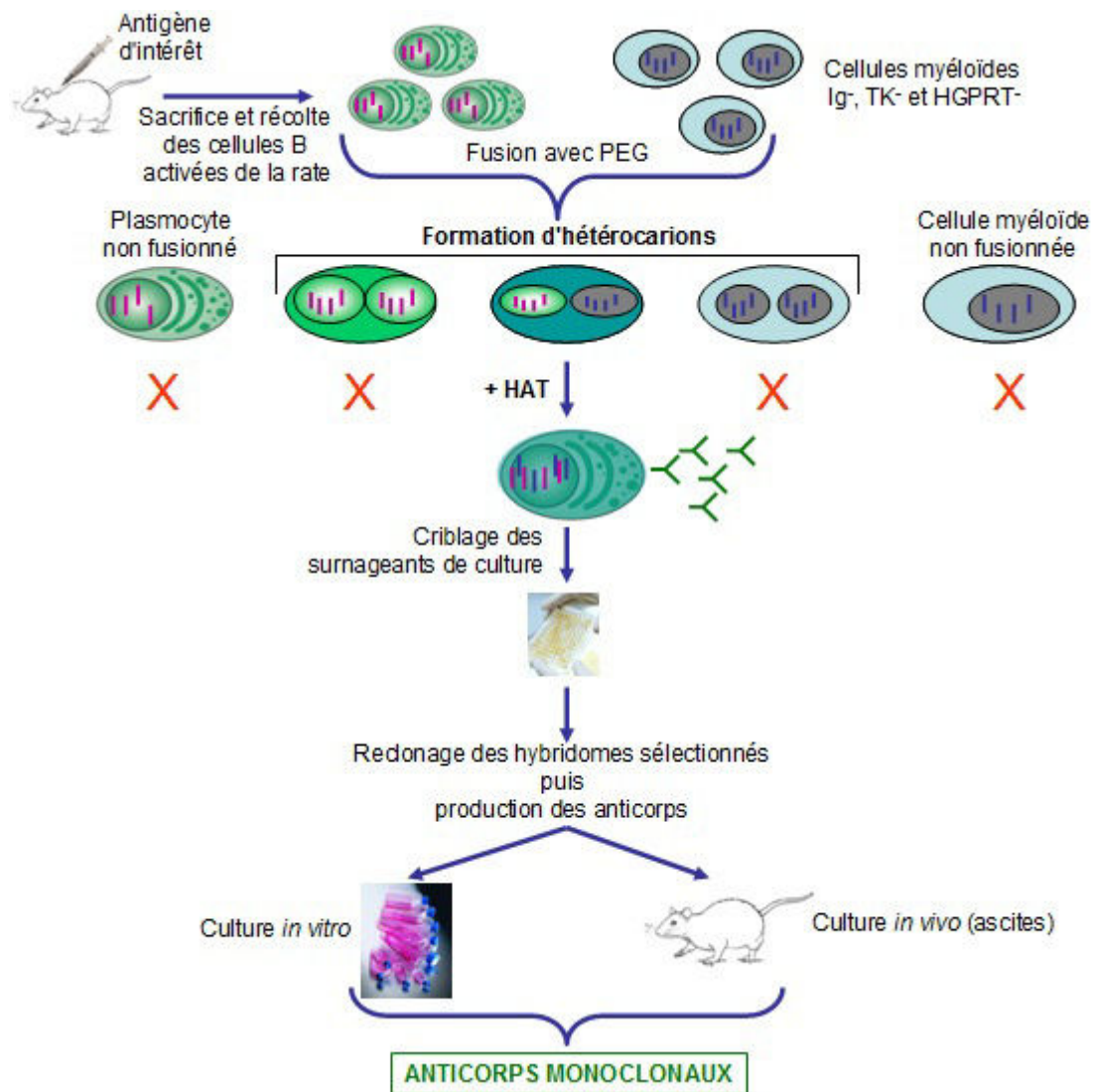
hybride pouvant sécréter les deux anticorps parentaux. (Cambrosio & Keating, 1992; Sourya, Samarth, SN, & SK, 2011) La même année, Richard COTTON et Cesar MILSTEIN (1927-2002) ont démontré que la fusion de deux cellules somatiques myéloïdes, une de rat et une de souris, permettait d'obtenir une cellule hybride sécrétant les immunoglobulines parentales. (Cotton & Milstein, 1973) Schwaber et Cohen ont aussi mis en évidence en 1974 que la fusion d'un lymphocyte humain et d'une cellule myéloïde murine permettait d'obtenir une lignée cellulaire hybride presque immortelle, qui sécrétait des immunoglobulines humaines. (Schwaber & Cohen, 1974) Néanmoins, la découverte de la technologie des hybridomes est généralement attribuée à Georges KOHLER (1946-1995) et Cesar MILSTEIN, qui ont mis au point en 1975 une technique permettant de produire à l'identique des molécules d'anticorps de spécificité unique, à partir de souris immunisées avec un antigène d'intérêt. (Cotton & Milstein, 1973; Köhler & Milstein, 1975) La production d'anticorps de spécificité unique représentait un enjeu majeur car il était impossible d'isoler biochimiquement chaque anticorps, de spécificité unique, à partir d'un sérum. En effet, si *in vivo* l'hétérogénéité des anticorps permet d'accroître la protection immunitaire, *in vitro* il est préférable d'utiliser des anticorps de spécificité unique pour obtenir des résultats reproductibles. (Harlow & Lane, 1988) L'obtention d'hybridomes débute par l'immunisation d'une souris avec un antigène d'intérêt (Figure 24), le plus souvent en présence d'un adjuvant (Peipp *et al.*, 2001; Schwemmlin *et al.*, 2006), bien que des protocoles récents permettent de s'en affranchir. En effet, les adjuvants "classiques", comme l'adjuvant complet de Freund peuvent parfois dénaturer l'immunogène. Pour diminuer le risque d'une telle dénaturation et réduire la durée des protocoles d'immunisation, Staquet *et al.* (Staquet *et al.*, 2006) ont mis en évidence que l'interféron de type I (IFN-I) et un ligand du CD40 pouvaient respectivement être utilisés comme stimulant et comme agent de prolifération des lymphocytes B. L'INF-I induit la différenciation des cellules dendritiques en cellules présentatrices de l'antigène (Theofilopoulos, Baccala, Beutler, & Kono, 2005), et les ligands du CD40 des cellules B induisent la prolifération, la commutation isotypique et la génération de lymphocytes B mémoires (Banchereau *et al.*, 1994). Comparé à l'utilisation d'adjuvant, ce traitement permet en moyenne de multiplier par deux la synthèse des lymphocytes B et d'obtenir de 5 à 10 fois plus d'hybridomes réactifs, dont les anticorps sécrétés présentent des affinités similaires à celles obtenues par les protocoles conventionnels d'immunisation. En outre, en utilisant ce protocole d'immunisation, 18 jours sont suffisants pour que les souris développent une réponse immunitaire vis-à-vis de l'immunogène, contre 43 à 176 jours avec l'adjuvant complet de Freund. (Rycyzyn *et al.*, 2008; Staquet *et al.*, 2006) Après obtention d'une réponse

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

immunitaire suffisante, les plasmocytes de la rate sont isolés et fusionnés avec des cellules myéloïdes de souris, en utilisant un agent permettant la fusion des membranes plasmiques, le polyéthylène-glycol. (Davidson, O'Malley, & Wheeler, 1976; Lentz, 2007; Staquet *et al.*, 2006) Les cellules sont ensuite mises en culture et, seules les cellules fusionnées seront sélectionnées. En effet, le milieu de culture utilisé, appelé HAT, contient de l'Hypoxanthine, de l'Aminoptérine et de la Thymidine (Figure 25). L'aminoptérine est une enzyme qui inhibe la voie de synthèse classique de l'ADN dite "*de novo*". Lorsque cette voie est inhibée, les cellules utilisent la voie dite de récupération pour synthétiser l'ADN à partir de deux précurseurs principaux : la thymidine et l'hypoxanthine. Cette voie implique deux enzymes indispensables, naturellement présentes dans les plasmocytes : la HGPRT (Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosylTransferase) et la thymidine kinase. Les cellules myéloïdes qui sont utilisées pour la fusion sont déficitaires en HGPRT et en thymidine kinase et meurent donc rapidement en présence du milieu HAT, tout comme les lymphocytes non fusionnés dont la durée de vie est naturellement limitée. Seules les cellules ayant fusionné avec un plasmocyte peuvent survivre, car les enzymes manquantes sont apportées par le lymphocyte fusionné grâce au mécanisme de complémentation génétique. Les lignées cellulaires myéloïdes murines servant de partenaires de fusion ont été obtenues en induisant chimiquement des myélomes chez la souris, puis en recherchant parmi les nombreuses cellules ainsi obtenues celles présentant les caractéristiques adéquates. Un tel protocole ne peut pas être éthiquement appliqué chez l'Homme, et le taux de cancers myéloïdes humains spontanés est trop rare pour pouvoir isoler une lignée myéloïde humaine pouvant servir de partenaire de fusion. Les lymphocytes issus d'une souris immunisée ne produisent pas tous des anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt, ce qui rend nécessaire une étape de criblage des hybridomes. Les cellules d'hybridomes sont déposées dans les puits de plaque de culture à un degré de dilution tel que, statistiquement, chaque puit ne reçoit qu'une ou aucune cellule d'hybridome ("dilution limites"). Après identification des hybridomes sécrétant des anticorps d'intérêt par ELISA (Orii, Yamaguchi, & Watanabe, 2013), des étapes successives de sous-clonages peuvent être nécessaires pour obtenir un clone pur. Puisque les anticorps sont sécrétés par un clone cellulaire pur, ils seront tous identiques et sont donc qualifiés d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps monoclonaux sont ensuite produits soit *in vitro*, en purifiant les anticorps sécrétés dans les surnageants de cultures en bioréacteurs, soit *in vivo*, en injectant un clone d'hybridome dans la cavité péritonéale d'une souris puis en purifiant les anticorps à partir des liquides d'ascites. (Hefferon, 2012; Yokoyama, 2001) La mise au point de la technologie des

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

hybridomes a valu à Georges KOHLER et Cesar MILSTEIN le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1984 (prix partagé avec Niels Kaj Jerne).

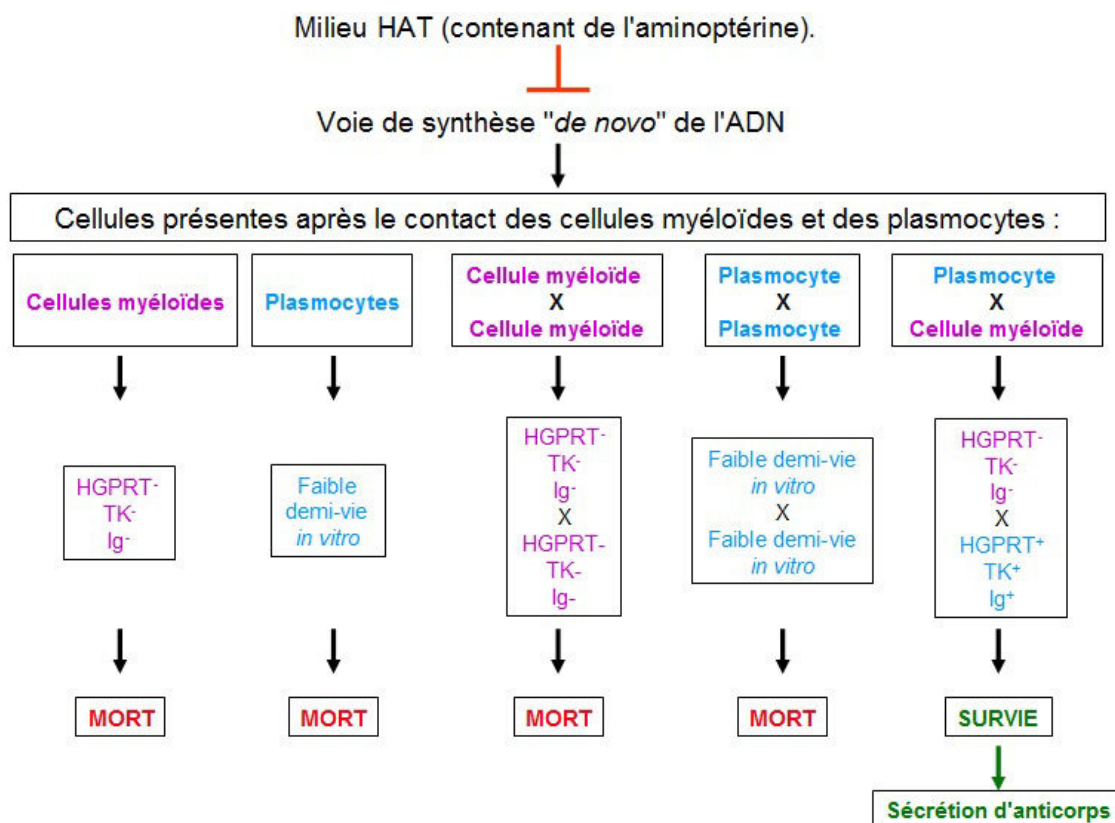


**Figure 24 : Production d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes.**

Les plasmocytes d'une souris immunisée sont isolés et fusionnés avec des cellules myéloïdes. Le milieu HAT permet uniquement la sélection des hybridomes formés par la fusion d'un plasmocyte avec une cellule myéloïde. Un criblage est réalisé pour sélectionner les hybridomes sécrétant un anticorps dirigé contre l'antigène d'intérêt, qui sont alors utilisés pour la production *in vitro* ou *in vivo* des anticorps monoclonaux. HGPRT : Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transférase ; TK : Tyrosine Kinase ; PEG : PolyEthylène-Glycol. (Janeway *et al.*, 2009; Kindt *et al.*, 2008; Köhler & Milstein, 1975)



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps



**Figure 25 : Pression de sélection exercée par le milieu HAT sur les cellules.**

Le signe X indique que les cellules ont fusionné. En présence de l'aminoptérine, seuls les hybridomes formés par la fusion de plasmocytes et de cellules myéloïdes survivront et produiront des anticorps. HGPRT : Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transférase ; TK : Tyrosine Kinase ; Ig : Immunoglobuline. (Janeway *et al.*, 2009; Kindt *et al.*, 2008; Köhler & Milstein, 1975)

Plusieurs anticorps monoclonaux murins à visé thérapeutique ont été développés à partir des hybridomes, dont le Muromonab (Orthoclone OKT3®, Centocor Ortho Biotech Inc., Horsham, Etats-Unis d'Amérique), qui fut le premier anticorps approuvé pour un usage thérapeutique (1986). (Emmons & Hunsicker, 1987) Les anticorps possèdent des déterminants antigéniques différents entre les espèces, et peuvent donc se comporter comme de puissants immunogènes. Si ces anticorps murins thérapeutiques sont reconnus comme non-Soi par le système immunitaire, comme les anticorps polyclonaux équins, l'organisme va alors les éliminer, principalement en produisant des anticorps anti-anticorps thérapeutiques. (Hwang, Almagro, Buss, Tan, & Foote, 2005; Hwang & Foote, 2005; Mirick, Bradt, Denardo, & Denardo, 2004) On peut distinguer les anticorps anti-isotypes, anti-allotypes et anti-idiotypes :

- Les anticorps anti-isotypes reconnaissent tous les anticorps de même isotype d'une autre espèce. Ils reconnaissent donc des épitopes codés par les régions constantes des immunoglobulines. De tels anticorps peuvent par exemple être utilisés pour déterminer la (sous)-classe de l'anticorps sérique



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

produit au cours de la réponse immunitaire. L'organisme humain ne développe de tels anticorps que contre les anticorps thérapeutiques entièrement non-humains.

- Les anticorps anti-allotypes reconnaissent des épitopes propres à certains allèles des gènes constants. Ils ne reconnaîtront donc que les immunoglobulines d'un isotype donné produites par certains individus d'une espèce. (Geertje M Bartelds *et al.*, 2010) Par exemple, de tels anticorps peuvent être formés durant la grossesse par le système immunitaire de la mère, et être dirigés contre les allotypes paternels présents dans les immunoglobulines du fœtus.
- Les anticorps anti-idiotypes reconnaissent des épitopes formés durant le processus de maturation d'affinité dans les domaines variables des anticorps (*cf paragraphe "2.5.3) Maturation d'affinité"*) et ne reconnaissent donc qu'un anticorps unique. (Greenspan & Bona, 1993)

Les anticorps humains peuvent donc être reconnus comme non-Soi par l'organisme et être éliminé. L'organisme a donc mis en place un système qui repose sur un équilibre entre une introduction de diversité, qui permet de cibler tous les antigènes, mais qui fait que les anticorps n'appartiennent plus strictement au Soi immunologique. Cet équilibre repose notamment sur le fait que les anticorps d'une spécificité donnée ne sont pas sécrétés en permanence.

A l'exception des cas où les anticorps thérapeutiques murins induisent une immunosuppression, leur origine conduit l'organisme des patients traités à synthétiser des anticorps anti-anticorps murins, essentiellement de type anti-isotype, qui favorisent l'élimination de l'anticorps, et peuvent conduire à un échec thérapeutique. Cette élimination est aussi la cause d'autres phénomènes délétères comme par exemple le dépôt des complexes anticorps humain/anticorps thérapeutiques au niveau des glomérules rénaux. Actuellement, les anticorps murins ne sont que peu utilisés en thérapie, et il n'existe actuellement que cinq anticorps monoclonaux murins à visé thérapeutique sur le marché (**Figure 26**). Cependant la technologie des hybridomes a constitué une révolution dans le domaine du diagnostic *in vitro* et de la recherche. Ces anticorps monoclonaux ont un rôle central, par exemple pour la cytométrie en flux, la purification de protéine ou encore la déplétion de cellules.

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

La technologie des hybridomes ne peut que difficilement être appliquée à des cellules humaines. Le problème principal limitant l'application de la technologie des hybridomes aux lymphocytes B humain est l'absence de lignée cellulaires pouvant servir de partenaire de fusion pour immortaliser les lymphocytes humains. De plus, l'application de la technologie des hybridomes aux anticorps humains nécessite d'avoir accès à des lymphocytes B issus de volontaires immunisés ou de patients convalescents. Cette technique ne peut donc pas être appliquée à tous les antigènes, et en particulier elle ne peut éthiquement pas être appliquée aux agents du risque biologique provoqué, qui ne sont pas rencontrés naturellement. Néanmoins, les avancées récentes en biologie moléculaire et cellulaire et l'absence de brevet limitant l'utilisation de la technologie des hybridomes ont donné un regain d'intérêt pour la technologie des hybridomes. La fréquence des lymphocytes B dans le sang périphérique total exprimant des anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt étant très faible, il est nécessaire d'isoler, par tri cellulaire, ces lymphocytes spécifiques avant toute immortalisation. Leur immortalisation peut aussi être réalisée en utilisant le virus d'Epstein Barr (*Epstein Barr Virus*, EBV), responsable du lymphome de Burkitt et de la mononucléose infectieuse. (G. Miller, 1982; Nilsson, Klein, Henle, & Henle, 1971; Steinitz, 2009) L'EBV va infecter les lymphocytes B en se fixant au CD21 et au CMH de classe II, puis induire l'expression de la protéine EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*) qui inhibe l'apoptose en bloquant la protéine bcl2. Cependant les cellules immortalisées par l'EBV sont difficiles à cloner et ne produisent qu'une faible quantité d'anticorps. Pour remédier à ce problème, il est possible d'effectuer un sauvetage en les fusionnant avec une cellule non-humaine pour donner un hétérohybridome immortel, ce qui a reposé le problème d'identifier une lignée cellulaire compatible. Il est aussi possible de cloner les gènes codant les anticorps en utilisant les techniques moléculaires. Plusieurs études se sont aussi intéressées à la transfection des lymphocytes avec des gènes induisant la transformation cellulaire. Par exemple, l'expression ectopique de la sous unité catalytique de la télomérase en combinaison avec la transfection de l'oncogène SV40 (*Simian Vacuolating Virus 40 T Antigen*) et l'allèle oncogène de H-ras ont été démontrés comme permettant la transformation de cellules épithéliales et fibroblastiques. (Hahn *et al.*, 1999)

La société Vivalis (Vivalis, <http://www.vivalis.com>, La Corbière, France) a développé la technologie VIVA|Screen<sup>TM</sup> qui permet de sélectionner un lymphocyte B sécrétant un anticorps d'intérêt parmi plus de 200 millions de cellules mononucléées du sang périphérique, issues de patients convalescents. Après prélèvement des cellules mononucléées, les lymphocytes B sont isolés, activés, multipliés puis immortalisés. Après des étapes de sélection contre l'antigène, les gènes codant l'anticorps d'intérêt sont isolés et clonés dans un vecteur

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

permettant son expression dans les lignées cellulaires stables CHO ou EB66<sup>®</sup> (Vivalis, La Corbière, France). Les cellules EB66<sup>®</sup> permettent en particulier de moduler le profil de glycosylation des anticorps et ainsi d'optimiser l'ADCC.

Nom générique	Nom commercial	Entreprise	Cible	Particularités	Prescription	Première AMM
Catumaxomab	REMOVAB <sup>®</sup>	Fresenius Biotech GmbH TRION Pharma	EPCAM		Cancers gastriques et ovariens. Ascites malignes.	20 avril 2009 (EMA)
Edrecolomab	PANOREX <sup>®</sup>	Centocor Inc. GlaxoSmithKline	EPCAM		Cancers du colon	01 janvier 1995 (Allemagne)
Ibritumomab tiuxetan	ZEVALIN <sup>®</sup>	Biogen IDEC Pharmaceuticals Schering AG	MS4A1	Conjugué au tiuxetan pour être radiomarqué avec Y-90 ou In-111	Lymphome non-Hodgkinien	19 février 2002 (FDA)
Muromonab-CD3	ORTHOCLONE OKT3 <sup>®</sup>	Centocor Ortho Biotech Products LP	CD3E		Transplantation du foie, des reins et du cœur	19 juin 1986 (FDA)
Tositumomab	BEXXAR <sup>®</sup>	Corixa Corp. GlaxoSmithKline	MS4A1	Radiomarqué I-131	Lymphome non-Hodgkinien	27 juin 2003 (FDA)

**Figure 26 : Liste des anticorps monoclonaux murins disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.**

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché. FDA : *US Food and Drug Administration*. D'après IMGT (<http://www.imgt.org>), en date du 21/02/2013.

## 2.2) Les anticorps recombinants

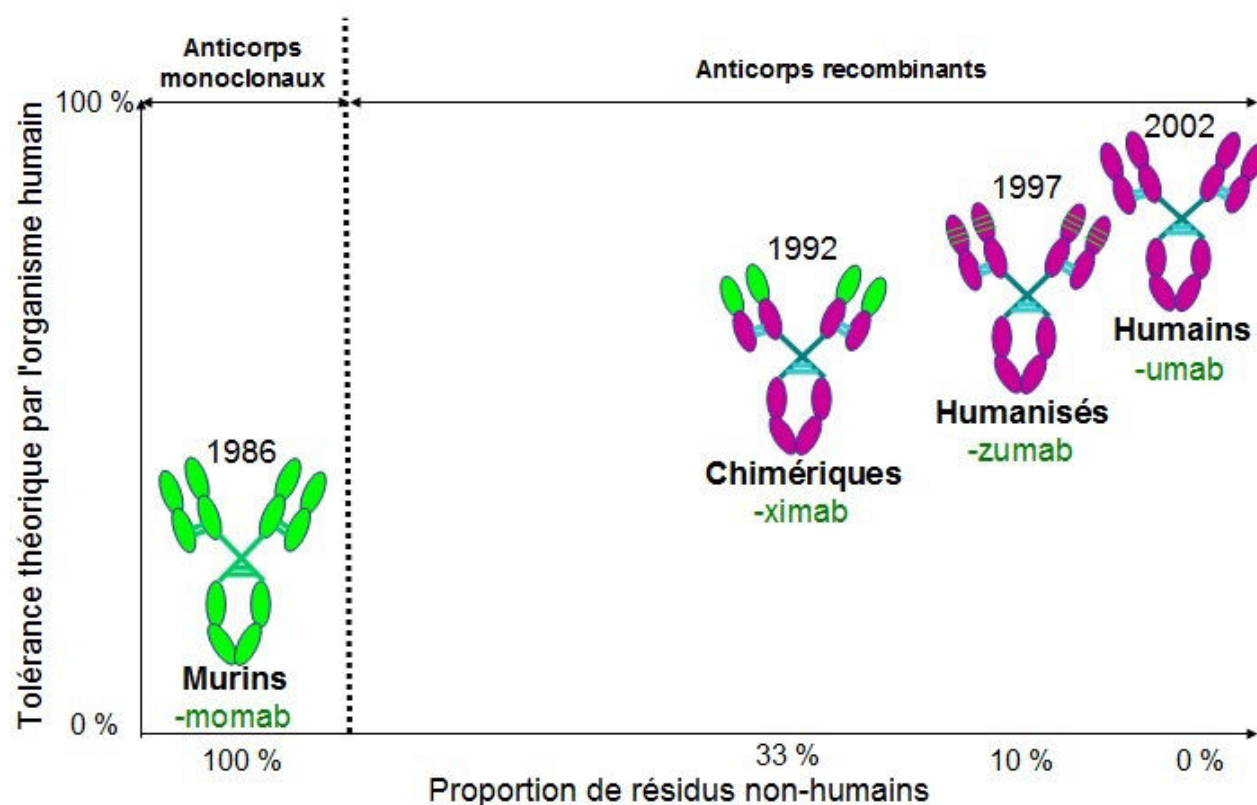
Les anticorps recombinants forment une classe de molécules thérapeutiques en pleine expansion depuis leur apparition en 1993. (The EPIC Investigators, 1994) En 2010, ils représentaient 7 % du marché pharmaceutique global qui s'élevait alors à 597 milliards de dollars et le chiffre d'affaires des 10 anticorps les plus vendus s'élevait à plus de 40 milliards de dollars. Plus de 50 % des anticorps recombinants actuellement commercialisés sont prescrits en oncologie, et plus de 37 % sont prescrits pour le traitement des maladies auto-immunes. (Elvin, Couston, & van der Walle, 2013)

### 2.2.1) Les différentes générations d'anticorps recombinants et leurs différentes spécificités

Les anticorps recombinants s'opposent aux anticorps monoclonaux conventionnels par les méthodes utilisées pour leur isolement. En effet l'isolement d'anticorps recombinants nécessite des techniques de biologie moléculaire et de génie génétique. (Strohl & Strohl, 2012) Trois générations d'anticorps recombinants se sont succédé durant ces 20 dernières années : les anticorps chimériques, les anticorps humanisés, et les anticorps humains (Figure 27). Chaque nouvelle génération a été développée parce que la précédente était jugée trop

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

immunogène. De nombreux chercheurs s'accordent à dire que l'augmentation de la proportion de séquence humaine (augmentation de "l'humanité") dans des anticorps est corrélée avec l'augmentation de leur tolérance (Mukovozov, Sabljic, Hortelano, & Ofosu, 2008; Pendley, Schantz, & Wagner, 2003), et les différentes générations d'anticorps développées visent donc à diminuer la proportion de résidus non-humains dans les anticorps thérapeutiques afin d'optimiser leur tolérance. Le développement de ces différentes générations d'anticorps a été rendu possible par l'avènement des techniques de biologie moléculaire. En particulier, la découverte de la PCR a permis le clonage des gènes codant les domaines variables, étape préalable à l'expression recombinante des anticorps. (Orlandi, Güssow, Jones, & Winter, 1989) Comme il a déjà été mentionné, même les anticorps entièrement humains ne sont pas parfaitement tolérés, comme le montre l'existence d'anticorps anti-idiotypes. (G M Bartelds *et al.*, 2006; Geertje M Bartelds *et al.*, 2011; van Schouwenburg *et al.*, 2013)



**Figure 27 : Les différentes générations d'anticorps monoclonaux.**

Les anticorps monoclonaux conventionnels obtenus par biologie cellulaire s'opposent aux anticorps recombinants obtenus par biologie cellulaire suivi d'étapes d'ingénierie moléculaire.

### 2.2.2) La 1<sup>ère</sup> génération d'anticorps : les anticorps chimériques

La chimérisation d'un anticorps consiste à exprimer les séquences d'ADN codant les domaines variables d'un anticorps d'origine animale (généralement murin), responsables de la spécificité pour l'antigène, en fusion avec les séquences d'ADN codant les régions constantes d'un anticorps humain. (Boulianne, Hozumi, & Shulman, 1984; Morrison, Johnson, Herzenberg, & Oi, 1984) Cette manipulation permet de réduire la proportion de résidus non-humains à 33 % et donc d'augmenter la tolérance des anticorps. Le suffixe de la Dénomination Commune Internationale (*International Nonproprietary Names*, INN) des anticorps chimériques est "-ximab" (Abciximab, par exemple). Actuellement six anticorps chimériques sont commercialisés pour un usage thérapeutique (Figure 28). Le premier anticorps chimérique (sous un format Fab) à avoir été commercialisé est l'Abciximab (ReoPro<sup>®</sup>, Centocor Ortho Biotech Inc., Horsham, Etats-Unis d'Amérique), le 16 décembre 1993. Il est utilisé en cardiologie en tant qu'anti coagulant, chez des personnes nécessitant une angioplastie coronaire. A l'inverse des autres anticorps thérapeutiques, l'Abciximab a été isolé sous forme d'immunoglobuline entière puis il a été clivé en un fragment Fab. Ce clivage lui confère une courte demi-vie, permettant son élimination rapide après injection. En tout, six anticorps chimériques ont obtenus des autorisations de mise sur le marché pour diverses indications cliniques, entre 1993 et 2011. Bien que plusieurs anticorps chimériques soient encore en essais cliniques, les anticorps chimériques sont très vite apparus comme imparfaitement tolérés. (Norman, Chatenoud, Cohen, Goldman, & Shield, 1993; E. Schmidt, Hennig, Mengede, Zillikens, & Kromminga, 2009; Su & Lichtenstein, 2003; Wagner *et al.*, 2003) Par exemple, jusqu'à 61 % des patients traités avec l'Infliximab ont développé une réponse anticorps anti-Infliximab après cinq injections. (Getts, Getts, McCarthy, Chastain, & Miller, 2010; Su & Lichtenstein, 2003) Pour pallier ce problème, une nouvelle génération d'anticorps recombinants a été développée.

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

Nom générique	Nom commercial	Entreprise	Cible	Particularités	Prescription	Première AMM
Abciximab	REOPRO®	Centocor Inc. Eli Lilly	ITGA2B ITGB3		Anti plaquettes (prévention pré-opératoire)	16 décembre 1993 (FDA)
Basiliximab	SIMULECT®	Novartis Pharmaceuticals Corp.	IL2RA		Prévention des rejets lors des transplantations d'organes	12 mai 1998 (FDA)
Brentuximab vedotin	ADCETRIS™	Seattle genetics, Inc.	TNFRSF8	Conjugué au MMAE	Lymphome Hodgkinien	19 août 2011 (FDA)
Cetuximab	ERBITUX®	ImClone Systems Inc. Merck & Co., Inc.	EGFR		Cancers colorectaux métastatiques	12 février 2004 (FDA)
Infliximab	REMICADE®	Janssen Biotechn Inc.	TNF		Spondylarthrite ankylosante. Maladie de Crohn's. Psoriasis sévère. Colite ulcéreuse. Arthrite psoriasique. Arthrite rhumatoïde	24 août 1998 (FDA)
Rituximab	MABTHERA® RITUXAN®	CureTech IDEC Pharmaceuticals, Inc. Genentech Inc.	MS4A1		Leucémie lymphocytaire chronique. Granulome de Wegener. Lymphome non-Hodgkinien. Arthrite rhumatoïde	1er novembre 1997 (FDA)

**Figure 28 : Liste des anticorps chimériques disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.**

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché. FDA : *U S Food and Drug Administration*. D'après IMGT (<http://www.imgt.org>), en date du 21/02/2013.

### 2.2.3) La 2<sup>ème</sup> génération d'anticorps : les anticorps humanisés

Les anticorps humanisés (suffixe de la dénomination commune internationale en "-zumab") sont technologiquement plus difficile à obtenir que les anticorps chimériques. Le principe général de l'humanisation, tel que proposé par Greg Winter à la fin des années 1980 (P. T. Jones, Dear, Foote, Neuberger, & Winter, 1986; Riechmann, Clark, Waldmann, & Winter, 1988) consiste à greffer les régions hypervariables (*Complementary Determining Regions*, CDR) d'un anticorps d'intérêt, souvent murin, sur les régions charpentes (*Framework Region*, FR) d'un anticorps humain. Cette technique permet théoriquement de conserver la spécificité de l'anticorps pour sa cible, tout en ne conservant qu'environ 10 % de résidus codés par des séquences non-humaines. Cependant, les régions charpentes contraignent la conformation des CDR, permettant de maintenir une conformation tri-dimensionnelle précise du site de fixation de l'antigène sur l'anticorps. Ainsi, bien que la majorité des acides aminés qui composent les FR n'interviennent pas directement dans l'interaction avec l'épitope, certains des acides aminés des FR parentaux sont indirectement importants pour la conformation tridimensionnelle des CDR et doivent aussi être greffés pour maintenir la fonctionnalité de l'anticorps. (Foote & Winter, 1992). Plusieurs approches ont été développées pour sélectionner les FR qui serviront de charpente à la greffe des CDR. Il peut s'agir de FR i) réarrangés (Co *et al.*, 1996) ii) consensus (P. Carter *et al.*, 1992; Tiwari, Khanna, Acharya, & Sinha, 2009) iii) d'origine germinale (Tomlinson, Walter, Marks, Llewelyn, & Winter, 1992).

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

L'inconvénient des FR réarrangés est qu'ils peuvent être reconnus comme n'appartenant pas au Soi immunologique humain. En effet, lors du processus de réarrangement de l'ADN codant les domaines variables, des acides aminés non codés par le génome peuvent être introduits dans les FR, et être immunogènes. Les FR consensus, eux, correspondent à une séquence construite synthétiquement dans le but de préserver la conformation des CDR. Les acides aminés de chaque position, composant les FR consensus, correspondent à ceux les plus fréquemment retrouvés à la même position dans les séquences germinales humaines. Cette séquence n'est donc pas retrouvée naturellement dans l'organisme et peut donc aussi être immunogène mais elle respecte en général la conformation des CDR murins. Les FR germinaux apparaissent comme un cadre privilégié pour l'humanisation. En effet, ils sont retrouvés dans les IgM, n'ayant pas subi le mécanisme de maturation d'affinité, et ils ne sont donc pas immunogènes. Les seules différences de séquences de ces FR germinaux correspondent à la variation allélique inter-individus ; elles sont minimales et donc peu susceptibles d'engendrer une réponse immunitaire. (Hwang *et al.*, 2005)

Depuis 1986, plusieurs variantes d'humanisation ont été utilisées afin de contourner les brevets existants et d'optimiser la tolérance des anticorps humanisés. (Brevets US patent US5225539, US5693761 ou encore US5821337) (Co & Queen, 1991; P. T. Jones *et al.*, 1986; Ostberg & Queen, 1995; Queen *et al.*, 1989) Pour aider au travail d'humanisation, Jose Saldanha *et al* (Saldanha, 2013) ont regroupés dans une base de données, accessible en ligne, l'ensemble des anticorps humanisés et l'emplacement des résidus mutés qui ont dû être restaurés pour préserver les affinités des anticorps. Parmi ces alternatives on peut par exemple citer :

- la SDR (pour *Specificity-Determining Region*), qui est une approche consistant à greffer au sein du domaine variable d'un anticorps humain uniquement les acides aminés des CDR et FR qui ont été déterminés par cristallographie, ou par des outils *in silico*, comme nécessaires à la spécificité de l'anticorps. (Kashmiri, De Pascalis, Gonzales, & Schlom, 2005) Seul un tiers des acides aminés des CDR sont greffés, en moyenne, car les deux tiers restants ne sont pas impliqués dans l'interaction avec l'antigène. (Padlan, Abergel, & Tipper, 1995) Cette technique permet ainsi de réduire le nombre de résidus non-humains dans l'anticorps thérapeutique, et d'augmenter sa tolérance sans affecter son affinité.
- La HSC (pour *Human String Content*) (Lazar, Desjarlais, Jacinto, Karki, & Hammond, 2007) repose sur le fait que les séquences d'anticorps non mutées



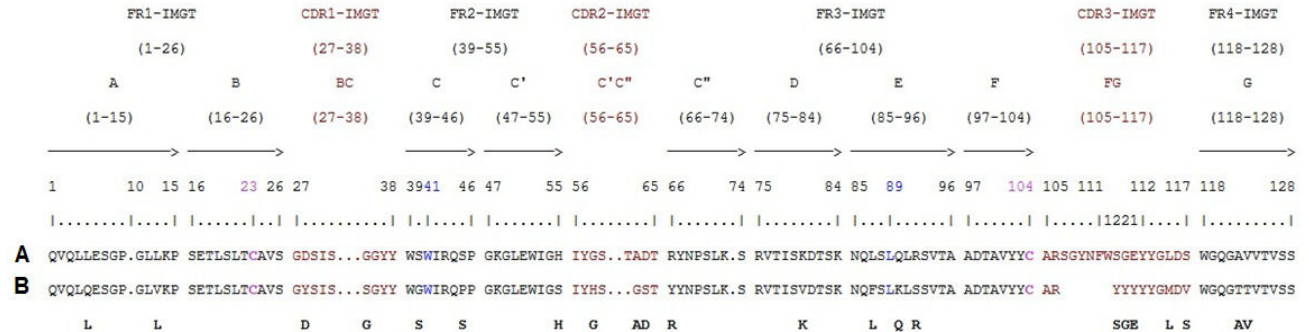
font partie du Soi, et ne sont donc pas immunogènes. Ces séquences ne comportent en particulier pas d'épitope T, qui sont nécessaires à l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Les épitopes T sont majoritairement des séquences de neuf acides aminés, et la stratégie HSC vise à les éliminer. Pour cela, la séquence du domaine variable de l'anticorps est découpée informatiquement en peptides de neuf résidus, qui sont ensuite alignés avec toutes les séquences germinales humaines. Si une séquence est identifiée comme identique à une séquence germinale humaine, celle-ci ne peut pas former un épitope. A l'inverse, si le peptide de neuf acides aminés comporte des différences avec les séquences germinales humaines, les lymphocytes n'auront jamais été en contact avec ce peptide et le détecteront donc comme non-Soi. Des mutations sont alors introduites pour supprimer l'épitope potentiel en cherchant à remplacer sa séquence par une séquence germinale humaine.

- La super-humanisation, ou germinalisation, a été utilisée pour la première fois en 2002 (Tan *et al.*, 2002) pour humaniser l'anticorps murin 9.3 dirigé contre le CD28. La séquence germinale humaine la plus proche de l'anticorps isolé a été identifiée. Les résidus de l'anticorps murin différents de la séquence germinale de l'anticorps humain le plus proche ont été mutés pour être remplacés par les acides aminés humains correspondant, si ceux-ci ne diminuent pas l'affinité de l'immunoglobuline pour sa cible (Figure 29 et Figure 30). (Gonzales *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2005; Pelat *et al.*, 2008) Cette approche a été appliquée aux FR des anticorps de primates non-humains isolés dans notre laboratoire. En effet, l'utilisation d'espèces dont les anticorps sont proches de celles des anticorps humains diminue le nombre de résidus à muter par rapport à l'espèce murine et, généralement, les résidus à muter ont des propriétés physico-chimiques plus proches des résidus humains retrouvés aux mêmes positions. La proximité entre les anticorps macaques et humains a été mise en évidence dans plusieurs travaux de notre unité, et vérifiée dans les travaux présentés dans ce manuscrit. (Pelat *et al.*, 2007, 2008, 2009). Par exemple, le Fab 35PA83, provenant d'un macaque, comportait 22 acides aminés différents par rapport à la séquence germinale de l'anticorps humain le plus proche, 12 dans sa chaîne lourde et 10 dans sa chaîne légère. Le Fab Hu<sub>4</sub>35PA<sub>83</sub> est le variant le plus germinalisé qui préserve l'affinité (3,4 nM pour le Fab parental contre 3,7 nM pour le variant Hu<sub>4</sub>35PA<sub>83</sub>), et seul un des 10 acides aminés de sa chaîne légère



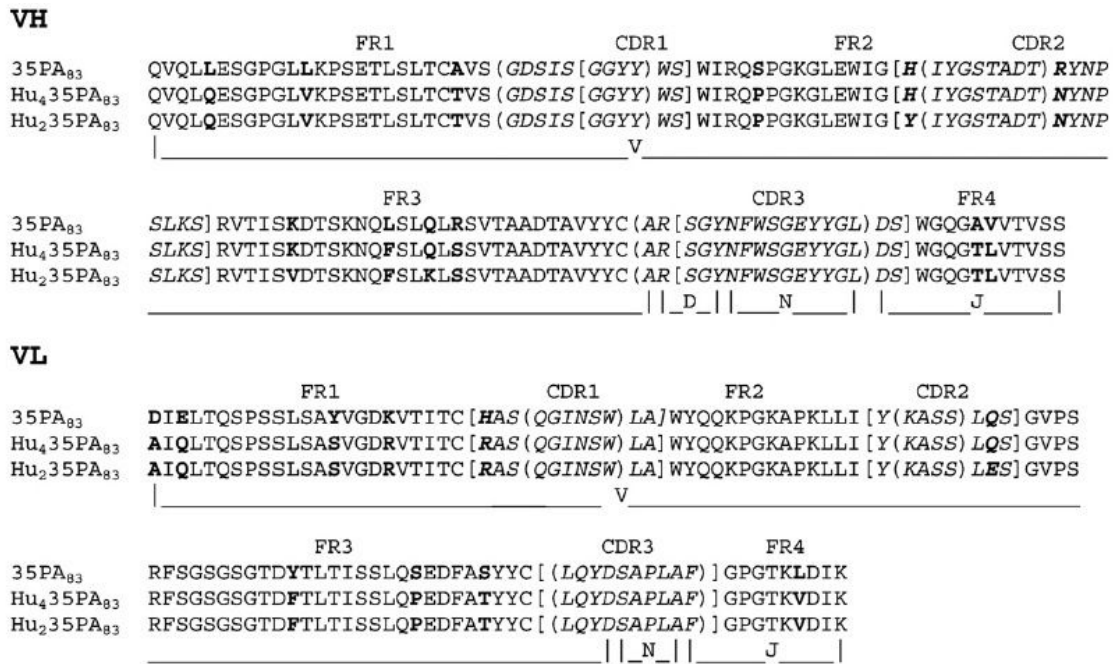
## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

et trois des 12 acides aminés de sa chaîne lourde n'ont pas pu être mutés ("germinalisé") en leurs homologues germinaux humains (Figure 30). (Pelat *et al.*, 2008)



**Figure 29 : Principe de la germination.**

A) Séquence de l'anticorps isolé. B) Séquence germinale humaine. Les résidus en gras sont ceux qui divergent entre les deux séquences et dont le plus grand nombre possible doit être remplacé par les acides aminés humains situés à la même position. Seules les mutations respectant l'affinité seront conservées. (Pelat *et al.*, 2008)



**Figure 30 : Germinalisation du Fab 35PA<sub>83</sub>.**

35PA<sub>83</sub> : séquence du Fab isolé. Hu<sub>2</sub>35PA<sub>83</sub> : séquence du Fab 35PA<sub>83</sub> complètement germinalisé. Hu<sub>4</sub>35PA<sub>83</sub> : séquence du 35PA<sub>83</sub> la plus germinalisée possible, conservant l'affinité du Fab initial. Les acides aminés divergeant entre les trois séquences sont représentés en gras. Les différentes régions sont annotées selon la numérotation IMGT. Les acides aminés composant les CDR selon la nomenclature IMGT sont représentés en italique. Les acides aminés de la région N ne sont pas codés par de l'ADN germinale. (Pelat *et al.*, 2008)

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

- La technique de "*resurfacing*" ("placage") consiste à supprimer uniquement les acides aminés formant des épitopes B exposés au solvant. Afin d'identifier ces résidus, l'anticorps isolé est modélisé à l'aide d'outils bioinformatiques comme WAM (<http://antibody.bath.ac.uk>), Modeller (<http://salilab.org/index.html>), Swiss PDB Viewer (<http://spdv.vital-it.ch>), ou encore CrystalProtein (<http://crystalprotein.com/>). Les acides aminés cryptiques n'étant pas exposés au solvant, ils ne sont pas accessibles aux lymphocytes B et ne forment donc pas d'épitope B. (Novotný *et al.*, 1986) Seuls les acides aminés d'origine non-humaine et exposés au solvant seront donc remplacés par les acides aminés humains retrouvés aux mêmes positions, dans la structure tridimensionnelle de la séquence de l'anticorps humain le plus proche. Les mutations ne respectant pas l'affinité ne seront pas conservées. (Pedersen *et al.*, 1994; Roguska *et al.*, 1994; Skrlj, Vranac, Popović, Curin Šerbec, & Dolinar, 2011) Skrlj *et al* ont humanisé par *resurfacing* le scFv V5B2 en introduisant 13 mutations dans les FR sans altérer l'affinité du scFv, confirmant ainsi que les acides aminés exposés ne sont pas obligatoirement impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. (Skrlj *et al.*, 2011) Cette technique a été aussi appliquée à des anticorps actuellement en essais cliniques comme le Lorvotuzumab mertansine (Roguska *et al.*, 1994) ou le Cantuzumab mertansine (Rodon *et al.*, 2008), tout deux en phase II. L'absence d'observation d'anticorps anti-Cantuzumab mertansine chez les patients traités met en évidence le succès du *resurfacing*. (Tolcher *et al.*, 2003)
- La technique de "désimmunisation" repose sur le fait que les mécanismes d'apprêtement des peptides antigéniques sur les CMH étant connus, il est possible de modéliser bioinformatiquement les épitopes T. Cette technique consiste à localiser les épitopes T dans une séquence, puis à les supprimer en introduisant des mutations. De même que précédemment, seules les mutations ne perturbant pas l'affinité sont conservées Plusieurs sociétés proposent des solutions informatiques (comme EPIVax: <http://www.ePIVax.com/>) ou *ex vivo* (comme Antitope : <http://www.antitope.co.uk/>) qui permettent de détecter la présence d'épitopes T potentiels dans une protéine, afin de pouvoir les supprimer. (De Groot, Goldberg, Moise, & Martin, 2006)

## *Partie 2 : Biotechnologie des anticorps*

Le Daclizumab (Zenapax<sup>®</sup>, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Bâle, Suisse / Protein Design Labs, BioPharma, Fremont Etats-Unis d'Amérique) a été le premier anticorps humanisé à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché, le 4 décembre 1997. Il cible l'IL2RA, présent à la surface de cellules immunitaires et était donc utilisé afin d'éviter les phénomènes de rejets lors des greffes de reins. Son efficacité et sa tolérance ont permis de montrer la diminution de l'immunogénicité par l'humanisation, bien que cette tolérance soit aussi favorisée par son action immunosuppressive. (Bellet & Dangles-Marie, 2005) On peut noter que son retrait du marché aux Etats-Unis d'Amérique est dû à la diminution du marché, et non pas à des problèmes d'immunogénicité. La société Protein Design Labs BioPharma (Fremont, Etats-Unis d'Amérique) est d'ailleurs en train de tester le Daclizumab (phases I et II d'essais cliniques) dans neuf indications cliniques nouvelles comme des transplantations d'organes ou les leucémies. Actuellement, 13 anticorps humanisés sont disponibles. En 2012 deux anticorps ont reçus une autorisation de mise sur le marché : le Mogamulizumab (Poteligeo<sup>®</sup>, Kyowa Hakko Kirin, Tokyo) le 20 mars 2012 et le Pertuzumab (Perjeta<sup>™</sup>, Genentech Inc, San Francisco) le 8 juin 2012. Cependant, dans certains cas, les anticorps humanisés continuent à être immunogènes, et des anticorps neutralisants anti-anticorps humanisés ont été détectés. (Getts *et al.*, 2010; Hwang & Foote, 2005) En particulier, plus de 40 % des patients traités avec le Teplizumab (MacroGenics Inc.), l'Alemtuzumab (Campath<sup>®</sup> / MabCampath<sup>®</sup> / LEMTRADA<sup>™</sup>, Berlex Inc. / Genzyme Corp. / Millennium Pharmaceuticals Inc) ou le Vedolizumab (Genentech Inc. / Millennium Pharmaceuticals Inc. / MRC Technology) ont développé une réponse anticorps anti-anticorps thérapeutiques. (Getts *et al.*, 2010; Somerfield *et al.*, 2010) L'existence de problèmes de tolérance des anticorps humanisés ont conduit au développement d'une génération d'anticorps mieux tolérés, les anticorps humains.

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

Nom générique	Nom commercial	Entreprise	Cible	Particularités	Prescription	Première AMM
Alemtuzumab	CAMPATH® LEMRADA™	Berlex Inc. Genzyme Corp. Millennium Pharmaceuticals Inc. Sanofi-Aventis	CD52		Leucémie lymphocytaire chronique.	07 mai 2001 (FDA)
Bevacizumab	AVASTIN®	Genentech Inc.	VEGFA		Carcinome des cellules rénales. Cancers du sein. Cancers colorectaux métastatique. Glioblastome. Cancers métastatiques des cellules pulmonaires à grande taille.	26 février 2004 (FDA)
Certolizumab pegol	Cimzia®	Celltech, UCB	TNF	Conjugué avec le pégol	Maladie de Crohn. Arthrite rhumatoïde.	22 avril 2008 (FDA)
Eculizumab	Soliris™	Alexion Pharmaceuticals Inc.	C5		Hémoglobinurie paroxystique nocturne	16 mars 2007 (FDA)
Mogamulizumab	Poteligeo®	Kyowa Hakko Kirin Amgen	CCR4		Leucémies lymphocytaires de l'adulte	30 mars 2012 (MHLW)
Natalizumab	Tysabri®	Biogen IDEC Pharmaceuticals. Elan Pharmaceuticals International Ltd.	ITGA4		Sclérose multiple. Maladie de Crohn.	23 novembre 2004 (FDA)
Nimotuzumab	Theracim®	YM BioSciences Inc.	EGFR		Cancers de la tête et du coup. Cancers pancréatiques.	02 septembre 2004 (EMA)
Omalizumab	Xolair®	Genentech Inc. Novartis Pharmaceuticals Corp. Tanox Inc.	IgE Fc		Asthme sévère persistant	20 juin 2003 (FDA)
Palivizumab	Synagis®	Abbott Laboratories. Medimmune Inc.	F RSV		Virus respiratoire syncytial	19 juin 1998 (FDA)
Pertuzumab	Perjeta™	Genentech Inc.	ERBB2		Cancer du sein	8 juin 2012 (FDA)
Ranibizumab	Lucentis®	Genentech Inc. Novartis Pharmaceuticals Corp.	VEGFA		Dégénérescence maculaire liée à l'âge	30 juin 2006 (FDA)
Tocilizumab	Actemra™ RoActemra®	Chugai pharmaceuticals Co. Ltd. F. Hoffmann-La Roche Ltd.	IL6R		Arthrite idiopathique juvénile systémique. Arthrite rhumatoïde.	17 avril 2008 (Japon)
Trastuzumab	Herceptin®	F. Hoffmann-La Roche Ltd. Genentech Inc.	ERBB2		Cancers du sein métastatiques surexprimant ERBB2. Cancers gastriques.	1er septembre 2008 (FDA)

**Figure 31 : Liste des anticorps humanisés disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.**

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché. FDA : *U S Food and Drug Administration*. MHLW : *Ministry of Health, Labour and Welfare*. D'après IMGT, en date du 21/02/2013.

### 2.2.4) La 3<sup>ème</sup> génération d'anticorps : les anticorps humains

Des sauts technologiques réalisés récemment permettent d'obtenir des anticorps recombinants entièrement humain (suffixe de la dénomination commune internationale en "-umab", comme l'Adalimumab, par exemple). Si en théorie les technologies cellulaires d'immortalisation peuvent être adaptées pour obtenir des anticorps humains, plusieurs difficultés non résolues rendent son utilisation difficile comme il a été vu précédemment. Différentes alternatives ont donc été développées pour obtenir des anticorps entièrement humain, en particulier l'obtention de souris transgéniques, et la construction et le criblage de banques de fragments d'anticorps.

#### 2.2.4.1) Les souris transgéniques

Bien que les souris soient phylogénétiquement éloignées de l'Homme, les mécanismes de recombinaison des gènes codant les anticorps, les mécanismes additionnels de génération de la diversité des anticorps, et les enzymes qui les catalysent sont similaires. Des transgènes

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

ont été effectuées pour insérer les séquences d'ADN codant les immunoglobulines humaines dans le génome murin afin de permettre leur expression et leur maturation par les souris. (Brüggemann *et al.*, 1989) Les principales lignées de souris transgéniques sont les souris Xenomouse<sup>®</sup> et HuMab<sup>®</sup>, développées par Abgenix (Amgen, Thousand Oaks, Etats-Unis) et Medarex (Bristol-Myers Squibb, Princeton, Etats-Unis d'Amérique) respectivement. (Lonberg, 2005) Différentes stratégies existent pour inactiver un répertoire de gènes et les remplacer par un autre répertoire génique. Par exemple, dans le cas des Xenomouse<sup>®</sup>, les manipulations génétiques ont été réalisées au niveau des cellules souches embryonnaires. Dans un premier temps, l'expression des chaînes lourdes et des chaînes légères  $\kappa$  des immunoglobulines murines a été inactivée grâce à la délétion des régions JH et C $\kappa$ . (Green, 1999) La réalisation de croisements successifs a ensuite permis d'obtenir des souris homozygotes, présentant les délétions des régions JH et C $\kappa$  sur leurs deux chromosomes, pour rendre impossible la production d'anticorps. Dans un second temps, les segments géniques codant les anticorps humains ont été introduits dans le génome murin à l'aide de chromosomes artificiels de levures (*Yeast Artificial Chromosomes*, YAC). (Mendez *et al.*, 1997) Finalement, près de 90 % du répertoire VH a été inséré, ainsi que les régions constantes humaines  $\gamma$  1,  $\gamma$  2 et  $\gamma$  4, ce qui permet de générer une diversité importante d'anticorps. (Bellet, Pecking, & Dangles-Marie, 2008; Green, 1999; Lonberg, 2005)

D'autres modèles de souris transgéniques, comme les Trans-Chromo mouse (T-C mouse<sup>®</sup>, Kirin Brewing Company, Tokyo, Japon) ont également été développés grâce à l'introduction de mini chromosomes contenant les segments géniques codant des chaînes lourdes et des chaînes légères  $\kappa$  humaines dans des souris, et en inactivant les locus codant les immunoglobulines murines. Leur immunisation permet l'expression de l'ensemble des isotypes d'anticorps humains. (Ishida *et al.*, 2002; Tomizuka *et al.*, 2000)

La société Regeneron (Tarrytown, Etats-Unis d'Amérique, <http://www.regeneron.com>) a développée des souris transgéniques appelées VelocImmune<sup>™</sup> qui permettent la production d'anticorps dont les domaines variables sont humains. Dans ces souris, l'ADN codant les domaines variables des immunoglobulines murines (6 mégabases) a été remplacé par les gènes codant les domaines variables des immunoglobulines humaines. Les anticorps produits ont donc des domaines variables humains mais des régions constantes murines, ce qui permet de les sécréter avec une efficacité égale à celle de souris non génétiquement modifiées. L'anticorps d'intérêt est d'abord sélectionné par la technologie des hybridomes, puis les gènes codant les domaines variables sont isolés par PCR et fusionnés avec des gènes codant les régions constantes d'un anticorps humain. Cette greffe permet de choisir la région Fc de

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

l'anticorps humain qui présente les fonctions effectrices souhaitées. Sanofi-Aventis et Regeneron se sont associés depuis 2007 pour développer des anticorps thérapeutiques en utilisant les VelocImmune™, et le Sarilumab est l'un des fruits de cette collaboration. Cet IgG1 dirigé contre le récepteur de l'IL6 a présenté de très bons résultats pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde durant la phase IIb d'essais cliniques, et entre actuellement en phase III. (Reichert, 2013; Sanofi/Regeneron, 2011) En utilisant les souris transgéniques VelocImmune™, la technologie des hybridomes et des techniques de biologie moléculaire, Tkaczyk *et al* (Tkaczyk *et al.*, 2012) ont isolé des anticorps d'affinité nanomolaires ( $K_D$  de 0,5 à 15 nM) qui neutralisent la toxine alpha de *Staphylococcus aureus* ( $CI_{50}$  allant jusqu'à  $0,30 \text{ mg.ml}^{-1}$ ).

Il existe aussi une technologie alternative, qui utilise des souris présentant une immunodéficiência combinée sévère (souris dites "SCID"), se traduisant par une lymphopénie sévère des lymphocytes T et B, qui empêche toute réponse immunitaire. Après injection de lymphocytes humains, ceux-ci seront reconnus par les cellules murines présentatrices de l'antigène mais, en l'absence de lymphocytes murins, aucune réponse ne sera dirigée contre ces lymphocytes humains. L'injection de lymphocytes humains dans les souris SCID est ainsi bien tolérée et permet d'obtenir des anticorps humains après immunisation de la souris. (Ilan *et al.*, 2002; Reisner & Dagan, 1998)

Les différents modèles de souris transgéniques ont été utilisés avec succès pour l'isolement d'anticorps humains (Figure 32). (Green, 1999; Lonberg, 2005) Le Panitumumab (Vectibix®, Amgen, Thousand Oaks, Etats-Unis d'Amérique) est le premier anticorps humain obtenu à partir de telles souris, à avoir été approuvé par la FDA, le 27 septembre 2006. (Jakobovits, Amado, Yang, Roskos, & Schwab, 2007) Cette immunoglobuline, prescrite dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques, est une IgG2 $\kappa$  dirigée contre l'EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) qui inhibe l'activation des cellules tumorales dépendantes de l'EGF. (Saltz Nat Rev Drug Discov 2006) Cependant, pour arriver à un tel succès, il a fallu près de 30 ans. Aujourd'hui encore, l'obtention de souris transgéniques nécessite un long travail et l'accès à ces modèles est très coûteux et le succès n'est pas assuré. (C. T. Scott, 2007)



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

Nom générique	Nom commercial	Entreprise	Cible	Prescription	Première AMM
Adalimumab	Humira®	Abbott Laboratories	TNF	Arthrite psoriasique. Maladie de Crohn. Athrite idiopathique juvénile. Psoriasis. Arthrite rhumatoïde. Spondylarthrite ankylosante	31 décembre 2002 (FDA)
Belimumab	Benlusta®	GlaxoSmithKline Human Genome Sciences Inc.	TNFSF13B	Lupus érythémateux disséminé	10 mars 2011 (FDA)
Canakinumab	Ilaris®	Novartis Pharmaceuticals Corp.	IL1B	Syndrome périodique associé à la cryopyrine	17 juin 2009 (FDA)
Golimumab	Simponi™	Centocor Ortho Biotech Inc.	TNF	Arthrite psoriasique. Arthrite rhumatoïde. Spondylarthrite ankylosante.	24 avril 2009 (FDA)
Ofatumumab	Arzerra™	Genmab A/S GlaxoSmithKline	MS4A1	Leucémie lymphocytaire chronique	26 octobre 2009 (FDA)
Panitumumab	Vectibix™	Amgen	EGFR	Cancers colorectaux métastatiques	27 septembre 2006 (FDA)
Raxibacumab	ABthrax®	GlaxoSmithKline Human Genome Sciences Inc.	PA	Maladie du charbon par inhalation	14 décembre 2012 (FDA)
Ustekinumab	Stelara™	Amgen Centocor Ortho Biotech Inc. Medarex	IL12B	Purpura thrombopénique idiopathique Psoriasis	22 août 2008 (FDA)

**Figure 32 : Liste des anticorps humains disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour un usage thérapeutique.**

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché. FDA : *U S Food and Drug Administration*. D'après IMGT, en date du 21/02/2013.

### 2.2.4.2) Les technologies d'exposition de fragments d'anticorps

Différentes techniques ont été développées afin de créer des banques de fragments d'anticorps, qui peuvent être exprimés à la surface de différentes structures comme les phages, les cellules procaryotes et eucaryotes ou encore les ribosomes. A l'aide de ces techniques, les fragments d'anticorps les plus affins contenus dans ces banques peuvent être isolés, même si ceux-ci sont présents en très faible nombre. Deux grandes catégories de banques existent : les banques naïves et les banques immunes. Toutes deux sont constituées de nombreux fragments d'anticorps formés par l'association aléatoire ("combinatoire") des domaines variables des chaînes lourdes et des domaines variables des chaînes légères.

#### 2.2.4.2.1) Les différents types de banques

##### 2.2.4.2.1.1) Les banques naïves issues de lymphocytes B

Les banques naïves sont construites à partir des régions VH et VL réarrangées issues des lymphocytes B de sujets non volontairement immunisés. (McCafferty, Griffiths, Winter, & Chiswell, 1990) Elles représentent la diversité des IgM et peuvent être utilisées pour l'isolement d'anticorps dirigés contre tous les antigènes possibles, y compris les protéines pour lesquelles la vaccination est difficilement concevable ou réalisable, comme dans le cas des

## *Partie 2 : Biotechnologie des anticorps*

protéines du Soi immunologique ou des agents du risque biologique provoqué. Afin d'obtenir des banques "réellement" naïves, il est nécessaire d'utiliser uniquement des amorces spécifiques des IgM et IgD pour l'amplification des régions VH et VL. En effet, bien que les sujets n'aient pas été volontairement immunisés, ils sont naturellement confrontés à différents pathogènes et développent donc une réponse immunitaire contre eux. Comme les IgM et les IgD n'ont pas subi le processus de maturation d'affinité, elles présentent des affinités médiocres, variant généralement entre 1 et 100 nM (Hennie R Hoogenboom, 2005). Afin d'isoler des anticorps de bonne affinité, il est nécessaire de cribler des banques d'une diversité élevée ( $10^{10}$  clones en moyenne), mais il faut néanmoins noter que certaines associations de VH et VL peuvent être redondantes et donc diminuer la diversité effective de la banque. (Glanville *et al.*, 2009) Des banques naïves présentant des diversités suffisantes pour isoler des clones d'affinité nanomolaire, voire subnanomolaire, ont été obtenues. (Sblattero & Bradbury, 2000; Sheets *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 1996) Un processus de maturation d'affinité *in vitro* peut ensuite être appliqué aux fragments d'anticorps isolés dont l'affinité n'est pas suffisamment favorable. Ce processus consiste à introduire des mutations dans la séquence des domaines variables des anticorps, principalement au niveau des CDR, afin d'améliorer leurs affinités (*cf paragraphe "2.5.3) Maturation d'affinité"*). Néanmoins, ce procédé peut augmenter l'immunogénicité des immunoglobulines puisque la séquence de l'anticorps ayant subi un tel processus s'éloigne de la séquence germinale. MedImmune (Gaithersburg, Etats-Unis d'Amérique) a succédé au CAT (Cambridge Antibody Technology Group Plc), et est détenu par le groupe biopharmaceutique AstraZeneca (Londres, Royaume-Uni). Cette société est particulièrement intéressée par l'isolement d'anticorps thérapeutiques à partir du criblage de banques naïves de fragments d'anticorps. Il a ainsi développée une banque naïve de scFv exprimés à la surface de phages d'une diversité de  $1,4 \cdot 10^{10}$  clones, à partir de l'association aléatoire des régions VH et VL issues des lymphocytes B de 43 sujets sains. (Vaughan *et al.*, 1996) Les banques naïves ont un caractère universel puisqu'elles permettent d'isoler des anticorps dirigés contre tous les antigènes, de façon comparable à la maturation des IgM.

### *2.2.4.2.1.2) Les banques naïves (semi-)synthétiques*

Les banques semi-synthétiques ont été développées à partir de banques naïves, dans lesquelles une diversité supplémentaire a été introduite grâce à l'insertion de séquences



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

d'ADN aléatoires au niveau des CDR (en particulier au niveau des CDR3). (C F Barbas, Bain, Hoekstra, & Lerner, 1992; Hoet *et al.*, 2005) Ces séquences sont introduites par PCR, en utilisant des amorces dégénérées. Cette technique permet d'augmenter la diversité des anticorps de la banque et de pallier l'absence de processus de maturation d'affinité *in vivo*, pour sélectionner dès le criblage des fragments d'anticorps de bonne affinité. Des banques semi-synthétiques d'une diversité de l'ordre de  $10^7$  à  $10^{10}$  clones ont été construites. (Goldman *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 1994; G. Wang *et al.*, 2004)

Ce procédé a été étendu pour créer des banques entièrement synthétiques qui s'affranchissent de la construction préalable d'une banque naïve. Celles-ci sont entièrement construites *in vitro* par PCR en associant aléatoirement les gènes V, (D) et J non réarrangés des VH et VL puis en associant aléatoirement les chaînes lourdes et légères entre elles. (Hayashi *et al.*, 1994; H R Hoogenboom & Winter, 1992; H. Y. Yang, Kang, Chung, & Shim, 2009) De la diversité peut aussi être introduite au niveau des CDR en insérant des séquences nucléotidiques aléatoires par PCR. Bien que l'affinité des clones isolés à partir de banques (semi-)synthétiques puisse s'élever à  $10^{-11}$  M (Knappik *et al.*, 2000) les fragments d'anticorps présentent souvent des affinités modérées, de l'ordre de  $10^{-8}$  M voire de l'ordre de  $10^{-6}$  M (Mickael Hust, communication personnelle), qui doivent être améliorées par un processus de maturation d'affinité *in vitro*.

### 2.2.4.2.1.3) Les banques immunes

Les banques immunes peuvent être construites à partir des lymphocytes B de sujets immunisés soit volontairement, par injection d'un antigène d'intérêt, soit naturellement, dans le cas de patients convalescents infectés par le micro-organisme à neutraliser. L'immunisation de volontaires n'est possible qu'avec des vaccins approuvés ou en phase clinique de développement, ce qui limite le nombre d'immunogènes pouvant servir à l'immunisation, et la disponibilité d'un vaccin diminue l'intérêt des anticorps recombinant ciblant cet antigène. Les protocoles d'immunisation nécessitent plusieurs injections espacées dans le temps afin de permettre à l'organisme de sélectionner les clones les plus réactifs après chaque injection de l'antigène. Dans les deux cas, les lymphocytes B spécifiques de l'immunogène ont subi les processus de maturation d'affinité *in vivo*, et des anticorps de haute affinité sont sécrétés. L'objectif de la stratégie est alors d'isoler ces anticorps. Comme les sujets sont naturellement en contact avec d'autres antigènes, la réponse anticorps ne sera pas spécifique de

## *Partie 2 : Biotechnologie des anticorps*

l'immunogène utilisé pour l'injection. La diversité des banques immunes peut être moins importante que celle des banques naïves ( $10^7$  à  $10^8$  clones) tout en permettant d'isoler des fragments d'anticorps isolés dont l'affinité est plus élevée ( $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  M), rendant facultatives les techniques de maturation d'affinité *in vitro*. (Aujame, Geoffroy, & Sodoyer, 1997; Chassagne *et al.*, 2004; Pansri, Jaruseranee, Rangnoi, Kristensen, & Yamabhai, 2009; Tikunova *et al.*, 2012) Il est cependant nécessaire de construire autant de banques immunes que d'antigènes à cibler, bien que des travaux récents montrent chez l'animal qu'il est possible d'utiliser un mélange d'immunogènes afin d'obtenir des anticorps dont l'affinité peut atteindre  $6,75 \cdot 10^{-10}$  nM. (Finlay, Bloom, & Cunningham, 2011; Hof, Hoeke, & Raats, 2008; Y. Li, Cockburn, Kilpatrick, & Whitlam, 2000). L'isolement d'anticorps dirigés contre les antigènes pour lesquels aucune vaccination n'existe (comme certains agents du risque biologique provoqué) est difficile du fait de considérations éthiques. L'une des alternatives possible est l'immunisation de primates non-humains (*cf paragraphe "2.3) Les anticorps de primates non-humains"*).

### *2.2.4.2.1.4) Clonage et empaquetage des banques*

L'ADN codant les domaines variables des anticorps amplifiés à partir d'un sujet immunisé, ou non, doit être cloné dans un vecteur permettant l'expression de ces fragments d'anticorps à la surface des particules (généralement phages ou cellules), permettant ainsi le criblage de la banque. Pour cela, deux banques de pré-clonage sont généralement contruite : une pour les domaines variables des chaînes légères et une pour les domaines variables des chaînes lourdes. L'ADN codant ces régions est amplifié à l'aide d'amorces introduisant des sites de restriction de part et d'autre de la séquence codante afin de pouvoir introduire les séquences ADN dans ce vecteur. Les séquences codant les chaînes légères et lourdes sont ensuite combinées aléatoirement. (Chasteen, Ayriss, Pavlik, & Bradbury, 2006) Seuls des fragments d'anticorps sont clonés et présentés à la surface des particules car il est difficile d'exprimer des anticorps entiers.

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

### 2.2.4.2.2) La technologie d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages

Il est possible d'introduire de l'ADN codant des fragments d'anticorps dans des phages qui exprimeront alors ces fragments à leur surface. Les phages peuvent ainsi être utilisés comme des outils permettant d'associer un génotype (ADN codant le fragment d'anticorps) à un phénotype (fragment d'anticorps exprimé à leur surface). L'interaction des phages avec l'antigène permet de sélectionner les fragments d'anticorps interagissant avec l'antigène intérêt. Bien que des techniques alternatives aient été développées, la technique de référence reste l'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages (*phage display*) car elle permet en particulier d'utiliser *E. coli* pour la production des particules phagiques, puis pour l'expression des fragments d'anticorps sélectionnés.

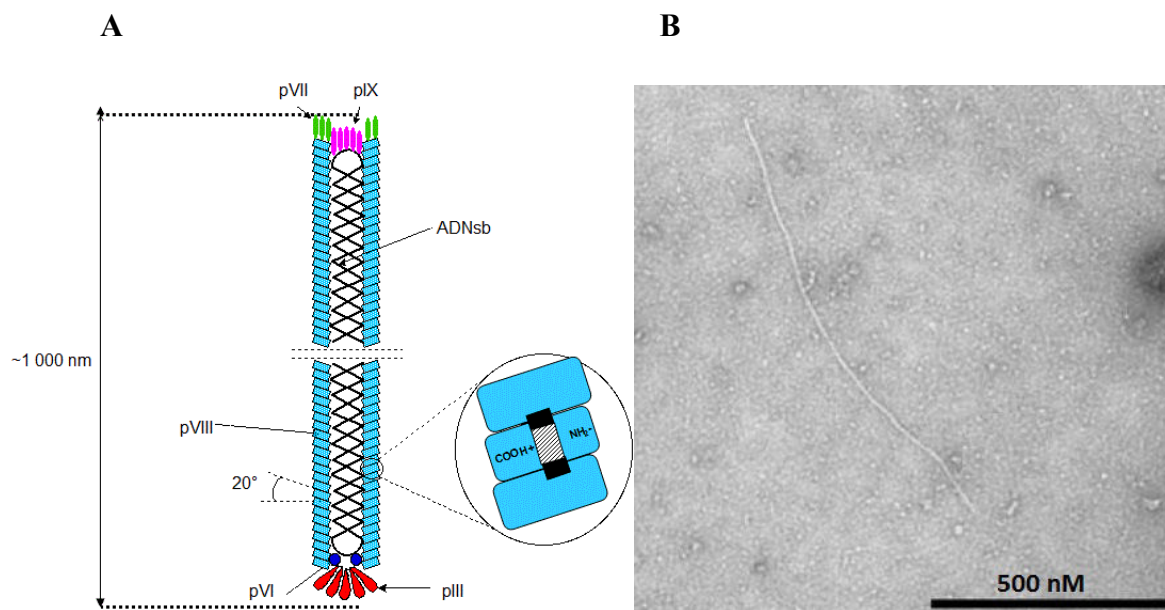
Les bactériophages sont des virus de bactéries qui ont été observés dès 1915 par le bactériologiste anglais Frederick William TWORT (1877-1950) puis en 1917 par le bactériologiste français Félix d'HERELLE (1873-1949). Il existe une grande diversité de bactériophages, dont deux types pouvant infecter les souches d'*E. coli* ont été utilisés pour la technique d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages : les phages filamenteux de la famille des Inoviridae (M13, fl et fd) et les phages lytiques de la famille des Myoviridae (T7, T4 et  $\lambda$ ). Les premiers travaux ont été menés avec le phage  $\lambda$ , qui était déjà utilisé comme vecteur de clonage, mais celui-ci ne permettait pas de produire une grande quantité de phages. Actuellement le phage filamenteux M13 est le plus utilisé. (Castagnoli *et al.*, 2001; Huse *et al.*, 1989)

#### 2.2.4.2.2.1) Le phage M13

Le phage M13 est non létal pour les bactéries qu'il infecte, et dont il sort par extrusion et non par lyse cellulaire, ce qui permet de produire la grande quantité de phages nécessaires pour construire des banques de grande diversité. Il a une structure cylindrique d'environ 1 000 nm de long et 5 nm de diamètre qui est formée par l'association de protéines de surface. Cette structure renferme le patrimoine génétique du phage, présent sous la forme d'ADN monocaténaire circulaire (Figure 33). Le génome du phage M13 a une taille de 6,4 kb et code pour trois groupes de gènes impliqués dans la réplication du génome viral (gènes II, V et X), la synthèse de la capsid (gènes III, VI, VII, VIII et IX) et l'assemblage des particules

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

virales (gènes I, IV et XI). Comme les autres virus, le phage ne dispose pas des enzymes nécessaires à sa réplication, et sa survie dépend donc de l'infection d'une cellule et du détournement de sa machinerie cellulaire. Des cinq protéines formant la capsid, la protéine PVIII est la plus représentée puisque 2700 à 3 000 exemplaires de cette protéine forment la structure en hélice- $\alpha$  de la gaine flexible du phage. Cette protéine de 50 acides aminés n'est pas impliquée dans l'infectiosité du phage, mais permet l'empaquetage et la protection du génome viral. Son extrémité N-terminale est exposée au solvant tandis que son extrémité C-terminale est en contact avec la molécule d'ADN. Une des extrémités du phage comprend trois à cinq exemplaires des protéines PVII (33 acides aminés) et PIX (32 acides aminés) et l'autre extrémité comprend trois à cinq exemplaires des protéines PIII (406 acides aminés) et PVI (112 acides aminés). La protéine PIII confère l'infectiosité du phage M13 puisqu'elle interagit *via* son extrémité N-terminale avec les pili F des bactéries. (P Holliger & Riechmann, 1997; Stengele, Bross, Garcés, Giray, & Rasched, 1990)



**Figure 33 : Phage M13.**

A) Structure schématique. B) Visualisation en microscopie électronique à transmission. Adapté de Ploss & Kuhn. (Ploss & Kuhn, 2011)

### 2.2.4.2.2) Expression de protéines à la surface des phages

L'équipe de George Pieczenik SMITH a mis en évidence dès 1985 qu'il était possible de fusionner un peptide avec la région exposée au solvant de la protéine PIII du phage M13.

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

(G. P. Smith, 1985) Ces travaux ont rendu possible la localisation de l'épitope d'un anticorps en exprimant à la surface des phages des courts peptides constitutifs de l'antigène, puis en criblant ces phages afin de ne sélectionner que les peptides reconnus par l'anticorps, par exemple. Avec les progrès de la biologie moléculaire, comme les techniques de clonage par PCR, il est devenu possible de synthétiser des fragments d'anticorps de taille réduite conservant les propriétés de fixation de l'antigène, comme les Fab ou les scFv, par exemple. (Better, Chang, Robinson, & Horwitz, 1988; Bird *et al.*, 1988; Huse *et al.*, 1989; Larrick *et al.*, 1989) En 1988, Plückthun *et al* (Skerra & Plückthun, 1988) ont démontré que de tels fragments d'anticorps pouvaient être exprimés dans *E. coli*. Il est alors apparu qu'il était possible d'exprimer des fragments d'anticorps à la surface des phages afin de sélectionner ceux qui reconnaissent un antigène, grâce à l'interaction entre l'antigène d'intérêt et les fragments d'anticorps exposés à la surface des phages, d'une façon "inverse" à l'interaction anticorps/peptides exposés à la surface des phages déjà utilisée par Smith. (Marks, Hoogenboom, Griffiths, & Winter, 1992; McCafferty *et al.*, 1990) De part son coût modeste et sa simplicité relative, la majorité des laboratoires utilisent la technique d'exposition à la surface des phages pour sélectionner des fragments d'anticorps.

L'ensemble des cinq protéines de surface du phage M13 ont servi de support à l'exposition de protéines d'intérêt mais les protéines PIII et PVIII sont les plus fréquemment utilisées. (Devlin, Panganiban, & Devlin, 1990; Mandrecki & Goldam, 2009; J. K. Scott & Smith, 1990) Des protéines ont ainsi été fusionnées avec l'extrémité N-terminale de la protéine PIII et avec les extrémités N- et C-terminale de la protéine PVIII. (Cabilly, 1999; Marvin, 1998) Les 2 700 à 3 000 copies de la protéine PVIII permettent d'exprimer autant de protéines de fusion, cependant la proximité entre les protéines PVIII va induire un encombrement stérique lorsque des peptides de plus d'une dizaine acides aminés sont fusionnés. De plus, l'expression de près de 3 000 peptides de fusion engendre un phénomène de multivalence et d'avidité, si bien que la sélection n'est plus fonction de la seule affinité du peptide pour l'anticorps. La protéine PIII, présente en seulement trois à cinq exemplaires permet de limiter les phénomènes d'avidité, et de fusionner des protéines de taille plus importante comme les fragments d'anticorps. (Huovinen, Sanmark, Ylä-Pelto, Vehniäinen, & Lamminmäki, 2010; Rodi, Soares, & Makowski, 2002; Schlebusch, Reinartz, Kaiser, Grün, & Wagner, 1997) Des travaux réalisés en 1995 ont confirmé que des scFv fusionnés à la PIII s'expriment mieux que ceux fusionnés à la PVIII et ne perturbent pas l'assemblage des phages, ce qui permet un criblage optimal, en particulier quand un seul scFv-fusion est exprimé sur chaque phage. (C F Barbas, Kang, Lerner, & Benkovic, 1991; Kretzschmar & Geiser, 1995;

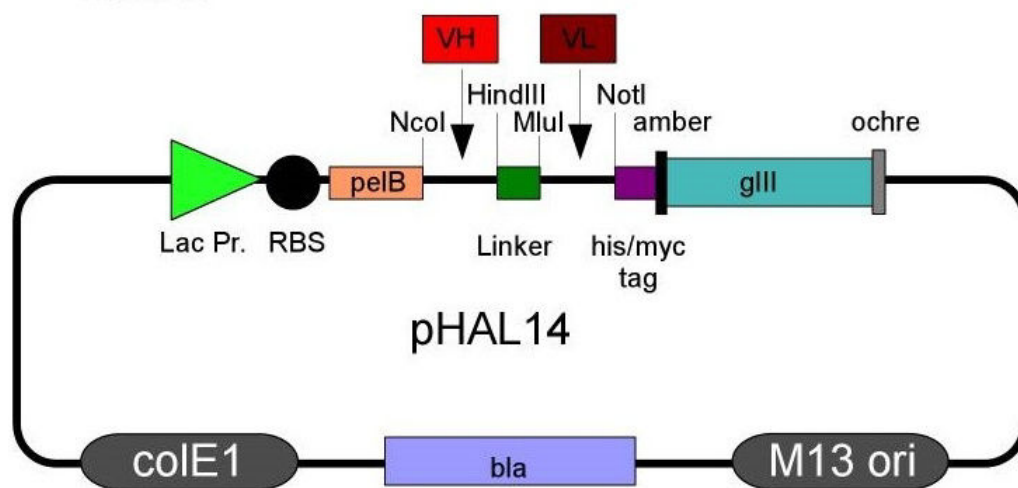
## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

Mandecki & Goldam, 2009) Il a récemment été démontré qu'il est possible de fusionner des fragments d'anticorps (scFv ou Fab) avec la protéine PIX. Cette protéine présente l'avantage de ne pas être impliquée dans l'infection des bactéries et perturbe donc moins le cycle infectieux des phages. (Gao *et al.*, 2002; Tornetta *et al.*, 2010) Dans la suite de ce manuscrit, nous nous focaliserons sur la fusion avec la protéine PIII puisqu'elle est largement utilisée, en particulier dans les travaux présentés dans ce manuscrit.

Le gène codant le fragment d'anticorps peut être exprimé de deux façons différentes. Le gène peut être directement inséré dans le génome phagique et sera donc exprimé autant de fois qu'il y a de copies de la glycoprotéine à laquelle la protéine correspondante est fusionnée (cinq fois pour la PIII par exemple). (O'Connell, Becerril, Roy-Burman, Daws, & Marks, 2002) Cependant l'expression de plusieurs fragments à la surface des phages cause des phénomènes d'avidité non souhaités. Pour remédier à ce problème, le gène de la protéine de fusion peut être apporté par un plasmide ou un phagemide. (Qi, Lu, Qiu, Petrenko, & Liu, 2012) Les phagemides sont des vecteurs de clonage hybrides, monocaténaire, dérivant des phages filamenteux et des plasmides, et comportent deux origines de réplication. Dès l'entrée du phagemide dans le cytoplasme bactérien, l'origine de réplication plasmidique, comme *colE1*, permet de convertir le phagemide monocaténaire, infectieux, en phagemide double brin, qui est la forme de réplication dans la bactérie. Une fois sous forme double brin, le phagemide peut être dupliqué en un grand nombre de copies. Cette forme double brin est aussi celle utilisée par les techniques de biologie moléculaire. Après infection avec les phages assistants, l'origine de réplication phagique permet au phagemide d'être dupliqué sous forme monocaténaire, qui est destinée à être empaquetée sous forme de phage infectieux. Les phagemides comportent aussi un promoteur faible, une séquence ADN signal d'encapsidation du vecteur ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique (Figure 34). Statistiquement, le risque de recombinaison d'une séquence d'ADN est d'autant plus faible que cette séquence et le vecteur sont petits. Par conséquent, les phagemides ne comportent ni les gènes codant les protéines phagiques autre que la PIII ni les gènes codant certaines enzymes phagiques. Seuls, ces vecteurs peuvent se répliquer mais ils ne peuvent donc pas être encapsidés. Lorsque les protéines et les enzymes manquantes sont apportés par des phages assistants (phage *helper*), tel que le phage M13K07 (Qi *et al.*, 2012), les protéines permettant l'encapsidation et les particules phagiques sont produites, puis le phagemide est encapsidé. Si le phage auxiliaire code aussi pour des protéines PIII non recombinantes, une partie des PIII sera native et l'autre (codée par le phagemide) sera fusionnée à un fragment d'anticorps. Selon les niveaux d'expression respectifs de la protéine PIII native et de la protéine PIII fusionnée, les phages

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

comporteront théoriquement de zéro à cinq protéines de fusion dérivées de la protéine PIII (PIII-fusionnée). Généralement l'expression de la PIII native est supérieure à celui de la PIII fusionnée, et statistiquement les phages n'exprimeront aucune ou une seule PIII fusionnée à leur surface. (Stefan, 2007) Il est aussi possible d'utiliser des vecteurs possédant des promoteurs inductibles qui permettent d'exprimer un nombre plus ou moins important de PIII de fusion à la surface des phages. (Chappel, He, & Kang, 1998) De plus, les phages comportant plus d'une protéine de fusion seront moins infectieux et se répliqueront donc moins lors des phases répétées d'infection et de production lors du criblage. (McCafferty *et al.*, 1990) L'origine de répllication des phages assistants est plus faible que celle du phagemide mais son promoteur est plus fort, donc de grandes quantités de protéines phagiques sont produites à partir de l'ADN phagique mais le phagemide est plus fréquemment encapsidé que l'ADN phagique, qui est présent en moins de copies. (C F Barbas *et al.*, 1991; Dotto & Zinder, 1984) De façon alternative, Chasteen *et al* (Chasteen *et al.*, 2006) ont développé une nouvelle lignée bactérienne qui contient naturellement un plasmide codant pour les protéines phagiques, ce qui permet de ne pas utiliser de phages assistants lors de la phase d'amplification.



**Figure 34 : Carte du phagemide pHAL14.**

M13 ori : origine de répllication phagique. colE1 : origine de répllication bactérienne. Lac Pr : promoteur. RBS : (*Ribosome Binding Site*), séquence de Shine-Dalgarno. PelB : séquence d'exportation dans le périplasme de la protéine codée. VH et VL : domaines variables des anticorps. gIII : gène de la PIII. Bla : gène de résistance à l'ampicilline. Source : Pr. Stefan Dübel et Dr. Michael Hust, communication personnelle.



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

### 2.2.4.2.2.3) Déroulement du criblage

Après construction de la banque de phages exposant des fragments d'anticorps, celle-ci est criblée *in vitro* de façon à sélectionner les phages les plus affins pour l'antigène d'intérêt. Plusieurs techniques ont été développées pour éliminer les phages non réactifs. (Sidhu, 2005)

Cette sélection peut être réalisée soit en phase liquide (Louis, Bewley, Gustchina, Aniana, & Clore, 2005) soit sur un support comme une membrane de cellulose (Bugli *et al.*, 2011), des billes magnétiques (Chang, Takayanagi, Yoshida, & Shimizu, 2011; Moghaddam *et al.*, 2003), la matrice d'une colonne de purification (Breitling, Dübel, Seehaus, Klewinghaus, & Little, 1991) ou encore sur un support en polystyrène de type plaque ELISA (Hust, Maiss, Jacobsen, & Reinard, 2002; Mortensen, Dupont, Jespersen, Willats, & Arneborg, 2007). (Carlos F. Barbas, Burton, Scott, & Silverman, 2001) Dans le cas d'un criblage contre un antigène adsorbé, une étape de saturation est nécessaire afin d'empêcher l'établissement d'interactions entre les fragments d'anticorps et l'antigène ou le support. La banque de phages est ensuite incubée avec l'antigène d'intérêt, afin de permettre l'interaction entre les fragments d'anticorps exprimés à la surface des phages et l'antigène. Après incubation, des étapes successives de lavage sont réalisées avec un tampon dont la stringence permet de rompre les liaisons non spécifiques qui auraient pu être établies malgré l'étape de saturation préalable. Parmi les détergents utilisés, le polysorbate 20 ("Tween 20<sup>®</sup>") est le plus utilisé car il présente l'avantage d'être non toxique pour les phages et les bactéries aux concentrations utilisées. Classiquement, le nombre de lavages est augmenté à chaque tour de criblage pour éliminer progressivement les phages peu ou pas réactifs. En effet, dans le cas où la stringence serait importante dès le premier tour de criblage, des phages exprimant des fragments d'anticorps très affins mais présents en faible nombre pourraient être éliminés. Néanmoins, dans notre unité nous avons mis en évidence qu'il était possible, à partir d'une banque immune, d'isoler des scFv d'affinité nanomolaires en un seul tour de criblage, en utilisant d'emblée une stringence élevée. (Chahboun *et al.*, 2011) Après lavages, les phages ayant interagi avec l'antigène sont élués en augmentant la force ionique, en diminuant le pH ou encore par trypsination. L'éluion avec de la trypsine est totalement indépendante de l'affinité du fragment de l'anticorps pour sa cible et ne dégrade pas les phages puisque qu'*in vivo*, dans l'intestin, les phages conservent leur infectiosité malgré la présence de telles protéases. Les phages élués sont ensuite amplifiés par l'infection d'une culture d'*E. coli* contenant les phages assistants. Lors de la phase de culture, la sélection des cellules bactériennes infectées à la fois par un phagemide et un phage assistant est réalisée par l'ajout



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

de trois antibiotiques dans le milieu. Un premier antibiotique, spécifique du gène de résistance porté par l'ADN bactérien, est ajouté afin d'éviter toute contamination par d'autres bactéries. Comme le gène de résistance est situé généralement sur l'épisome F codant le pilus d'*E. coli*, seules les bactéries sensibles à l'infection peuvent se multiplier. Un deuxième antibiotique, spécifique du gène de résistance porté par l'ADN phagemidique, est ajouté pour sélectionner les bactéries infectées par les phagemides élués. Finalement un troisième antibiotique, spécifique du gène de résistance porté par l'ADN phagique, est ajouté pour sélectionner les bactéries qui sont infectées par le phage assistant. Après incubation du mélange associant les bactéries, les phages élués et les phages assistants, les phages d'intérêt produits pendant la culture ( $10^{11}$  à  $10^{15}$  particules phagiques par litre de milieu en moyenne) peuvent être récupérés par précipitation avec du PEG800 puis par centrifugation. (Carlos F. Barbas *et al.*, 2001) Ces phages peuvent être à nouveau criblés contre la protéine cible afin d'enrichir progressivement la population phagiques avec les clones de plus affins. Généralement, compte tenu de la concentration des phages produits lors de la culture, durant le criblage  $10^{12}$  phages sont incubés dans chaque puit de la plaque ELISA, permettant ainsi de représenter l'intégralité de la diversité de la banque dans chaque puit (théoriquement 10 000 copies de chaque clone pour une banque d'une diversité de  $10^8$  clones). Généralement, trois à cinq tours de criblage sont réalisés. Il a été observé qu'à chaque tour de criblage, la proportion de phages exposant un fragment d'anticorps spécifique de l'antigène augmente d'un facteur 1 000. (Marks *et al.*, 1992) Après les étapes de sélection, la réactivité des phages élués, est évaluée par ELISA.

Pour produire les fragments d'anticorps solubles, les vecteurs phagemidiques utilisés peuvent contenir un codon stop de type ambre (TAG) entre le gène codant la protéine phagique (PIII) et le gène codant le fragment d'anticorps. Dans les souches bactériennes suppressives, utilisées pour l'amplification des phages pendant le criblage, ce codon ambre est lu comme un acide glutamique ce qui ne stoppe pas la traduction, permettant la fusion du fragment d'anticorps et de la protéine phagique. Pour produire le fragment l'anticorps soluble, le vecteur est transformé dans une souche bactérienne non-suppressive qui lit le codon ambre comme un codon stop, ce qui arrête la traduction et permet donc d'exprimer uniquement le fragment d'anticorps. (Barderas *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 1994) Dans le cas où le vecteur ne possède pas de codon ambre entre le fragment d'anticorps et la protéine phagique, il est nécessaire d'exciser l'ADN codant le fragment d'anticorps, puis de le cloner dans un vecteur d'expression. Certains vecteurs comme pComb3H permettent à l'inverse d'exciser le gène codant la protéine phagique, ce qui permet de s'affranchir d'une étape de clonage. (Shen *et al.*,

## *Partie 2 : Biotechnologie des anticorps*

2007) La production des fragments d'anticorps est généralement réalisée dans l'espace périplasmique d'*E. coli*, où les conditions d'oxydoréduction permettent la formation des ponts disulfures nécessaires à la conformation des fragments d'anticorps comme les Fab ou des scFv-Fc. (Better *et al.*, 1988; Skerra & Plückthun, 1988). La présence d'un peptide signal, comme par exemple la séquence pelB de la pectate lyase d'*Erwinia caratovora*, en amont du gène codant le fragment d'anticorps, est nécessaire pour permettre l'exportation dans le périplasme. (Lei, Lin, Wang, Callaway, & Wilcox, 1987) La présence d'une séquence spécifique comme une région hexa-histidine, une région myc ou encore un peptide FLAG<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis d'Amérique) est aussi nécessaire pour permettre une purification des fragments d'anticorps par affinité, par exemple sur une colonne de nickel dans le cas de l'utilisation d'un motif hexa-histidine.

### *2.2.4.2.2.4) Limites de la technique d'exposition à la surface des phages*

Durant la construction de la banque de phages l'un des risques majeurs est que certains phagemides se liguent sans qu'il n'y ait d'insertion de l'ADN codant les fragments d'anticorps. Les bactéries portant les phagemides sans insert se répliquent plus rapidement, diminuant alors la diversité réelle de la banque et perturbant le criblage en diminuant la proportion de phages réactifs contenus dans la culture. Un autre risque majeur apparaît durant la phase d'amplification des phages, où certains clones peuvent être produits plus facilement que d'autres et donc être surreprésentés dans la population phagique, au détriment de clones potentiellement plus affins mais produits en plus faibles quantités. Il a aussi été constaté que certains clones pouvaient être toxiques pour *E. coli*. En effet, parmi la grande diversité des fragments d'anticorps, certains peuvent reconnaître des protéines bactériennes et perturber le cycle cellulaire bactérien. Au cours des étapes de sélection, des recombinaisons peuvent aussi s'accumuler dans les séquences codant les fragments d'anticorps et conduire à leur élimination progressive même s'ils sont réactifs vis à vis de la protéine cible. (Pavoni, Monteriù, Cianfriglia, & Minenkova, 2007) Compte tenu de l'efficacité des protocoles de transformation bactérienne il a été constaté que la taille des banques exposées à la surface des phages est généralement comprise entre  $10^7$  à  $10^{11}$  clones, bien que des banques d'une diversité de  $10^{13}$  clones ont parfois été décrites. Une autre limite est que l'adsorption d'une protéine sur un support solide peut causer sa dénaturation et notamment altérer la

## *Partie 2 : Biotechnologie des anticorps*

conformation des épitopes d'intérêt, mais l'adsorption est aléatoire et la diversité des orientations permet généralement de présenter tous les épitopes dans une conformation native. Pour s'affranchir des problèmes de dénaturation, il est aussi possible de biotinyler l'antigène puis d'effectuer un criblage en utilisant l'antigène soluble.

### *2.2.4.2.3) Les autres techniques d'exposition de fragments d'anticorps*

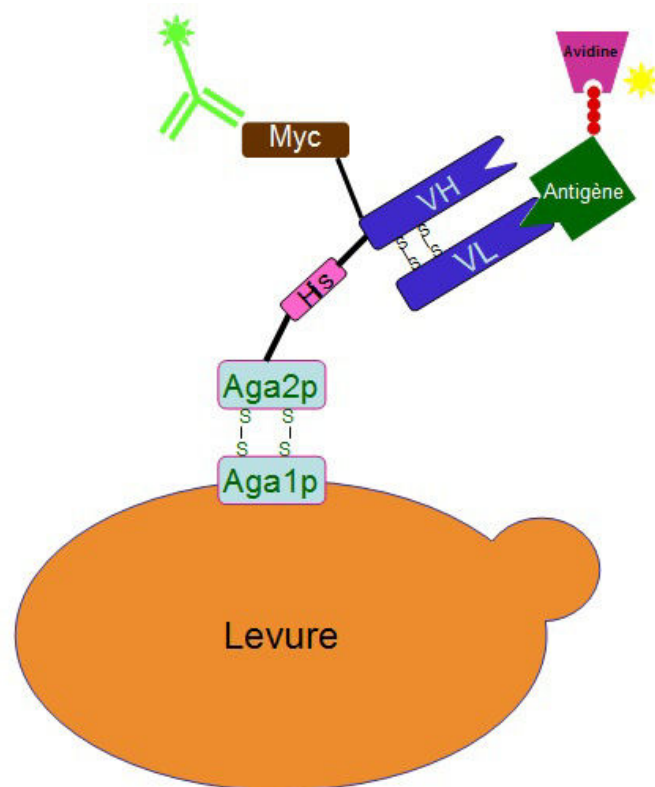
La technique de l'exposition à la surface des phages est la première à avoir été développée, et est actuellement la technique la plus fréquemment utilisée. Afin de contourner cette technologie qui est brevetée (brevets EP1266965, 1992 et US5693780, 1997), plusieurs techniques alternatives ont été développées. Il est ainsi possible d'exprimer les fragments d'anticorps à la surface d'autres organismes comme les levures (Gai & Wittrup, 2007), les cellules bactériennes (Mazor, Van Blarcom, Iverson, & Georgiou, 2009) ou les cellules de mammifères (Ho & Pastan, 2009). Ces techniques peuvent aussi permettre de s'affranchir de plusieurs limites liées à *E. coli* comme la faible efficacité de la transformation, les phénomènes de recombinaison, l'amplification préférentielle des clones sans l'insert d'intérêt, ou encore l'incapacité d'exprimer des protéines présentant des conformations tri-dimensionnelles complexes.

#### *2.2.4.2.3.1) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des levures*

Une des techniques alternatives à l'utilisation des phages repose sur l'exposition de fragments d'anticorps à la surface des levures (*yeast display*, brevets US6699658, US6114147, US6027910). (Boder & Wittrup, 1997; Gai & Wittrup, 2007; Shusta, Kieke, Parke, Kranz, & Wittrup, 1999) Son principe fondamental est similaire mais le fragment d'anticorps est fusionné à une protéine de surface des levures, comme par exemple l'extrémité C-terminale de la sous unité Aga2p de l' $\alpha$ -agglutinine de *Saccharomyces cerevisiae*. (Boder & Wittrup, 1997; Lee *et al.*, 2006; Y. Lin *et al.*, 2003; van den Beucken *et al.*, 2003; Z. Wang, Mathias, Stavrou, & Neville, 2005) La banque d'anticorps est incubée en présence d'un antigène biotinylé ou couplé à une molécule fluorescente (Figure 35), ce qui permet de sélectionner les levures exprimant les fragments d'anticorps réactifs à l'aide d'un cytomètre en

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

flux (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) au lieu d'une sélection sur support solide. (Boder & Wittrup, 1997; Gai & Wittrup, 2007) Plus de 400 millions de cellules peuvent ainsi être triées par heure. En moyenne plusieurs fragments d'anticorps identiques sont exposés sur chaque levure, et la probabilité que chacun d'entre eux interagisse avec l'antigène est dépendante de leur affinité. Le marquage est donc fonction de l'affinité du fragment d'anticorps exprimé à la surface de la levure, et la sélection en cytométrie en flux peut donc prendre en compte cette affinité. Compte tenu des capacités de transformation de *Saccharomyces cerevisiae*, la taille des banques est limitée à  $10^7$  environ. Pour dépasser cette limite, dans le cas de banques de fragments d'anticorps comme les Fab, il est possible de construire séparément une banque pour les chaînes lourdes et une banque pour les chaînes légères. La combinaison de ces deux banques permet d'associer aléatoirement les chaînes lourdes et légères, générant une diversité totale théoriquement égale à la multiplication des diversités des deux banques. Des banques d'une diversité supérieure à  $10^9$  clones ont parfois pu être obtenues. (Blaise *et al.*, 2004; Feldhaus *et al.*, 2003; Weaver-Feldhaus *et al.*, 2004) La technique d'exposition à la surface des levures a permis d'isoler des anticorps de haute affinité. Par exemple, le scFv 4-4-20 a été isolé par cette technique, et son affinité pour la fluorescéine-biotine est de 0,7 nM. Afin d'améliorer son affinité, une banque de variants du scFv 4-4-20 a été générée par *PCR shuffling* (*cf* paragraphe "2.5.3) *Maturation d'affinité*") et son criblage par *yeast display* a permis l'isolement du scFv 4 M5.3 dont l'affinité de 48 fM est la meilleure affinité jamais obtenue pour un anticorps (amélioration d'un facteur de près de 15 000 fois par rapport au clone initial). (Boder, Midelfort, & Wittrup, 2000; Boder & Wittrup, 1997)



**Figure 35 : Expression d'un fragment d'anticorps à la surface d'une levure.**

Le Fab est exposé à la surface de la levure grâce à une fusion avec la sous unité Aga2p (bleu ciel). Les Fab interagissant avec un antigène sont détectés en cytométrie en flux grâce à i) la biotinylation (rouge) de l'antigène (vert) qui peut être reconnue par une molécule d'avidine (violet) marquée avec une molécule fluorescente (jaune), ii) la fusion du Fab avec une séquence (marron) pouvant être reconnue par un anticorps couplé à une molécule fluorescente (vert clair). Les Fab peuvent ensuite être purifiés par affinité grâce à un tag moléculaire (His : Histidine, rose).

#### 2.2.4.2.3.2) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des cellules de mammifères

L'expression de fragment d'anticorps à la surface des cellules de mammifères (*mammalian cell display*, brevet US7732195) est une stratégie similaire à celle de l'expression à la surface des levures. (Ho & Pastan, 2009a, 2009b) Les fragments d'anticorps ou les immunoglobulines entières sont exposés à la surface de différentes cellules mammifères comme les cellules HEK293 ou CHO, grâce à la fusion avec une protéine membranaire comme le PDGRF (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*). La biotinylation des antigènes et la fusion du fragment d'anticorps à une séquence pouvant être reconnue par un anticorps fluorescent permettent la sélection des cellules exposant les fragments réactifs en cytométrie en flux. Une équipe a récemment démontré qu'il était possible d'utiliser cette approche pour cribler des banques d'anticorps entiers, et qu'un seul tour de criblage permettait d'enrichir la

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

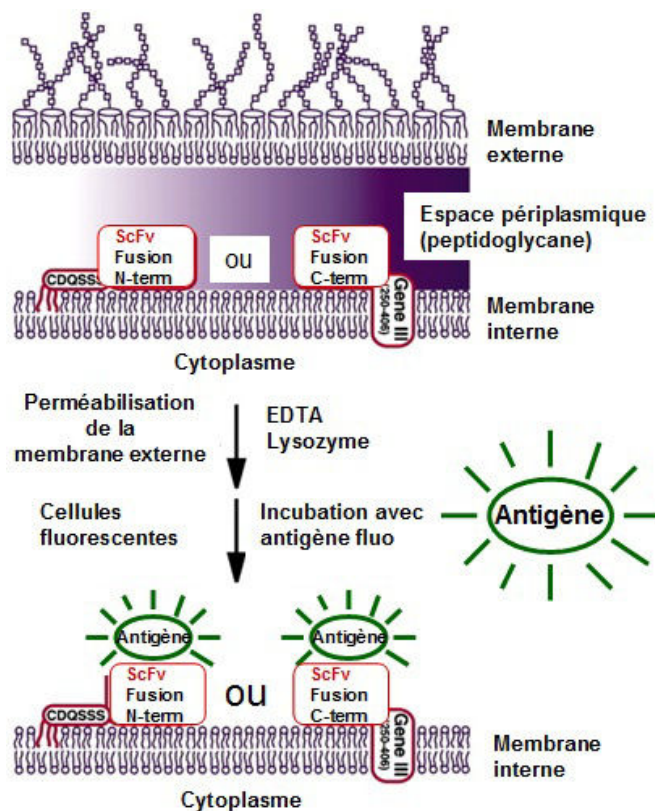
banque en clones d'affinité élevée par un facteur 500. (Chen Zhou, Jacobsen, Cai, Chen, & Shen, 2010) Le criblage d'anticorps entiers présente le grand avantage de ne pas risquer de sélectionner des fragments d'anticorps dont l'affinité serait dégradée lors de leur conversion en immunoglobuline entière. Cependant plusieurs limites existent à cette technique. En particulier, il est difficile d'exprimer un seul fragment d'anticorps à la surface des cellules car les techniques de transfection utilisées conduisent fréquemment à l'insertion de plusieurs gènes codant les fragments d'anticorps dans la cellule de mammifère. (Beerli *et al.*, 2008; Chen Zhou *et al.*, 2010) La manipulation délicate des cellules mammifères limite la taille des banques pouvant être générées, de  $10^6$  à  $10^7$  clones environ (Beerli *et al.*, 2008), donc les banques naïves ne peuvent donc pas être criblées par cette technique. Son utilisation est généralement réservée à l'optimisation de l'affinité de fragments d'anticorps ou pour isoler des fragments d'anticorps à partir de banques immunes de petite taille. Ho *et al* (Ho, Nagata, & Pastan, 2006) ont utilisé cette technique pour obtenir des variants d'un scFv dirigé contre le CD22. Après transfection, les clones exprimés à la surface de cellules HEK293 qui interagissent avec le CD22 ont été sélectionnés par cytométrie en flux. Un scFv d'une affinité de 1,2 nM pour le CD22 a ainsi été isolé. Cette technique a aussi permis d'isoler une IgG entière neutralisant l'IL12 humaine et murine à partir d'une banque immune construite après immunisation d'un animal avec ces deux IL12. (Akamatsu, Pakabunto, Xu, Zhang, & Tsurushita, 2007)

### 2.2.4.2.3.3) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des cellules bactériennes

L'exposition de fragment d'anticorps à la surface des cellules bactériennes (*bacterial display*) fonctionne selon un principe très similaire aux deux techniques précédentes. (Mazor *et al.*, 2009) Bien que certains protocoles utilisent des bactéries Gram positives, la plupart d'entre eux utilisent des bactéries Gram négatives, comme *E. coli*, dont la membrane externe ne comporte qu'une mince couche de peptidoglycane. (Löfblom, Sandberg, Wernérus, & Ståhl, 2007) Une équipe a ainsi développé le système APEX (*Anchored Periplasmic EXpression*), qui permet au fragment d'anticorps produit dans le périplasme d'être exprimé à la surface de la membrane cytoplasmique interne (Figure 36). (Harvey *et al.*, 2004) Dans ce système, la fixation du fragment d'anticorps à cette membrane peut être réalisée soit par la fusion d'une séquence de six acides aminés (CDQSSS) qui correspond à la partie de la

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

lipoprotéine bactérienne NlpA responsable de l'intégration dans la membrane externe, soit par la fusion avec le domaine N-terminal de la PIII du phage M13 qui présente la caractéristique de pouvoir s'intégrer dans les lipides membranaires. La perméabilisation de la membrane externe permet de créer des pores dont la taille permet à l'antigène fluorescent d'accéder aux fragments d'anticorps exposés, permettant de sélectionner les clones réactifs par cytométrie en flux. Cependant, la cytométrie en flux ne permet que difficilement de trier des banques d'une diversité supérieure à  $10^8$  clones. Le *bacterial display* permet l'expression de molécules complexes comme des IgG non glycosylées. Dans ce cas, l'ancrage peut être réalisé par la fusion avec un récepteur de la région Fc, qui peut s'insérer dans la membrane interne. (G. Chen *et al.*, 2001) Cette technique a été appliquée avec succès par Mazor *et al* (Mazor, Van Blarcom, Mabry, Iverson, & Georgiou, 2007), pour l'isolation de plusieurs IgG nanomolaires interagissant avec la sous unité PA de *Bacillus anthracis*.



**Figure 36 : Principe de la technique APEX.**

La technique APEX permet d'exprimer des scFv à la surface de la membrane interne des bactéries et de sélectionner les fragments les plus affins en cytométrie en flux. Traduit de Harvey *et al.* (Harvey *et al.*, 2004)

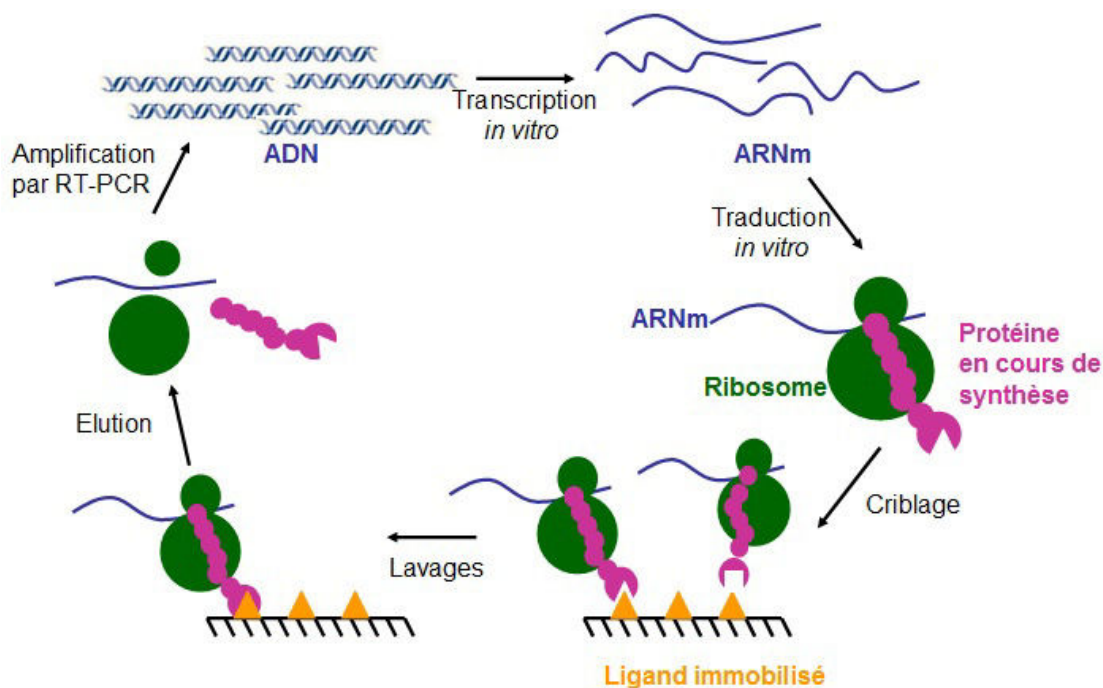


## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

### 2.2.4.2.3.4) L'exposition de fragments d'anticorps à la surface des ribosomes

Pour s'affranchir des nombreux problèmes posés par les techniques *in vivo*, des méthodes *in vitro* d'exposition de fragments d'anticorps ont été développées. La technique *in vitro* la plus avancée est celle de l'exposition de fragments d'anticorps à la surface des ribosomes (*ribosome display*, brevet US7074557), qui permet le criblage de banques dont la diversité peut s'élever à  $10^{13}$  clones (voire  $10^{15}$  clones). (Thom & Groves, 2012) L'élément central de cette technique réside dans l'absence de codons stop à l'extrémité des gènes codant les fragments d'anticorps, ce qui empêche le fragment d'anticorps traduit de se dissocier du ribosome et de son ARNm, formant alors un complexe ARNm / fragment d'anticorps / ribosome. Après une étape de sélection sur l'antigène immobilisé sur un support, l'ARNm des clones affins est dissocié du ribosome par ajout d'EDTA (*EthyleneDiamineTetraacetic Acid*). Les ARNm d'intérêt sont ensuite rétro transcrits en ADN par RT-PCR, puis un nouveau tour de criblage est réalisé. A la fin du criblage, les ADN des clones les plus affins sont transformés pour produire et purifier les anticorps sélectionnés. Cependant cette technique est délicate à mettre en place, et est donc préférentiellement utilisée pour le criblage de banque de grande taille comme les banques naïves. Des banques de maturation d'affinité comprenant un grand nombre de variants ont aussi été générées puis criblées par cette technique, ce qui facilite l'isolement d'anticorps de très haute affinité. (Kastelic & He, 2012; Lipovsek & Plückthun, 2004) Il a été mis en évidence que des mutations ponctuelles pouvaient apparaître durant le processus d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des ribosomes, permettant un phénomène de maturation d'affinité inhérent à cette méthode. (Hanes, Jermutus, Weber-Bornhauser, Bosshard, & Plückthun, 1998) Une équipe a criblé une banque immune murine par la technique d'exposition à la surface des ribosomes et isolé un scFv dont l'affinité pour le peptide 7P14P est de 40 nM. (Hanes *et al.*, 1998) En utilisant un processus de maturation d'affinité et a nouveau la technique d'exposition à la surface des ribosomes, l'affinité des scFv préalablement isolés a ensuite pu être améliorée jusqu'à 500 fois, permettant l'isolement d'un scFv d'une affinité de 5.2 pM. (Zahnd *et al.*, 2004) A partir d'une banque synthétique de scFv, cette même équipe a aussi pu améliorer jusqu'à 40 fois l'affinité des scFv parentaux, permettant l'isolement d'un clone d'une affinité de 82 pM. (Hanes, Schaffitzel, Knappik, & Plückthun, 2000)





**Figure 37 : Principe de la technique d'exposition à la surface des ribosomes.**

L'ADN codant pour les protéines exposées est transcrit en ARNm puis traduit en protéine. Les complexes ARNm / ribosome / protéine sont ensuite criblés. Après lavage, les complexes sont dissociés puis l'ARNm est rétrotranscrit en ADN, permettant d'effectuer un nouveau tour de criblage.

### 2.2.4.3) Technique utilisée dans notre laboratoire

Contrairement à la culture des cellules eucaryotes, la culture bactérienne est moins contraignante, en particulier car elle est moins sensible aux contaminations et moins dépendante du milieu de culture et des facteurs de croissance. En outre, les cellules procaryotes, comme la lignée *E. coli* HB2151 utilisée dans notre laboratoire, permettent d'obtenir en deux à trois jours des rendements de protéines recombinantes suffisants (généralement de l'ordre 100 à 1 000  $\mu\text{g}$  de fragment d'anticorps par litre de culture) pour permettre les mesures d'affinités par résonance plasmonique de surface ou les tests *in vitro* et *ex vivo* de neutralisation. Depuis 1995, notre laboratoire a donc été équipé avec le matériel nécessaire à la culture bactérienne. La technique d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages permet de cribler des banques immunes d'une taille importante ( $10^8$  clones en moyenne pour les banques immunes), permettant l'isolement d'anticorps recombinants dont l'affinité pour l'immunogène est élevée. Des techniques d'exposition plus récentes, comme le *ribosomal display*, sont plus délicates à maîtriser et peu de publications décrivent l'isolement d'anticorps par ces techniques, contrairement au *phage display* qui est devenu depuis 1985 la technique de référence pour l'isolement d'anticorps. Les travaux précédents conduits dans

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

notre unité ont mis en évidence que l'utilisation de scFv, dont la séquence codante est de 800 pb, diminuait le risque de recombinaison durant le criblage, et ce format a donc été préféré aux Fab, dont la séquence codante est de 1 600 pb. Durant ma thèse, les anticorps neutralisant les toxines botuliques, ont donc été isolés grâce à la technologie d'exposition de scFv à la surface des phages.

### 2.3) Les anticorps de primates non-humains

#### 2.3.1) Proximité entre les anticorps de primates et les anticorps humains

Les primates non-humains sont philogénétiquement proches des Hommes, et ils sont donc considérés comme des animaux de choix pour la recherche dans différents domaines comme l'hématologie, l'immunologie, la virologie, ou encore pour l'évaluation de la toxicité de molécules thérapeutiques avant les essais cliniques. (Akari, Iwasaki, Yoshida, & Iijima, 2009; Dixit & Coats, 2009; Fabbrini *et al.*, 2012; Hérodin, Thullier, Garin, & Drouet, 2005; P. R. Johnson & Hirsch, 1991; Muller & Brennan, 2009; Nyindo & Farah, 1999; SCHER, 2009) Leur utilisation a donc été proposée pour l'isolement d'anticorps à visé thérapeutique quand l'immunisation de volontaires humains n'est pas possible éthiquement ou pratiquement. Des travaux menés par Abhinandan *et al* (Abhinandan & Martin, 2007) et Thullier *et al* (Philippe Thullier, Huish, Pelat, & Martin, 2010) ont calculé le pourcentage moyen d'identité existant entre les domaines variables  $V\gamma$ ,  $V\kappa$  et  $V\lambda$  de macaques et celles des anticorps humains représentés dans la base de données de Kabat. (G. Johnson & Wu, 2001) Ces études ont permis de développer deux index qui évaluent la proximité d'une séquence donnée avec les séquences de cette base : le H-score (*Humanness-score*) et le G-score (*Germline-derived score*). (Philippe Thullier, Huish, *et al.*, 2010) Le H-score compare la séquence du domaine variable d'un anticorps donné (VH ou VL) avec l'ensemble des séquences de domaines variables exprimés contenues dans la base de Kabat. L'un des inconvénients du H-score est lié au fait que certaines familles de gènes VH humains sont surreprésentées (comme les familles VH3 et VH4) par rapport à d'autres, car elles sont plus fréquemment utilisées par le système immunitaire. (Druar *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 1992) Les séquences appartenant à ces familles surreprésentées ont un H-score artificiellement amélioré. Pour éviter ce biais le G-score a été développé ; il compare la séquence protéique du domaine variable analysé uniquement avec les séquences peptidiques humaines exprimées codées par les gènes VH ou VL de la famille à

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

laquelle la séquence analysée est apparentée et contenues dans la base de Kabat. Ces deux index évaluent la proximité de séquences de domaines variables d'anticorps avec leurs homologues humains, et ils peuvent être utilisés comme un outil de prédiction de tolérance. Les H- et G-score sont des moyennes centrées réduites (Figure 38 et Figure 39) donc elles sont :

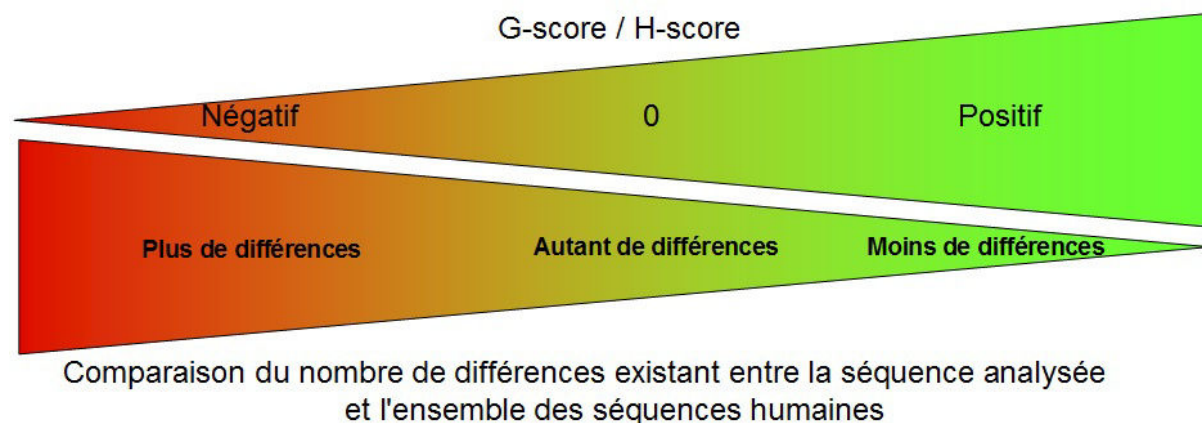
- égales à 0 si la séquence à analyser présente autant de différences avec la séquence humaine de référence que le nombre moyen de différences observé quand on compare les séquences humaines entre elles.
- inférieures à 0 si la séquence à analyser présente plus de différences avec la séquence humaine de référence que le nombre moyen de différences observé quand on compare les séquences humaines entre elles.
- supérieures à 0 si la séquence à analyser présente moins de différences avec la séquence humaine de référence que le nombre moyen de différences observé quand on compare les séquences humaines entre elles.

Le H-score, et plus encore le G-score, permettent donc d'évaluer la proximité entre une séquence de domaine variable à analyser et ses homologues humains. Afin d'estimer "l'humanité" des domaines variables des anticorps de macaques, les G-score moyens des séquences de 53 régions VH, 55 régions VL $\kappa$  et 39 régions VL $\lambda$  de macaques ont été calculés, et sont de -1,184, -0,650 et -1,538, respectivement. (Philippe Thullier, Huish, *et al.*, 2010) Ces résultats démontrent que les séquences des domaines variables des anticorps de macaques ne peuvent pas être considérées comme humaines, ce qui justifie l'humanisation des anticorps à visée thérapeutique isolés à partir de macaques.

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

**Figure 38 : Formule du H-score et du G-score.**

Les H- et G-score sont des moyennes centrées réduites. X : Valeur de la séquence observée ;  $\mu$  = Valeur moyenne de la banque ;  $\sigma$  = écart-type.



**Figure 39 : Explication schématique du G-score et du H-score.**

La séquence d'un domaine variable d'anticorps est comparée aux séquences des domaines variables des anticorps humains contenues dans une base de données. Le nombre moyen de différences existant entre l'ensemble des séquences contenues dans la base de données est connu. Moins il y a de différences entre la séquence analysée et l'ensemble des séquences du pool d'anticorps humains, plus les valeurs du H-score et du G-score sont élevées plus la tolérance attendue de l'anticorps est bonne.

L'Index de Germinalité (IG) est un autre paramètre utilisé pour évaluer le caractère humain des domaines variables d'un anticorps non-humain, non pas en les comparant avec les séquences des anticorps humains exprimés, mais en les comparant avec les séquences protéiques germinales des domaines variables des anticorps humains qui leur sont les plus proches. En effet, les séquences germinales codant les IgM, qui appartiennent au Soi immunologique et sont donc parfaitement tolérées. La séquence germinale la plus proche de celle du domaine variable à analyser est d'abord identifiée à l'aide d'outils bioinformatiques comme IMGT/DomainGapAlign<sup>®</sup>. (Ehrenmann & Lefranc, 2012; M.-P. Lefranc, Ehrenmann, Ginestoux, Giudicelli, & Duroux, 2012; Pelat *et al.*, 2008) L'index de germinalité est ensuite calculé comme la proportion d'acides aminés identiques entre les régions charpentes (FR1 à 4) de l'anticorps non-humain et celles de la séquence humaine sélectionnée. Plus sa valeur est proche de 100 %, plus les régions charpentes de la séquence analysée sont similaires à leurs homologues humains, et donc plus leur administration à l'Homme devrait être bien tolérée. Cependant l'index de germinalité ne tient pas compte des régions hyper-variables (CDR) et n'est donc que partiellement prédictif d'une bonne tolérance, mais un "indice de germinalité" a été défini, pour inclure ces régions hyper-variables. En outre, aucune valeur de référence de l'index de germinalité des anticorps humains n'a été calculée, ce qui ne permet pas de quantifier la proximité de la séquence à analyser avec l'ensemble des anticorps humains.

Ce paramètre mathématique a été utilisé dans notre laboratoire pour comparer l'ensemble des anticorps de macaques avec l'ensemble des anticorps humains. Afin d'identifier les gènes V putatifs de macaques, un BLASTP entre l'allèle numéro 1 de chaque gène V

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

humain et le génome de *Macaca mulatta* (accessible au 14/04/2013 sur <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/content/rhesus-monkey-genome-project>) a été effectué. A partir des 141 gènes V humains, seuls 75 gènes V macaques ont été identifiés, et leurs séquences peptidiques ont été analysées par IMGT/DomainGapAlign afin d'identifier le gène V humain le plus proche de chaque région V de macaque. (Philippe Thullier, Chahboun, & Pelat, 2010) Le pourcentage d'identité entre les gènes V humains et les gènes V macaques ont alors été calculés, et en moyenne :

- les régions VH de macaques présentent 91 % d'identité avec les régions VH humaines les plus proches. Ce degré d'identité est moindre que celui observé (97,3 %) en comparant entre eux les différents allèles, lorsqu'ils existent, des gènes VH humains.
- les régions VL $\lambda$  de macaques présentent 92,7 % d'identité avec les régions VH humaines les plus proches. Ce degré d'identité est moindre que celui observé (99 %) en comparant entre eux les différents allèles, lorsqu'ils existent, des gènes VH humains.
- les régions VL $\kappa$  de macaques présentent 92,8 % d'identité avec les régions VH humaines les plus proches. Ce degré d'identité est moindre que celui observé (98,8 %) en comparant entre eux les différents allèles, lorsqu'ils existent, des gènes VH humains.

En moyenne, la différence entre les gènes V de macaques et humains est 4,2 fois plus importante que la différence existant entre les différents allèles d'un gène V humain. Des résultats similaires sont obtenus lorsque seules les régions charpentes sont étudiées. Cette étude montre donc que les gènes V de macaques et humains sont différents, donc les domaines variables des anticorps de macaques sont potentiellement immunogènes chez l'Homme mais leur tolérance peut être optimisée par un processus d'humanisation.

Le G-score et l'index de germinalité ont été utilisés pour analyser "l'humanité" du Fab 35PA83 avant et après germinalisation (*cf paragraphe "2.2.3) La 2ème génération d'anticorps : les anticorps humanisés "*). Avant humanisation, l'index de germinalité était de 87,6 %, le H-score de -0,241 et le G-score de -0,541 alors qu'après humanisation ces trois valeurs sont respectivement de 97,7 %, -0,082 et 0,191, et donc le Fab germinalisé est quasiment humain. Ces paramètres confirment donc l'intérêt de l'humanisation pour augmenter "l'humanité", et donc théoriquement la tolérance, des anticorps thérapeutiques.

### 2.3.2) Limitations juridiques restreignant l'utilisation des anticorps de macaques

Afin de tirer parti des avantages que procurent les primates non-humains pour l'isolement d'anticorps thérapeutiques, la société Biogen-Idec Inc (Weston, Etats-Unis d'Amérique) a breveté en Europe (brevet EP1266965, 1992) et aux Etats-Unis d'Amérique (brevet US5693780, 1997) l'utilisation clinique d'anticorps dont les domaines variables dérivent des anticorps des "singes de l'ancien monde" (*old world monkey* : babouins et macaques). De tels anticorps chimériques, dont les régions constantes sont humaines et les domaines variables sont d'origine primate, sont appelés anticorps primatisés (Primatized<sup>®</sup>). Aux Etats-Unis d'Amérique, ce brevet porte sur l'utilisation d'anticorps de babouins et de macaques dirigés contre tous les antigènes. En Europe, compte tenu des limitations plus strictes sur la brevetabilité du vivant, d'autres éléments scientifiques ont dû être apportés. Le brevet européen repose sur l'observation selon laquelle un macaque a répondu à l'immunisation par le CD4 humain, et cette observation a été généralisée à l'ensemble des protéines humaines si bien que le système immunitaire du macaque reconnaît les protéines humaines comme non-Soi. En outre, des travaux comparant 29 séquences de domaines variables de macaques avec des séquences consensus humaines, considérées comme statistiquement représentatives, auraient permis de montrer que les différences observées entre les séquences des anticorps de macaques et celles des anticorps humains sont équivalentes à celles observées lorsque les anticorps humains sont comparés entre eux. Il serait donc impossible de distinguer les anticorps de macaques et les anticorps humains, et l'administration de ces deux types d'anticorps serait tolérée de façon équivalente. Les macaques seraient donc, selon ces observations, des animaux dont toutes les protéines sont différentes de leurs homologues humains, à l'exception des domaines variables des anticorps, et représenteraient donc des animaux de choix pour l'obtention d'anticorps bien tolérés dirigés contre ces protéines humaines. Le brevet européen est basé sur ces "observations" et il a donc été limité à l'isolement d'anticorps thérapeutiques dirigés contre les antigènes d'origine humaine. Cependant, les travaux de notre laboratoire, présentés au chapitre précédent et réalisés sur les 131 séquences des domaines variables des anticorps humains disponibles dans les bases de données en ligne, ont mis en évidence l'existence de différences significatives entre les anticorps de primates non-humains et les anticorps humains, ce qui contredit les résultats avancés par la société Biogen-IDEC. (Philippe Thullier, Huish, *et al.*, 2010) Une procédure de révocation du brevet européen a alors été entamée par notre laboratoire, soutenu

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

juridiquement et financièrement par le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB), conduisant à son annulation le 22 août 2010. La société Biogen Idec Inc a néanmoins tiré profit des années d'utilisation exclusive des domaines variables d'anticorps permises par ces brevets, pour développer des anticorps thérapeutiques à partir des primates immunisés : le Galaximab, une IgG dirigée contre le CD80, actuellement en phase III d'essais cliniques (Czuczman *et al.*, 2012) et le Lumiliximab, une IgG dirigée contre le CD23, actuellement en phase II d'essais clinique (Poole, Meng, Reff, Spellman, & Rosenwasser, 2005). Aucun anticorps anti-lumiliximab n'a été détecté durant les essais cliniques, ce qui souligne la bonne tolérance des anticorps de primates. (Byrd *et al.*, 2007)

### 2.4) Les épitopes

Un épitope correspond à la portion d'une protéine qui est reconnue comme non-Soi par le système immunitaire. Les épitopes T correspondent à des peptides linéaires, présentés aux lymphocytes T sous une forme associée aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), eux même présents à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. Les épitopes B, correspondent à la région d'une protéine qui est reconnue par un lymphocyte B ou un anticorps. L'immunogénicité d'une protéine est souhaitée dans le cas où la protéine est destinée à un usage vaccinal, mais elle est redoutée lorsque la protéine est destinée à un usage thérapeutique. Afin de prédire l'immunogénicité d'une protéine, des techniques *in vitro* et *in silico* permettant de détecter la présence d'épitopes sur une molécule ont été développées.

#### 2.4.1) Les épitopes T et les épitopes B

Le CMH-I est une protéine membranaire composée d'une chaîne lourde  $\alpha$  de 43 kDa et d'une chaîne légère  $\beta_2$  microglobuline de 12 kDa, codées par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C. Il est responsable de la présentation des antigènes produits dans le cytosol de la cellule présentatrice de l'antigène. Ces antigènes sont principalement des protéines virales ou bactériennes (comme dans le cas des bactéries intracellulaires) produites dans la cellule après son infection, des protéines mal conformées, ou des protéines mutées après transformation maligne de la cellule. Le CMH-II est une protéine membranaire composée d'une chaîne  $\alpha$  de 34 kDa et d'une chaîne  $\beta$  de 29 kDa. Il permet la présentation des antigènes provenant de



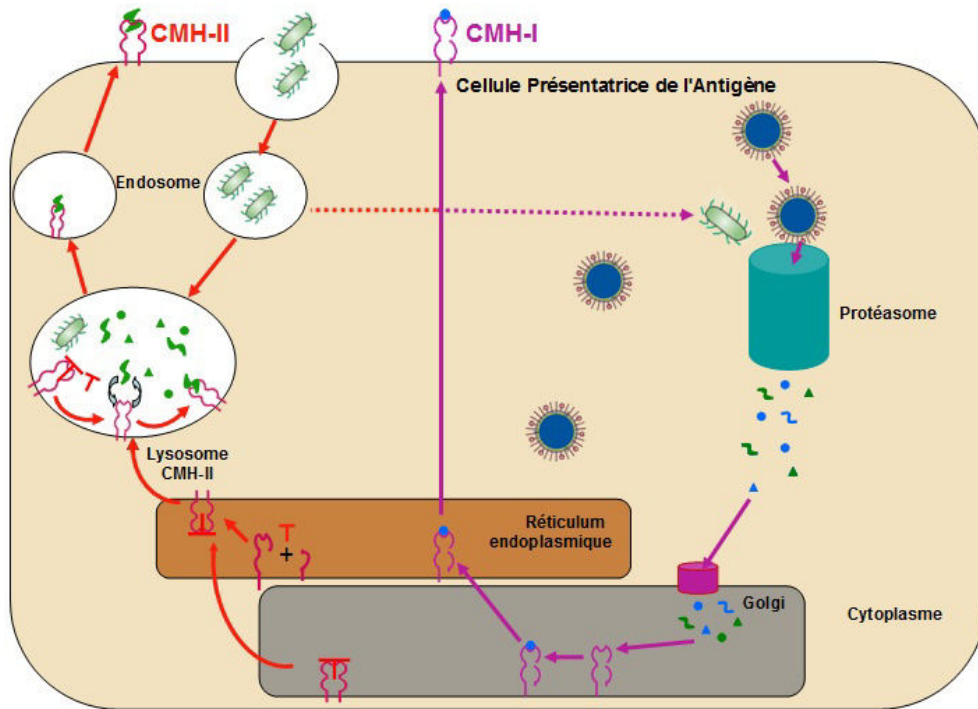
## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

l'extérieur de la cellule et qui ont été endocytés, et dans certains cas (présentation croisée) d'antigènes intracellulaires. (Wilson & Villadangos, 2005) Les antigènes ne sont pas exposés sur le CMH dans leur conformation native mais sous forme de peptides. Des étapes d'apprêtement (*processing*) sont nécessaires pour exposer l'antigène en association avec les molécules du CMH (Figure 40). Les antigènes sont ainsi clivés par différentes protéines intracellulaire, dont le protéasome pour les protéines intracellulaires, et des cathepsines pour les antigènes endocytés. (Kloetzel, 2004; Shi *et al.*, 2000) Des protéines chaperonnes associent ensuite les peptides clivés aux molécules du CMH pour les exposer à la surface cellulaire. (Rock, York, & Goldberg, 2004) Les complexes CMH-I/antigène peuvent être reconnus par les lymphocytes T de type CD8 (lymphocytes cytotoxiques), et les complexes CMH-II/antigène peuvent être reconnus par les lymphocytes T de type CD4 (lymphocytes assistants/*helper*). Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire du TCR (*T Cell Receptor*), qui est présent à la surface des lymphocytes T, et des récepteurs CD4 et CD8 qui interagissent avec un domaine du CMH. Cette double interaction constitue un signal primaire pour le lymphocyte T, mais ce signal n'est pas suffisant à lui seul pour activer le lymphocyte T. Le signal secondaire est provoqué par l'interaction entre le ligand CD86 (B7) présent à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène et le CD28 présent à la surface du lymphocyte. (Greenfield, Nguyen, & Kuchroo, 1998) Les lymphocytes T activés sécrètent des cytokines impliquées dans la différenciation cellulaire et dans l'activation de différentes cellules immunitaires. (Nakayamada, Takahashi, Kanno, & O'Shea, 2012) Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vont aussi pouvoir interagir avec les lymphocytes B en établissant une interaction entre le complexe CMH-peptide antigénique et le BCR (qui sont des IgD ou IgM exprimées à la surface des lymphocytes B) d'une part et entre le CD40 et le CD154 (CD40 ligand) d'autre part (Figure 41). (van Kooten & Banchereau, 2000) Les cellules B activées vont alors se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en lymphocytes B mémoire.

Ce processus de présentation dépend des caractéristiques physico-chimiques des acides aminés du CMH qui s'associent aux peptides antigéniques par des liaisons non covalentes. Par exemple, à cause de la taille des CMH-I et -II, les épitopes T ont une taille de huit à 10 acides aminés et les épitopes B ont une taille de 13 à 25 acides aminés. (Liao & Arthur, 2011)

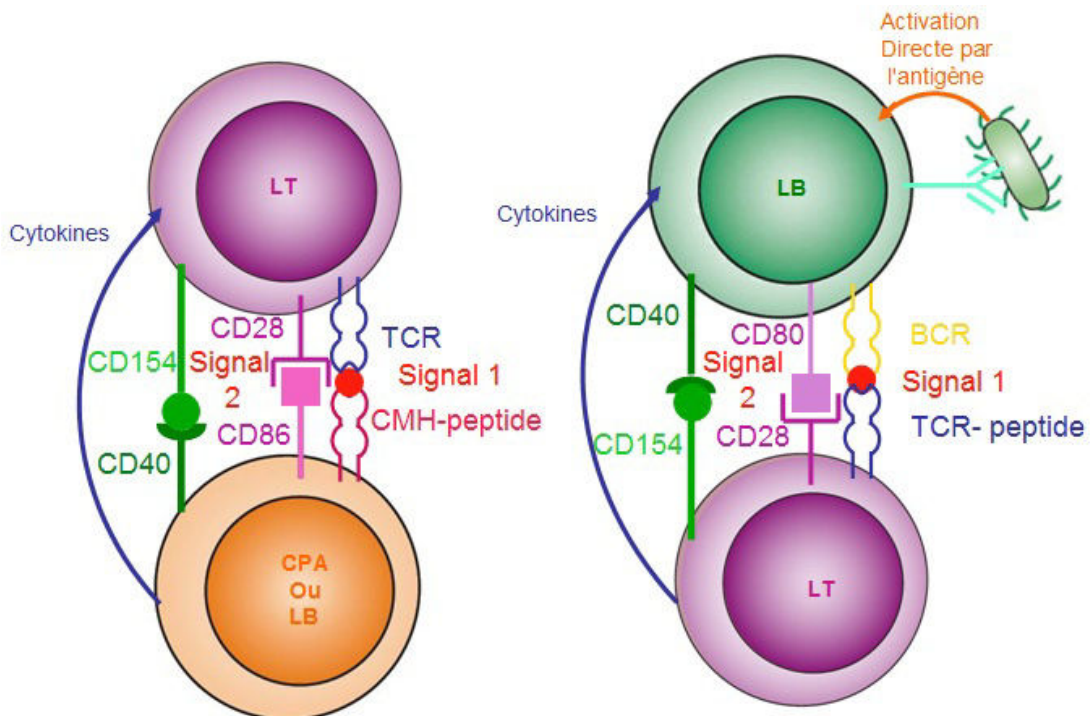


## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps



**Figure 40 : Apprêtement des antigènes et expression à la surface cellulaire après association aux molécules du CMH.**

La voie classique du CMH-II est représentée par des flèches rouges et la voie classique du CMH-I est représentée par des flèches mauves. Dans de rares cas, des peptides issus de la dégradation des pathogènes endocytés peuvent être exprimés par le CMH-I.



**Figure 41 : Présentation de l'antigène et activation des lymphocytes.**

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) vont pouvoir activer les cellules T *via* le CMH (signal 1) et les co-récepteurs (signal 2). Les lymphocytes T (LT) vont alors pouvoir activer les lymphocytes B (LB). Les lymphocytes B peuvent aussi être activés directement par les pathogènes grâce aux anticorps exprimés à leur surface.

### 2.4.2) Localisation des épitopes T

Plusieurs sociétés proposent des solutions informatiques (comme EPIVax: <http://www.ePIVax.com/>) qui permettent de détecter la présence d'épitopes potentiels dans une protéine, et ainsi de prédire une éventuelle immunogénicité avant de commencer tout essai clinique. (De Groot *et al.*, 2006; Tsurui & Takahashi, 2007) Ces techniques bioinformatiques consistent souvent en un découpage virtuel de la séquence de la protéine en peptides chevauchants d'une dizaine d'acides aminés. Ces courts peptides sont alors alignés avec le génome humain afin de déterminer s'ils sont codés par le génome humain. (Nielsen *et al.*, 2008; Nielsen, Lundegaard, & Lund, 2007) Dans le cas où aucune correspondance n'est détectée, l'organisme détectera cette séquence comme non-Soi et pourra développer une réponse anticorps dirigé contre cet épitope. A l'inverse, dans le cas où une telle correspondance est observée, l'organisme considérera cette séquence comme appartenant au Soi immunologique, et le système immunitaire ne développera pas une réponse immunitaire dirigée contre elle. D'autres outils permettent une prédiction en comparant la séquence de la protéine à analyser avec une banque d'épitopes T dont l'affinité pour le CMH est connue. (Lata, Bhasin, & Raghava, 2009) Si la protéine comporte une séquence correspondant à un peptide dont l'affinité pour le CMH est élevée, elle sera probablement reconnue par les lymphocytes T. D'autres sociétés comme Antitope (<http://www.antitope.co.uk/>) proposent des outils pour détecter *ex vivo* la présence d'épitopes T. Pour cela des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, issus de donneurs n'ayant généralement pas été en contact avec la protéine à tester, sont incubés avec différents peptides chevauchants représentant la protéine. L'observation de la multiplication des lymphocytes permet de détecter leur activation, qui correspond à la présence d'un ou plusieurs épitopes sur le peptide testé. (Knapp *et al.*, 2009)

Lorsqu'un épitope T est localisé, il est possible de le supprimer en mutant sa séquence ("dé-immunisation"), afin de diminuer son immunogénicité, mais ce processus peut altérer la conformation et la fonction de la protéine.

### 2.4.3) Localisation de l'épitope d'un anticorps

Il est souvent nécessaire de localiser l'épitope d'un anticorps sur son antigène, afin de pouvoir le breveter par exemple, ou pour déterminer quelle région de l'antigène porte des fonctions inhibées par un anticorps donné. Pour cela, plusieurs techniques ont été

## *Partie 2 : Biotechnologie des anticorps*

développées, et elles nécessitent généralement de pouvoir purifier l'antigène ou de pouvoir l'exprimer sous forme recombinante. (Ladner, 2007) Les épitopes linéaires sont formés par une séquence continue d'acides aminés, bien que dans certains cas il est possible que certains acides aminés de cette séquence n'interviennent pas directement dans l'interaction avec l'anticorps (épitopes linéaires discontinus). Un épitope conformationnel est formé par des acides aminés qui sont éloignés dans la structure primaire, mais que le repliement a rapproché dans la structure tertiaire. L'une des premières étapes pour localiser un épitope consiste à déterminer si l'anticorps reconnaît un épitope linéaire ou conformationnel, en réalisant un western-blot en conditions dénaturantes, par exemple. Dans ce cas, si une interaction avec la protéine dénaturée est observée, cela signifie que l'épitope est linéaire.

### **2.4.3.1) Localisation des épitopes linéaires**

Une des techniques principales de localisation d'épitopes linéaires consiste à synthétiser des peptides recombinants chevauchants, de tailles variables, recouvrant la totalité de la séquence protéique de l'antigène cible (technique "*pepscan*"). (Z. Wang & Laursen, 1992; Yermakova, Vance, & Mantis, 2012) Des techniques d'immuno-transfert comme le western-blot permettent alors de mettre en évidence si un ou plusieurs de ces peptides interagissent avec l'anticorps. Lorsque l'anticorps interagit avec un des peptides, il est possible de cliver ou de re-synthétiser ce peptide en fragments plus petits afin de localiser plus précisément l'épitope. Une technique similaire consiste à réaliser un ELISA de compétition, où chaque peptide chevauchant est incubé séparément avec l'anticorps. (Geysen, Meloen, & Barteling, 1984; Yermakova *et al.*, 2012) Les anticorps pré-incubés avec les peptides sont ensuite incubés dans les puits d'une plaque ELISA sur laquelle l'antigène est adsorbé. Les peptides ayant interagi avec l'anticorps entreront en compétition pour la fixation avec l'antigène. Les peptides dont l'affinité pour l'anticorps est élevée bloquent l'interaction anticorps-antigène et les anticorps préincubés ne donneront pas de signal dans cet ELISA, indiquant que le peptide comporte l'épitope de l'anticorps.

Les épitopes linéaires peuvent aussi être localisés par spectroscopie de masse. (Suckau *et al.*, 1990; Y. Zhao *et al.*, 1996) Dans un premier temps, l'antigène est soumis à une digestion ménagée par une enzyme protéolytique afin de générer différents fragments. Ces peptides sont ensuite incubés avec l'anticorps, et les peptides contenant l'épitope sont immunoprécipités, avant d'être finalement caractérisés en spectroscopie de masse par

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

désorption laser (*Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry*, MALDI-MS). (Y. Zhao *et al.*, 1996) L'analyse du profil du peptide fixé par l'anticorps permet de déterminer la séquence l'épitope. Cette technique présente l'avantage d'être réalisable en quelques heures et de pouvoir être appliquée aux anticorps de faible affinité ( $10^{-6}$  M). La spectroscopie de masse couplée à l'échange d'hydrogène par le deutérium (*Hydrogen Deuterium eXchange Mass-Spectrometry*, HDX-MS) permet aussi la localisation d'épitope. (Malito *et al.*, 2013) Cette technique est basée sur le taux d'adsorption différentielle du deutérium ( $^2\text{H}$ ) dans un peptide, selon qu'il soit fixé ou non à un anticorps. Les molécules d'hydrogènes contenus dans les acides aminés n'interagissant pas avec l'anticorps seront plus fréquemment remplacées par le deutérium, ce qui augmentera la masse molaire de ces acides aminés. Les peptides dont la masse molaire n'augmente pas après incubation avec le deutérium sont donc ceux contenant l'épitope.

Les techniques d'exposition de peptides à la surface de particules, dont la technique d'exposition à la surface des phages, peuvent aussi être utilisées pour localiser l'épitope d'un anticorps et cette utilisation est même à l'origine de la technologie des phages. (E. P. Hudson, Uhlen, & Rockberg, 2012; Yermakova *et al.*, 2012; M. Zhou *et al.*, 2013) Pour cela, une banque de peptides construite par clonage de fragments du gène codant l'antigène, ou par clivage de peptides aléatoires peut être générée puis criblée sur l'antigène. Après plusieurs cycles de criblage, l'ADN codant les peptides élusés est séquencé. Seule la séquence correspondant à l'épitope, ou une séquence similaire présentant les mêmes propriétés physico-chimiques, sera sélectionnée durant le criblage. Dans le cas où plusieurs séquences sont identifiées, il est nécessaire de les aligner pour rechercher une séquence consensus puis d'aligner cette séquence consensus sur celle de l'antigène. La séquence de l'antigène dont les acides aminés possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques que ceux de la séquence consensus est alors localisée et représente en théorie l'épitope de l'anticorps. Cette technique nécessite néanmoins de disposer d'un anticorps d'affinité élevé afin de pouvoir effectuer plusieurs cycles de criblage afin d'éliminer les peptides interagissant faiblement avec l'anticorps, sans éliminer le peptide comportant l'épitope. Après avoir déterminé le plus petit peptide formant l'épitope, par l'une de ces techniques, des expériences de compétition doivent être réalisées pour confirmer qu'il s'agit bien de l'épitope.

### 2.4.3.2) Localisation des épitopes conformationnels

Il existe différentes techniques de localisation d'épitopes conformationnels, et actuellement la technique considérée comme la plus précise repose sur la cristallographie par rayons X du complexe anticorps-antigène. (Gurda *et al.*, 2012; Malito *et al.*, 2013) Les structures cristallines permettent une cartographie à l'échelle atomique des complexes, et donc la visualisation directe des acides aminés interagissant avec l'anticorps. Cependant cette technique est plus difficile à mettre en place, et elle ne peut être effectuée que dans le cas où l'antigène est co-cristallisable, ce qui exclut en particulier une grande partie des antigènes membranaires.

Dans le cas où il n'est pas possible d'obtenir des cristaux, des expériences de mutagenèse dirigée en alanine peuvent être utilisées. Ces deux techniques reposent sur la mutation en alanine de certains acides aminés de la protéine. L'alanine est un acide aminé dit "inerte" car sa chaîne latérale est limitée à un groupement CH<sub>3</sub> non chargé, qui n'intervient qu'exceptionnellement dans l'établissement d'une interaction entre deux protéines. Le remplacement d'un acide aminé par une alanine permet donc de perturber l'interaction antigène/anticorps si cet acide aminé est effectivement impliqué dans l'interaction. L'*alanine shaving* consiste à muter en alanine tous les acides aminés d'une région de cinq à 12 résidus et cette technique est appliquée à tout ou partie de la protéine pour générer plusieurs variants. Si l'affinité de l'un de ces variants est plus faible que l'affinité de la protéine non mutée, cela signifie qu'une partie des acides aminés qui ont été mutés en alanine forme l'épitope, et l'*alanine scanning* va alors permettre de localiser très précisément ces acides aminés. En effet, l'*alanine scanning* consiste à ne muter en alanine qu'un seul acide aminé par variant pour déterminer si cet acide aminé fait partie de l'épitope, car dans ce cas l'affinité du variant sera dégradée. Cette technique est appliquée uniquement aux acides aminés identifiés en *alanine shaving*, pour limiter le nombre de variants à produire. Finalement, un variant final est synthétisé dans lequel tous les acides aminés épitopiques identifiés par *alanine scanning* sont mutés en alanine. L'absence d'interaction entre l'anticorps et ce variant permet de confirmer la localisation d'épitope. On peut noter que la glycine est un acide aminé dont la chaîne latérale est réduite à son minimum puisqu'elle n'est formée que par un atome d'hydrogène, ce qui limite encore plus l'établissement d'interaction. Cependant les mutations en glycines peuvent conférer une grande flexibilité à la protéine, modifiant sa structure et donc l'établissement d'interaction avec l'anticorps, indépendamment du rôle de l'acide aminé muté. Les mutations en glycine ne sont donc pas utilisées pour localiser des épitopes.

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

Les techniques de spectroscopie de masse peuvent aussi être appliquées à la localisation d'épitopes conformationnels. (Pandit *et al.*, 2012; Q. Zhang *et al.*, 2011) Cependant il est souvent nécessaire que les peptides représentant l'antigène aient une conformation identique à celle rencontrée dans la protéine native, et donc les peptides synthétisés doivent être d'une taille suffisante pour en permettre leur repliement. Cependant, le repliement d'une protéine implique parfois des résidus très éloignés dans la séquence primaire, qui ne sont donc pas retrouvés dans le peptide synthétisé, donc il persiste toujours un risque que le peptide prenne une conformation différente de la conformation rencontrée dans le contexte de la protéine. De façon alternative, il est possible d'incuber l'antigène natif avec l'anticorps puis d'effectuer une digestion enzymatique pour dégrader l'intégralité de l'antigène à l'exception de sa partie interagissant avec l'anticorps ("*protection-mapping*"). Après dissociation de la partie de la protéine qui était fixée à l'anticorps, il est possible de la caractériser par spectroscopie de masse (<sup>252</sup>Cf *Plasma Desorption Mass Spectrometry*, PDMS), pour analyser le profil de ce fragment. (Suckau *et al.*, 1990) Néanmoins cette technique nécessite d'utiliser une protéase spécifique de l'antigène, ne dégradant pas l'anticorps, et de connaître la séquence de l'antigène afin de pouvoir prédire la masse moléculaire de l'ensemble des peptides. Un autre inconvénient de cette technique est qu'elle détecte l'ensemble de la région interagissant avec l'anticorps, or dans un épitope conformationnel tous les acides aminés d'une séquence linéaire n'interviennent pas directement dans l'interaction. Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des techniques de mutagenèse dirigée, de type mutation ponctuelle en alanine, pour détecter précisément les acides aminés formant l'épitope dans le peptide identifié.

La résonance magnétique nucléaire par *Saturation Transfer Difference* est fondée sur la différence de mobilité des acides aminés impliqués ou non dans l'interaction avec l'antigène. (Mayer & Meyer, 2001; Rosen & Anglister, 2009) En identifiant en résonance magnétique nucléaire les acides aminés dont la mobilité est très inférieure aux autres, il est possible de localiser l'épitope.

### 2.4.3.3) Compétition pour un même épitope

Plusieurs anticorps ne peuvent produire un effet synergique que s'ils ne ciblent des épitopes différents. (Adekar, Takahashi, *et al.*, 2008; Nowakowski *et al.*, 2002) Afin de déterminer si deux anticorps ciblent un même épitope, sans même avoir à connaître



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

précisément leurs épitopes, il est possible d'effectuer des expériences de compétition en résonance plasmonique de surface, par exemple. Dans ce cas l'antigène est immobilisé, puis le premier anticorps est apporté en flux jusqu'à saturation des épitopes. Un second anticorps est alors apporté en flux, et il ne peut interagir que s'il n'entre pas en compétition avec le premier anticorps déjà fixé sur l'antigène. Cette étude peut aussi être réalisée en ELISA en compétition. Généralement, l'antigène est adsorbé sur une plaque ELISA, puis le premier anticorps est incubé. Après des étapes de lavage, le second anticorps, préalablement biotinylé, est incubé. Après de nouvelles étapes de lavages, des molécules de streptavidine conjuguées à la peroxydase, par exemple, sont incubées. Après incubation du substrat la détection d'un signal signifie que le second anticorps a pu se fixer, et donc que les deux anticorps n'entrent pas en compétition. Il est alors judicieux de rechercher une synergie entre les effets de ces anticorps.

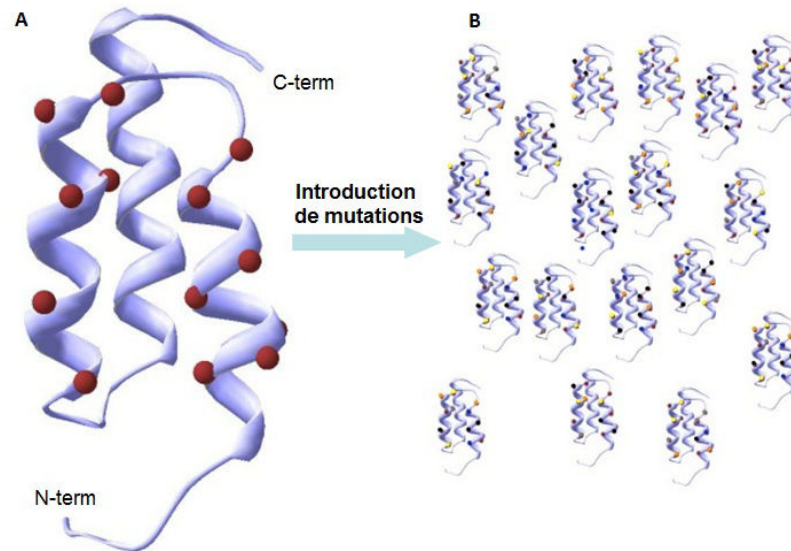
### 2.5) Ingénierie des anticorps

#### 2.5.1) Les protéines similaires aux anticorps humains

Il existe des protéines humaines ou animales qui peuvent se lier aux "antigènes" selon des mécanismes similaires aux anticorps, et dont il est possible de tirer parti pour développer des molécules à visé thérapeutique. Les Affibody<sup>®</sup> (Affibody AB, <http://www.affibody.com/>, Solna, Suède) sont des peptides d'environ 6 kDa dont la structure a été développée en s'inspirant de celle du domaine Z de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, qui est formé de trois hélices alpha, et qui est dépourvu de ponts disulfures (Figure 42). Ces peptides sont dépourvus de fonction effectrice mais l'un de leurs grands avantages est qu'ils peuvent être produits efficacement par expression recombinante dans des cellules bactériennes, ou alors par synthèse chimique. (Feldwisch & Tolmachev, 2012; Nygren, 2008) Des banques de  $10^7$  à  $10^9$  Affibody<sup>®</sup> peuvent être développées en introduisant aléatoirement des mutations au niveau des 13 résidus exposés au solvant. Néanmoins, contrairement aux anticorps qui subissent un processus de sélection et de maturation d'affinité, les Affibody<sup>®</sup> ne présentent généralement qu'une affinité faible ( $10^{-6}$  M) et nécessitent donc des étapes de maturation d'affinité, en introduisant de nouvelles mutations au niveau de ces résidus clés. Avec un tel processus, Gunneriusson *et al* (Gunneriusson, Nord, Uhlén, & Nygren, 1999) ont pu améliorer l'affinité d'un Affibody<sup>®</sup> dirigé contre la *Taq DNA Polymerase*, de 370 à 8 nM. Plusieurs travaux récents semblent démontrer l'avenir prometteur de ces peptides en imagerie médicale,

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

voire en thérapie, bien que leur origine non-humaine laisse craindre une forte immunogénicité. (Ekerljung, Lennartsson, & Gedda, 2012; Honarvar *et al.*, 2013; Lindgren *et al.*, 2013; Orlova *et al.*, 2013)



**Figure 42 : Les Affibody®.**

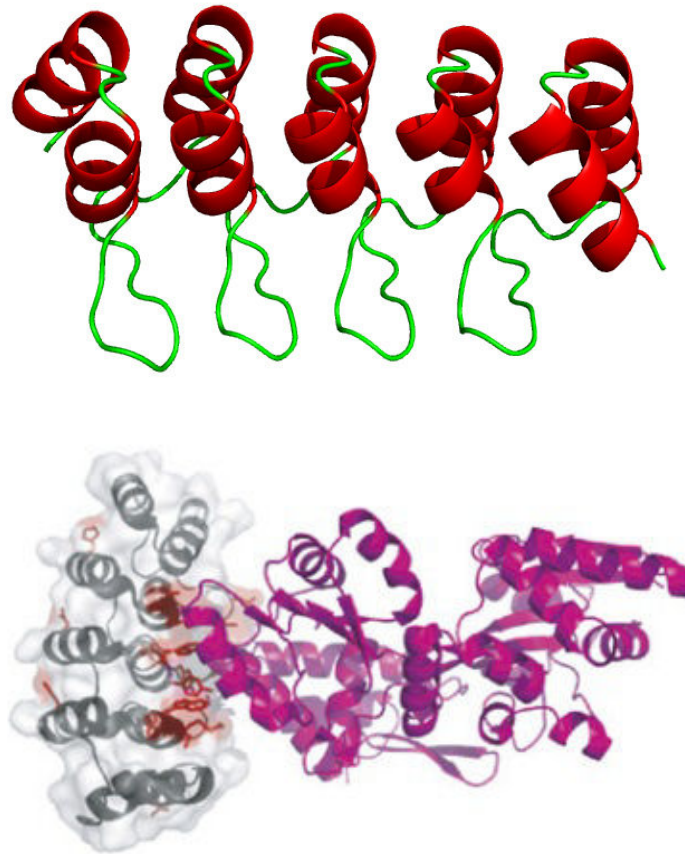
**A)** Structure schématique d'un Affibody®. Les sphères rouges représentent les 13 acides aminés exposés au solvant. **B)** L'introduction de mutations au niveau de ces 13 résidus permet de générer une banque d'Affibody®. (Feldwisch, 2012)

Les DARPin (*Designed Ankyrin-Repeat Protein*) sont des protéines, formées de l'association de plusieurs ankyrines (Figure 43). (Stumpp & Amstutz, 2007) Les ankyrines sont des protéines membranaires de 33 acides aminés (environ 4 kDa) très représentées dans l'organisme (en particulier dans les erythrocytes), et qui sont impliquées dans la liaison de protéines au cytosquelette. (Curran & Mohler, 2011) Chaque ankyrine comportant sept acides aminés variables, les banques formées par des DARPin composés d'une seule ankyrine présentent une diversité supérieure à  $10^7$ . (Stumpp, Binz, & Amstutz, 2008) Ces banques sont généralement criblées par les techniques d'exposition à la surface des phages ou des ribosomes. (Kummer *et al.*, 2012; Tamaskovic, Simon, Stefan, Schwill, & Plückthun, 2012) Zahnd *et al* (Zahnd, Pecorari, Straumann, Wyler, & Plückthun, 2006) ont ainsi isolé des DARPin dirigé contre Her2 dont la meilleure affinité est de 7,3 nM. Par la suite, des mutations ont été introduites aléatoirement dans ces DARPin par *error prone PCR*. Le criblage de cette nouvelle banque par la technique d'exposition à la surface des ribosomes a permis l'isolement d'un DARPin comportant quatre mutations, et dont l'affinité est de 90 pM.



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

(Zahnd *et al.*, 2007) Comme les DARPin sont présentes abondamment dans l'organisme, une faible immunogénicité peut être espérée. Deux DARPin dirigées contre le VEGF sont d'ailleurs actuellement en phase I/II d'essais clinique et semblent présenter une très bonne tolérance. (Tamaskovic *et al.*, 2012)



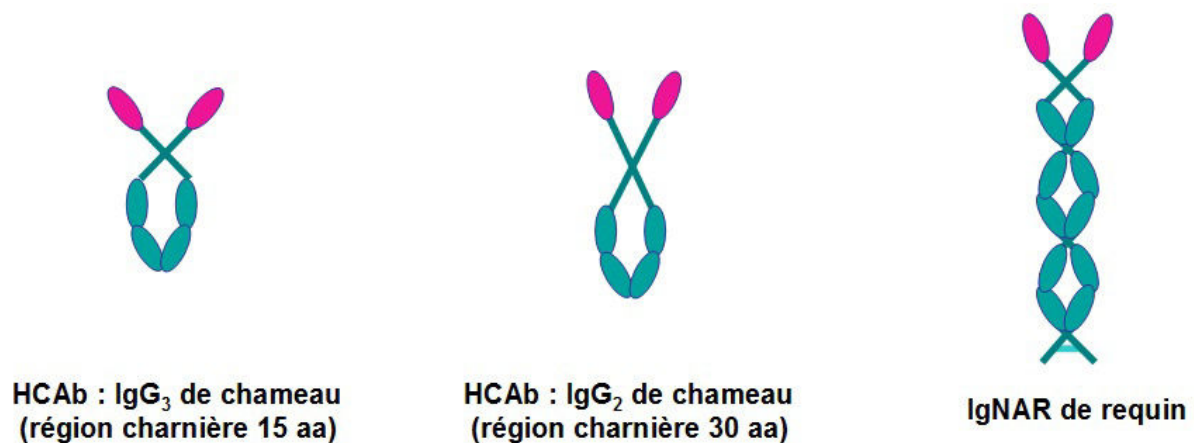
**Figure 43 : Les DARPins.**

**Haut)** Représentation d'un DARPin composé de cinq ankyrines. **Bas)** Représentation d'un DARPin (gris) en interaction avec la *Mannose Binding Protein* (MBP, représentée en violet). (Stumpp *et al.*, 2008)

Des études sur les systèmes immunitaires animaux ont aussi permis de découvrir des anticorps dont la structure est différente des anticorps humains (Figure 44). En effet, en plus d'un répertoire IgG<sub>1</sub> conventionnel, les camélidés possèdent une famille d'anticorps de 95 kDa dépourvue de chaîne légère, et appelée HCAb (*Heavy Chain Antibody*). Les chaînes lourdes, associées en homodimères, sont formées de deux régions constantes (CH2 et CH3) et d'un domaine variable de 15 kDa appelé VHH. L'interaction avec l'antigène se fait donc au niveau du domaine variable de l'une ou l'autre des chaînes lourdes. (Hamers-Casterman *et al.*, 1993) Deux types d'HCAb ont été décrits, l'un possède une région charnière de 15 acides aminés et l'autre une région charnière de 30 acides aminés. Le domaine variable de ces anticorps, appelé

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

VHH, est commercialisé sous différents noms tel que Nanobodies™ (Ablynx, Gent, Belgique). (Muyldermans, 2001) De tels fragments peuvent interagir avec l'antigène grâce à leurs CDR, et sont stables même en l'absence de peptides de liaison contrairement aux scFvs. Les anticorps de camélidés peuvent être produits avec un très bon rendement dans *S. cerevisiae*, et présentent une stabilité et une solubilité remarquables. (Harmsen & De Haard, 2007) Les anticorps de requins ont eux aussi une structure particulière (Figure 44). Il s'agit de molécules homodimériques d'environ 160 à 200 kDa appelées Ig<sub>NAR</sub> (*Immunoglobulin New Antigen Receptor*). (A. S. Greenberg *et al.*, 1995; Streltsov, Carmichael, & Nuttall, 2005) Ils sont formés d'un domaine variable monocaténaire d'environ 13 kDa associé à cinq régions constantes par une courte région charnière de cinq acides aminés. Les Ig<sub>NAR</sub> disposent de CDR3 dont la taille peut atteindre 34 résidus. (Dooley & Flajnik, 2006) Cependant, comme ces anticorps sont d'origine animale, ils peuvent être immunogènes lors d'une utilisation thérapeutique chez l'Homme.



**Figure 44 : Les anticorps de camélidés (HCAb) et de requins (IgNAR).**

Les domaines variables sont représentés en rose et les régions constantes sont représentées en bleu.

### 2.5.2) Biodistribution des fragments d'anticorps

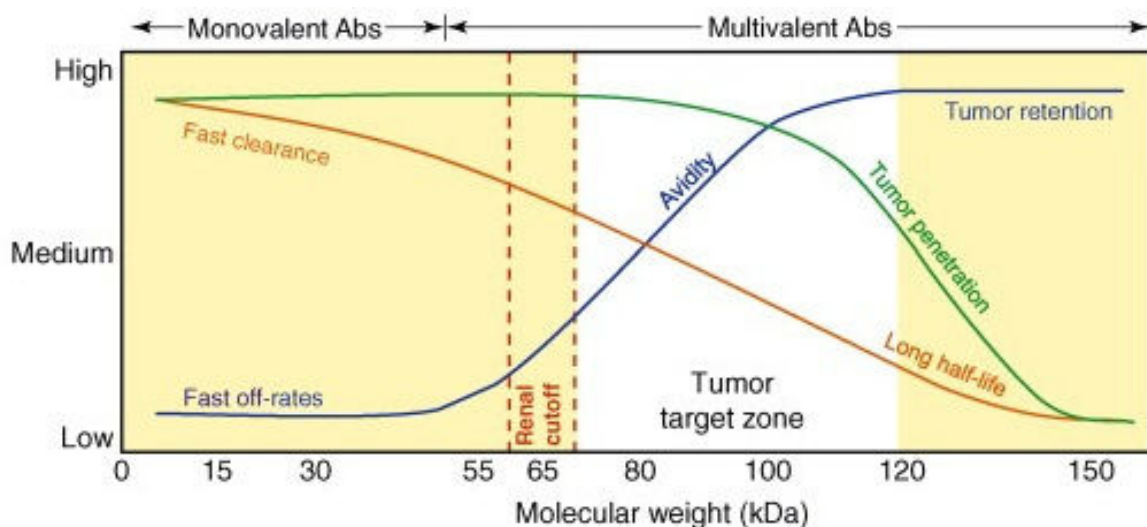
La biodistribution est un paramètre qui conditionne l'accès des anticorps à leur cible thérapeutique, et qui peut aussi influencer leurs effets secondaires et les doses à injecter. L'optimisation de la biodistribution est importante dans le traitement des cancers, en particulier, pour s'assurer que l'anticorps puisse atteindre voire pénétrer les tumeurs solides. La biodistribution est influencée par différents paramètres comme par exemple la taille de

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

l'anticorps, son affinité, son avidité, sa demi-vie, la location de la cible (soluble ou dans un tissu) ou encore la pression hydrostatique régnant dans le tissu.

### 2.5.2.1) Influence du masse moléculaire sur la biodistribution

Il est généralement considéré que les fragments d'anticorps de faible masse moléculaire pénètrent facilement dans les tumeurs mais sont rapidement éliminés par le rein, qui filtre les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 60 kDa, alors que les immunoglobulines entières présentent une longue demi-vie et une affinité optimale mais ne diffusent que difficilement dans les tumeurs solides. D'après la littérature il semblerait que les fragments d'anticorps dont la masse moléculaire est comprise entre 70 et 120 kDa pénètrent dans les tissus plus efficacement que les IgG entières (Figure 45). (Cuesta, Sainz-Pastor, Bonet, Oliva, & Alvarez-Vallina, 2010; Thurber & Wittrup, 2008) Selon Schmidt *et al* (M. M. Schmidt & Wittrup, 2009), la pénétration optimale des tumeurs solides serait obtenue avec des molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 12 kDa ou supérieur à 75 kDa. Cependant le temps de rétention des fragments d'anticorps dont la masse moléculaire est inférieure à 12 kDa est plus faible, et leur usage nécessite qu'ils présentent des affinités subnanomolaires. Les molécules dont la masse moléculaires est d'environ 25 kDa présentent la plus faible pénétration dans les tumeurs solides, probablement par élimination rapide de la circulation, excluant l'utilisation de scFv ou Fab pour le traitement des tumeurs solides.



**Figure 45 : Influence de l'affinité et de la masse moléculaire des anticorps sur la pénétration tumorale.** Selon ce modèle proposé par Cuesta *et al* (Cuesta *et al.*, 2010), la pénétration tumorale est optimale pour les fragments dont la masse moléculaire est compris entre 70 et 120 kDa.

### 2.5.2.2) Approches permettant le ciblage du compartiment intracellulaire

L'utilisation des *intrabodies* est une forme de thérapie génique consistant à transformer l'ADN codant un fragment d'anticorps (le plus souvent au format scFv) dans des cellules, afin que la machinerie enzymatique cellulaire synthétise elle-même l'anticorps. L'introduction de l'ADN peut se faire soit par transfection soit par infection, en utilisant des virus comme vecteur. (Lobato & Rabbitts, 2004; Moutel, Nizak, & Perez, 2012; Chun Zhou & Przedborski, 2009) Les *intrabodies* ont été développés dès 1988 dans le but de cibler des protéines intracellulaires (Carlson, 1988), et peuvent ainsi apparaître comme une alternative à l'ARN interférence mais ils agissent au niveau post-traductionnel. (Cao & Heng, 2005) Les *intrabodies* peuvent être utilisés soit en thérapie, pour neutraliser une protéine intracellulaire (C. Zhang *et al.*, 2012; Chun Zhou & Przedborski, 2009), soit en imagerie dynamique, s'ils ne déstabilisent pas leur protéine cible (Rinaldi *et al.*, 2013). Zhang *et al* (C. Zhang *et al.*, 2012) ont ainsi isolé des scFv d'affinités nanomolaires, empêchant le transport à la membrane de la protéine p75NTR (*p75 NeuTrophin Receptor*). La transfection transitoire de cellules avec l'ADN codant ces scFv a permis de diminuer de 56 % l'expression membranaire de p75NTR.

Une des principales limites à l'utilisation des *intrabodies* est inhérente aux conditions réductrices du cytoplasme, qui ne permettent pas d'établir des ponts disulfures, perturbant donc la stabilité des fragments d'anticorps. Il peut alors être nécessaire d'introduire des mutations dans la séquence codant les fragments d'*intrabodies* afin d'améliorer leur stabilité. (Wirtz & Steipe, 1999) Il est aussi possible d'utiliser un fragment d'anticorps dont l'isolement a été fait dans un système intracellulaire, ce qui permet de s'assurer de sa stabilité cytoplasmique. (Visintin, Tse, Axelson, Rabbitts, & Cattaneo, 1999)

Afin de s'affranchir de certaines contraintes propres aux *intrabodies*, les *transbodies* ont été développés. A l'inverse des *intrabodies*, les *transbodies* sont produits par expression recombinante *in vitro*, ce qui permet de synthétiser les anticorps avant internalisation, et donc de s'affranchir des problèmes de stabilité inhérents à la production intracellulaire des *intrabodies*. Cette stratégie consiste à fusionner un scFv au domaine de transduction d'une protéine, qui est généralement un court peptide chargé positivement, permettant à ces protéines d'être internalisées dans le cytosol. (Heng & Cao, 2005) Les mécanismes de cette internalisation ne sont pas encore élucidés mais il semble indépendant des voies d'excrétion et d'internalisation conventionnelles. (Joliot & Prochiantz, 2004; Y.-S. Y.-R. Kim *et al.*, 2006) Il semblerait que ces peptides, comme la protéine TAT (*Trans-Activator of Transduction*) du

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

virus HIV, interagissent avec des glycosaminoglycanes exprimés à la surface cellulaire et chargés négativement, comme le sulfate d'héparane ou le sulfate de chondroïtine, avant d'être internalisés. (Gump & Dowdy, 2007) Peu de travaux sur les *transbodies* ont été publiés. Pongpair *et al* (Pongpair *et al.*, 2010) ont conjugué un scFv dirigé contre la protéine M1 du virus influenza A avec la pénétrine, qui constitue alors un domaine de transduction. Cette protéine de 16 acides aminés issue de la drosophile, permet à l'anticorps de pénétrer dans les cellules mammifères MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*), ce qui perturbe la réplication du virus sans affecter la viabilité cellulaire. Des analyses en microscopie confocale ont mis en évidence l'accumulation de ce scFv dans le cytoplasme, confirmant la capacité du scFv-pénétrine à franchir la membrane plasmique. Cependant, il a été constaté qu'il s'accumulait préférentiellement sous la membrane plasmique, probablement en interagissant avec les phospholipides membranaires chargés négativement, ce qui constitue une limite à cette approche.

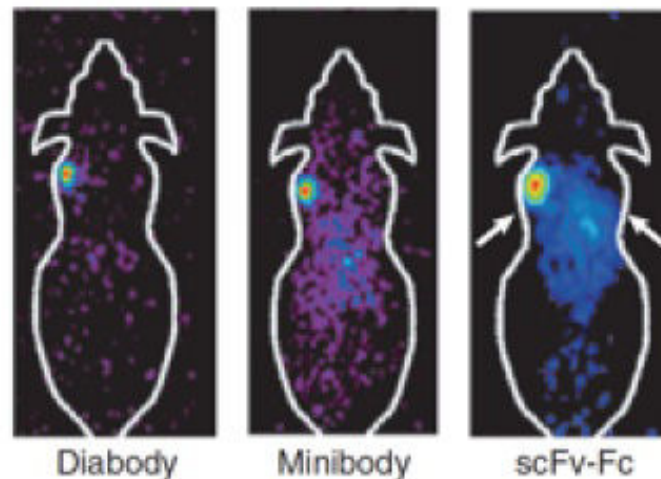
Certains anticorps dirigés contre des fragments d'ADN présentent des CDR contenant un nombre inhabituellement élevé d'acides aminés basiques. Aux pH physiologiques, leur charge positive leur permet d'interagir avec la membrane plasmique des cellules et d'être internalisés de façon non spécifique, lors des mécanismes d'endocytose et de recyclage des protéines membranaires. Le scFv 3D8, isolé par Kim *et al*, interagit avec des fragments d'ADN de séquences aspécifiques et il peut être internalisé dans des cellules HeLa par endocytose médiée par les cavéoles. (Jang *et al.*, 2009; A. Kim *et al.*, 2012; Y.-S. Y.-R. Kim *et al.*, 2006) Il a été envisagée d'utiliser ce scFv comme vecteur pour l'internalisation de molécules synthétiques.

### 2.5.2.3) Application de la biodistribution à l'imagerie

La biodistribution des fragments d'anticorps est aussi cruciale en imagerie médicale. Les *diabodies* peuvent pénétrer de façon optimale jusqu'au centre des organes ou des tumeurs, et sont éliminés rapidement par l'organisme. Ils représentent donc des vecteurs de qualité en imagerie, puisqu'ils permettent de limiter l'exposition des organes sains aux radiations, une fois l'acte d'imagerie médicale terminée. Olsafen *et al* ont mis en évidence qu'un *diabodie* dirigé contre la protéine HER2 conjugué à un radio-marqueur (le N-succinimidyl-4-[(18)F]fluorobenzoate) permettait de détecter les tumeurs HER2 positives par microPET (*micro Positron Emission Tomography*) en seulement 1 à 4 heures après injection, ce qui

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

permet un diagnostic en un seul jour d'hospitalisation (Figure 46). (Olafsen, Sirk, Olma, Shen, & Wu, 2012; Vaidyanathan & Zalutsky, 2006) Les fragments d'anticorps de taille plus importante, comme les F(ab')<sub>2</sub> ou les scFv-Fc, s'accumulent plus fortement dans les tumeurs, permettant d'obtenir un signal plus important en imagerie. Cependant ils persistent plus longtemps dans l'organisme, ce qui n'est pas favorable à leur tolérance s'ils sont conjugués à des molécules toxiques. (Philipp Holliger & Hudson, 2005)



**Figure 46 : Comparaison des résultats obtenus en imagerie PET-scan réalisée avec des diabody, minibody et scFv-Fc.**

Ces trois fragments d'anticorps conjugué à <sup>124</sup>I sont dirigés contre le CEA (CarconoEmbryonic Antigen). Ces trois fragments présentent 18 heures après injection une localisation tumorale. Néanmoins, compte tenu de leur élimination plus rapide, les *diabodies* fournissent une meilleure résolution. D'après Holliger *et al.* (Philipp Holliger & Hudson, 2005)

### 2.5.3) Maturation d'affinité

Les anticorps ne présentent pas toujours une affinité suffisante pour un usage thérapeutique, en particulier s'ils sont issus d'une banque naïve car ils n'ont pas subi le processus naturel de maturation d'affinité. (Peter Amersdorfer *et al.*, 2002; Rothe *et al.*, 2008) Il est donc parfois nécessaire d'améliorer l'affinité d'un anticorps pour un antigène par un processus de maturation d'affinité *in vitro*. Cette amélioration permet en particulier de réduire les doses à injecter, ce qui optimise ainsi la tolérance clinique et diminue le coût du traitement. (Adams, Schier, Marshall, *et al.*, 1998)

Le *light chain shuffling* est l'une des plus anciennes techniques de maturation d'affinité *in vitro*. Cette méthode est basée sur l'observation que l'interaction avec l'antigène implique majoritairement la chaîne lourde d'un anticorps. Dans cette approche, la chaîne lourde d'un



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

anticorps donné est combinée avec des chaînes légères différentes pour créer une banque de variants qui sera ensuite criblée. (Lou *et al.*, 2010; Ohlin, Owman, Mach, & Borrebaeck, 1996; Rojas *et al.*, 2004) Cette technique a par exemple été appliquée avec succès par Lou *et al.* (Lou *et al.*, 2010) pour isoler des variants dont l'affinité pour les toxines BoNT/A et B sont jusqu'à 77 fois supérieures à celles des Fab parentaux, permettant par exemple l'isolement du Fab B11E8 dont l'affinité pour la BoNT/B<sub>1</sub> est de 34 pM. Une des variantes est le *DNA shuffling* qui consiste à réassembler aléatoirement l'ADN codant les chaînes lourdes et légères des clones isolés après un criblage, afin de créer de nouvelles associations. (Stemmer, 1994a)

D'autres techniques de maturation d'affinité *in vitro*, basées sur l'introduction de mutations, ont été mises au point. Deux catégories distinctes peuvent être décrites : les méthodes introduisant aléatoirement des mutations dans le domaine variable et les méthodes utilisant la mutagenèse dirigée.

La technique de mutagenèse aléatoire est basée sur l'introduction d'un nombre aléatoire de mutations dans le domaine variable de l'anticorps. (P. C. Cirino, Mayer, & Umeno, 2003) Ce processus repose sur l'utilisation d'une DNA polymérase de faible fidélité (*error-prone*) comme *Thermus aquaticus* ou un mutant de *Pyrococcus furiosus*, qui fait des erreurs lors de la réplication de l'ADN avec une fréquence supérieure à la normale. Toutefois, cette fréquence est spontanément trop faible pour introduire suffisamment de mutations pour améliorer l'affinité. Cette fréquence d'erreur peut être accrue en modifiant différents paramètres de la PCR tels que le rapport molaire des différents nucléotides, le remplacement du tampon Mn<sup>2+</sup> par un tampon Mg<sup>2+</sup>, où encore en ajoutant dans le mélange réactionnel des nucléotides triphosphates analogues non naturels. (Neylon, 2004) Le taux de mutation peut alors varier d'une mutation pour 1 000 nucléotides, dans le cas où le tampon et le rapport des nucléotides sont changés, à une mutation pour cinq nucléotides si des nucléotides non naturels sont ajoutés. (Zaccolo, Williams, Brown, & Gherardi, 1996) Les ADN ainsi modifiés servent à la construction d'une banque de variants d'anticorps, qui est ensuite criblée. Il a été mis en évidence une corrélation positive entre le nombre de mutations introduites et l'affinité, et les mutations affectant les CDR sont celles qui ont le plus grand impact sur l'affinité. (Ramirez-Benitez & Almagro, 2001; Tomlinson *et al.*, 1996; Tonegawa, 1983) Des cycles successifs de mutagenèse et de criblage des banques peuvent être réalisés afin d'augmenter à chaque cycle l'affinité des clones isolés. Cependant, il est intéressant de noter que dans certains cas, les mutations les plus éloignées des sites de fixation de l'antigène peuvent aussi augmenter l'affinité, probablement en modifiant la conformation des domaines variables de l'anticorps. (Daugherty, Chen, Iverson, & Georgiou, 2000) La technique de mutagenèse aléatoire a permis



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

notamment d'isoler le DARPin H10-2-G3, dirigé contre Her2, dont l'affinité (90 pM) est 3 000 fois supérieure à celle du clone originel. (Zahnd *et al.*, 2007)

Pour muter l'ADN de façon aléatoire, il est aussi possible de d'utiliser des souches bactériennes mutantes qui introduisent plus de mutations que les souches sauvages durant le processus de réplication de l'ADN. La souche mutante mutD5 d'*E. coli* contient une DNA polymérase III déficiente pour la sous-unité epsilon, nécessaire à son activité de correction d'erreur de réplication. (Schaaper & Radman, 1989; Scheuermann & Echols, 1984) Low *et al* (Low, Holliger, & Winter, 1996) ont utilisé cette souche pour isoler un anticorps dont l'affinité de 3,2 nM est 100 fois meilleure que celle du clone initial, grâce à l'introduction de quatre mutations.

L'inconvénient des méthodes d'introduction aléatoire de mutations est de ne pas pouvoir contrôler leur localisation, alors que les régions hypervariables devraient être préférentiellement mutées. Des techniques de mutagenèse dirigée comme le *CDR walking* ont été développées afin de permettre de contrôler l'emplacement des mutations, notamment pour cibler spécifiquement le CDR. (C F Barbas *et al.*, 1994) Il n'est cependant pas possible de muter chacun des résidus composant les CDR en chacun des acides aminés existants. En effet, 20 acides aminés existent naturellement et en moyenne les six CDR sont composés de 54 résidus, ce qui nécessiterait de créer une banque d'une diversité d'environ  $20^{54}$  variants protéiques. Cette diversité augmenterait exponentiellement s'il était nécessaire que les variants contiennent plusieurs mutations. Pour limiter le nombre de variants à générer, il est par exemple possible d'effectuer des mutations en n'utilisant qu'un acide aminé de chaque catégorie physico-chimique (résidus polaires ou apolaires ; acides, basique ou neutres ; hydrophobes ou hydrophiles ; aromatiques ou aliphatiques) ou encore de ne muter que le CDR3. Des programmes bioinformatiques de modélisation d'anticorps, et d'estimation de l'énergie apportée par chaque résidus pour interagir avec l'antigène, apparaissent être des outils d'avenir pour prédire les acides aminés les plus impliqués dans l'interaction avec l'antigène et qui pourraient être mutés préférentiellement. (Almagro *et al.*, 2011; Lippow & Tidor, 2007; Lippow, Wittrup, & Tidor, 2007) De tels outils ont été utilisés par l'équipe de Lippow pour prédire l'effet de toutes les mutations uniques possibles (à l'exception du remplacement par une proline ou une cystéine) à chacune des positions des six CDR de l'anticorps anti-lysozyme D44.1 sur l'affinité de cet anticorps. (Lippow *et al.*, 2007) Les mutations diminuant les forces électrostatiques nécessaires à l'interaction entre l'anticorps et la protéine seraient les plus favorables, et la combinaison de plusieurs mutations pourrait avoir un effet synergique. Ainsi, la combinaison de six mutations d'intérêts, identifiées

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

informatiquement, a permis *in vitro* d'obtenir un mutant dont l'affinité a été augmentée 140 fois (affinité augmentée de 4,2 nM à 30 pM). Un processus de maturation d'affinité par mutagenèse dirigée a aussi permis d'augmenter l'affinité du Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Bâle, Suisse / Genentech Inc, San Francisco, Etats-Unis d'Amérique) d'un facteur 1 230 (passage d'une affinité de 16 nM à 13 pM).

### 2.5.4) Ingénierie de la région Fc

Comme détaillé précédemment, la région Fc porte les fonctions effectrices des anticorps. Les IgG1 sont les molécules les plus utilisées en biotechnologie puisqu'elles peuvent se lier aux FcγR, activer le complément, recruter les cellules responsables de l'ADCC et de la phagocytose et elles présentent aussi la plus longue demi-vie. Il peut cependant être judicieux de modifier la région Fc afin moduler ces propriétés, sans affecter l'affinité.

#### 2.5.4.1) Demi-vie et pharmacocinétique

Les anticorps pourvus d'une longue demi-vie permettent de limiter le nombre d'injections, limitant ainsi les coûts de traitement et le risque de développer une réponse anticorps anti-anticorps thérapeutiques, ce qui est primordial durant le traitement de maladies chroniques. Une longue demi-vie permet aussi un usage prophylactique des anticorps, en particulier pour certains personnels à risque. Les fragments d'anticorps présentent souvent des tailles inférieures à 70 kDa et sont donc éliminés de la circulation générale par filtration rénale (Caliceti & Veronese, 2003; Friedrich, Wald, Bagshaw, Burns, & Adhikari, 2012) alors que les immunoglobulines entières sont éliminées par internalisation cellulaire puis digestion enzymatique.

Comme il a été vu plus haut, la durée de demi-vie des IgG1 est fortement dépendante de l'expression du récepteur néonatal, FcRn. (Baker *et al.*, 2009) Les modifications de la région Fc augmentant l'affinité d'un anticorps pour le récepteur néonatal permettent d'augmenter sa demi-vie. Chez la souris les résidus impliqués dans l'interaction entre le FcRn et les IgG1 sont situés au niveau des CH2 et CH3. Plus particulièrement, en cristallographie et par mutagenèse dirigée, il a été mis en évidence le rôle majeur de trois résidus histidines (H310, H435 et H436) dans l'interaction avec le récepteur néonatal. (Medesan, Matesoi, Radu, Ghetie, & Ward, 1997) Chez l'Homme, il a été mis en évidence que le récepteur

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

néonatal humain peut interagir avec les IgG de lapin ou de cochon d'Inde, mais qu'il est incapable d'interagir avec les IgG de souris, de rat, de bovin ou encore de mouton. (Ober, Radu, Ghetie, & Ward, 2001) Cette observation explique en partie la courte demi-vie des IgG murines dans l'organisme humain, comme constaté avec le Muromonab ou le Tositumomab, dont les demi-vies respectives sont de 18 et 67 heures. Pour prédire précisément la demi-vie des anticorps thérapeutiques chez l'Homme, il est nécessaire de compléter les études pré-cliniques initiales chez la souris par des études de l'interaction entre l'IgG et le récepteur néonatal humain. Plusieurs travaux ont été menés sur la caractérisation de l'interaction entre les IgG et le récepteur néonatal de primates non-humains et d'humains. (Hinton *et al.*, 2004, 2006) L'introduction de la double mutation T250Q et M428L dans une IgG1 humaine a permis d'augmenter son interaction avec le récepteur néonatal macaque d'un facteur 37, et d'un facteur 29 avec le récepteur néonatal humain. (Hinton *et al.*, 2006) Dall'Acqua *et al* (Dall'Acqua, Kiener, & Wu, 2006) ont mis en évidence que l'introduction de la triple mutation M252Y, S254T et T256E dans l'IgG1 MEDI-524 (Motavizumab, Numax<sup>®</sup>, MedImmune Inc, Gaithersburg, Etats-Unis d'Amérique), permettait d'augmenter d'un facteur 10 sa capacité d'interaction aux récepteurs néonataux humains et macaques. Il a aussi été mis en évidence que ce triple mutant, appelé MEDI-527 (MEDI-524-YTE), présente une augmentation de la demi-vie et de la biodisponibilité d'un facteur quatre chez le macaque (demi-vie allant jusqu'à 21 jours). Les premiers résultats de la phase I d'essais cliniques du MEDI-557 confirment l'augmentation de la demi-vie. (Cingoz, 2009; Dall'Acqua *et al.*, 2006)

Une autre technique pour augmenter la demi-vie des anticorps consiste à les conjuguer avec des molécules ou comme le polyéthylène glycol (PEG) (Caliceti & Veronese, 2003; Chapman, 2002; Constantinou, Chen, & Deonarain, 2010; Roberts, Bentley, & Harris, 2002), des polypeptides recombinants inertes (Schellenberger *et al.*, 2009) ou encore avec l'acide polysialique (Gregoriadis, McCormack, Wang, & Lifely, 1993). Dans le cas du PEG, la complexité réside dans le fait que la greffe ("PEGylation") ne doit pas perturber la structure, la stabilité ou les fonctions de l'anticorps. Ce composé présente l'avantage d'être neutre, flexible, hydrophile, non métabolisé *in vivo* et formé d'une chaîne plus ou moins longue et plus ou moins ramifiée. (Caliceti & Veronese, 2003; Jevševar, Kusterle, & Kenig, 2012) La PEGylation augmente la masse moléculaire des fragments d'anticorps, permettant d'augmenter leur demi-vie *in vivo* en diminuant leur élimination par filtration rénale, et accroît aussi leur pénétration et leur rétention dans les tissus. (Chapman, 2002; Jevševar *et al.*, 2012) Mazuet *et al* (Mazuet, Dano, Popoff, Créminon, & Volland, 2010) ont démontré que la PEGylation d'un F(ab')<sub>2</sub> neutralisant BoNT/A<sub>1</sub> permettait d'augmenter d'un facteur deux sa demi-vie sans

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

toutefois augmenter la capacité de neutralisation. Il a été mis en évidence que la PEGylation permettrait dans certain cas de diminuer l'immunogénicité de la protéine à laquelle il est fixé, probablement en masquant des épitopes présents sur la protéine (Chapman, 2002; Gefen *et al.*, 2013), de diminuer sa dégradation protéolytique (Kontermann, 2009) et d'augmenter sa stabilité (C. Yang, Lu, & Liu, 2011). Cependant il n'est pas possible de prédire l'impact de la PEGylation sur ces paramètres, ce qui oblige à les évaluer *in vivo*. (Gefen *et al.*, 2013)

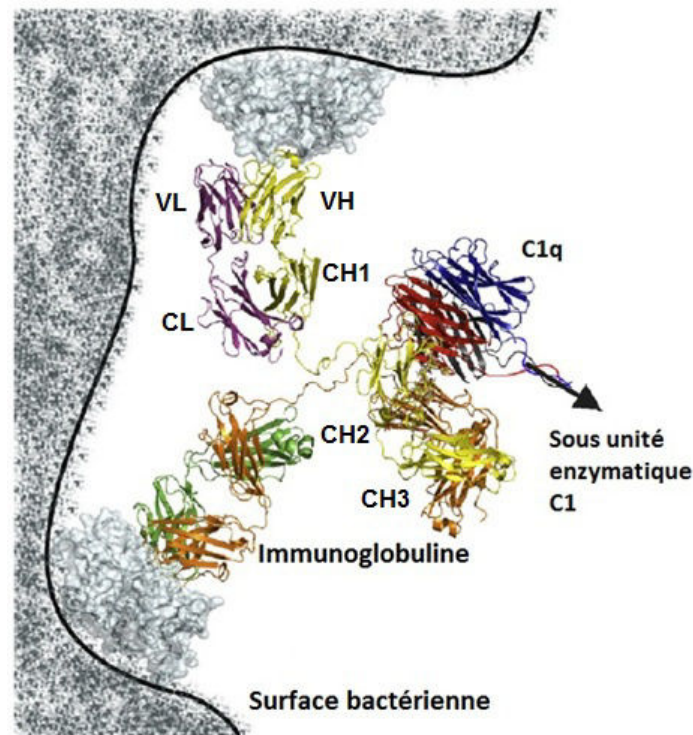
Vaccaro *et al* ont modifié la région Fc d'une immunoglobuline afin de permettre une interaction avec le récepteur néonatal de façon indépendante du pH et avec une affinité améliorée. L'injection de tels anticorps appelés "Abdegs" (*antibodies that increase IgG degradation*) permettrait de saturer les récepteurs néonataux et d'augmenter ainsi l'élimination des autres immunoglobulines circulantes. Une telle stratégie pourrait être utilisée dans le cas de maladies auto-immunes pour favoriser l'élimination des immunoglobulines pathologiques du sérum, bien qu'un tel traitement risque de créer transitoirement une immunodéficience partielle. (Vaccaro, Zhou, Ober, & Ward, 2005)

Igawa *et al* (Igawa *et al.*, 2010) ont démontré que la demi-vie des IgG était aussi dépendante du point isoélectrique du domaine variable de l'anticorps. Le point isoélectrique du Tocilizumab (Actemra<sup>TM</sup> / RoActemra<sup>®</sup>, Chugai pharmaceuticals Co. Ltd / Hoffmann-La Roche Ltd.) a été modifié, en introduisant plusieurs mutations dans sa séquence. Les mutations ont été sélectionnées afin que le Tocilizumab puisse interagir avec sa cible (l'IL-6R) au pH du plasma mais se détacher plus facilement au pH endosomal, permettant la dégradation de l'IL-6R par le lysosome et le recyclage de l'anticorps. Les anticorps ayant un faible point isoélectrique dans leur domaine variable ont ainsi une demi-vie deux fois plus longue que les IgG avec un point isoélectrique élevé.

On peut noter que dans certains cas particulier, une courte demi-vie peut être souhaitée. C'est le cas par exemple de l'Abciximab (ReoPro<sup>®</sup>, Centocor Inc, Horsham, Etats-Unis d'Amérique), un Fab dirigé contre les intégrines  $\alpha 2B$  et  $\beta 3$  situé à la surface des plaquettes, et utilisé lors d'interventions coronaires afin de limiter la coagulation sanguine. Lors d'une injection intraveineuse sa demi-vie est comprise entre 10 et 30 minutes, permettant de restaurer intégralement la fonction des plaquettes en 48 heures, évitant ainsi d'engendrer des saignements post-opératoires excessifs.

### 2.5.4.2) Optimisation de l'activation du complément

Le domaine CH2 des IgM, IgG1, et plus particulièrement des IgG3 peut activer la voie classique du complément en interagissant avec la sous-unité C1q du complexe pentamoléculaire C1. (Dangl *et al.*, 1988) La sous unité C1q est une structure hétérodimérique formée par l'association des régions C-terminale des chaînes A, B et C. Le site de fixation du complément sur les immunoglobulines murines et humaines est différent. (Idusogie *et al.*, 2000) Plusieurs études de mutagenèse ont été réalisées pour déterminer quels sont les acides aminés des IgG et IgM humaines et de C1q qui sont impliqués dans cette interaction. (Gadjeva *et al.*, 2008; Kishore *et al.*, 2004; Zlatarova *et al.*, 2006) Il a ainsi été mis en évidence que la mutation en alanine des résidus D270, K322, P329 et P331 de l'IgG1 Rituximab (Mabthera<sup>®</sup>, Rituxan<sup>®</sup>, CureTech, Yavne Israël / IDEC Pharmaceuticals, San Diego, Etats-Unis d'Amérique / Genentech, San Francisco Etats-Unis D'Amérique) diminuait significativement l'interaction avec le complément. (Idusogie *et al.*, 2000) Il a également été mis en évidence que les résidus K200 et K170 des IgG et IgM étaient impliqués dans cette interaction. (Gadjeva *et al.*, 2008) Récemment, Schneider *et al* (Schneider & Zacharias, 2012) ont observé la structure atomique du complexe C1q - IgG1 et démontré que les résidus D270, K322 P329 et P331 sont impliqués dans l'interaction entre C1q et l'IgG1 (Figure 47). Suite à ces travaux, des acides aminés homologues présents sur d'autres immunoglobulines, comme les IgG4, peuvent être mutés en ces résidus afin que ces immunoglobulines puissent interagir avec le complément. (Natsume *et al.*, 2008; Sensel, Kane, & Morrison, 1997) Moore *et al* (Moore, Chen, Karki, & Lazar, 2010) ont étudié l'impact de 38 mutations de la région Fc d'une IgG1 sur la cytotoxicité dépendante du complément, et mis en évidence que le triple mutant S267E, H268F et S324T augmentait cette cytotoxicité de 6,9 fois, et l'affinité de l'IgG1 pour le complément de 47 fois. Un mutant comportant ces trois mutations ainsi que les mutations S267E et I332E induirait une cytotoxicité dépendante du complément 23 fois plus importante que l'IgG1 initiale. On peut aussi noter que la glycosylation de l'acide aminé N297 est nécessaire pour maintenir une conformation permettant l'interaction de l'IgG avec le complément. (Krapp, Mimura, Jefferis, Huber, & Sondermann, 2003; Tao & Morrison, 1989)



**Figure 47 : Interaction anticorps-bactérie-complément.**

Représentation en ruban de l'interaction entre une IgG1 fixée à la surface d'une bactérie *via* ses domaines variables, et avec le complexe C1 *via* sa région Fc. (Schneider & Zacharias, 2012)

### 2.5.4.3) Optimisation de l'activation de l'ADCC

La région Fc des IgG est capable de se lier aux Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII -a, -b et -c (CD32 -a, -b et -c) et Fc $\gamma$ RIII -a et -b (CD16 -a et -b), présents à la surface de nombreuses cellules du système immunitaire (Tableau 3, p42). (Gessner, Heiken, Tamm, & Schmidt, 1998) Contrairement au récepteur Fc $\gamma$ RII-b qui comporte un motif ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motifs*), les récepteurs Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII -a, et -c et Fc $\gamma$ RIII-a présentent un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*), et peuvent donc activer l'ADCC et la phagocytose des pathogènes. L'affinité des IgG pour les récepteurs Fc est dépendante d'une part du type du récepteur Fc, et d'autre part de l'isotype de l'IgG. Les IgG1 et IgG3 présentent pas exemple des affinités allant jusqu'à 20 nM pour le Fc $\gamma$ RI. Le choix de l'isotype utilisé comme charpente pour un anticorps thérapeutique est donc essentiel pour moduler l'activation de l'ADCC.

Chacune des trois classes de Fc $\gamma$ R est codée par des gènes spécifiques situés dans la même région du chromosome 1. (Gessner *et al.*, 1998) Un polymorphisme génique a été observé au niveau des gènes FCGR2A et FCGR3A, codant respectivement RFc $\gamma$ II-a et

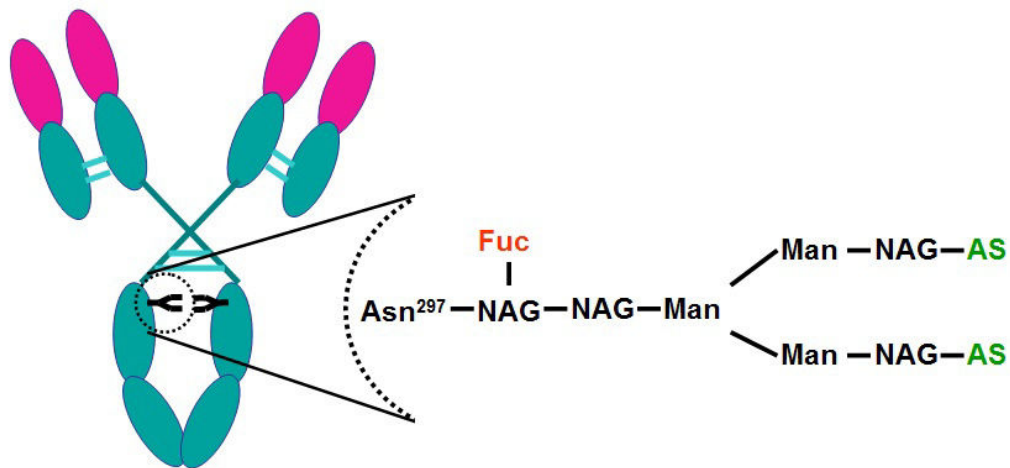


## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

RFc $\gamma$ III-a. Certains de ces polymorphismes induisent une augmentation de l'affinité des récepteurs Fc pour les anticorps. (Cartron *et al.*, 2002; Mellor, Brown, Irving, Zalcborg, & Dobrovic, 2013; Musolino *et al.*, 2008) Les individus portant de tels allèles bénéficient d'un accroissement de l'activité thérapeutique des anticorps dont l'objectif est une lyse cellulaire, par exemple. Il a été mis en évidence que la mutation homozygote H131R sur le gène FCGR2A augmente l'affinité de la région Fc des IgG2 pour FC $\gamma$ RII-a. De même, la mutation homozygote V158F sur le gène FCGR3A augmente l'affinité du récepteur RFc $\gamma$ III-a pour les IgG1 et IgG3. (Mellor *et al.*, 2013) Le Trastuzumab est une IgG1 humanisée dirigée contre la protéine HER2, qui est utilisée dans le cas de cancer du sein et de cancers gastriques, et dont une partie de son activité thérapeutique est due à l'activation de l'ADCC. Il a été mis en évidence que les mutations A330L, I332E et S239D augmentaient l'affinité du Trastuzumab pour le FC $\gamma$ RIIIa et ainsi l'ADCC. (Lazar *et al.*, 2006) Shields *et al* (R L Shields *et al.*, 2001) ont compilé et étudié l'impact des mutations de chacun des acides aminés exposés au solvant des régions CH2 et CH3 des IgG1 sur l'affinité pour les récepteurs Fc (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIIA, FcRN) et certains récepteurs associés aux CMH. Ces travaux peuvent servir de support pour les futurs projets de modification de la région Fc d'une IgG1, afin d'accroître ou diminuer son interaction avec le récepteur Fc.

La modification de la glycosylation de l'asparagine 297 peut également affecter l'ADCC (Figure 48). Scallon *et al* (Scallon, Tam, McCarthy, Cai, & Raju, 2007) ont modifié le profil de glycosylation de trois IgG1 en générant deux variants pour chacune de ces trois IgG1 ; un variant présentant un fort taux d'acide sialique au niveau des glycosylations et un autre présentant un faible taux d'acide sialique. Les variants avec le plus fort taux d'acide sialique présentent une plus faible ADCC, probablement car l'acide sialique diminue la flexibilité de l'anticorps et donc l'affinité pour les récepteurs Fc. Cette hypothèse expliquerait aussi pourquoi l'absence de fucose au niveau de l'asparagine 297 augmente l'ADCC d'un facteur 50 (Figure 48). (Robert L Shields *et al.*, 2002; Shinkawa *et al.*, 2003; Sibénil *et al.*, 2006)





**Figure 48 : Glycosylation de l'asparagine 297.**

Exemple de sialylation et fucosylation au niveau de la glycosylation de l'asparagine 297 d'une IgG. Asn : Asparagine ; NAG : N-acetylglucosamine ; Fuc : Fucose ; Man : Manose ; AS : Acide Sialique.

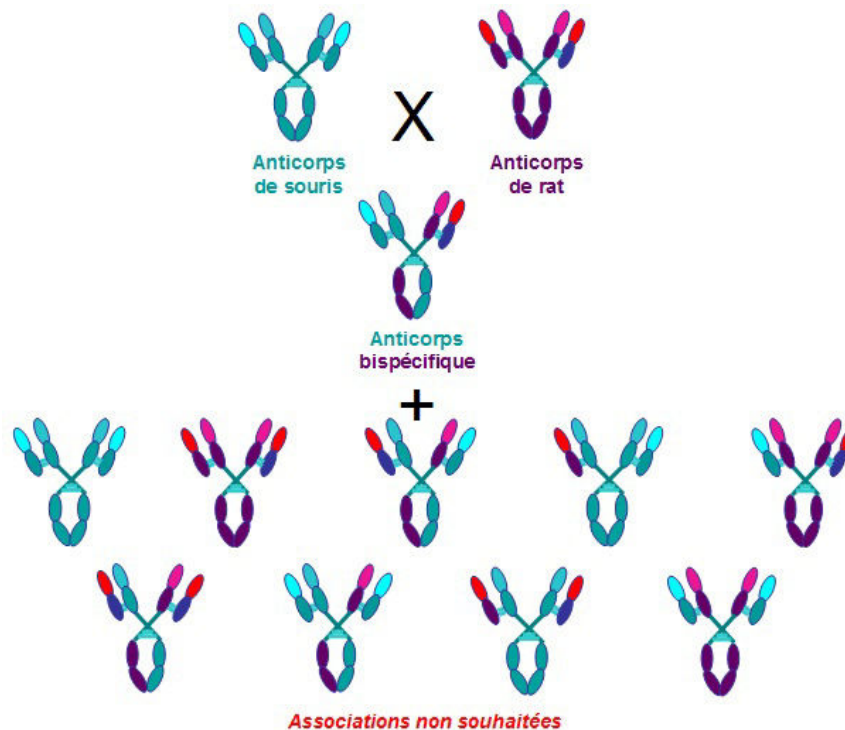
#### 2.5.4.4) Les anticorps bispécifiques

Il est parfois nécessaire que l'anticorps interagisse avec sa cible uniquement dans certains tissus ou sur certaines cellules. Pour permettre une telle spécificité, une des approches consiste à développer des anticorps bispécifiques dont l'une des domaines variables est spécifique d'un tissu tandis que l'autre est spécifique de la cible antigénique. (Lindhofer, Mocikat, Steipe, & Thierfelder, 1995; May, Saprà, & Gerber, 2012) Ces anticorps sont difficiles à obtenir, mais différentes techniques de production ont été développées :

- La technique des quadromas est l'une de ces méthodes. (Lindhofer *et al.*, 1995) Elle repose sur l'obtention préalable de deux hybridomes d'espèces différentes, généralement de souris et de rat, sécrétant deux anticorps monoclonaux ayant deux spécificités d'intérêt. Ces deux hybridomes sont alors fusionnés afin que leur patrimoine génétique comporte les deux génomes parentaux, formant ainsi des quadromas qui codent pour des anticorps dont les chaînes légères et lourdes de chacun des deux bras de l'anticorps s'associent aléatoirement. En conséquent, en plus de l'anticorps bispécifiques, les quadromas sécrètent aussi les anticorps parentaux ainsi que des anticorps dont l'association des deux chaînes est incorrecte (Figure 49) ; des étapes de purification et de caractérisation des anticorps sont donc nécessaires. L'utilisation d'hybridomes de deux espèces différentes permet d'augmenter la proportion d'anticorps bispécifiques d'intérêt puisque les chaînes lourdes et légères de rat s'associent

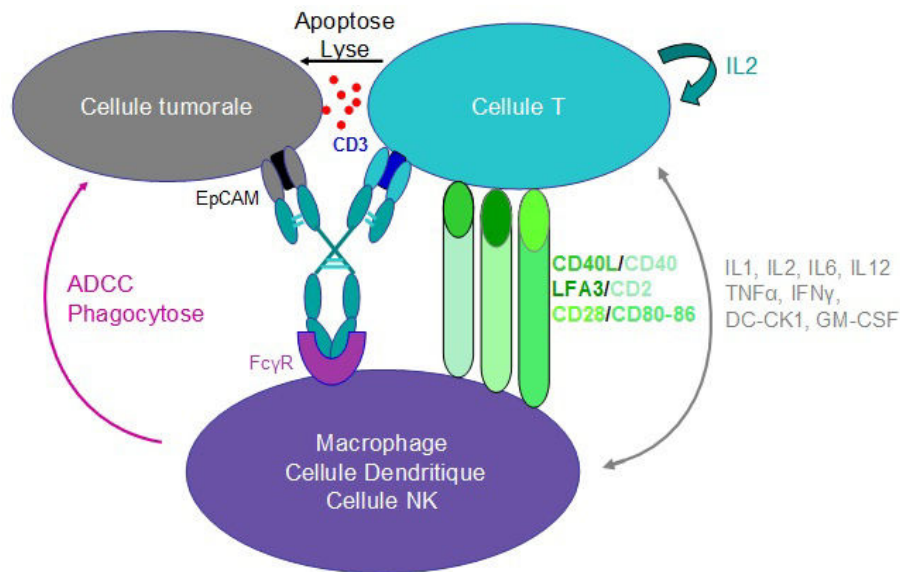
## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

préférentiellement ensemble, tout comme celles de souris. Les anticorps bispécifiques peuvent être purifiés par chromatographie d'affinité avec des colonnes greffées avec la protéine A, qui ne peut pas interagir avec la région Fc des immunoglobulines de rats qu'à pH neutre. De tels anticorps sont appelés trispécifiques, puisqu'en plus de pouvoir interagir avec deux antigènes distincts, ils peuvent activer les fonctions effectrices grâce à leur région Fc. L'origine animale de ces anticorps rend toutefois leur tolérance incertaine. Le Catumaxomab (Removab<sup>®</sup>, Fresenius Biotech GmbH, Bad Homburg, Allemagne, TRION Pharma GmbH, Munich, Allemagne) est une IgG2 bispécifique prescrite pour le traitement des cancers ovariens, des cancers gastriques et des ascites malignes, et qui est obtenue par la technologie des quadromas. Il cible à la fois la molécule EpCAM, fortement exprimé à la surface de la majorité des cellules tumorales, et le CD3, exprimé à la surface des cellules T. Cette double interaction permet le recrutement et l'activation des lymphocytes T au niveau des tumeurs exprimant EpCAM (Figure 50). (Linke, Klein, & Seimetz, 2010)



**Figure 49 : Technologie des quadromas.**

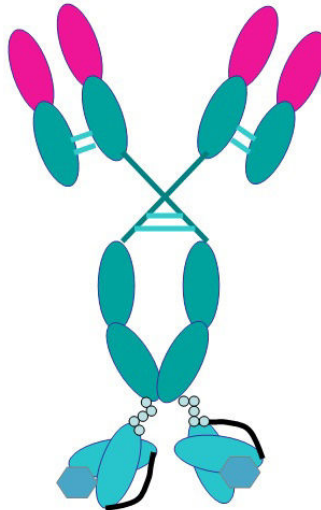
Les hybridomes sécrétant un anticorps d'intérêt de souris et un anticorps d'intérêt de rat sont fusionnés. En plus de l'anticorps bispécifique d'intérêt, les quadromas synthétisent aussi les anticorps parentaux ainsi que des anticorps dont l'association des chaînes lourdes et légères est incorrecte.



**Figure 50 : Mécanisme d'action du Catumaxomab.**

Une des régions variable de l'anticorps cible la cellule tumorale en interagissant avec EpCAM tandis que l'autre domaine variable recrute une cellule T en interagissant avec son CD3. La région Fc de l'anticorps permet de recruter différentes cellules effectrices du système immunitaire. D'après Linke *et al.* (Linke *et al.*, 2010)

- Pour obtenir des anticorps bispécifiques, il est aussi possible de conjuguer chimiquement, ou par un lien peptidique, des scFv ou des Fab à la région Fc d'un anticorps monoclonal. (Metz *et al.*, 2011; Schanzer *et al.*, 2011) Metz *et al.* (Metz *et al.*, 2011) ont ainsi obtenu des anticorps dont les scFv couplés à l'extrémité C-terminale de l'anticorps ciblent la digoxigénine, et les domaines variables des anticorps ciblent une molécule exprimée à la surface cellulaire (HER2, IGF1-R, CD22 et LeY-carbohydrate) (Figure 51). Cet anticorps bispécifique peut être utilisé en imagerie médicale, en permettant d'émettre de la fluorescence uniquement au niveau des cellules ciblées par l'anticorps. L'encombrement stérique produit par les fragments d'anticorps conjugués empêche l'interaction avec les récepteurs spécifiques de la région Fc, ce qui limite l'usage thérapeutique de tels anticorps.



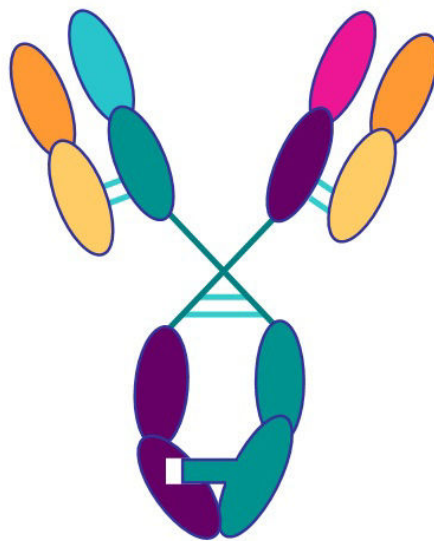
**Figure 51 : Anticorps conjugué chimiquement à des scFv.**

Les domaines variables de l'anticorps interagissent avec des molécules présentes à la surface cellulaire pour cibler le tissu cible. Les scFv interagissant avec la digoxigénine sont conjugués chimiquement à l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde. (Metz *et al.*, 2011)

- La technologie des "boutons pressions" ("*knobs-into-holes*") est basée sur l'introduction de mutations dans la région CH3 des chaînes lourdes de deux anticorps différents mais ayant la même chaîne légère, qui permettent dans 95 % des cas l'association des deux chaînes lourdes différentes (Figure 52). (Jackman *et al.*, 2010; Merchant *et al.*, 1998; Ridgway, Presta, & Carter, 1996) Par exemple, les mutations introduites permettent la formation d'un "bouton" d'acides aminés (mutations knob : T366W, par exemple) dans la région CH3 de l'une des deux chaînes lourdes, et d'une niche (mutation hole : T366S, L368A et Y407V, par exemple) dans l'autre chaîne lourde, permettant aux acides aminés de "s'emboîter". Ces mutations ne sont pas accessibles au solvant, ce qui les rend peu susceptibles de former un épitope T. Ce système permet aux deux chaînes lourdes de ne former que des hétérodimères (Figure 52). Les chaînes légères des deux anticorps étant identiques, elles peuvent indifféremment s'associer à l'une ou l'autre des chaînes lourdes de l'hétérodimère. L'inconvénient de ce système est la nécessité d'isoler deux anticorps ciblant deux antigènes différents, mais possédant la même chaîne légère. Pour obtenir de tel anticorps bispécifiques, il est nécessaire d'isoler un premier anticorps interagissant avec une protéine d'intérêt puis d'associer sa chaîne légère aux chaînes lourdes d'une banque d'anticorps. Cette banque est

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

ensuite criblée contre le deuxième antigène d'intérêt, pour isoler un anticorps réactif, composé d'une chaîne lourde différente du premier anticorps mais dont la chaîne légère est identique. Ce système implique que la spécificité pour les deux antigènes soit principalement portée par la chaîne lourde. Afin de remédier aux problèmes de mésappariement entre les chaînes lourdes du premier anticorps et les chaînes légères du deuxième anticorps, les anticorps monocaténaires de camélidés représentent une piste actuellement étudiée. Ces anticorps permettent d'obtenir des anticorps bispécifique plus facilement par génie génétique. (Els Conrath, Lauwereys, Wyns, & Muyldermans, 2001)



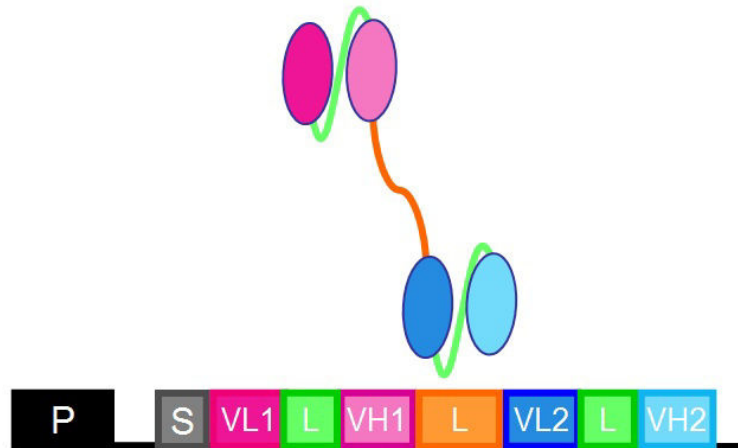
**Figure 52 : Anticorps "knobs-into-holes".**

La présence de mutations spécifiques dans la région CH3 des deux chaînes lourdes permet de favoriser l'association de deux chaînes lourdes différentes. La chaîne légère de chacun des deux bras de l'anticorps est identique.

- Il est possible d'obtenir des anticorps bi-, tri-, voire tétra-spécifiques, par génie génétique. L'ADN codant des anticorps (généralement au format scFv ou Fab) est cloné dans un vecteur et fusionné avec des peptides de liaisons permettant l'association des différents anticorps entre eux, pour former des tandems de scFv, par exemple (Figure 53). Pour fusionner deux anticorps, il est aussi possible d'utiliser un des domaines *leucine zipper* de type *c-fos/c-jun* (Figure 54). Ces domaines sont des hélices  $\alpha$  qui s'associent entre elles selon un mécanisme de "fermeture éclair", grâce aux résidus leucines qu'elles contiennent.

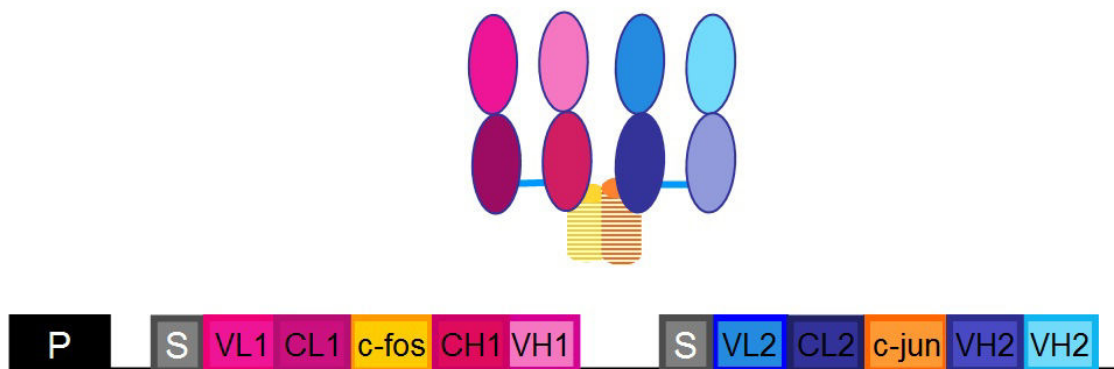
## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

Deux domaines c-fos ou c-jun ne peuvent pas s'homodimériser, ce qui permet uniquement la formation d'anticorps hétérodimériques. (de Kruijf & Logtenberg, 1996; de Leij L, Molema, Helfrich, & Kroesen, 1998)



**Figure 53 : Tandem de scFv.**

Un scFv spécifique d'un antigène (rose) est relié par un peptide à un scFv spécifique d'un deuxième antigène (bleu). P : promoteur ; S : séquence signal d'exportation ; VL : domaine variable de la chaîne légère ; VH : domaine variable de la chaîne lourde.



**Figure 54 : Dimérisation des anticorps grâce à un motif "leucine zipper".**

Un Fab spécifique d'un antigène (rose) est fusionné avec un motif c-fos (jaune). Un Fab spécifique d'un autre antigène (bleu) est fusionné à un motif c-jun (orange). Les domaines c-fos et c-jun interagissent entre eux par un mécanisme de type "fermeture éclair" (*leucine zipper*), permettant la dimérisation des deux Fab. P : promoteur ; S : séquence signal d'exportation ; VL : domaine variable de la chaîne légère ; VH : domaine variable de la chaîne lourde.

La barrière hémato-encéphalique limite le passage des molécules dans le cerveau, et seul environ 0,1 % des anticorps conventionnels parviennent à la franchir. (Reiber & Felgenhauer, 1987) Il a été proposé d'utiliser les anticorps bispécifiques pour permettre aux molécules synthétiques de franchir cette barrière. (Pardridge, 2010) Différentes molécules exprimées à la surface de la barrière hémato-encéphalique peuvent être ciblées, comme le

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

récepteur de la transférine (Boado, Zhou, Lu, Hui, & Pardridge, 2010), le récepteur de l'insuline (Boado, Zhang, Zhang, & Pardridge, 2007) ou le LDLR (*Low-Density Lipoprotein Receptor*) (Spencer & Verma, 2007). Afin d'optimiser le franchissement de la barrière hémato-encéphalique, il a été mis en évidence que l'interaction avec une de ces molécules doit présenter une affinité modérée afin que l'anticorps puisse s'en dissocier après franchissement de la barrière hémato-encéphalique. (Yu *et al.*, 2011) Boado *et al.* (Boado *et al.*, 2010) ont développé un anticorps bispécifique capable de franchir la barrière hémato-encéphalique de rats. Des domaines variables spécifiques du récepteur de la transférine du rat ont été greffés sur les régions constantes d'une IgG<sub>1</sub> murine, et deux scFv spécifiques du peptide amyloïde A $\beta$  ont été fusionnés à l'extrémité C-terminale de cette IgG<sub>1</sub>. Cet anticorps peut franchir la barrière hémato-encéphalique murine à raison de 3 % de la dose injectée par gramme de cerveau de souris, ce qui pourrait ouvrir à terme de nouvelles perspectives pour le traitement des pathologies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

### 2.5.5) Utilisation des anticorps comme vecteurs thérapeutiques

Fréquemment, la cible des molécules thérapeutiques est localisée dans une zone précise de l'organisme, comme les tumeurs par exemple. Cependant ces molécules sont incapables de cibler spécifiquement une cible et doivent donc être utilisées à forte concentrations pour permettre une répartition dans tout l'organisme, ce qui est susceptible d'engendrer des effets secondaires importants. (Chari, 2008) Les anticorps et les fragments d'anticorps peuvent être conjugués chimiquement ou enzymatiquement à de telles molécules thérapeutiques pour les adresser à un tissu particulier (Figure 55). (Beck *et al.*, 2010; Ducry & Stump, 2010; Govindan & Goldenberg, 2012) Différents formats d'anticorps comme les IgG<sub>1</sub>, 2 et 4, les Fab, les F(ab')<sub>2</sub> ou encore les scFv ont été conjugués à des molécules synthétiques. (Wu & Senter, 2005) Une plus faible dose de la molécule synthétique est alors nécessaire pour obtenir l'effet thérapeutique, et des molécules de toxicité élevée peuvent être utilisées. La technique utilisée pour la conjugaison doit empêcher la dissociation de la molécule synthétique tout en ne perturbant ni la fonctionnalité de l'anticorps ni sa solubilité. Parmi les nombreuses cibles de tels anticorps vecteurs on peut citer le CD20, HER2/neu, CD22, CD70, EpCAM ou encore MUC1. (Teicher, 2009) Il est souvent nécessaire que l'anticorps soit internalisé après l'interaction à la surface cellulaire, afin que la molécule synthétique puisse



## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

agir dans la cellule. Pour cela, il est possible d'adapter la technique d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages pour ne sélectionner que des anticorps d'intérêt pouvant être internalisés. (M. A. Poul, Becerril, Nielsen, Morisson, & Marks, 2000; M.-A. Poul, 2009) Ces protocoles sont basés sur le criblage d'une banque de fragments d'anticorps sur des cellules exprimant la protéine de surface à cibler. Les phages, dont les fragments d'anticorps ont interagi avec la cellule puis ont été internalisés, sont ensuite récupérés par lyse cellulaire. Les fragments d'anticorps ainsi isolés représenteront des candidats privilégiés pour être conjugué à une molécule thérapeutique dont l'activité est intracellulaire. Contrairement aux criblages standards, il n'est pas forcément judicieux d'isoler les anticorps les plus affins. En effet, Rudnik *et al* (Rudnick *et al.*, 2011) ont mis en évidence *in vitro* que la capacité d'internalisation d'anticorps dirigés contre HER2 était inversement corrélée avec leur affinité, probablement parce que les anticorps très affins n'arrivent pas à se dissocier de la molécules de surface avec laquelle ils interagissent. Par conséquent, même si l'anticorps est internalisé, il ne se dissociera pas et sera externalisé lors du recyclage des protéines membranaires. Quatre anticorps dont les affinités varient entre 0,56 et 270 nM ont été étudiés. L'anticorps H3B1 dont l'affinité pour HER2 était la plus élevée (0,56 nM) a présenté la plus faible accumulation dans la cellule tumorale, par opposition aux anticorps C6.6 et ML39, présentant des affinités respectives de 23 et 7.3 nM, et dont l'internalisation est apparue être la plus importante. Cependant, il existe plusieurs limites à l'utilisation des anticorps conjugués thérapeutiques. Tout d'abord il est préalablement nécessaire d'identifier une protéine exprimée différemment à la surface des cellules saines et des cellules pathologiques. Il est ensuite difficile de quantifier la dose à injecter puisque l'activité de la molécule dépend fortement du taux d'expression de la protéine de surface ciblée par l'anticorps, or elle est variable selon les individus et les tumeurs. En outre certaines cellules peuvent exprimer des pompes d'efflux qui exportent la molécule thérapeutique vers l'extérieur de la cellule. Actuellement seul deux anticorps conjugués thérapeutiques sont disponibles sur le marché. Le Brentuximab vedotin (Adcetris<sup>TM</sup>, Seattle genetics, Inc.) a été approuvé par la FDA en août 2011 et par l'EMA en octobre 2012 pour le traitement des lymphomes Hodgkiniens et des lymphomes anaplasiques à grandes cellules. (Khalaf, Caldwell, & Reddy, 2013) Cet anticorps dirigé contre le TNFRSF8 est conjugué à un anti mitotique, le monométhyle auristatin E, dont la toxicité élevée ne lui permet pas d'être administré sous forme non conjuguée. Le Trastuzumab emtansine a été approuvé par la FDA en février 2013 pour le traitement des cancers du sein HER2 positif. (Boyras *et al.*, 2013) La Mertansine à laquelle il est conjugué, lui confère des propriétés cytotoxiques. Le Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg<sup>®</sup>, Pfizer, New York, Etats-

## Partie 2 : Biotechnologie des anticorps

Unis d'Amérique), qui avait été approuvé le 17 mai 2000 par la FDA pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës, a finalement été retiré de la vente le 1<sup>er</sup> juin 2010 suite à des problèmes de tolérance et l'absence de bénéfice prouvé. (FDA, 2010; Hütter & Schlenk, 2011) Actuellement cinq anticorps conjugués sont approuvés pour l'imagerie : le Capromab pendetide, l'Ibritumomab tiuxetan, le Tositumomab, le Sulesomab et le Besilesomab.

Nom générique	Nom commercial	Entreprise	Cible de l'anticorps	Molécule conjuguée	Prescription	Première AMM
Brentuximab vedotin	Adcetris™	Seattle Genetics Inc	TNFRSF8	monométhyle auristatin E (anti mitotique)	Lymphome Hodgkinien, lymphomes anaplasiques à grandes cellules	19 Août 2011 (FDA)
Trastuzumab emtansine	Kadcyla™	Hoffmann-La Roche Ltd. Genentech Inc	Her2	Mertansine (cytotoxique)	Cancers du sein Her2 positifs	22 février 2013 (FDA)
Capromab pendetide	ProstaScint®	Cytogen	FOLH1	Pendetide GYK-DTPA (chélateur de l'Indium 111)	Cancer de la prostate	28 octobre 1996 (FDA)
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	Cell Therapeutics Inc	MS4A1	Tiuxetan (chélateur de yttrium 90 et de l'indium 111)	Lymphome non Hodgkinien	19 février 2002 (FDA)
Tositumomab	Bexxar®	GSK	MS4A1	Iodine 131	Lymphome non Hodgkinien CD20 positif	27 juin 2003 (EMA)
Sulesomab	LeukoScan®	Immunomedics Inc	NCA-90	Technetium-99m	Ostéomyélite	18 juin 1999 (EMA)
Besilesomab	Scintimun®	Iba Molecular Imaging	CEACAM8	Technetium-99m	Infections des os périphériques, diagnostic des ostéomyélites, scintigraphie de la moëlle osseuse	11 janvier 2010 (EMA)

**Figure 55 : Liste des anticorps conjugués disposant d'une autorisation de mise sur le marché.**

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché. FDA : *U S Food and Drug Administration*. EMA : *European Medicines Agency*. D'après IMGT, en date du 09/03/2013.



*Partie 3 :  
Le risque  
biologique  
provoqué*

### 3) Le risque biologique provoqué

Les progrès de la médecine ont permis au cours du temps d'enrayer de nombreuses pandémies causées naturellement par les bactéries et les virus, par exemple. Cependant, le risque biologique peut être aussi provoqué intentionnellement, et les modalités de lutte contre ce risque peuvent être différentes de celles de la lutte contre le risque naturel.

#### 3.1) Définitions

Le terme "agents biologiques" désigne i) les micro-organismes (naturels ou génétiquement modifiés) ii) les cultures cellulaires iii) les endoparasites humains iv) les toxines, susceptibles de provoquer une infection, une allergie ou une intoxication chez un hôte, humain ou non. (République française, 2008) Il est important de noter que les virus et prions, bien que non vivants, sont considérés comme des agents biologiques.

Une "arme biologique" peut être décrite comme l'association d'agent(s) biologique(s) et d'un vecteur de dissémination comme par exemple des bombes, des missiles, des nébulisateurs, voire des animaux, dans le but de nuire. (Mates, 1999) Par extension, le risque biologique provoqué peut se définir comme le risque d'utilisation délibérée d'armes biologiques dans le but de porter atteinte au genre humain. Les armes biologiques peuvent être utilisées pour atteindre directement les Hommes, par une contamination directe de la population, mais elles peuvent aussi être utilisées pour contaminer indirectement les Hommes, en ciblant les réseaux d'approvisionnement agroalimentaire. (Burrows & Renner, 1999; Christopher, Cieslak, Pavlin, & Eitzen, 1997; Mobley, 1995; Weingart *et al.*, 2010)

#### 3.2) Historique

##### 3.2.1) Les débuts du risque biologique provoqué

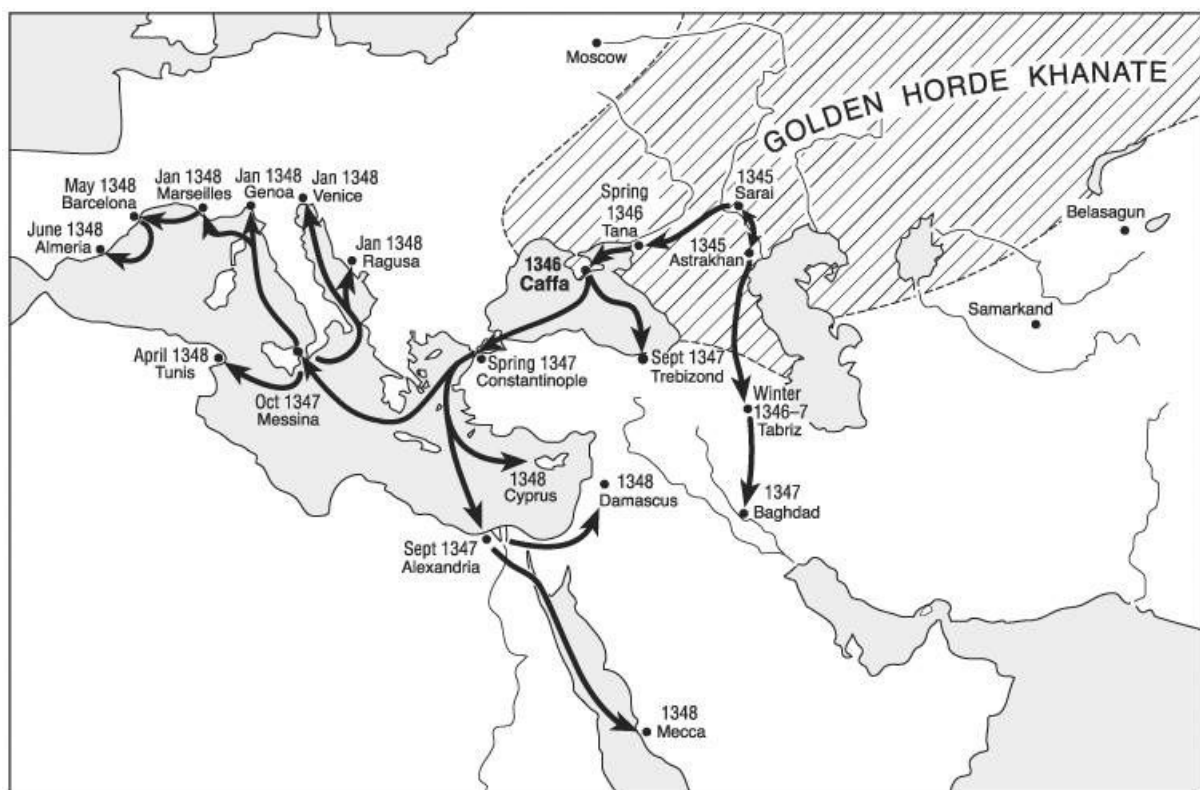
Si l'Homme, au cours du temps, a cherché à soigner les différentes maladies infectieuses, paradoxalement, il a aussi cherché à utiliser à des fins martiales les agents biologiques responsables de leur apparition.

Une des premières descriptions de l'usage d'armes biologiques date de 1350 avant Jésus-Christ. Dans les villages qu'ils venaient de piller, les Hittites (un ancien peuple

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

d'Anatolie) laissaient volontairement des animaux malades afin de contaminer les populations, et des analyses récentes supposent que ces animaux étaient atteints de tularémie. (Trevisanato, 2007) Des cas plus détaillés d'utilisation d'agents biologiques ont été reportés dès le 14<sup>ème</sup> siècle, comme à Caffa (aujourd'hui Théodosie, Ukraine), un ancien comptoir de commerce génois sur les rives de la mer noire, où les Tartares qui assiégeaient la ville en 1346 auraient catapulté des cadavres atteints de la peste au dessus des fortifications de la ville. (Lang, 2003; Wheelis, 2002) Cet acte, a eu des conséquences physiques et psychologiques importantes sur les habitants de la cité. Il aurait causé la fuite des Génois par voie maritime, ce qui expliquerait en grande partie la propagation rapide de l'épidémie de peste pulmonaire qui ravagea l'Europe pendant cinq ans, tuant entre le tiers et la moitié de la population européenne (

Figure 56). (Reid, 2005)



**Figure 56 : Hypothèse décrivant la propagation de l'épidémie de peste noire en Europe au 14<sup>ème</sup> siècle.**

Selon une hypothèse avancée par Wheelis *et al*, (Wheelis, 2002), suite au catapultage de cadavres atteint de la peste dans l'enceinte de la ville de Caffa, cette maladie se serait rapidement propagée dans toute l'Europe à partir de ce port.

Plus tard, en 1763, un virus a été utilisé pour la première fois comme arme biologique, lors de la guerre de sept ans entre les Amérindiens et les Britanniques. Après la défaite des

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

Français face aux Britanniques durant la guerre de la conquête (1763-1766), ces derniers imposèrent aux Amérindiens des conditions beaucoup plus rigoureuses. Pontiac, un chef de guerre souleva alors les Amérindiens et ils remportèrent de nombreuses batailles. Selon des échanges épistolaires entre Henri BOURQUET (1719-1765), mercenaire à la solde des britanniques, et le général Jeffrey AMHERST (1717-1797), gouverneur militaire de la Nouvelle-France, il semblerait que les Britanniques aient offert aux Amérindiens des couvertures infectées par la variole provenant des hôpitaux militaires, afin "*d'éliminer cette race exécrationnelle*". (F. Anderson, 2000; Nester, 2000)

Le 19<sup>ème</sup> siècle marque un tournant pour la microbiologie, avec les travaux de nombreux scientifiques parmi lesquels on peut citer Louis PASTEUR (1822-1895) avec l'antisepsie, la pasteurisation et la vaccination, Robert KOCH (1843-1910) avec la découverte du bacille du charbon et de la tuberculose, ou encore Alexandre YERSIN (1863-1943) avec la découverte du bacille de la peste. L'ensemble de ces travaux ainsi que d'autres avancées scientifiques majeures ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des agents biologiques, mais leurs résultats peuvent aussi être détournés à des fins malveillantes.

La première guerre mondiale a été marquée par la première utilisation d'armes chimiques. En effet, le 22 avril 1915, près de la ville d'Ypres, l'armée Allemande utilisa du gaz moutarde (appelé ypérite par la suite) sur les troupes de la coalition française, provoquant la désorganisation de cette dernière et la perte de la bataille. Face au danger représenté par de telles armes, différents pays mirent en place des programmes de développement d'armes biologiques afin de pouvoir riposter à une attaque chimique ou biologique, et au moins afin de servir d'arme de dissuasion.

#### **3.2.2) Les programmes de développement d'armes biologiques**

Plusieurs pays ont mis en place des programmes de développement d'armes biologiques, à différentes échelles. Actuellement, les programmes portant sur les armes biologiques sont tous officiellement à finalité défensive, bien que plusieurs pays soient suspectés d'avoir des programmes comportant un volet offensif.



### 3.2.2.1) Le programme français

Dès 1921, le professeur Auguste TRILLAT (1861-1944) fut chargé de mettre au point le programme français. Ses premières recherches, sur le site de Sevran-Livry en Seine-Saint-Denis, concernaient la mise au point de vecteurs pouvant disperser une charge biologique sur un champ de bataille. (Korn, Berche, & Binder, 2008) Ces vecteurs militarisés furent testés en 1926 sur le champ d'expérimentation de Gâvres pour disséminer les agents de la peste, du charbon ou de la toxine botulique et ce, malgré la ratification quelques jours plus tôt du Protocole de Genève (traité du 17 juin 1925, ratifié le 9 mai 1926). Ces programmes étaient en partie présentés comme défensifs puisqu'ils étaient sensés permettre la compréhension du fonctionnement des armes biologiques, afin de mieux s'en prémunir. La dualité de ce programme, à la fois offensif et défensif, permit de poursuivre les recherches malgré la signature de traités limitant le développement des armes biologiques. Néanmoins, faute de soutien politique et par manque de financement, le volet offensif fut abandonné. Actuellement il ne persiste que des programmes portant sur la recherche de contre-mesures médicales, comme des outils de diagnostic ou des moyens de prévention et de traitement. Ces recherches sont menées depuis le début des années 1980 par la Direction Générale de l'Armement, principalement au Centre d'Etudes du Bouchet et au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées. Les actes terroristes de l'automne 2001 aux Etats-Unis d'Amérique ont à nouveau attiré l'attention sur le risque biologique provoqué. En France, le plan BIOTOX (ANSM, 2001; Merens *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2003) a été déclenché le 10 octobre 2001, et il a été ordonné au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées et au Centre d'Etudes du Bouchet de stopper leurs activités régulières pour être transformés en cellules de crise biologique. Ces deux centres ont ainsi pu analyser une grande partie des 4 500 échantillons suspects reçus en France entre octobre et novembre 2001. (Vidal *et al.*, 2003)

### 3.2.2.2) Le programme soviétique

Le programme soviétique, nommé Biopreparat et dirigé par Jacov FISHMAN, a débuté dès 1919 et a été prolongé bien après la fin de la seconde guerre mondiale. Son ampleur fut dévoilée à la suite des descriptions qu'en firent plusieurs scientifiques transfuges tels Vladimir PASECHNIK (1937-2001), Seguei POPOV ou encore Kanatjan ALIBEKOV (1950-). (Alibek & Handelman, 1999) Le programme Biopreparat disposait d'un budget

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

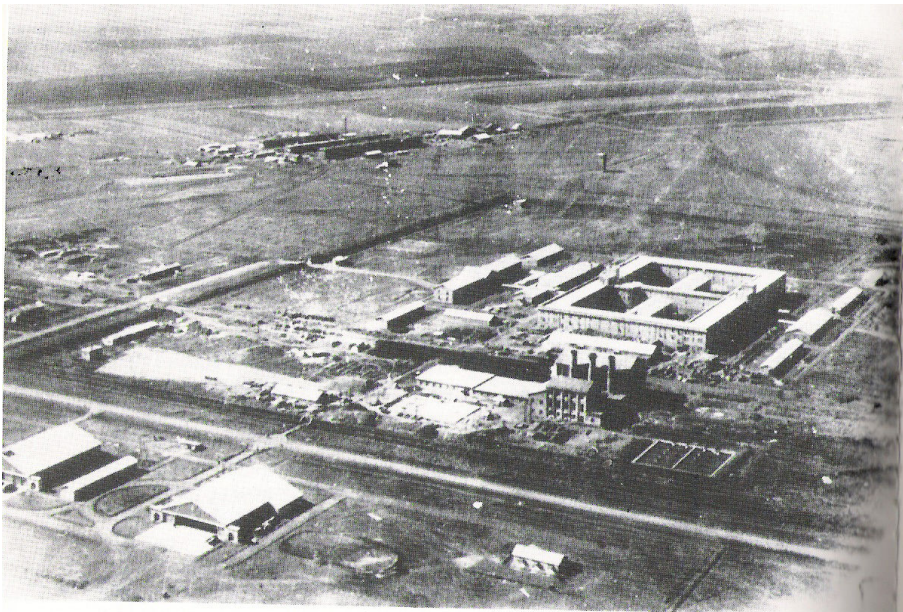
annuel de l'ordre d'un milliard de dollars et employa jusqu'à 65 000 personnes dans les années 1970. (Berche, 2006) Il permit la militarisation de huit agents biologiques (agents de la variole, de la peste, de la tularémie, de la morve, de l'encéphalite équine, du charbon, de la fièvre Q et du virus de Marburg) et la production de plusieurs tonnes d'agents infectieux. Les soviétiques débutèrent aussi, dans le centre d'Obolensk, des programmes de modifications génétiques afin d'augmenter la pathogénicité de plusieurs agents biologiques. (Berche, 2006; J. Miller, Engelberg, & Broad, 2001) Des projets, comme le *projet Bonfire* ou le *projet Factor* ont permis de modifier génétiquement certains agents tels que les bacilles du charbon et de la peste, pour les rendre plus résistants à la plupart des antibiotiques et aux écarts de température. Les soviétiques ont aussi essayé d'insérer des gènes codant pour des toxines dans des organismes commensaux non pathogènes comme *E. coli*. Le développement de tels programmes n'est pas sans risque, et des accidents ont rappelé le danger pour la population et les personnels. Ainsi, à Sverdlovsk (actuellement Yekaterinburg), en 1979, lors d'une opération de maintenance l'un des filtres du système d'aération du laboratoire où les spores du bacille du charbon étaient produites n'aurait pas été remis en place ce qui aurait provoqué la dissémination de ces spores sous forme d'aérosol, provoquant plusieurs décès. Suite à cet accident la dose létale médiane humaine du bacille du charbon par nébulisation a pu être estimée entre 8 000 et 10 000 spores. (Meselson *et al.*, 1994) La chute de l'Union Soviétique, en 1991, mit fin à ces programmes. Cependant deux problèmes majeurs se sont posés. Les stocks d'armes biologiques ont persisté pendant 11 ans jusqu'à l'annonce officielle de leur destruction en 2002, faisant craindre des vols. De plus, la fin du financement des programmes de recherche a aussi eu pour conséquence de laisser de nombreux scientifiques sans salaire, faisant redouter leur récupération par d'autres pays ou groupuscules développant des programmes de recherches illégaux. Afin de pallier à ce dernier problème, plusieurs programmes internationaux, ont été mis en place (*cf paragraphe "3.2.3) Les conventions de non prolifération des armes biologiques"*).

#### 3.2.2.3) Le programme japonais

Le programme japonais fut créé par mandat impérial en 1925 durant la guerre sino-japonaise, et le centre de recherche principal, baptisé unité 731, fut implanté en Mandchourie (Figure 57). Officiellement cette unité avait pour but "*la prévention des épidémies et la purification de l'eau*". Elle fut dirigée par le docteur Shiro ISHII (1892-1959) puis par Kitano

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

MISAJI (1894-1986) et rassemblait plus de 3 000 personnes. Plusieurs centaines de kilogrammes d'agents pathogènes tels que les bacilles de la peste, du charbon ou encore du choléra furent produits. Cette unité est tristement célèbre pour les expérimentations qu'elle réalisa dès 1932 sur l'Homme. Les agents pathogènes développés par l'unité 731 furent inoculés à des milliers de prisonniers chinois mais aussi dispersés dans l'environnement par épandage ou par l'utilisation de vecteurs biologiques tels que la puce. (Girdwood, 1985; Rich, 1995) On estime qu'entre 1940 et 1942, près de 12 essais d'épandage auraient été effectués sur des villes. Selon les travaux publiés en 2002 par le *Symposium International sur les Crimes de la Guerre Bactériologique*, l'utilisation de ces armes biologiques auraient fait plus de 580 000 morts. (Barenblatt, 2004) En 1942, le manque de contrôle des agents pathogènes se retourna contre les troupes japonaises elles même, faisant plus de 1 700 morts et stoppant les recherches sur le terrain. (Williams & Wallace, 1990) En 1945, suite à l'invasion de la Mandchourie par l'armée soviétique, la destruction de l'unité 731 fut ordonnée. Dès 1946, des négociations secrètes débutèrent entre les Etats-Unis d'Amérique, représentés par le général américain Douglas MacARTHUR (1880-1964), et l'unité 731, représentée par lieutenant-général Shiro ISHII. (Gold, 1996) L'accord qui en a résulté garantissait l'immunité de tous les membres de l'unité 731 lors du procès de Tokyo (1948) pour crime de guerre, en échange du transfert de l'ensemble des résultats de l'unité japonaise aux Américains.



**Figure 57 : Vue aérienne du complexe de l'unité 731.**

Photographie aérienne de l'unité 731 à Pingfang. Un musée sur les crimes de guerre a été établi dans l'un des bâtiments historiques. (Williams & Wallace, 1990)

### 3.2.2.4) Le programme américain

A partir de 1942, George Wilhelm Herman Emanuel MERCK (1894-1957) dirigea les 5 000 personnes du programme américain établi à Camp Detrick (actuel Fort-Detrick) et nomma Ira L. BALDWIN (1895-1999) directeur scientifique de ce programme. (Covert, 2000) Plusieurs milliers de bombes contenant le bacille du charbon ont été produites et la militarisation d'une cinquantaine d'agents viraux fut étudiée. Entre 1949 et 1968, des essais d'épandage d'aérosols contenant des agents biologiques habituellement considérés non pathogènes, comme *Bacillus subtilis*, *Bacillus globigii* ou encore *Serratia marcescens* auraient été effectués au dessus de villes américaines ou dans le métro de New-York afin de démontrer la vulnérabilité des Etats-Unis face à une attaque biologique. (Douglass, Joseph D Livingstone, 1987; Korn *et al.*, 2008; Mobley, 1995; SCRS, 1995) Entre 1949 et 1968, une centaine d'épidémies causées par ces organismes opportunistes a été constatée, et plusieurs procès ont alors été engagés. Cependant aucune correspondance n'a pu être formellement établie entre les souches détenues par l'armée et les souches isolées chez les malades. L'armée américaine a donc été disculpée et l'origine de ces épidémies demeure encore inconnue. En 2001 il a été révélé qu'entre 1954 et 1973, l'armée américaine avait exposé dans le cadre de l'opération *whitecoat* plus de 2 000 volontaires, appartenant tous à l'Eglise adventiste du 7<sup>ème</sup> jour, à différents agents biologiques. (Aaron, 2001) Comme cette religion interdit de boire de l'alcool ou du café et de fumer, les volontaires issus de cette communauté présentaient des conditions physiques optimales. La plupart des membres de cette communauté étant des objecteurs de consciences refusant la conscription dans l'armée, des essais biologiques leurs furent proposés par le gouvernement en alternative au service militaire. Les volontaires furent exposés aux bactéries de la fièvre Q, de la fièvre jaune, de la peste et de la tularémie ainsi qu'aux virus de l'hépatite A et de l'encéphalite équine Vénézuélienne avant d'être soignés, pour évaluer l'efficacité des différents traitements. Des vaccins induisant une protection vis à vis de divers agents du risque biologique provoqué ont aussi pu être testés sur plusieurs de ces personnes. (Snyder, 2003) Aucun décès n'a été déclaré parmi ces 2 000 personnes qui ont été suivies à long terme par l'armée américaine.

### 3.2.2.5) Le programme irakien

Le programme irakien a débuté plus tardivement, en 1979, et avait pour objectif l'obtention d'armes de destruction massive. Le programme fut principalement développé à

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

partir de 1985 par le docteur Rihab Rashid Taha AL-AZAWI (1957-), et devait permettre la militarisation d'agents pathogènes en cinq ans. Ces travaux étaient menés dans des usines, sous la couverture d'une production de nourriture pour poulets. Du matériel comme des fermenteurs ou des dessiccateurs, ainsi que des souches biologiques ont pu être légalement achetés par l'Irak auprès de firmes occidentales. En particulier, 24 agents pathogènes différents, dont les agents du botulisme, de la gangrène, de la brucellose et du charbon, avaient été acquis auprès de l'*American Type Culture Center*. Ce programme fut stoppé suite à la guerre du Golfe de 1991. Les rapports des inspecteurs mandatés par le conseil de sécurité des Nations-Unies et les révélations en 1995 du général Hussein KAMAL (1954-1996) ont permis d'estimer que 8 500 litres de bacille du charbon, 19 000 litres de toxine botulique et 2 200 litres d'aflatoxine avaient été produits et placés dans des dispositifs explosifs de diffusion. Parmi ces dispositifs, 157 bombes R-400 et 25 missiles *Scud* avaient été remplis avec trois agents différents. (Henderson, 1999; Trevan, 2004; UNSCOM, 1991; Zilinskas, 1997)

#### 3.2.2.6) Le programme anglais

Paul FILDES (1882-1971) dirigea le programme britannique qui débuta au cours de la seconde guerre mondiale, et était établi à Porton Down. Ce programme se focalisa plus particulièrement sur le bacille du charbon. En particulier, 5 millions de rations de nourriture pour bétail furent infectés par les spores de ce bacille. L'objectif, qui n'a jamais été mis en application, était d'infecter le cheptel allemand. Des essais de diffusion de spores de *Bacillus anthracis* à l'aide de bombes (*N-bombs*) ont été menés sur l'île de Gruinard et ont provoqué la contamination du sol pour plusieurs décennies. Seule une formolisation complète des terres permit la décontamination et la zone ne fut rendue librement accessible qu'en 1990. (Aldhous, 1990; Manchee, Broster, Stagg, & Hibbs, 1994) Les chercheurs britanniques ont aussi introduit la toxine botulique dans des grenades afin de permettre la contamination de personnes à la suite des blessures provoquées par leurs éclats (*cf paragraphe "4.5) Cas particulier des toxines botuliques comme agent du bioterrorisme"*). (Harris & Paxman, 2002)



### 3.2.2.7) Le programme sud-africain

Le programme sud-africain, officiellement de nature défensive, fut mené entre 1985 et 1994 (Korn *et al.*, 2008). Il était connu sous le nom de *Project Coast* et avait comme objectif la mise au point d'armes biologiques et chimiques, dans le cadre de l'apartheid. Plusieurs personnes l'ont dirigé, dont le général Constand VILJOEN (1933-) et le Dr Wouter BASSON (1950-). Compte tenu du fort soutien financier, politique et industriel dont disposait ce programme, un centre de recherche dédié put être établi à Roodeplaats. L'implication de quatre compagnies privées permit l'obtention légale d'agents biologiques sous couvert d'une utilisation industrielle. (Gould & Fold, 2003) Le but de ces recherches était de tuer ou stériliser sélectivement la population noire sud-africaine, par exemple en développant des molécules ciblant la mélanine. Plusieurs objets de la vie courante comme des cigarettes, tournevis, parapluies ou canettes de soda furent infectés avec des agents biologiques tel que *Bacillus anthracis*, mais on ignore si des personnes sont mortes à la suite de ce programme. La justice sud-africaine acquitta en 2002 le Dr Basson, mais en 2005 un recours devant la cour constitutionnelle autorisa à rejuger ce dernier pour crimes contre l'humanité.

### 3.2.3) Les conventions de non prolifération des armes biologiques

La communauté internationale a cherché à restreindre l'ampleur des projets visant, ouvertement ou sous couvert de recherches médicales, à développer des armes biologiques. Le traité de Genève du 17 juin 1925 est le premier protocole qui s'attacha à limiter l'utilisation des armes biologiques en temps de guerre. Il étendait l'interdiction d'utilisation d'agents chimiques d'un précédent protocole aux "*moyens de guerre bactériologique*". Parmi les principales limites de ce protocole, on peut noter qu'il interdisait uniquement l'utilisation des armes biologiques et non pas leur développement, et qu'il n'avait pas prévu la création d'un organisme pour contrôler son application. En outre, bien que présents à la conférence de Genève, plusieurs pays ne ratifièrent pas le protocole, et d'autres le ratifièrent en émettant certaines limites, comme la France, le Royaume-Unis, l'URSS ou le Canada. Une des principales réserves était que ce protocole ne devait s'appliquer uniquement qu'aux Etats signataires, et que son application devait être arrêtée si un Etat ennemi ou allié venait à ne pas le respecter. (Ronzitti, 1989; UNODA, 1987) Ces réserves perdureront de très nombreuses

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

années ; par exemple, la France ne les lèvera qu'en 1996 et le Canada qu'en 1999, alors que ces deux Etats avaient signé entre temps la convention de 1972. Actuellement, 25 des 134 Etats signataires formulent toujours des réserves, comme la Chine, la Syrie, Israël ou les Etats-Unis d'Amérique.

Des négociations menées sous l'égide de l'Organisation des Nations Unies, entamées lors de la Conférence du Comité de Désarmement de Genève de 1969 aboutirent le 10 avril 1972 à la signature par plusieurs Etats, d'une "*convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes à agents biologiques ou à toxines et sur leur destruction*". (Bureau des affaires du désarmement des Nations Unies, 1972) Ce traité va plus loin que la convention de Genève de 1925 puisque les Etats signataires "*s'engagent à ne jamais, et en aucune circonstance, mettre au point, fabriquer, stocker, ni acquérir d'une manière ou d'une autre ni conserver des agents microbiologiques ou autres agents biologiques, ainsi que des toxines [...], des armes, de l'équipement ou des vecteurs destinés à l'emploi de tels agents ou toxines à des fins hostiles ou dans des conflits armés*". Ce traité entra en vigueur dès le 26 mars 1975 et est à ce jour ratifié par 155 des 171 pays signataires. Cependant, il résulte de consensus difficilement obtenus entre les pays signataires, ce qui a pour conséquence de limiter le caractère contraignant de ce texte, qui ne prévoit pas de sanctions en cas de violation, par exemple.

Suite à la fin de la guerre froide et face à la montée du terrorisme, en 2004, le conseil de sécurité des Nations Unies adopta la résolution 1540 portant sur la "*prolifération des armes nucléaires, chimiques et biologiques*". Cette résolution vise à limiter le transfert de technologies entre un Etat et des "*acteurs non étatiques qui tendent à mettre au point [...] des armes biologiques*". Cette résolution sera rappelée en 2006 lors de la 6<sup>ème</sup> conférence sur la Convention d'Interdiction des Armes Biologiques et à Toxines. Fait nouveau, cette conférence n'a pas été restreinte aux Etats mais a été étendue à 33 Organisations Non Gouvernementales comme l'Organisation Mondiale de la Santé, l'Organisation Mondiale de la Santé Animale ou encore l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation. La dernière conférence sur la Convention d'Interdiction des Armes Biologiques et à Toxines s'est déroulée du 5 au 22 décembre 2011 à Genève et a regroupé 165 Etats, ainsi que l'Organisation Mondiale de la Santé. Parmi les objectifs prioritaires, il a été rappelé l'importance de l'adhésion à cette conférence des huit pays non membre, la ratification du précédent traité par les 12 Etats uniquement signataires et la nécessité de mettre en place une législation internationale. En l'absence d'une telle législation, la conférence a insisté pour que chaque



## Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

Etat mette en place des sanctions pénales pour faire appliquer sur leurs territoires respectifs les décisions déjà prises.

Il est intéressant de noter que certains pays ont pris conscience très tôt du danger que représentent les armes biologiques. La peur des représailles d'une autre puissance représente certainement la raison pour laquelle, durant la seconde guerre mondiale, aucune utilisation d'armes biologiques, ou même chimique, n'a été rapportée malgré le développement de plusieurs programmes. Pour l'Allemagne, cette absence peut aussi être expliquée selon certaines hypothèses par le fait qu'Adolf HITLER (1889-1945), avait lui même été victime du gaz moutarde alors qu'il était caporal pendant la première guerre mondiale. Cet incident lui aurait fait prendre conscience des difficultés à maîtriser de telles armes sur le champ de bataille. (Bernstein, 1985)

### **3.3) Classification actuelle des agents du risque biologique provoqué**

Il existe plusieurs classifications des agents biologiques. En 1949, Theodor ROSEBURY a proposé une liste de 11 critères importants pour qu'un agent biologique puisse être considéré comme pouvant servir à l'élaboration d'une arme biologique. (Buisson, Cavallo, Kowalski, Renaudeau, & Tréguier, 2004) L'agent biologique doit avoir :

- 1) un faible seuil infectieux,
- 2) une virulence forte avec la capacité de provoquer une maladie aiguë, mortelle ou incapacitante,
- 3) un pouvoir pathogène stable pendant la fabrication, le stockage et le transport ;
- 4) une période d'incubation courte,
- 5) une faible contagiosité pour éviter un retournement contre l'attaquant,
- 6) aucun vaccin ou immunité naturelle dans la population cible ne doit exister, mais il est nécessaire que des moyens de protection contre cet agent puisse être utilisés par les troupes du pays agresseur,
- 7) une résistance aux antibiotiques utilisés classiquement,
- 8) une capacité à supporter la nébulisation,
- 9) une capacité à résister dans l'environnement lors de la dispersion, et pendant un temps assez long pour infecter la population cible,

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

10) une capacité à être transporté facilement et à survivre lors du stockage et de la dispersion sur le champ de bataille,

11) un faible coût de production à grande échelle.

Cette classification est principalement basée sur une utilisation militaire des armes biologiques, mais plusieurs de ses critères peuvent s'appliquer dans le cadre du bioterrorisme.

Le groupe Australie est une instance informelle créée en 1985 à l'initiative de l'Australie, et qui regroupe aujourd'hui 41 pays dont la France. Chaque année, ses membres se réunissent à Paris dans le but d'harmoniser et d'optimiser les mesures existantes qui limitent la prolifération et l'exportation des armes biologiques. Dans ce cadre, le groupe Australie a proposé une liste exhaustive des agents considérés comme pouvant servir au développement d'armes biologiques et dont l'exportation est réglementée.

Actuellement, la classification qui sert de référence est certainement celle proposée par le *Center for Disease Control* (CDC) d'Atlanta, dans sa mise à jour de 2002. (Centers for Diseases Control and Prevention, 2013) Elle répartit les agents biologiques en trois catégories, A, B et C en fonction des cinq critères suivants :

- la facilité de dissémination,
- la transmission interhumaine,
- la mortalité,
- les conséquences en termes de santé publique et de perturbation sociale,
- les exigences en termes de diagnostic et de surveillance.

Les agents de la classe A sont ceux considérés comme les plus susceptibles d'être utilisés pour développer des armes biologiques. Certains ont d'ailleurs déjà été utilisés à des fins belliqueuses. Cette liste exhaustive comprend les six agents suivants :

- *Variola major* (agent de la variole)
- *Bacillus anthracis* (agent de la maladie du charbon)
- *Yersinia pestis* (agent de la peste)
- Toxines de *Clostridium botulinum* (agent du botulisme)
- *Francisella tularensis* (agent de la tularémie)
- *Filovirus* et *Arenavirus* (agents des fièvres hémorragiques virales)

Des traitements contre ces agents peuvent exister mais sont difficilement applicables à grande échelle ou ne sont pas totalement efficaces. La circulation et le stockage de ces agents

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

sont très strictement contrôlés au niveau international par différentes lois, et il est de la responsabilité des organismes nationaux de santé publique de s'assurer de leur application. L'ensemble de ces micro-organismes peut être rencontré naturellement, à l'exception de la variole qui est officiellement éradiquée depuis le 8 mai 1980. (Organisation Mondiale de la Santé, 1980) Compte tenu de leur dangerosité, les recherches sur ces agents sont strictement encadrées et le développement de contremesures médicales représente une priorité.

La classe B des agents biologiques du CDC regroupe les pathogènes pouvant être disséminés sans difficulté majeure, dont le taux de morbidité est modéré et le taux de mortalité est bas mais qui requièrent néanmoins une surveillance spécifique et des moyens de diagnostic efficaces. Cette classe regroupe entre autre *Brucella sp.* (Brucéllose), *Coxiella burnetti* (fièvre Q), *Ricinus communis* (ricine), *Vibrio cholerae* (choléra), *Chlamydia psittaci* (ornithose, psittacose), *E. coli* O 157:H7, la toxine epsilon de *Clostridium perfringens* ou encore les alphavirus (encéphalopathie équine).

La classe C regroupe principalement les pathogènes émergents qui pourraient être modifiés génétiquement en vue d'une dissémination massive compte tenu de i) leur accès facile ii) leur production et dissémination faciles iii) leur capacité à induire une forte morbidité et une forte mortalité. Parmi ces agents on peut citer les hantavirus, le virus Nipah, le virus de la fièvre jaune ou encore les agents des encéphalopathies virales.

L'ensemble des agents appartenant à ces trois catégories présente un risque d'utilisation en temps de guerre ou lors d'actes bioterroristes.

En France, par arrêté ministériel du 15 janvier 2004, la liste des agents considérés comme prioritaires inclut les agents de la classe A du CDC ainsi que l'entérotoxine B du staphylocoque, les saxitoxines, les agents de la brucellose, la toxine diphtérique ainsi que la ricine. (République française, 2012) En France, les agents biologiques sont classés par le code du travail en quatre catégories. Les expérimentations utilisant un micro-organisme appartenant à l'un de ces groupes doivent être réalisées dans le laboratoire de sécurité biologique de niveau correspondant, conformément au guide des bonnes pratiques de laboratoire. (République française, 2007)

#### 3.4) Les menaces actuelles

Les expériences japonaises ont montré le caractère imprévisible et imparfaitement maîtrisable des armes biologiques, qui rend difficile leur usage stratégique. Ainsi, face à ces

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

limites et à la mise en place de traités internationaux de régulation, beaucoup de pays ont renoncé à militariser les agents biologiques. Cependant, la fin de la guerre froide a complètement changé la physionomie des conflits mondiaux puisqu'actuellement les menaces ne correspondent plus à deux blocs "est/ouest" distincts, et ne sont plus forcément étatiques. La guerre du Golfe a dévoilé le potentiel de certains pays disposant de moyens technologiques et financiers limités, comme l'Irak, à militariser des agents biologiques. Toutefois la principale crainte à l'heure actuelle est celle liée à l'utilisation de tels agents par des groupuscules terroristes, qui produiraient ainsi un fort impact psychologique sur les Etats. (Danzig, 2012) Certaines armes biologiques peuvent en effet être décrites comme relativement simples, et dont le développement ne fait pas appel à des connaissances technologiques avancées. Elles sont d'ailleurs parfois appelées "armes nucléaires des pauvres".

Les agents biologiques ont déjà été utilisés à des fins terroristes. Durant l'été 1993, le bacille du charbon a été utilisé à plusieurs reprises par la secte japonaise Aum Shinrikyō. Entre juin et juillet, cette secte a essayé de disséminer pendant plusieurs jours des spores du bacille du charbon à partir du toit de leur quartier général situé dans le quartier de Kameido à Tokyo ([Figure 58](#)). (Keim *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2004) Cependant cette tentative s'est soldée par un échec, car les membres de la secte avaient dérobé dans un laboratoire japonais la souche vaccinale (34F2) du bacille du charbon, qui est non virulente. En juin 1993, ces mêmes terroristes avaient tenté de disséminer cette souche vers le palais impérial et des bâtiments officiels, à partir de dispositifs de nébulisation placés sur des camions circulant dans la ville. Néanmoins, les filtres de ces systèmes s'étaient rapidement obstrués, rendant impossible la nébulisation de grandes quantités de spores. (Croddy & Wirtz, 2005; MIIS, 2001)

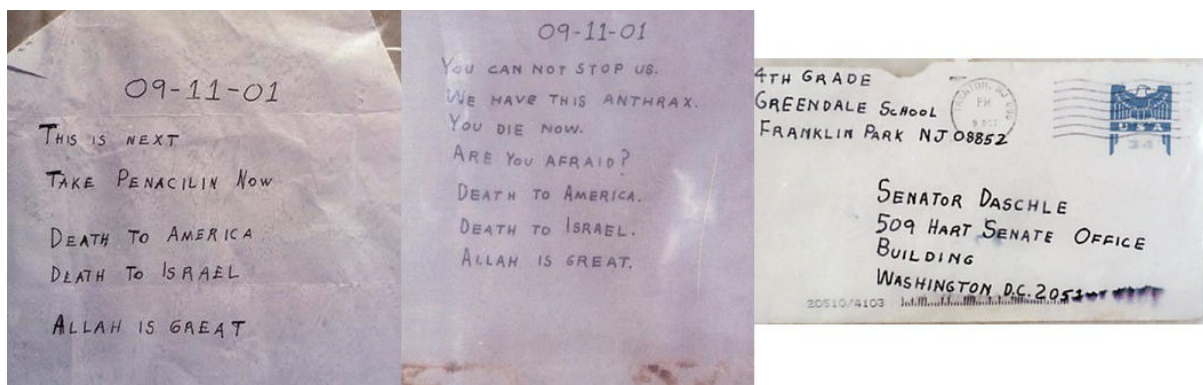
### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué



**Figure 58 : Photographie du dispositif de dispersion des spores du bacille du charbon utilisé par la secte Aum Shinrikyō.**

Ce dispositif était placé sur un toit du quartier général de la secte Aum Shinrikyō dans le quartier de Kameido à Tokyo. (Takahashi *et al.*, 2004)

En 2001, des lettres avaient été contaminées par les spores du bacille du charbon et envoyées sur le territoire des Etats-Unis d'Amérique, infectant 11 personnes et faisant cinq morts malgré la mise en place d'un traitement dans des conditions optimales (Figure 59). (Baggett *et al.*, 2005; Inglesby *et al.*, 2002; McCarthy, 2001; G. Schmid & Kaufmann, 2002) Bruce IVINS (1946-2008) est considéré selon le FBI (*Federal Bureau of Investigation*, Bureau Fédéral d'Investigation) comme l'auteur de ces attentats, mais il s'est suicidé avant son procès, laissant plusieurs questions sans réponses. Ce chercheur travaillait au laboratoire de sécurité biologique de Fort Detrick, où il aurait dérobé les spores de *B. anthracis*. (Baggett *et al.*, 2005; Inglesby *et al.*, 2002; Robinson, Matson, & Pace, 1991) Comme il était vacciné contre le bacille du charbon, il pouvait manipuler les spores avec une sécurité relative. Le séquençage de la souche utilisée pour cet attentat a mis en évidence qu'elle était identique à celle détenue à Fort Detrick par ce chercheur, prouvant sa culpabilité.



**Figure 59 : Photographie des lettres contaminées par le bacille du charbon, envoyées en 2001 aux Etats-Unis d'Amérique.**

Les enveloppes contenaient une lettre et des spores du bacille du charbon. Ces enveloppes ont été envoyées à différentes personnalités américaine, comme ici un sénateur. (G. Schmid & Kaufmann, 2002)



### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

Ces deux actes montrent que l'utilisation d'armes biologiques est possible même pour un individu seul, si celui-ci est suffisamment compétent, ou pour une secte disposant de moyens financiers, techniques et scientifiques suffisants. Certains agents biologiques semblent aussi plus appropriés pour un usage terroriste. Par exemple, la ricine (Schep, Temple, Butt, & Beasley, 2009) pourrait être préférentiellement utilisée compte tenu de son extraction facile (Abdel-Aziz, 1996) à partir des graines de *Ricinus communis*, qui contiennent de 1 à 10 % de ricine. La  $DL_{50}$  serait de 3 à 20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  par voie parentale et pulmonaire (Bradberry, Dickers, Rice, Griffiths, & Vale, 2003), et de 1  $\text{mg.kg}^{-1}$  par voie orale (Rauber & Heard, 1985), chez l'adulte. La culture de *Ricinus communis* est facile dans les zones tempérées et subtropicales, où elle est d'ailleurs utilisée comme plante ornementale (Figure 60). L'huile de ricin est produite en grande quantité (1 million de tonnes par an) puisqu'elle peut être utilisée comme lubrifiant, ou comme additif dans de nombreux produits chimiques. (Pina, Severino, Beltrão, Villeneuve, & Lago, 2005) Cette toxine a d'ailleurs été utilisée à plusieurs reprises par le KGB (*Komitet Gossoudarstvennoï Bezopasnosti*, Comité pour la Sécurité de l'État) et plusieurs services secrets. L'exemple le plus connu de son utilisation est celui de l'assassinat de Georgi MARKOV (1929-1978) en 1978 à Londres suite à l'injection d'une bille creuse contenant de la ricine, à l'aide d'un système à air comprimé camouflé dans un parapluie ("parapluie bulgare"). (Papaloucas, Papaloucas, & Stergioulas, 2008) Plus récemment, le 8 avril 2013 trois lettres contaminées par la ricine ont été envoyées à des hauts dignitaires américains, dont le président des Etats-Unis d'Amérique.



**Figure 60 : Photographie d'un plan de *Ricinus communis* et de ses graines.**  
A) Plan de *Ricinus communis*. B) Graine de ricine. (C. Meyer, 2013)

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

La chute de l'URSS, le 26 décembre 1991, a eu un impact notable sur le risque bioterroriste. En effet de nombreux biologistes, principalement issus du programme Biopreparat, se sont retrouvés sans emploi, faisant craindre qu'ils ne s'établissent dans des pays en guerre ou revendent des agents biologiques. Pour limiter ce risque, des organismes comme l'*International Science and Technology Center* (ISTC, 1992) ou l'INTAS (CORDIS, 1993) dépensent des millions d'euros dans des programmes permettant de les employer.

Depuis les années 1970, l'avancée rapide des technologies cellulaires et moléculaires peut faire craindre la génération et la diffusion d'organismes pathogènes génétiquement modifiés, qui pourraient former une deuxième génération d'armes biologiques. (Berche, 2006) Les travaux menés dès les années 1980 par les soviétiques ont démontré la possibilité de telles modifications, pour par exemple rendre les agents biologiques plus résistants aux antibiotiques et aux écarts de températures (*cf paragraphe "3.2.2.2) Le programme soviétique"*). D'autre part, en 2002, après trois ans de recherche, l'équipe du Pr Wimmer est arrivé pour la première fois à synthétiser entièrement *in vitro* un agent pathogène, le virus de la poliomyélite. (Cello, Paul, & Wimmer, 2002) En 2003, l'équipe du Pr Venter a réussi en seulement deux semaines à synthétiser *in vitro* le phage X174, dont le génome est de 5 kb. (Cello *et al.*, 2002; H. O. Smith, Hutchison, Pfannkoch, & Venter, 2003) Ces résultats sont inquiétants car il serait possible de tirer parti de la mise à disposition sur internet du génome de nombreux agents pathogènes, comme par exemple celui de la variole ou de ceux de 200 souches de différents virus de la grippe, pour synthétiser des génomes d'agents biologiques qui pourraient être utilisés à des fins bioterroristes. (Ghedin *et al.*, 2005; Massung *et al.*, 1994; Taubenberger *et al.*, 2005) Une autre technique, appelée "technique d'évolution dirigée par élevage moléculaire" (aussi connue par son anglicisme de *DNA shuffling*), permet en peu de temps d'obtenir des agents biologiques aux propriétés nouvelles et potentiellement pathogènes. Cette technique est basée sur le "découpage" en petit fragments de gènes très proches et en leur réassociation au hasard. Des étapes de sélection *in vitro* permettent ensuite de sélectionner de nouveaux agents biologiques. (Stemmer, Cramer, Ha, Brennan, & Heyneker, 1995; Stemmer, 1994a, 1994b) Cette technique a, par exemple, permis de générer une nouvelle souche d'*E. coli* 32 000 fois plus résistante aux antibiotiques que sa souche parentale, ou encore d'obtenir des virus possédant un nouveau tropisme. (Pekrun *et al.*, 2002; Powell *et al.*, 2000; Soong *et al.*, 2000) Une troisième génération d'armes biologiques, correspondant à des agents biologiques totalement synthétiques, est donc à craindre bien que les compétences et les outils nécessaires à la mise au point de tels agents rendent peu probable leur production par des groupes terroristes. Actuellement, aucun rapport ne décrit l'usage



### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

d'organismes génétiquement modifiés bien que des programmes aient été initiés, dont ceux réalisés dans le cadre du programme Biopreparat.

Comme dans le cas de la publication des séquences génomiques, la publication d'autres résultats scientifiques peut également être inquiétante. (Atlas *et al.*, 2003; Check, 2005; "Risks and benefits of dual-use research.", 2005) Parmi les travaux controversés, plusieurs équipes se sont aussi intéressées au virus H1N1 de la grippe espagnole de 1918, qui avait causé la mort de 20 à 50 millions de personnes. Par exemple, une équipe a construit des virus chimériques en introduisant les gènes l'hémagglutinine du virus de 1918 dans des virus de la grippe actuelle. Ces virus, initialement non pathogènes pour la souris, sont devenus virulents pour ces animaux. (Kobasa *et al.*, 2004) D'autres équipes ont reconstruit complètement le virus de la grippe espagnole à partir de l'ARN viral retrouvé dans les cadavres de personnes mortes de la grippe espagnole. (Sheng *et al.*, 2011; Taubenberger *et al.*, 2012; Tumpey *et al.*, 2005) Ces travaux ont permis de approfondir les connaissances sur les mécanismes ayant rendu cette épidémie aussi meurtrière, en constatant par exemple que le virus inhibait l'activité du gène RIG-1 impliqué dans la réponse immunitaire. Néanmoins la reconstruction de ce virus extrêmement pathogène a divisé la communauté scientifique, compte tenu du risque de sa dissémination dans l'environnement. En 2005, la parution d'un article décrivant comment la chaîne de commercialisation du lait pouvait être contaminée délibérément par la toxine botulique, et l'impact que produirait une telle contamination, avait soulevé de nombreuses inquiétudes (*cf paragraphe "4.5) Cas particulier des toxines botuliques comme agent du bioterrorisme"*). (Wein & Liu, 2005) La publication de cet article fut d'abord interdite avant d'être autorisée, mais précédée d'un commentaire du Président de l'Académie des Sciences des Etats-Unis d'Amérique. (Alberts, 2005)

Dès 1973, des scientifiques avaient demandé la création d'un moratoire sur le danger des études sur les manipulations génétiques. Une conférence sur ce sujet s'est tenue en 1975 à Asilomar en Californie, mais aucune décision claire n'a été prise. Plus récemment, fin 2011, la question de la censure ou de la diffusion restreinte d'articles scientifiques pouvant servir à des actes terroristes a été reposée. En effet des travaux parallèles de l'équipe américaine du professeur Yoshihiro KAWAOKA, soumis au journal Nature, et de l'équipe néerlandaise de Ron FOUCHIER, soumis au journal Science, décrivaient la génération d'un virus mutant de la grippe H5N1 qui pourrait induire une mortalité de 60 % chez les mammifères. Le principe de précaution s'est appliqué et ces publications n'ont pas été publiées dans un premier temps, mais l'Organisation Mondiale de la Santé et l'Office américain chargé de la biosécurité (*National Science Advisory Board for Biosecurity, NSABB*) ont finalement retiré leurs

### Partie 3 : Le Risque Biologique Provoqué

réserve et autorisé leurs publications. (Fouchier, García-Sastre, & Kawaoka, 2013; Yong, 2012) La confusion qui a régné face à ces différents cas montre l'absence de consensus internationaux clairs concernant la diffusion de résultats scientifiques, dont l'utilisation peut être ambivalente.



*Partie 4 :*  
*Le botulisme*

## 4) Le botulisme

### 4.1) Généralité

#### 4.1.1) Présentation générale du botulisme

Le botulisme est une intoxication actuellement rare, causée par sept sérotypes de neurotoxines (A, B, C, D, E, F et G) sécrétées par différentes espèces de *Clostridium*. (Lacy & Stevens, 1999; Middlebrook & Franz, 1997; J.-C. Zhang, Sun, & Nie, 2010) L'ensemble de ces sérotypes est toxique pour les primates non-humains, mais les sérotypes A, B et E sont à l'origine de la grande majorité des intoxications humaines naturelles. (Fillo *et al.*, 2011; T. J. Smith *et al.*, 2005) La toxine botulique A (BoNT/A) est la substance la plus toxique pour l'Homme connue à ce jour, avec une DL<sub>50</sub> environ estimée de 1 à 10 ng.kg<sup>-1</sup> par voie intraveineuse, sous-cutanée, intra-musculaire et intra-péritonéale, de 10 à 21 ng.kg<sup>-1</sup> par voie pulmonaire, et à 1 µg.kg<sup>-1</sup> par voie orale. (S. S. Arnon, 2001; Gelzleichter *et al.*, 1999; Gill, 1982; A. B. Scott & Suzuki, 1988; Taysse *et al.*, 2005; Wein & Liu, 2005)

Le botulisme est une affection neurologique aiguë et non fébrile, principalement caractérisée par une paralysie flasque descendante induite par l'inhibition de l'exocytose des vésicules d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires. Le traitement du botulisme dure plusieurs mois et peut nécessiter de placer le patient sous ventilation mécanique intensive (de un à sept mois) afin de pallier la défaillance des muscles du système respiratoire. (Prevention, 1998; J.-C. Zhang *et al.*, 2010) La durée d'incubation et la gravité des symptômes sont corrélées à la taille de l'inoculum, et au sérotype de neurotoxine impliquée.

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et du Botulisme en France est dirigé par le Pr. Michel POPOFF, à l'Institut Pasteur de Paris. Ce centre a un rôle d'observatoire des cas de botulisme au niveau national, un rôle de conseil auprès des institutions de santé, ainsi qu'un rôle d'aide et de confirmation du diagnostic clinique à partir d'échantillons suspects.

#### 4.1.2) Découverte du botulisme

Le botulisme est suspecté d'affecter l'Homme depuis son apparition, mais le nombre de cas a augmenté depuis que l'Homme a cherché à conserver la nourriture (Erbguth, 2008; J.-C.

## Partie 4 : Le botulisme

Zhang *et al.*, 2010). Ce n'est qu'au 18<sup>ème</sup> siècle que le premier cas de botulisme alimentaire a été décrit dans la littérature scientifique. En effet, à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle, les guerres napoléoniennes avaient laissé l'Europe dans une situation de grande pauvreté, les populations délaissant les précautions d'hygiène fondamentales pour essayer de mieux subvenir à leurs besoins alimentaires. Plusieurs cas d'empoisonnements dus à la consommation de viande ou de boudin en milieu rural ont alors été rapportés dans un ancien duché de l'Empire allemand, le royaume de Wurtemberg. La recrudescence de ces intoxications a mené le Gouvernement Royal de Stuttgart à publier en 1802 une note publique d'avertissement, visant à informer la population du risque lié à la consommation de "saucisses de sang" fumées. De nouveau, en 1811, un nouvel avertissement a été lancé, car ces aliments étaient suspectés de contenir de l'acide prussique (cyanure d'hydrogène, HCN). Afin d'éclaircir la cause des empoisonnements qui frappaient la population, une large enquête a été menée auprès des médecins afin de centraliser et d'analyser leurs rapports sur les cas liés à l'ingestion de nourriture contaminée.

La cause de la maladie a été mieux comprise en 1817. Bien qu'il n'ait jamais réussi à produire la toxine botulique, qu'il nommait acide gras toxique, Justinus Christian KERNER (1786-1862), un médecin allemand, contesta l'origine inorganique du botulisme. Dès 1820, en s'appuyant sur l'étude de 76 rapports médicaux, Kerner a publié le tableau clinique de la maladie dans un traité intitulé *"nouvelles observations concernant la substance empoisonnée qui apparaît si fréquemment en Wurtemberg à la suite d'une consommation de saucisses fumées"*. Puis, en 1822, il réalisa un rapport (*"le poison gras ou l'acide gras et ses effet sur le système du corps animal, une contribution à l'étude de la substance responsable de la toxicité des saucisses avariées"*) portant à la fois sur l'étude des 155 victimes atteintes de la maladie et sur ses propres expérimentations, menées chez des animaux qu'il avait nourri avec des saucisses contaminées. Ce traité est d'une importance capitale dans l'histoire de la compréhension du botulisme car, pour la première fois, une description précise de la maladie a été réalisée. Cette publication de 1820 détaillait l'intégralité des symptômes musculaires, mais aussi des autres signes cliniques présentés par les personnes atteintes de botulisme. Ces observations ont permis à Kerner de déduire que "l'acide gras toxique" agit à très faible dose en bloquant la transmission du signal nerveux au niveau des nerfs moteurs, mais aussi au niveau du système nerveux autonome. Précurseur, il a même suggéré que d'infimes doses de "l'acide gras toxique" pourraient être utilisées afin de soigner certaines pathologies du système nerveux caractérisées par un état hyperactif, tout en pondérant cette idée par la nécessité d'une meilleure caractérisation de cet agent. On peut noter que le terme de botulisme ne sera

## Partie 4 : Le botulisme

introduit qu'en 1870 par John MÜLLER, un médecin allemand, et que son étymologie est fondée sur le mot latin *botulus*, signifiant saucisse. (Torrens, 1998)

Plusieurs années plus tard, le 15 décembre 1895 à Ellezelles en Belgique, au lendemain d'un repas de funérailles, 34 des convives ont présenté des troubles oculaires, des faiblesses généralisées, des essoufflements, des dysphagies, des troubles de l'élocution et dans quelques cas des rétentions urinaires et constipations. En moins de deux semaines, 13 convives décédèrent. Emile Pierre Marie Van ERMENGEM (1851-1932), un ancien collaborateur de Robert KOCH, fut chargé de l'investigation médicale. Il étudia les tableaux cliniques, toxicologiques et bactériologiques et suspecta rapidement un jambon servi durant le dîner. L'analyse de ce jambon a mis en évidence la présence des mêmes bactéries que celles retrouvées dans le corps des victimes. A la suite d'expériences où des fragments de jambon ont été injectés ou donnés comme nourriture à des animaux, Van Ermengem conclut qu'il "était très probable que le poison dans le jambon ait été produit par un microorganisme anaérobique durant le processus de salaison". En 1897 il nomma le bacille identifié *Bacillus botulinum* en référence aux cas observés en Allemagne à la suite de la consommation de saucisses. En 1923, David Hendricks BERGEY (1860-1937) a rattaché le pathogène au genre *Clostridium*.

Il a fallu attendre 1928 pour que P. Tessmer SNIPE et Harmann SOMMER parviennent à purifier la toxine botulique. (Tessmer Snipe & Sommer, 1928) La mise en évidence de l'action de la toxine botulique au niveau des jonctions neuromusculaire sera formellement démontrée en 1949 par l'équipe d'Arnold BURGEM. (Burgem, Dickens, & Zatman, 1949)

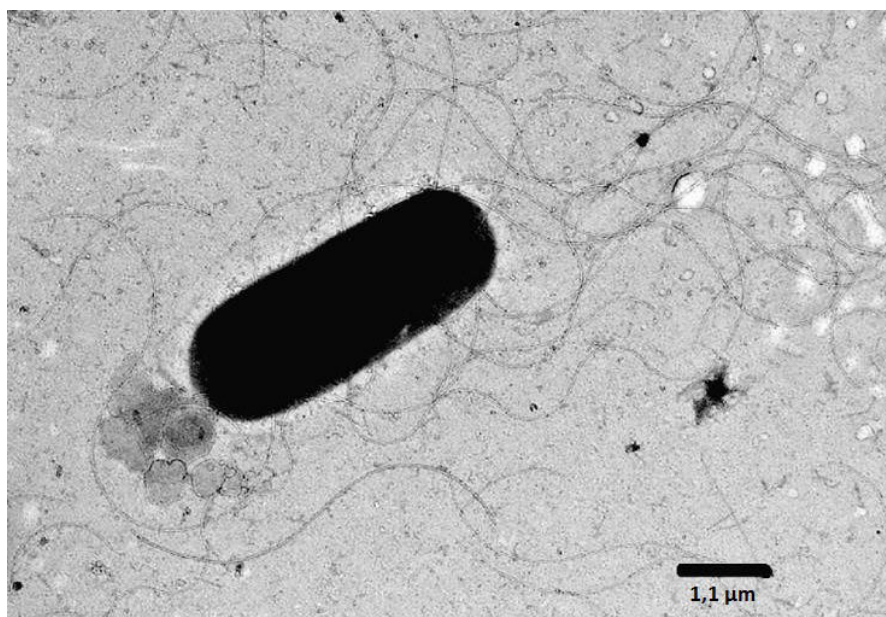
### 4.2) Le pathogène : *Clostridium botulinum*

Les toxines botuliques sont majoritairement sécrétées par *Clostridium botulinum* et plus accessoirement par *C. baratii* et *C. butyricum*. Ces bactéries sont des bacilles Gram positif, sporulantes, strictement anaérobies, d'une taille d'approximativement 0,3 à 1,3 x 3 à 10 µm et disposant de flagelles péritriches (Figure 61). Les bacilles sont généralement isolés mais ils peuvent aussi être associés en courtes chainettes. (Lindström & Korkeala, 2006; Paul *et al.*, 2007; J.-C. Zhang *et al.*, 2010) Les spores présentent une résistance exceptionnelle puisqu'elles ne sont pas inactivées par : des températures comprises entre 3°C et 121°C, des pH compris entre 4,6 et 9, des concentrations de 5 à 10 % de NaCl (Lindström & Korkeala,



## Partie 4 : Le botulisme

2006), une concentration de 5 mg.ml<sup>-1</sup> de chlore dans l'eau (Wannemacher, Dinterman, Thompson, & Schmidt, 1993), une dose d'UV de 5000 erg.mm<sup>2</sup> ou encore une dose de 1600 krad de rayons gamma (Denis, Dai, & Hamblin, 2013; Durban & Grecz, 1969).



**Figure 61 : Observation au microscope électronique à transmission de la souche FE0507BLP de *Clostridium botulinum*.**

La bactérie est marquée négativement. Les flagelles péritriches apparaissent en gris foncé. D'après Paul *et al* (Paul *et al.*, 2007).

### 4.2.1) Diversité et classification

#### 4.2.1.1) Classification physiologique historique

En fonction des températures optimales de croissance et de la sécrétion préférentielle des toxines de certains sérotypes, les clostridies ont été réparties en cinq groupes, tous potentiellement pathogènes pour l'Homme (Tableau 7). Quatre de ces groupes (I à IV) regroupent des souches différentes de *Clostridium botulinum* et de quelques espèces rares de clostridies, et le groupe V regroupe les espèces *C. baratii* et *C. butyricum*. L'ensemble de ces cinq groupes se différencie par leur activité protéolytique, en l'occurrence par la capacité des bactéries à cliver certaines protéines (lait ou œuf par exemple dans les tests biochimiques historiques), par leurs températures de croissance ainsi que par d'autres caractéristiques microbiologiques (Tableau 7). (Hatheway, 1990; Peck, 2009; J.-C. Zhang *et al.*, 2010)

Il est actuellement proposé que toutes les souches sécrétant la toxine botulique (BoNT) du sérotype A (BoNT/A) soient rattachées au groupe I, qui inclut également les souches protéolytiques sécrétant BoNT/B et F. La température optimale de croissance des souches du

## Partie 4 : Le botulisme

groupe I est comprise entre 35 et 40 °C, favorisant une multiplication optimale dans le corps humain. Les spores produites par les bactéries de ce groupe sont les plus résistantes puisqu'elles peuvent survivre plusieurs secondes à 121°C.

Les souches du groupe II sont non protéolytiques et sécrètent BoNT/B, E et F. Leur température optimale de croissance est comprise entre 18 et 25 °C, et donc leur capacité à se multiplier dans l'organisme humain est limitée. Néanmoins, les bactéries appartenant à ce groupe présentent la caractéristique de pouvoir continuer à se développer à basse température (jusqu'à 3,3 °C), donc un aliment contaminé par une souche de ce groupe représente un risque pour la santé même s'il est conservé au réfrigérateur.

Les souches du groupe III ont une activité protéolytique faible voire nulle et sécrètent les sérotypes C et D. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37 et 40 °C et ces souches peuvent donc, tout comme celles du groupe I, se multiplier de façon optimale chez l'Homme.

Les souches du groupe IV sont protéolytiques. Elles comprennent *C. botulinum* et, depuis 1978, *C. argentinense*. Ces bactéries protéolytiques sécrètent uniquement BoNT/G, et leur température optimale de croissance est comprise entre 25 et 45 °C.

Finalement, le groupe V regroupe les souches rares de *C. baratii* et *C. butyricum*. Les souches de *C. baratii* sécrètent BoNT/F et leur température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C. Les souches de *C. butyricum* sécrètent le sérotype BoNT/E et elles se développent préférentiellement entre 30 et 45 °C.

Clostridie	Neurotoxines sécrétées	Température de croissance		pH minimal de croissance	Résistance des spores à la chaleur (D-Value)	[NaCl] maximale pour la croissance
		Optimale	Minimale			
<i>C. botulinum</i> groupe I	A, B, F	35-40°C	12°C	4,6	D <sub>121</sub> = 1 s à 1,48 min	10%
<i>C. botulinum</i> groupe II	B, E, F	18-25°C	3,3°C	5	D <sub>85</sub> = 1 à 98 min	5%
<i>C. botulinum</i> groupe III	C, D	37-40°C	15°C	5,1	D <sub>104</sub> = 0,9 min	ND
<i>C. botulinum</i> groupe IV + <i>C. argentinense</i>	G	25-45°C	ND	ND	D <sub>104</sub> = 1,1 min	6,50%
<i>C. baratii</i> groupe V	F	30-37°C	ND	ND	ND	ND
<i>C. butyricum</i> groupe V	E	30-45°C	10°C	4,8	D <sub>100</sub> < 1 seconde	ND

Clostridie	Neurotoxine protéolytique	Production de		Fermentation des carbohydrates	Hydrolise de la gélatine	Digestion de la caséine
		Lechitinase	Lipase			
<i>C. botulinum</i> groupe I	oui	non	oui	oui	oui	oui
<i>C. botulinum</i> groupe II	non	non	oui	oui	oui	non
<i>C. botulinum</i> groupe III	Peu ou pas	oui	oui	oui	oui	faible
<i>C. botulinum</i> groupe IV + <i>C. argentinense</i>	oui	non	non	non	oui	oui
<i>C. baratii</i> groupe V	ND	oui	non	oui	non	non
<i>C. butyricum</i> groupe V	ND	non	non	oui	non	non

**Tableau 7 : Caractéristiques biochimiques et physiologiques principales différenciant les cinq groupes de clostridies.**

La D-Value correspond au temps nécessaire à la température indiquée pour détruire 90 % des spores. (Hatheway, 1990; Peck, 2009; J.-C. Zhang *et al.*, 2010).

#### 4.2.1.2) Classification génétique actuelle

Le principe sur lequel repose la classification physiologique présentée ci-dessus est critiquable au vu des nouvelles techniques biomoléculaires, permettant une caractérisation des espèces beaucoup plus précise. Il a été démontré que l'ADN codant les toxines BoNT/A, B, E et F fait partie du génome de la bactérie, l'ADN codant BoNT/C et D est intégré à un ADN phagemidique et l'ADN codant BoNT/G est situé dans un opéron plasmidique. (Hill *et al.*, 2007; Popoff & Marvaud, 1999) Si l'on compare les séquences protéiques des toxines des sept sérotypes, celles-ci peuvent présenter jusqu'à 70 % de différences au niveau de l'holotoxine et jusqu'à 61 % de différences au niveau des chaînes légères, qui portent le domaine catalytique (Tableau 8). (T. J. Smith *et al.*, 2005) A l'intérieur de chaque sérotype, des variations dans les séquences peptidiques de 1 à 31,6 % ont été observées. Ces variations sont à l'origine de la création de sous-types pour au moins six des sept sérotypes, seule la toxine du sérotype G ne comporte actuellement aucun sous-type (Tableau 9). Smith *et al.* (T. J. Smith *et al.*, 2005) proposent de considérer une toxine comme appartenant à un sous-type distinct si sa séquence en acides aminés présente au moins 2,6 % de différence par rapport aux séquences des sous-types existants. Ces différences permettent de comprendre la difficulté à neutraliser efficacement l'ensemble des sous-types d'un même sérotype avec un seul anticorps. Plusieurs études descriptives des sérotypes et des sous-types de toxines sont actuellement proposées, mais aucune analyse n'a étudié de façon exhaustive l'ensemble des souches sécrétant les sept sérotypes de toxine. Les sérotypes A, B, E, et dans une moindre mesure F étant à l'origine des cas humains, ils ont été les plus étudiés. Actuellement, l'étude de Hill *et al.* (Hill *et al.*, 2007) est certainement la plus détaillée pour les sérotypes A, B et E, et peut être considérée comme la classification de référence pour ces trois sérotypes.

Sérotypes de la chaîne légère	A	B	C	D	E	F	G
A		31	33	34	34	34	35
B			33	33	37	38	59
C				56	35	35	35
D					36	36	36
E						58	38
F							40
G							

Tableau 8 : Pourcentage d'homologie moyen entre les chaînes légères des sept sérotypes de toxines botuliques.

Tiré de Lebeda *et al.* (Frank J Lebeda *et al.*, 2010).

## Partie 4 : Le botulisme

Sérotypes	Pourcentage minimal et maximal de différences au niveau des acides aminés dans le sérotype	Nombre de sous-types actuellement décrits
A	2,1 à 16 %	5
B	2 à 7 %	7
C	24 % à 24,2 %	3
D	23,7 % à 23,9 %	2
E	1 à 5 %	5
F	10,7 % à 31,6 %	7
G	Pas de sous-type décrit	0

**Tableau 9 : Variation de la séquence en acides aminés au sein de chaque sérotype de toxine botulique.**

Selon les sources des souches bivalentes peuvent être considérées ou non comme un sous-type particulier. Adapté de (Hill *et al.*, 2007; Jacobson *et al.*, 2011; Raphael, Choudoir, Lúquez, Fernández, & Maslanka, 2010; T. J. Smith *et al.*, 2005)

L'analyse de 60 souches sécrétant BoNT/A par Hill *et al.* (Hill *et al.*, 2007) a mis en évidence l'existence de quatre sous-types. Selon cette étude, les sous-types A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> sont majoritaires puisqu'ils regroupent respectivement 54 et 4 souches, les sous-types A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub> sont eux minoritaires puisqu'ils ne sont représentés que par une seule souche chacun. Le pourcentage d'identité au niveau protéique entre ces quatre sous-types varie de 84 à 93 %, et les sous-types A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub> apparaissent éloignés des sous-types A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>. Une étude de 2009 a identifié un nouveau sous-type, A<sub>5</sub>, à partir de souches isolées chez quatre personnes atteintes de botulisme par colonisation de plaies datant de 2004. (A. T. Carter *et al.*, 2009) Ce sous-type est sécrété par cinq souches ce qui en ferait un sous-type majoritaire, et il présente 97,1 % d'identité protéique avec BoNT/A<sub>1</sub>. (Jacobson *et al.*, 2011) L'étude du génome d'une souche sécrétant BoNT/A<sub>5</sub> isolée à partir d'un enfant atteint de botulisme a mis en évidence des réarrangements génétiques avec le sérotype B. (Dover, Barash, & Arnon, 2009) Les souches Ba, Ab, et Af sont des souches bivalentes qui peuvent sécréter deux sérotypes, mais la sécrétion de la toxine d'un des deux sérotypes est prédominante, la toxine majoritairement produit étant représentée par la lettre en majuscule. Le rapport de sécrétion peut varier de 10/1 à 10 000/1. (Fernández, Ciccarelli, Arenas, & Giménez, 1986; Franciosa, Fencia, Pourshaban, & Aureli, 1997)

L'analyse de 60 souches sécrétant BoNT/B par Hill *et al.* (Hill *et al.*, 2007) a mis en évidence l'existence de cinq sous-types. Les sous-types B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> sont majoritaires puisqu'ils regroupent respectivement 16 et 32 souches. Les sous-types B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> (B non protéolytique) et B<sub>5</sub> (B exprimé de façon bivalente avec A) sont minoritaires puisqu'ils regroupent respectivement une, cinq et huit souches. Le pourcentage d'identité de ces toxines au niveau

## Partie 4 : Le botulisme

protéique varie de 93 à 98 %. Des études plus récentes ont identifié de nouveaux sous-types B<sub>6</sub> et B<sub>7</sub>. (Kalb *et al.*, 2012; Umeda, Seto, Kohda, Mukamoto, & Kozaki, 2009)

L'étude de 36 souches sécrétant BoNT/E par Hill *et al* (Hill *et al.*, 2007) a mis en évidence cinq sous-types, de E<sub>1</sub> à E<sub>5</sub>. Cependant aucun des cinq sous-types ne peut être considéré comme majoritaire, car l'ensemble des souches est réparti équitablement entre chacun des cinq sous-types. Le pourcentage d'identité entre ces cinq sous-types varie entre 95 et 99 %.

Actuellement sept sous-types de BoNT/F (F<sub>1</sub> à F<sub>7</sub>) sont décrits. Les sous-types F<sub>1</sub> à F<sub>5</sub> correspondent à des souches de *C. botulinum* du groupe I, le sous-type F<sub>6</sub> correspond aux souches de *C. botulinum* du groupe II et le sous-type F<sub>7</sub> à des souches de *C. baratii*. Les souches bivalentes Af sécrètent des toxines des sous-types F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub> alors que la souche bivalente Bf ne sécrète que le sous-type F<sub>2</sub>. (Raphael *et al.*, 2010)

Trois sous-types de BoNT/C (C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub>) ont été décrits et il a été observé que certaines souches contenaient des gènes mosaïques CD et DC. En plus de ces deux gènes mosaïques, il existe deux sous-types de BoNT/D. Aucun sous-type de BoNT/G n'a été décrit et ce sérotype présente environ 58 % d'identité avec le sérotype BoNT/B. (Campbell, Collins, & East, 1993) Une toxine du sérotype G a été détectée dans le corps de personnes décédées, sans que ne soit établi avec certitude l'implication de cette toxine dans le décès. (Sonnabend *et al.*, 1981)

### 4.2.2) Répartition géographique

Les clostridies sont des bactéries ubiquitaires et des cas de botulisme ont été rapportés dans le monde entier. (Hatheway, 1990) Hauschild *et al* (Hauschild, 1989) ont estimé le nombre de spores par kilo de terre ou de sédiments ; selon les lieux de prélèvements, la densité de spores peut varier de une à six spores par kilo de terre au Royaume-Uni, jusqu'à 2 500 dans les champs de pommes de terre aux Pays-Bas. La densité de spores dans les sédiments aquatiques varie d'une spore par kilo aux îles Féroé et dans le golf du Maine, jusqu'à 920 dans le lac Michigan. On retrouve principalement le sérotype A aux Etats-Unis d'Amérique et en Australie, le sérotype B aux Etats-Unis d'Amérique et en Europe, et le sérotype E au Canada, en Europe du nord et au Japon (Figure 62). Les sérotypes C et D sont répartis très sporadiquement dans le monde. (Huss, 1980; Leclair *et al.*, 2013; K. F. Meyer & Bubovsky, 1922)

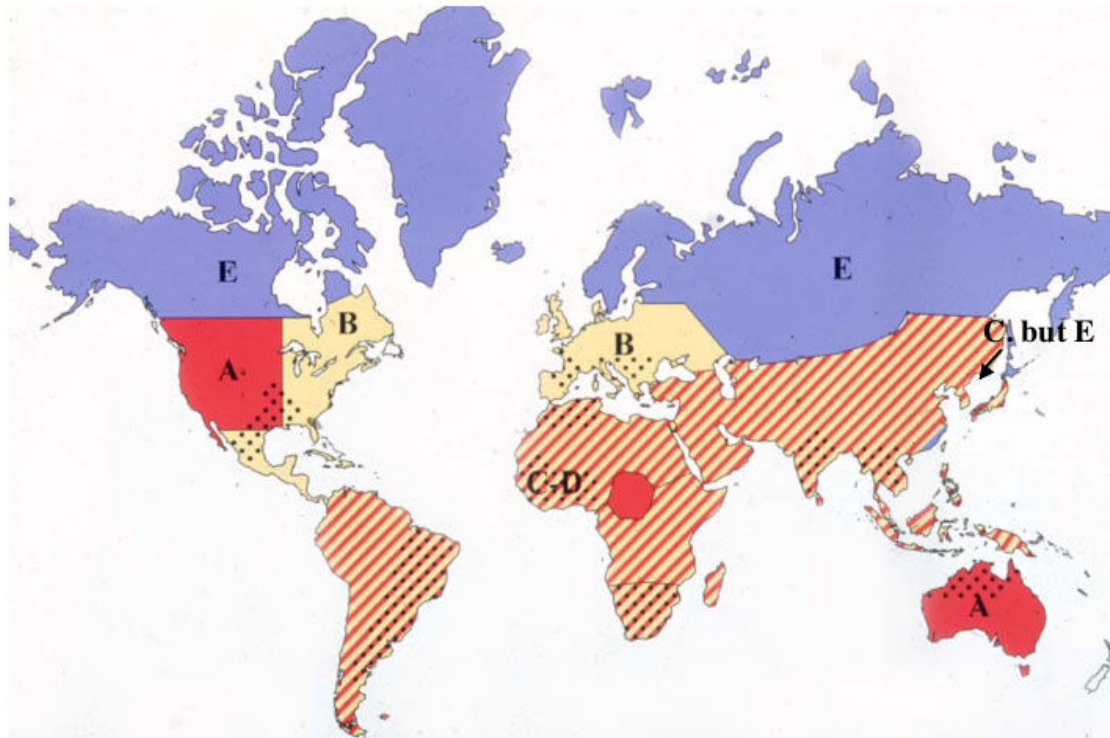


Figure 62 : Représentation du sérotype principal impliqué dans les cas de botulisme humain en fonction des zones géographique.

Rouge : cas dus au sérotype A ; Jaune : cas dus au sérotype B ; Bleu : cas dus au sérotype E ; Points noirs : cas dus aux sérotypes C et D. Source : Pr. Popoff, communication personnelle.

### 4.3) Structure et fonction des toxines botuliques

La toxicité élevée des toxines botuliques explique l'importance de la compréhension de leurs structures et leurs mécanismes d'action, pour mieux développer des traitements.

#### 4.3.1) Structure et fonction

La structure des toxines botuliques a d'abord été étudiée en se basant sur les similarités qu'elle partage avec la toxine tétanique, puis en se basant sur les similarités entre les toxines botuliques puisque les sept sérotypes de toxines botuliques possèdent des structures tri-dimensionnelles proches. La neurotoxine est composée d'une chaîne lourde (HC) de 100 kDa reliée à une chaîne légère (LC) de 50 kDa, par l'intermédiaire d'un pont disulfure établi entre deux cystéines en position 430 et 454 dans le cas de BoNT/A. Le domaine catalytique est entouré par un segment protéique peu structuré appelé "ceinture", situé entre les acides



## Partie 4 : Le botulisme

aminés 492 et 545 dans le cas de la toxine BoNT/A, et entre les acides aminés 481 et 532 dans le cas de BoNT/B. (Brunger *et al.*, 2007) L'ensemble forme un polypeptide de 150 kDa contenant 1296 acides aminés (Figure 63 et Figure 64). (Montecucco & Schiavo, 1995; Rossetto & Montecucco, 2008) Ce polypeptide est sécrété par la bactérie sous une forme clivée, à la suite de l'action de protéases bactériennes au niveau d'un site de clivage protéolytique situé entre la chaîne lourde et la chaîne légère. (Antharavally & DasGupta, 1998; Beecher & DasGupta, 1997; Kukreja, Sharma, & Singh, 2010; Y Sagane *et al.*, 1999) Cependant, dans le cas particulier de BoNT/E, la toxine est sécrétée sous forme non clivée, et ce clivage sera réalisé par une protéase de l'hôte intoxiqué. Une fois clivées, les deux chaînes se replient partiellement mais restent liées entre elles par l'intermédiaire d'un pont disulfure et de liaisons non covalentes. Les deux chaînes de la toxine comportent trois domaines principaux (Kumaran *et al.*, 2009; Lacy & Stevens, 1999; Lacy, Tepp, Cohen, DasGupta, & Stevens, 1998) :

- La chaîne légère (50 kDa, résidus 1 à 448) porte l'activité protéolytique et agit comme endoprotéase à zinc.
- La partie N-terminale de la chaîne lourde (50 kDa, résidus 449 à 854) permet la translocation de la chaîne légère de l'intérieur de l'endosome vers le cytosol, potentiellement en utilisant la "ceinture" protéique qu'elle comporte. (Brunger *et al.*, 2007; Fischer & Montal, 2007a; Fisher & Montal, 2006)
- La partie C-terminale de la chaîne lourde (50 kDa, résidus 855 à 1296), qui est subdivisée en deux domaines :
  - la partie HCN (25 kDa), qui, dans le cas de BoNT/A, pourrait se fixer aux phosphatidylinositols monophosphates, notamment présents dans certains micro-domaines des motoneurones.
  - la partie HCC (25 kDa), qui est organisée en feuillets  $\beta$ , est responsable de la reconnaissance spécifique du type cellulaire et de l'internalisation par endocytose dans les cellules cibles. Elle se fixe en effet aux zones dépourvues de gaines de myéline à l'extrémité des motoneurones cholinergiques.



Partie 4 : Le botulisme

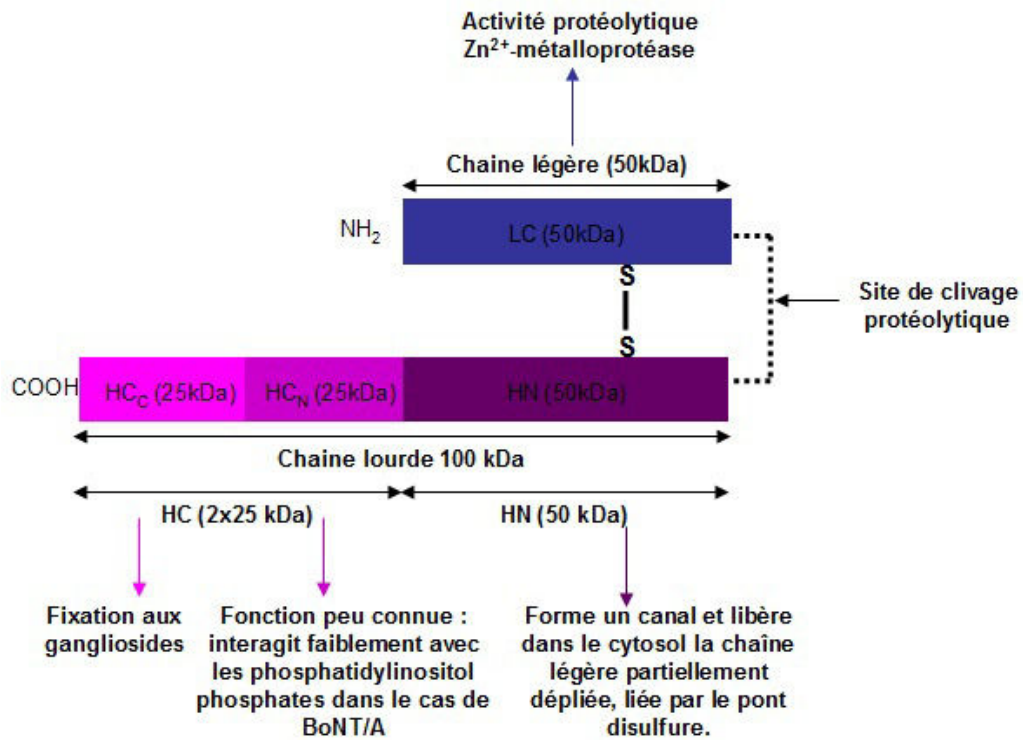


Figure 63 : Représentation schématique de la toxine botulique et de la fonction principale de chaque domaine.

La chaîne légère est représentée en bleu. La chaîne lourde est représentée en rose/violet. S : surface des cystéines. HC<sub>C</sub> : fragment C-terminal de la chaîne lourde. HC<sub>N</sub> : fragment N-terminal de la chaîne lourde.

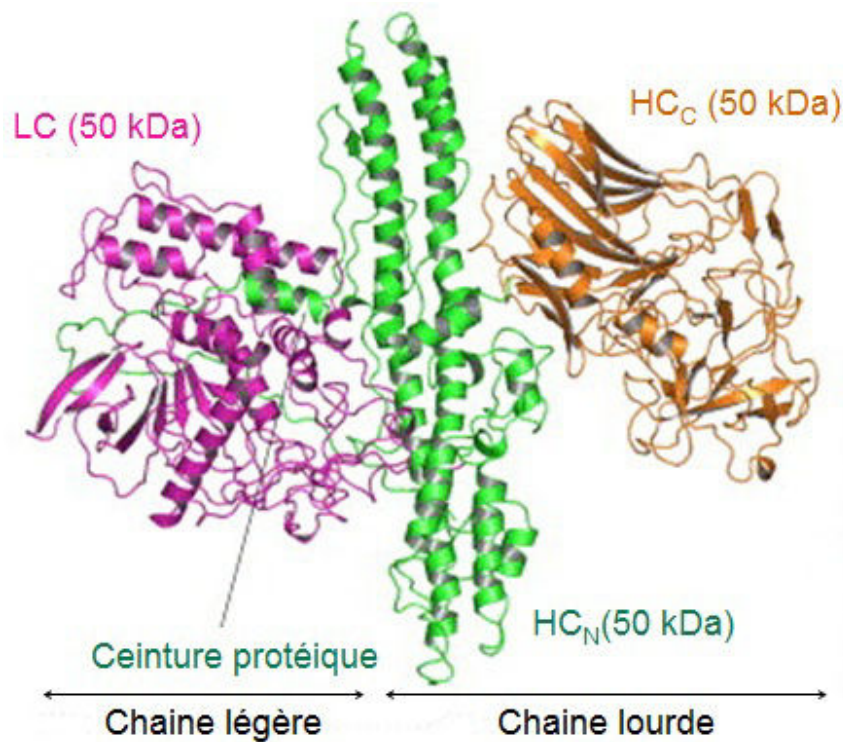


Figure 64 : Structure cristallographique de la toxine botulique A.

Le domaine de fixation aux neurones est représenté en vert ; le domaine de translocation en bleu et le domaine catalytique en rouge. Tiré de Turton *et al.* (Turton, Chaddock, & Acharya, 2002)

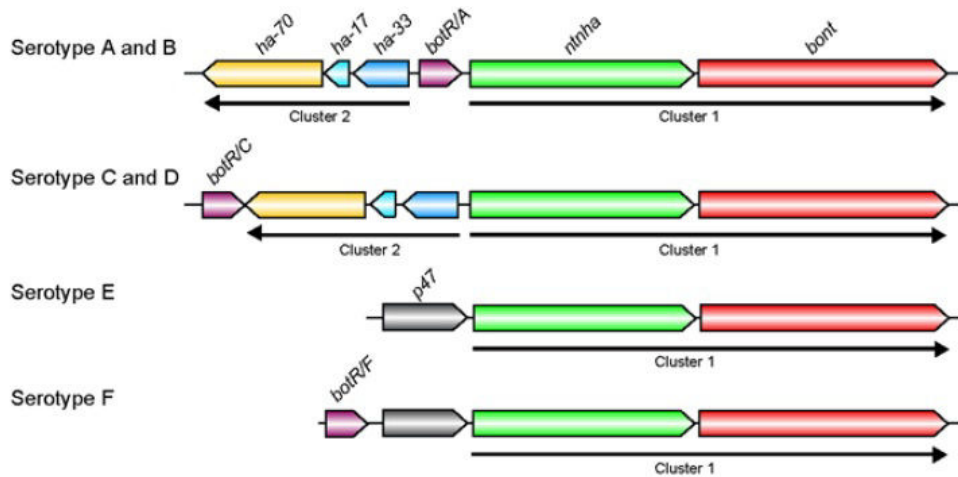
## Partie 4 : Le botulisme

Cette structure correspond à la forme pure de la toxine, codée par un gène d'environ 3,8 kb. Les séquences nucléotidiques et protéiques des toxines botuliques ont été obtenues à partir de 1990 (T Binz *et al.*, 1990; Hauser *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1990) et les formes cristallines à partir de 1998 (Lacy *et al.*, 1998). Il a été mis en évidence que la toxine botulique est sécrétée en association non covalente avec des protéines non toxiques, qui peuvent être classées en deux grandes catégories : les protéines non toxiques de type hémagglutinines (HA) et les protéines non toxiques de type non-hémagglutinines (NTNHA). (Yukako Fujinaga, 2006; Hasegawa *et al.*, 2007) Ces protéines sont codées par deux clusters de gènes proches (Figure 65) : un cluster qui code pour la NTNHA et la toxine botulique, et un autre qui code pour les différentes protéines HA (HA-70, -17 et -33). Les sérotypes E et F sont dépourvus des gènes codant les protéines HA mais ils disposent d'un gène codant la protéine p47, dont le rôle est inconnu. (G. Lin, Tepp, Pier, Jacobson, & Johnson, 2010) Trois types principaux de complexes peuvent être formés (Figure 66) (Inoue *et al.*, 1996) :

- Un complexe d'environ 300 kDa et 12 S, formé par l'association de la BoNT/A, B, C D ou G à la NTNHA.
- Un complexe d'environ 500 à 600 kDa et 16 S, formé par l'association de BoNT/ A, B, C ou D, de la NTNHA, de 6 HA-33, 3 HA-17 et 3 HA-70.
- Un complexe d'environ 880 à 1000 kDa et 19 S, formé par l'association de BoNT/A à un dimère composé de la NTNHA, de 6 HA-33, 3 HA-17 et 3 HA-70.

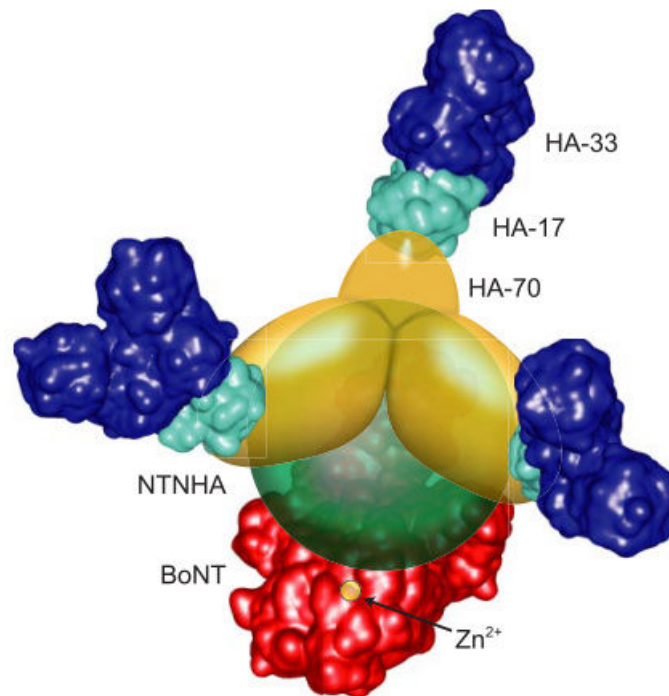
La variation des masses moléculaires dépend du nombre et de la nature de chacune des protéines composant le complexe. Ces protéines ont un rôle dans la protection de la toxine en augmentant sa résistance, principalement vis à vis des protéases, du pH du système digestif, et des cellules du système immunitaire. A pH acide, ces complexes sont stables et peuvent donc protéger la toxine botulique des conditions acides rencontrées dans l'estomac, mais ils se dissocient à pH neutre et donc dans le sang. (F. Chen, Kuziemko, & Stevens, 1998; Ohishi, Sugii, & Sakaguchi, 1977) Il a été montré que les HA associées à certaines toxines botuliques permettent le passage de la toxine dans la circulation générale. En effet, elles pourraient se fixer aux E-cadhérines humaines, ce qui perturberait la barrière épithéliale intercellulaire selon un mécanisme non élucidé. (Sugawara *et al.*, 2010)

## Partie 4 : Le botulisme



**Figure 65 : Organisation génétique des gènes codant la toxine botulique et les protéines accessoires.**

Ce schéma, tiré de Sagane *et al* (Yoshimasa Sagane *et al.*, 2012), représente l'organisation en clusters des gènes codant les toxines botuliques des sérotypes A à F et les protéines associées. Un cluster code pour la NTNHA (non toxique non hémagglutinin) et l'autre code pour les HA (hémagglutinines), la protéine p47 et le gène régulateur BotR. L'ensemble des gènes d'un même cluster est transcrit sur le même polycistron.



**Figure 66 : Modèle hypothétique d'association des différentes protéines associées aux toxines botuliques.**

La structure de la toxine botulique a été générée par modélisation par homologie, en utilisant les sérotypes A et B comme matrices. La structure et la taille de la NTNHA et de HA-70 sont basées sur les images obtenues en microscopie électronique à transmission et sur leurs masses moléculaires. Rouge : toxine botulique ; bleu foncé : HA-33 ; bleu clair : HA-17 ; jaune : HA-70 ; cercle vert : NTNHA ; cercle jaune : ion  $Zn^{2+}$  catalytique. (Hasegawa *et al.*, 2007)

### 4.3.2) Mécanismes d'action

L'action de la toxine botulique au niveau des motoneurones est décrite comme un mécanisme en cinq étapes, permettant à la toxine située dans la lumière intestinale de i) franchir l'épithélium intestinal ii) se fixer sur la membrane externe des motoneurones iii) de pénétrer par endocytose dans ceux-ci iv) sortir de l'endosome v) cliver la protéine cible. (Lance L Simpson, 2004)

#### 4.3.2.1) Franchissement de la barrière intestinale

Après ingestion ou production *in vivo* de la toxine, celle-ci se retrouve dans l'intestin et devra franchir la barrière épithéliale pour rejoindre les motoneurones cholinergiques. (Lance L Simpson, 2004) L'absorption de la toxine se fait principalement au niveau de l'intestin supérieur mais aussi, dans une moindre mesure, au niveau de l'estomac. (Bonventre, 1979; Couesnon, Molgó, Connan, & Popoff, 2012; A B Maksymowych *et al.*, 1999) Les mécanismes régissant le franchissement de la barrière intestinale sont mal identifiés.

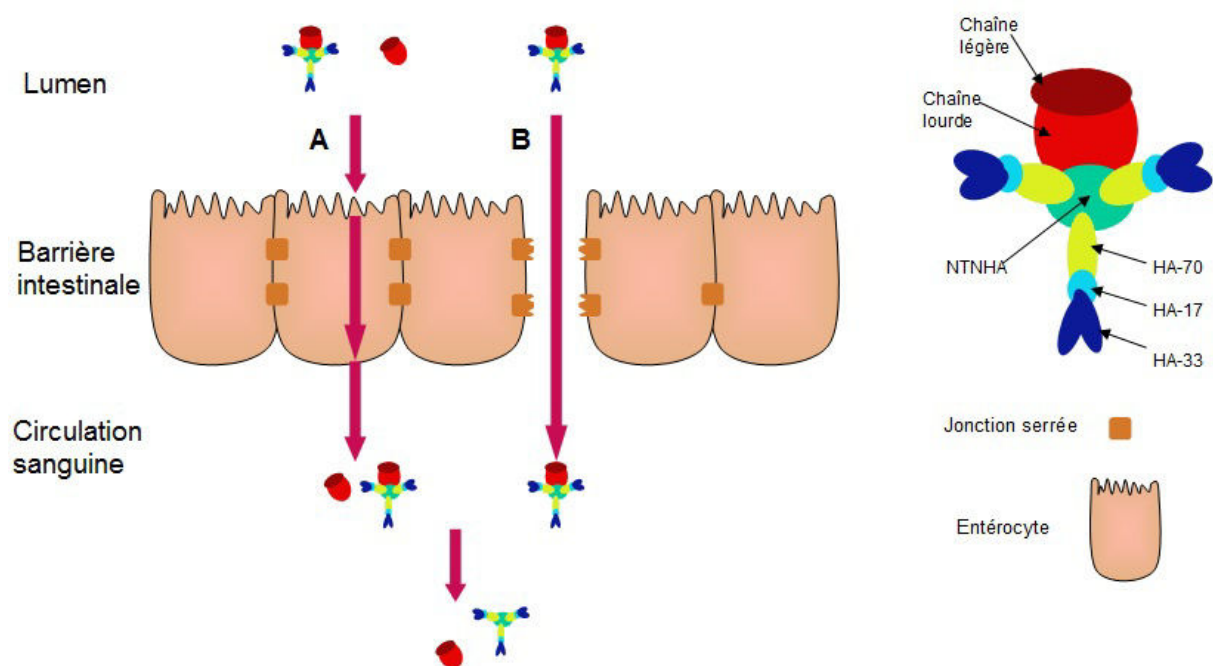
Selon certaines hypothèses, les protéines HA associées à la toxine botulique seraient impliquées dans le passage de la barrière épithéliale. Elles pourraient transporter activement la toxine par transcytose, depuis la face apicale jusqu'à la face basale des entérocytes. (Ahsan, Hajnóczky, Maksymowych, & Simpson, 2005) Selon d'autres hypothèses, les protéines HA perturberaient les jonctions intracellulaires, permettant le passage de la toxine entre les cellules (**Figure 67**). (Y. Jin, Takegahara, Sugawara, Matsumura, & Fujinaga, 2009; Matsumura *et al.*, 2008) Cette seconde hypothèse a été renforcée par des études *in vitro*, démontrant que des protéines HA (comme HA-33, HA-35 et HA-70) présentent une forte affinité pour des carbohydrates présents dans les glycoprotéines de surface des cellules épithéliales, comme le galactose ou l'acide sialique. (Y Fujinaga *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2012)

Selon d'autres modèles, la toxine pourrait franchir à elle seule la barrière épithéliale par un mécanisme de transcytose impliquant probablement l'interaction d'un domaine de la chaîne lourde avec un récepteur présent à la surface des entérocytes, comme SV2 et un co-récepteur comme les gangliosides (**Figure 67**). (Couesnon *et al.*, 2012; Couesnon, Pereira, & Popoff, 2008; A B Maksymowych & Simpson, 1998; Andrew B Maksymowych & Simpson,

## Partie 4 : Le botulisme

2004; Nishikawa *et al.*, 2004) Cette hypothèse est renforcée par plusieurs travaux comme ceux d'Al-Saleem *et al* (Al-Saleem *et al.*, 2012) qui ont montré *in vivo* que la protéine HA-35 ne semble pas indispensable à l'activité de la toxine botulique. En effet, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine HA-35 ne neutralise pas l'activité de la toxine contrairement aux anticorps ciblant directement la toxine. En outre, l'administration intranasale et intraveineuse de la toxine purifiée à des souris est aussi toxique que lorsque la toxine est administrée sous forme de complexe. L'administration de la toxine purifiée dans l'estomac et l'intestin de souris est elle aussi toxique, ce qui met en évidence que les protéines HA et NTNHA ne sont pas indispensables au franchissement de la barrière intestinale (A B Maksymowych *et al.*, 1999), mais elle est moins toxique que lorsque la toxine est sous forme de complexes, confirmant que les protéines HA et NTNHA diminuent la dégradation de la toxine dans l'estomac. (A B Maksymowych *et al.*, 1999)

Il semble donc que les deux mécanismes de franchissement de la barrière épithéliale soient possibles ; les protéines HA ne seraient pas indispensables mais pourraient faciliter le transport de l'intestin vers la circulation générale.



**Figure 67 : Hypothèse de franchissement de la barrière intestinale par la toxine botulique.**

Selon la première hypothèse (A) la toxine (rouge), sous forme libre ou de complexe (jaune, vert et bleu), peut adhérer à la face apicale des entérocytes et franchit ces derniers par transcytose. Selon la seconde hypothèse (B) la toxine perturbe les jonctions serrées et franchit la barrière intestinale en passant dans l'espace intercellulaire. Une fois dans la circulation sanguine, la toxine se dissocie de son complexe protéique.

### 4.3.2.2) Reconnaissance des motoneurones et pénétration cellulaire

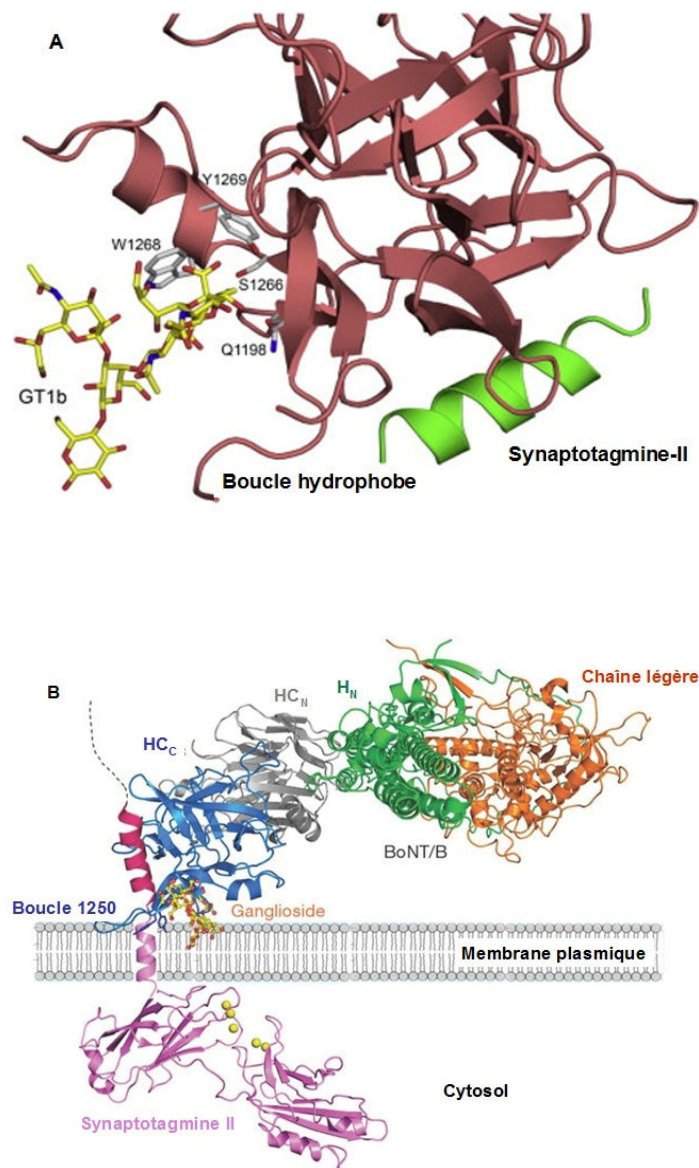
Une fois la barrière épithéliale franchie, la toxine botulique se retrouve dans la circulation et va pouvoir migrer jusqu'aux motoneurones. Des travaux chez le cochon d'Inde semblent indiquer que la toxine peut se lier aux érythrocytes, facilitant son transport dans la circulation générale. (Y Fujinaga *et al.*, 2000)

Le mécanisme d'entrée dans les motoneurones implique deux types de récepteurs. Dans un premier temps, un domaine lectine présent à la surface de la chaîne lourde permettrait à la toxine de se fixer avec une faible affinité aux gangliosides de type GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub>. (Stenmark, Dupuy, Imamura, Kiso, & Stevens, 2008) Toutefois ces gangliosides sont présents à la surface de nombreux types cellulaires, et ne peuvent donc pas expliquer le ciblage spécifique des motoneurones par la toxine. L'interaction de faible affinité avec les gangliosides, qui sont nombreux à la surface cellulaire, permettraient à la toxine de se déplacer latéralement sur cette surface. Ce déplacement conduirait *in fine* à l'engagement d'un autre récepteur, plus rare mais spécifique des motoneurones et possédant une plus forte affinité pour la toxine, puis à l'endocytose de la toxine. Les récepteurs engagés par les toxines botuliques sont dépendants des sérotypes. Pour BoNT/A, D et E il a été démontré qu'il s'agissait principalement de la protéine SV2 et partiellement de la synaptotagmine I. (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold, Rummel, Bigalke, Davletov, & Binz, 2006; Peng, Tepp, Johnson, & Dong, 2011). Pour BoNT/B, il avait été proposé que l'interaction se fasse avec la synaptotagmine II (Figure 68) (Chai *et al.*, 2006; R. Jin, Rummel, Binz, & Brunger, 2006), mais des études récentes ont démontré que si une interaction de haute affinité est effectivement possible chez la souris et le rat, cette interaction est faible chez l'Homme. (Strotmeier, Willjes, Binz, & Rummel, 2012) Cette différence d'affinité serait probablement due à la présence d'une leucine à la place d'une phenylalanine (mutation F54A) dans le domaine luminal de la synaptotagmine II humaine. Cette divergence pourrait expliquer pourquoi, chez l'Homme, la BoNT/B est moins toxique que chez les rongeurs. La fixation à la surface cellulaire pourrait aussi être due aux protéines complexées avec la toxine. En effet, il a été montré que HA33 peut interagir avec la synaptotagmine II de rat. (Peng *et al.*, 2012; Y. Zhou, Foss, Lindo, Sarkar, & Singh, 2005) Il a été observé que les synapses les plus actives étaient plus sensibles aux toxines botuliques. En effet, durant l'exocytose, la membrane des vésicules va fusionner avec la membrane plasmique de la cellule, exposant ainsi des récepteurs à la surface cellulaire. Les synapses les plus actives exposent donc à leur surface



## Partie 4 : Le botulisme

plus de récepteurs de haute affinité pour les toxines botuliques, et les internalisent plus souvent.



### Figure 68 : Interaction entre BoNT/B et la surface cellulaire des motoneurons.

La région C-terminale de BoNT/B peut à la fois interagir avec un ganglioside (GT1b) et avec un récepteur de forte affinité (Syt-II). Orange : chaîne légère ; vert : extrémité N-terminale de la chaîne lourde ; gris : région N-terminale de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde ; bleu : région C-terminale de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde ; violet : synaptotagmine II ; jaune et rouge : ganglioside GT1b ; marron : BoNT/B. **A**) Interaction de BoNT/B avec GT1b et la synaptotagmine II. Les résidus indiqués sont ceux principalement impliqués dans l'interaction avec GT1b. **B**) Interaction de BoNT/B avec GT1b et la synaptotagmine II à la surface cellulaire. D'après Chai *et al* 2006 (Chai *et al.*, 2006) et *et al* (Stenmark, Dong, Dupuy, Chapman, & Stevens, 2010)



### 4.3.2.3) Endocytose

Après interaction avec la membrane externe des motoneurones, au maximum une à deux molécules de toxine botulique pénètrent dans la cellule selon des mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés. Les modèles proposés sont principalement fondés sur les mécanismes connus d'internalisation de certaines toxines AB de type III, comme la toxine diphtérique. Les toxines AB sont formées de deux composants uniques. Le composant A ("*Activity*") est la partie de la toxine responsable de l'activité toxique, et correspond à la chaîne légère de la toxine botulique. La partie B ("*Binding*") est impliquée dans la fixation à la surface cellulaire, l'internalisation, et la sortie de l'endosome, et correspond à la chaîne lourde de la toxine botulique. Au maximum, une à deux molécules de toxine botulique seraient internalisées dans chaque vésicules d'endocytose lors du recyclage des récepteurs exprimés à la surface de ces vésicules, qui sont transitoirement exposés à la surface cellulaire après fusion de la vésicule avec la membrane plasmique, et au niveau desquels la toxine s'est fixée. (Betz & Angleson, 1998; J. D. Black & Dolly, 1986; (Colasante, Rossetto, Oirazzini, Molgo, & Montecucco, 2013; Couesnon, Shimizu, & Popoff, 2009; Harper *et al.*, 2011; Lance L Simpson, 2004)

### 4.3.2.4) Translocation de la toxine dans le cytosol

Après endocytose, le récepteur de la toxine botulique se retrouve exposé à l'intérieur de l'endosome, tout comme la toxine, mais la chaîne légère doit sortir de l'endosome pour être activée dans le cytosol. En s'appuyant sur des mécanismes connus (comme l'endocytose de particules virales ou de la toxine diphtérique) (Ménétreay, Gillet, & Ménez, 2005), il a été montré, à l'aide de traitements antibiotiques bloquant l'acidification de l'endosome, que la translocation de la chaîne légère dans le cytosol s'effectuait au stade de l'endosome tardif dont le pH est acide. Le mécanisme de translocation peut être divisé en cinq étapes, présentées ci-dessous et simplifiées dans la **Figure 69**. (Koriazova & Montal, 2003; Lance L Simpson, 2004). La translocation nécessite un pH endosomal d'approximativement 5,3 et un pH cytosolique de 7. (Fischer & Montal, 2007b)

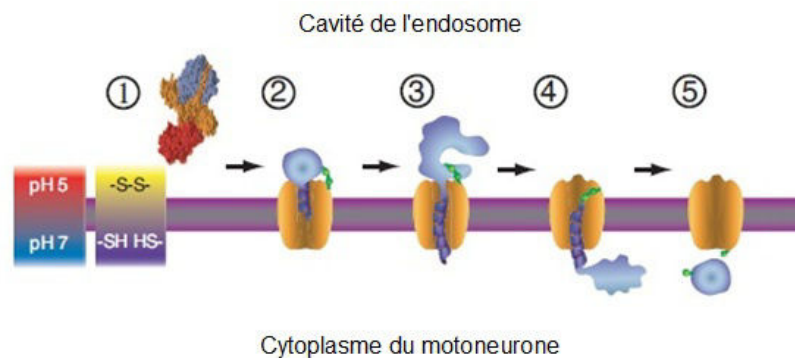
- 1) **Acidification de l'endosome.** Les ATPases de l'endosome vont engendrer un gradient de protons  $H^+$  qui va être responsable de l'acidification (jusqu'à un pH de 5,3-5,5) du lumen de l'endosome, préalablement neutre. A pH acide, la

toxine botulique va changer de conformation et les régions hydrophobes de la chaîne lourde et de la chaîne légère vont être exposées à la membrane de l'endosome. (L L Simpson, Coffield, & Bakry, 1994; L L Simpson, 1982, 1983)

- 2) **Formation d'un canal dans la membrane de l'endosome.** Les régions hydrophobes du fragment N-terminal de la chaîne lourde s'intègrent dans la membrane endosomale et forment un pré-canal. (Bade *et al.*, 2004; Brunger *et al.*, 2007; Fischer, Sambashivan, Brunger, & Montal, 2012; Montal, 2009) Des travaux ont établi que des segments de la chaînes lourde (595-614, 627-645, 648-691) sont amphiphiles ce qui leur confère la possibilité de s'insérer dans la bicouche lipidique des endosomes. (F J Lebeda & Olson, 1995) Des travaux en cryomicroscopie électronique menés par Schmid *et al* (M. F. Schmid, Robinson, & DasGupta, 1993) ont permis d'émettre l'hypothèse que les canaux seraient formés par l'association de quatre entités de toxines botuliques. Le diamètre des canaux formés par le domaine de translocation de la chaîne lourde n'étant pas suffisant pour permettre le passage de la chaîne légère sous sa forme native, seule la forme linéaire de la chaîne légère peut transiter par le canal. Une étude a ainsi démontré qu'à 37°C, la chaîne légère de BoNT/A changeait de conformation pour adopter une conformation appelée PRIME (*Pre-Imminent Molten-Globule Enzyme*) lui permettant de passer au travers du canal. Les auteurs ont démontré dans un test endopeptidasique que la chaîne légère sous cette forme présente une activité catalytique plus importante que sous sa forme native. (Cai & Singh, 2001; Kukreja & Singh, 2005)
- 3) **Translocation de la chaîne légère.** Une fois insérée dans le canal néoformé, la chaîne légère l'utilise pour passer de la face interne à la face externe de l'endosome. (Koriazova & Montal, 2003) Durant la translocation de la chaîne légère, son extrémité N-terminale est dirigée vers le cytosol et son extrémité C-terminale vers la cavité endosomale. (Fischer & Montal, 2007b) Des travaux réalisés sur BoNT/A à l'aide de la technique de patch-clamp ont mis en évidence la fluctuation de la conductance électrique lors du passage de la chaîne légère dans le canal. L'augmentation de la conductance permet l'ouverture du canal et donc la translocation de la chaîne légère. (Fischer & Montal, 2007b)

## Partie 4 : Le botulisme

- 4) **Dissociation de la chaîne légère.** Le pont disulfure existant entre la chaîne légère et la chaîne lourde de la toxine botulique va être réduit dans le cytosol, puis les liaisons non covalentes persistantes vont être rompues et permettre la séparation des deux chaînes. (Fischer & Montal, 2007a)
- 5) **Libération de la chaîne légère dans le cytosol.** Le pH neutre du cytosol va permettre le repliement de la chaîne légère. Ce repliement empêche toute rétro-translocation de la chaîne légère dans l'endosome. Celle dernière se retrouve alors libre et fonctionnelle à l'intérieur de la cellule, sous sa forme active. (Fischer & Montal, 2007b) (Brunger *et al.*, 2007)



**Figure 69 : Modèle de translocation de la chaîne légère de BoNT/A au travers de la membrane endosomale.**

1) La toxine internalisée dans l'endosome est tout d'abord présente sous sa forme libre. 2) La chaîne lourde s'insère dans la membrane plasmique de l'endosome pour former un canal où se fixe la chaîne légère. 3 et 4) La chaîne légère change de conformation et traverse le canal. 5) Après avoir franchi la membrane de l'endosome, la chaîne légère se détache de la chaîne lourde et retrouve sa conformation native. D'après Fischer *et al.* (Fischer & Montal, 2007a)

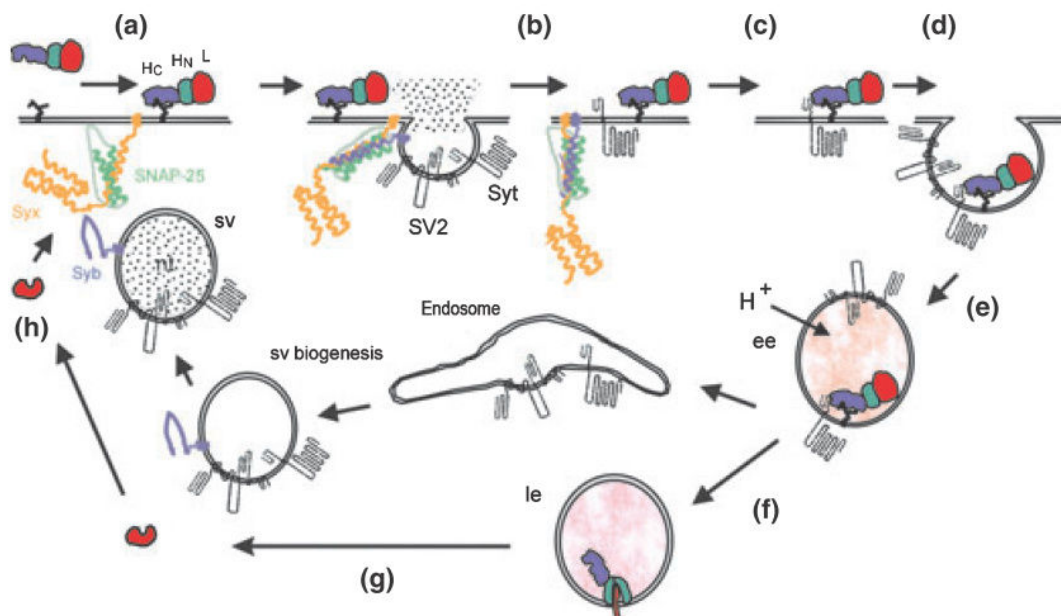
### 4.3.2.5) Clivage des protéines cible

Grâce au motif His-Glu-X-X-His (X étant un acide aminé variable), la chaîne légère de la toxine botulique possède une activité du type métalloprotéase  $Zn^{2+}$ -dépendante. (Schiavo *et al.*, 1992) Une fois dans le cytosol, la chaîne légère va rejoindre la face interne de la membrane plasmique du motoneurone, où se trouve le complexe protéique SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) impliqué dans l'exocytose des vésicules d'acétylcholine. Le clivage par la chaîne légère d'une protéine de ce complexe rend impossible l'interaction de ce complexe avec les vésicules d'exocytose, inhibant ainsi le déversement de l'acétylcholine qu'elles contiennent dans l'espace post synaptique (Figure 70). Les chaînes légères des différents sérotypes ne clivent pas les mêmes

## Partie 4 : Le botulisme

protéines du complexe SNARE. Les sérotypes BoNT/A et E clivent SNAP25 (S. Chen & Barbieri, 2007; Schiavo *et al.*, 1993; Tonello, Morante, Rossetto, Schiavo, & Montecucco, 1996), le sérotype BoNT/C peut indépendamment cliver SNAP25 et la syntaxine (Blasi *et al.*, 1993; Williamson & Neale, 1998) et les sérotypes BoNT/B, D, F et G clivent VAMP (aussi appelé synaptobrevine) (Poulain *et al.*, 1993; Schiavo *et al.*, 1992; Yamasaki *et al.*, 1994). En inhibant l'exocytose, la toxine botulique bloque la transmission du potentiel d'action aux fibres musculaires, nécessaire à la contraction des muscles.

On dispose de peu d'informations sur la durée d'action de la toxine botulique. Cette durée dépend de la demi-vie de la chaîne légère dans le cytosol, qui peut être estimée de plusieurs semaines à plusieurs mois d'après l'observation de la persistance des symptômes du botulisme. Le devenir de la chaîne légère de la toxine botulique, après clivage de sa cible protéique, reste inconnu ; elle pourrait être transportée hors du motoneurone ou être dégradée par des protéases intracellulaires. La persistance de la toxine botulique dans l'organisme varie en fonction du sérotype. La chaîne légère de BoNT/A semble posséder la plus longue demi-vie, ce qui pourrait s'expliquer par une moindre susceptibilité à l'ubiquitination et à la dégradation par le protéasome que d'autres toxines comme BoNT/E. (Tsai *et al.*, 2010) La toxine botulique n'étant pas cytotoxique, la fonction du motoneurone est intégralement rétablie après dégradation de la chaîne légère.



**Figure 70 : Représentation des différentes étapes de l'action de la toxine botulique.**

(a) Fixation initiale de faible affinité de la toxine botulique avec des gangliosides. (b, c) Après la fusion de la vésicule d'exocytose avec la membrane plasmique, la toxine botulique se fixe à son récepteur de forte affinité, exposé à la surface cellulaire. (d) Endocytose de la toxine botulique. (e) Les pompes à protons acidifient l'endosome. (f) L'acidification provoque un changement conformationnel de la toxine botulique. (g)

## Partie 4 : Le botulisme

Translocation de la chaîne légère dans le cytosol. **(h)** La chaîne légère clive sa protéine cible du complexe SNARE : (syb, bleu clair) : Synaptobrevine, (Syx, orange) : syntaxine, (SNAP25, vert) : SNAP35 D'après Binz *et al.* (Thomas Binz & Rummel, 2009)

### 4.4) La maladie

#### 4.4.1) Tableau clinique

Les cas humains de botulisme sont majoritairement dus aux sérotypes A, B et E, mais les sérotypes C et F sont impliqués dans des cas rares. A la suite d'une contamination, la toxine botulique va atteindre les nerfs crâniens puis les muscles, de façon descendante. La migration de la toxine va engendrer successivement différents signes cliniques sans fièvre, reflétant tous une affection du système nerveux et musculaire, ce qui facilite le diagnostic. (Tableau 10) (Hughes *et al.*, 1981; LOPH, 2011) Les symptômes peuvent apparaître en plusieurs jours ou brusquement, en quelques heures. Le premier d'entre eux est généralement un état de fatigue. Plusieurs symptômes sont retrouvés chez la plupart des patients mais leur sévérité et la précocité de leur apparition dépend fortement de la taille de l'inoculum et de la voie d'intoxication. Par exemple dans le cas d'une intoxication alimentaire, les troubles gastro-intestinaux apparaissent plus précocement, compte tenu du grand nombre de neurones présents dans le tube digestif et de leur proximité avec l'inoculum initial, alors que le botulisme de blessure se caractérise par l'absence de symptômes gastro-intestinaux. Tous les muscles vont progressivement être affectés de façon descendante, en commençant par le visage. En l'absence de traitement, le botulisme provoque indirectement la mort, en causant une asphyxie suite à la paralysie des muscles respiratoires.

## Partie 4 : Le botulisme

Sérotipe	BoNT/A	BoNT/B	BoNT/E
<b>Symptômes</b>	<b>% de survenue</b>		
<b>Neurologiques</b>			
Dysphagie	96	97	82
Sécheresse buccale	83	100	93
Diplopie	90	92	39
Dysarthrie	100	69	50
Faiblesse des membres supérieurs	91	62	ND
Faiblesse des membres inférieurs	82	59	ND
Vision floue	100	42	91
Dyspnée	91	34	88
Paresthésie	20	12	ND
Ptosis	96	55	46
Réflexe nauséux réduit	81	54	ND
Parésie oculaire	87	46	ND
Parésie faciale	84	48	ND
Faiblesse de la langue	91	31	66
Affection des pupilles	33	56	75
Nystagmus	44	4	ND
Ataxie	24	13	ND
Diminution/absence des réflexes des tendons	54	29	ND
Hyperactivité des tendons	12	0	ND
<b>Gastro-intestinaux</b>			
Constipation	73	73	52
Nausée	73	57	84
Régurgitation	70	50	96
Campes abdominales	33	46	ND
Diarrhée	35	8	39
<b>Affection mentale</b>			
Détresse mentale	88	93	27
Léthargie	4	4	73
Faiblesse	9	4	0
<b>Autres</b>			
Fatigue	88	93	27
Mal de gorge	4	4	73

**Tableau 10 : Principaux signes cliniques et symptômes causés par le botulisme.**

Des imprécisions dans les pourcentages d'apparition des symptômes en fonction du sérotipe impliqué peuvent résulter du nombre variable de patients pris en compte pour chaque sérotipe. D'après l'office public de santé de Louisiane. (LOPH, 2011)

### 4.4.2) Les différentes formes de botulisme

#### 4.4.2.1) Le botulisme alimentaire

Le botulisme résultant de l'ingestion d'aliments contaminés par la toxine botulique est la forme la plus répandue de la maladie, mais cette intoxication alimentaire est rare par comparaison aux autres intoxications alimentaires. (Delmas *et al.*, 2010; Group, 2012; Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, 2002) Si le temps d'incubation est généralement de 12 à 72 heures, le délai d'apparition des symptômes peut varier de 2 heures à 8 jours. Ce délai potentiellement important entre la contamination et les premiers signes cliniques de la maladie peut rendre difficile l'étude épidémiologique

## Partie 4 : Le botulisme

permettant de remonter à l'origine de la maladie, ce qui peut retarder le retrait de la vente de l'aliment incriminé. La fréquence d'intoxication varie en fonction des habitudes alimentaires des différents pays. Les clostridies sont présent dans le sol (Hauschild, 1989) ce qui explique que la plupart des cas de botulisme sont consécutifs à la consommation de conserves domestiques n'ayant pas respecté un procédé d'appertisation correct, en particulier en ne respectant pas des temps de cuisson suffisants. Si des aliments ont été mal nettoyés ou mal appertisés, les spores qu'ils contenaient ne sont pas toutes détruites lors du processus de conservation, et les conditions de conservation dans un milieu anaérobie, nutritif et peu acide forment un environnement permettant à la bactérie de se multiplier et de produire des toxines. Les spores survivent à une cuisson de 30 minutes à 100°C (Konagaya *et al.*, 2009), et il a été mis en évidence qu'une cuisson d'au moins 15 minutes à 105°C était nécessaire pour détruire les spores. Plus précisément, une cuisson de 15 s à 121°C est nécessaire pour réduire l'inoculum initial d'un facteur égal à  $10^{12}$ . (N. M. Anderson *et al.*, 2011) On retrouve aussi les clostridies et leurs spores dans les sédiments aquatiques, si bien que les poissons peuvent les ingérer et être infectés par la toxine, principalement BoNT/E. Les processus de fermentation et de fumage utilisés pour conserver les poissons non ou mal éviscérés ne permettent pas la destruction des clostridies ou des toxines botuliques, et peuvent donc être à l'origine de contamination alimentaire. Du fait de la consommation de tels produits, les cas d'intoxications à BoNT/E sont majoritairement observés dans les régions nordiques et au Japon. Le traitement du botulisme alimentaire se fait d'une part par le traitement des signes vitaux en unité de soins intensifs, et d'autre part par l'injection d'anticorps anti-toxines botuliques. Dans les pays développés, bien que le délai pour se rétablir complètement du botulisme soit long, la mortalité n'est que de l'ordre de 5 à 10 % lorsqu'une prise en charge individualisée est possible. (S. S. Arnon *et al.*, 2001) Lors d'une des dernières intoxications alimentaires en France, en 2011, neuf personnes ont été hospitalisées suite à l'apparition de symptômes d'une toxi-infection 24 à 36 heures après avoir consommé de la tapenade contaminée par la toxine botulique, dont le processus artisanal de fabrication n'avait pas permis la destruction des spores. (Pingeon *et al.*, 2011) Dans sept des neuf cas, la toxine botulique de sérotype A a été retrouvée et aucun patient n'est décédé.



### 4.4.2.2) Le botulisme par infection et colonisation d'une blessure

Cette forme de botulisme est la plus rare et résulte de la germination et de la multiplication de *C. botulinum* dans les couches profondes (et donc en anaérobiose) des plaies et abcès résultants d'une blessure ou d'un acte chirurgical. Elle a été décrite pour la première fois en 1943. Une adolescente présentant une fracture ouverte des deux jambes avait succombé à la suite de la sécrétion de toxine botulique de type A, par des clostridies qui c'étaient développées au niveau des plaies profondes. (Hatheway, 1990; Merson & Dowell, 1973) Le tableau clinique de cette forme de botulisme est similaire à celui d'une intoxication alimentaire, à l'exception de l'absence de symptômes gastro-intestinaux et d'une période d'incubation plus longue (sept jours en moyenne). En plus du traitement habituel, un traitement antibiotique adjoint à un nettoyage chirurgical de la plaie infectée est nécessaire. Toutefois, malgré ces traitements, le taux de mortalité imputable à cette forme de botulisme est d'environ 15 %. (Hatheway, 1995)

Depuis quelques années, une nouvelle forme de botulisme comparable au botulisme de blessure a été observée. Il s'agit des cas de botulisme chez les personnes consommatrices de drogues injectables car l'utilisation et l'échange de seringues ayant contenue de la drogue contaminée peut créer un foyer de botulisme. (MacDonald *et al.*, 1985; Mulleague *et al.*, 2001; Yuan, Inami, Mohle-Boetani, & Vugia, 2011) Il est probable que cette forme de botulisme existe depuis plusieurs années, mais le faible nombre de tests réalisés sur les drogues et seringues suspectes ne permettrait pas d'incriminer les toxines botuliques. (Hatheway, 1995; Offerman *et al.*, 2009)

### 4.4.2.3) Le botulisme infantile

Cette forme de botulisme a été décrite pour la première fois en 1976 aux Etats-Unis d'Amérique. (Midura & Arnon, 1976; Pickett, Berg, Chaplin, & Brunstetter-Shafer, 1976) Contrairement au botulisme alimentaire, le botulisme infantile est causé par une toxinogénèse *in vivo*. Dans l'intestin, la température et la présence de nutriments forment des conditions favorables pour le développement des bactéries. Cependant, contrairement aux nourrissons, la flore intestinale commensale des adultes est suffisamment développée pour empêcher la croissance des bactéries pathogènes. Chez le nourrisson, les spores de *Clostridium* ingérées vont pouvoir germer, coloniser le tube digestif et produire la toxine. (Feigin, Cherry,

## Partie 4 : Le botulisme

Demmler, & Kaplan, 2004; Lindström & Korkeala, 2006) La majorité des cas de botulisme infantile est due aux sérotypes A et B : entre 1976 et 2006, sur 524 cas de botulisme étudiés par Koepke *et al* (Koepke, Sobel, & Arnon, 2008), 437 étaient dus au sérotype A, 56 au sérotype B et seulement 12 à l'ensemble des autres sérotypes. Le miel est le seul aliment reconnu comme pouvant être à l'origine des intoxications chez l'enfant. (Hoarau *et al.*, 2012; King *et al.*, 2010; J. K. Smith *et al.*, 2010) Des études estiment qu'en moyenne 2 à 7 % des pots de miel dans le commerce contiennent des spores de *Clostridium botulinum*. (*Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on honey and microbiological hazards*, 2002) Les suspicions de cas d'intoxication par le lait en poudre n'ont jamais pu être formellement confirmées. (J. K. Smith *et al.*, 2010; Weingart *et al.*, 2010) Peu de cas de botulisme infantile ont été décrits et leur taux de mortalité est estimé entre 1 et 2 %. (King *et al.*, 2010; Koepke *et al.*, 2008)

Il existe une autre forme peu fréquente de botulisme, proche du botulisme infantile mais affectant des adultes. (Chia, Clark, Ryan, & Pollack, 1986; Griffin, Hatheway, Rosenbaum, & Sokolow, 1997; Sobel, 2005) En effet, lorsque la flore intestinale est pathologique, par exemple à la suite d'une immunodéficience ou de traitements médicaux, les clostridies peuvent coloniser l'intestin et provoquer le botulisme.

### 4.4.2.4) Autres formes de botulisme humain

Dans le cas du risque biologique provoqué, la forme pulmonaire du botulisme est la plus redoutée, bien que peu d'études aient étudié cette forme la maladie. (Al-Saleem *et al.*, 2012; Franz, Pitt, Clayton, Hanes, & Rose, 1993; Gelzleichter *et al.*, 1999; Park & Simpson, 2003; Taysse *et al.*, 2005) Les toxines botuliques sont en effet capables de rejoindre la circulation générale *via* les voies respiratoires, sans être confrontées au pH acide et aux protéases de l'intestin. En fonction de tests chez la souris et d'extrapolation chez l'Homme, la DL<sub>50</sub> de BoNT/A par voie pulmonaire est estimée de 10 à 21 ng.kg<sup>-1</sup>. (S. S. Arnon *et al.*, 2001; Gelzleichter *et al.*, 1999; Gill, 1982; Taysse *et al.*, 2005) Lors d'un conflit armé, les troupes se nourrissent en utilisant des rations contrôlées. La forme pulmonaire représente donc le seul risque, et elle pourrait obliger les troupes à porter des équipements individuels de protection respiratoire, limitant la capacité opérationnelle des troupes. En pratique, ces équipements ne sont pas portés en permanence et les troupes sont exposées. Des cas de botulisme inhalatoires ont été observés suite à l'inhalation de drogue contaminée par des

## Partie 4 : Le botulisme

spores et constitut aussi une forme pulmonaire de botulisme. (Roblot *et al.*, 2006) En France, en 2006, deux patients de 27 et 28 ans ont été admis en soin intensif après avoir présenté une constipation sévère, une sécheresse buccale et des troubles de l'accommodation, 2 à 6 heures après l'inhalation de la même poudre de cocaïne. La toxine BoNT/B a été retrouvée dans le sérum de l'un des deux patients. (Roblot *et al.*, 2006) Bien que les investigations médicales n'aient jamais pu formellement identifier la cocaïne comme source de l'infection en raison de l'absence de prélèvements, celle-ci semble bien à l'origine de la contamination. Un seul foyer de botulisme par inhalation non causé par une prise de drogue a été décrit en 1962 chez trois vétérinaires travaillant dans un laboratoire en Allemagne de l'Ouest. Ceux-ci ont été infectés alors qu'ils éliminaient des lapins et de cochons d'Indes dont la fourrure avait été recouverte de toxine. La toxine botulique A a été retrouvée dans le sérum des trois personnes. (S. S. Arnon *et al.*, 2001; Middlebrook & Franz, 1997)

Finalement une dernière forme de botulisme est apparue récemment avec l'avènement de l'utilisation de la toxine botulique à finalité thérapeutique et esthétique. Ce botulisme iatrogène peut être dû à une mauvaise formulation ou une mauvaise utilisation de la toxine botulique thérapeutique. (Bakheit, Ward, & McLellan, 1997; Sobel, 2005)

### 4.4.2.5) Cas vétérinaires

Les cas de botulisme animal sont majoritairement dus aux sérotypes C et D. Le botulisme animal est principalement lié à la capacité des spores bactériennes à pouvoir survivre longtemps dans le sol. (Mitscherlich & Marth, 1984) Une forme viscérale du botulisme causé par BoNT/C a ainsi été décrite chez les bovins. (Antharavally & DasGupta, 1998; Böhnelt, Schwagerick, & Gessler, 2001) Les spores ingérées par l'animal se retrouvent dans l'intestin inférieur où elles vont germer et produire les toxines botuliques. La partie non absorbée des toxines et spores sera éliminée dans les excréments, contaminera le sol et pourra alors infecter d'autres animaux.

### 4.4.3) Epidémiologie

En France le botulisme est une maladie à déclaration obligatoire : toute suspicion de cas de botulisme doit donc être déclarée sans délai auprès de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS). En France, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a

## Partie 4 : Le botulisme

estimé la fréquence de la maladie à 0,43 cas pour un million d'habitants entre 1991 et 2009. (“Dossiers thématiques en ligne de l’InVs,” 2013) En 2011, un total de 172 sérums et de 55 selles ou liquides gastriques de patients suspectés d'être atteints du botulisme a fait l'objet d'analyses biologiques, et 19 cas de botulisme répartis en neuf foyers ont été confirmés. (Tableau 11)

Type de toxine	Année																			Total 1991/2009
	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
A							2	1	3	1	1					2	1	1	7	
A et B simultanément									1			1							2	
B	17	12	9	13	8	2	6	12	1	1	13	12	5	17	14	1	5	3	2	
E							2	2	3			1	2	1					1	
Non typée	1		1	1		1	2	2	4	3	4	1	1	1		1		1		
Négatif ou non recherchée	1	3	2		2	2	2		1		3		2	1	1					
Total personnes infectées annuel	19	15	12	14	10	5	14	17	12	6	18	18	8	21	15	5	6	5	10	
Foyer d'origine alimentaires														12	16	3	5	4	9	
Foyer d'origine "infantiles"														1		1	1	1	2	
Foyer d'origine "blessure"															1			1		
Total de foyer annuel	19	15	12	14	10	5	14	17	21	15	18	18	22	13	16	5	6	6	11	

**Tableau 11 : Etude épidémiologique des cas de botulisme survenus en France entre 1991 et 2009.**

Représentation de l'origine du foyer infectieux et dénombrement des victimes par type de toxine botulique impliquée dans l'intoxication. Source : (“Dossiers thématiques en ligne de l’InVs,” 2013)

### 4.5) Cas particulier des toxines botuliques comme agent du bioterrorisme

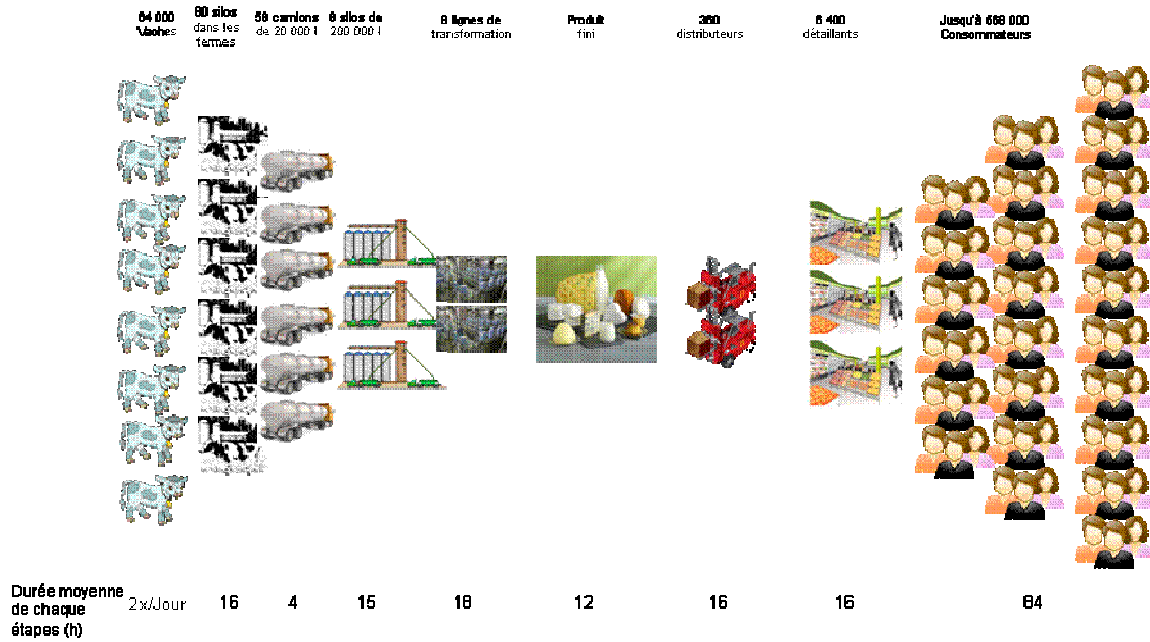
Les recherches menées dans notre laboratoire ont en particulier comme objectif l'isolement d'anticorps neutralisant les toxines botuliques. En effet, le botulisme n'est rencontré dans notre pays que rarement, les caractéristiques des toxines botuliques en font une arme biologique potentielle. Les toxines sécrétées par *Clostridium botulinum* sont ainsi classées par le CDC parmi les agents biologiques de catégorie A, c'est-à-dire parmi les agents les plus à risque d'être militarisés. En effet, sous forme de complexes les toxines botuliques sont relativement simples à produire et stables, ce qui facilite leur dissémination par nébulisation, ou leur introduction dans le réseau d'approvisionnement en eau potable, par exemple. (Baldwin, Bradshaw, Johnson, & Barbieri, 2004; Brandau *et al.*, 2007; F. Chen *et al.*, 1998; Encinar *et al.*, 1998; Kazdovina, 1995)

Un article de 2005 présente les conséquences qu'induirait l'introduction de toxine botulique dans les stocks de lait aux Etats-Unis d'Amérique. (Wein & Liu, 2005) Cette hypothèse correspond à l'un des trois scénarios bioterroristes les plus redoutés, avec une attaque avec le virus de la variole et une nébulisation des spores de *B. anthracis*. (Eubank *et al.*, 2004; Halloran, Longini, Nizam, & Yang, 2002; Kaplan, Craft, & Wein, 2002; Wein &

## Partie 4 : Le botulisme

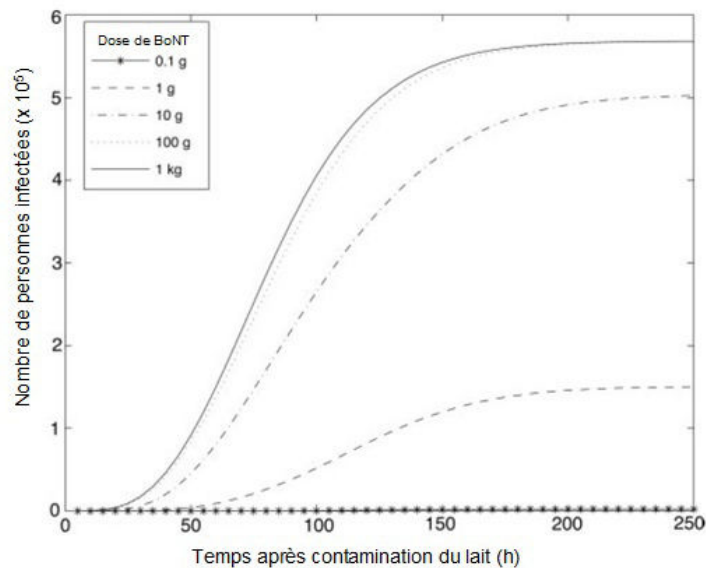
Liu, 2005) La chaîne agroalimentaire du lait permet de contaminer facilement de grands volumes de lait à différentes étapes, par exemple lors du stockage du lait en provenance de différentes fermes dans des silos de 200 000 litres ou lors du transport dans les camions dont la capacité est d'environ 20 000 litres (Figure 71). La pasteurisation (77 °C, 15 s) est conçue pour préserver les qualités nutritionnelles du lait, et Wein *et al* estiment que seuls 68,4 % de la toxine seraient inactivées par ce processus. La pasteurisation par ultra haute température, permettrait d'inactiver totalement la toxine, mais ce procédé utilisé en France n'est pas employé par tous les pays. Wein *et al* estime qu'en moyenne, 3 litres de lait sont consommés en 84 h par trois adultes et un enfant, ce qui explique qu'une contamination du système d'approvisionnement peut affecter un grand nombre de personnes. En se basant sur une estimation de la DL<sub>50</sub> de la toxine botulique par voie orale à 1 µg.kg<sup>-1</sup> pour un adulte et 0,43 µg.kg<sup>-1</sup> pour un enfant (S. S. Arnon, 2001; K F Meyer & Eddie, 1951; Morton, 1961), la modélisation effectuée par Wein *et al* estime que jusqu'à 568 000 personnes pourraient être atteintes en disséminant 10 g de toxine botulique dans le lait pasteurisé (Figure 72). Ces données ont néanmoins été pondérées par une étude de 2010, qui montre que le processus de pasteurisation pourrait détruire 99,99 % de la toxine pure et 99,5 % de la toxine sous forme de complexes. (Weingart *et al.*, 2010). Si le botulisme est traité à temps, sa mortalité reste faible, même si son traitement nécessite de long mois d'hospitalisation dans un service de soins intensifs et l'utilisation de traitements rares et coûteux. En cas d'intoxication massive, la prise en charge de toutes les victimes serait extrêmement difficile, voire impossible, donc le risque d'une mortalité élevée ne peut être écarté.

## Partie 4 : Le botulisme



**Figure 71 : Chaîne agroalimentaire du lait aux États-Unis d'Amérique.**

Les vaches sont traitées deux fois par jour. Le lait récolté est stocké dans des silos de taille limitée dans les fermes. Chaque jour des camions citernes de 20 000 litres récoltent ce lait, qui est stocké par les coopératives, dans des silos de 200 000 litres. Ce lait est alors acheminé par camion citerne jusqu'aux usines de transformation. Adapté de Wein *et al.* (Wein & Liu, 2005)



**Figure 72 : Conséquence de la contamination du lait par la toxine botulique.**

Ces courbes représentent une estimation du nombre de personnes pouvant être intoxiquées par la toxine botulique dans le cas de la contamination de la chaîne agroalimentaire du lait, aux États-Unis d'Amérique. Cette estimation est basée sur une absence de tests de détection. Résultats représentés en fonction du temps après contamination, et en fonction de la quantité de toxine botulique utilisée pour contaminer le lait. Tiré de Wein *et al.* (Wein & Liu, 2005)

La première utilisation de la toxine botulique comme arme biologique remonterait à la seconde guerre mondiale, durant laquelle des résistants tchèques l'auraient utilisée pour assassiner le général nazi Reinhard HEYDRICH (1904-1942) au cours de l'opération

## Partie 4 : Le botulisme

*anthropoid*. (Berche, 2009; Mobley, 1995) En effet, des grenades enduites d'une colle contenant la toxine botulique avaient été fournies aux résistants par les services secrets anglais. Le 27 mai 1942, lorsque le résistant tchèque Jan KUBIS (1913-1942) lança une de ces grenades, plusieurs fragments atteignirent Heydrich. Ce dernier fut hospitalisé mais, alors que son opération s'était correctement déroulée, il présenta en moins de 24 h des signes de paralysie et mourut en huit jours, à la suite du botulisme semble-t-il.

La toxine botulique a aussi été utilisée en avril 1990 par la secte Aum Shinrikyō. Trois véhicules avaient été équipés pour répandre la toxine en différents endroits du Japon. Un des véhicules répandit la toxine dans Tokyo, un autre vers la ville de Yokohama et la base navale américaine de Yokosuka et un troisième dans la zone de l'aéroport international de Narita. L'attaque n'a fait aucune victime car la souche de *Clostridium botulinum* que la secte avait isolée à partir du sol présentait une faible virulence, et avait été produite en trop faible quantité. Malgré cet échec, la secte Aum Shinrikyō utilisa de nouveau la toxine botulique le 9 juin 1993 à Tokyo, lors du mariage du prince Naruhito, mais la secte avait fait l'acquisition d'une souche non virulente. Finalement, cette même secte est suspectée d'avoir essayé d'assassiner un avocat en 1994 en introduisant la toxine botulique dans une boisson. Une nouvelle fois, la souche acquise n'a présenté aucune virulence. (Ballard, Pate, Ackerman, McCauley, & Lawson, 2001)

En parallèle de l'utilisation de la toxine botulique par des groupes terroristes, plusieurs pays l'ont militarisée. En effet, il a été estimé qu'entre 1990 et 1995, l'Irak aurait produit annuellement 6 000 litres de toxine botulique, et l'aurait placée dans différents missiles. Entre 1932 et 1945, l'unité 731 de l'armée japonaise établie à Ping Fang (en territoire chinois alors occupé), aurait exposé des prisonniers et des civils chinois à des agents biologiques, et en particulier aux clostridies sécrétant des toxines botuliques.

### 4.6) Diagnostic clinique et dosage de la toxine botulique

Le diagnostic du botulisme est basé sur l'étude des signes cliniques et sur les éléments épidémiologiques. Le botulisme ne sera formellement confirmé que par des tests biologiques effectués dans des laboratoires spécialisés et dont la réalisation prend plusieurs jours.

Il existe deux principales catégories de tests permettant le diagnostic du botulisme : les tests *in vivo* de létalité sur souris et les tests *in vitro*, principalement basés sur des techniques comparable à l'ELISA. L'ensemble de ces méthodes requière différents prélèvements



## Partie 4 : Le botulisme

biologiques, mais le sérum et les selles du patient sont prélevés en priorité. (Sobel, 2005; J.-C. Zhang *et al.*, 2010) La toxine botulique présente dans l'organisme pénétrant rapidement dans les motoneurones, il est possible que la toxine ne soit plus détectable dans le sérum si le prélèvement est effectué tardivement. Il a été d'ailleurs été mis en évidence qu'un sérum prélevé deux jours après intoxication ne permet la détection des toxines botuliques que dans 13 % des cas. (Woodruff *et al.*, 1992) Des échantillons de sang ou de liquide gastrique peuvent aussi servir de base au diagnostic, surtout dans les cas où les tests effectués sur le sérum et les selles ne s'avèrent pas positifs. Dans le cas d'une suspicion d'intoxication alimentaire, les aliments suspects doivent être analysés afin de prévenir l'apparition de nouvelles intoxications en retirant de la vente et en détruisant les aliments avariés. Dans le cas spécifique du botulisme infantile, les selles sont les prélèvements privilégiés car elles rendent possibles la réalisation d'une coproculture permettant la détection des bactéries, en plus de la détection directe de la toxine.

### 4.6.1) Les tests *in vivo*

La méthode actuellement préconisée pour la détection des toxines botuliques est le test de létalité sur souris. (Gaithersburg, 2000; Gilligan, Brown, & Berman, 1983; Haim M. & Lilly Jr, 2001) La  $DL_{50}$  chez la souris varie selon le sérotype de 0,4 à 2,5 pg par souris. (Gill, 1982) Ce test *in vivo*, dont le principe repose sur l'injection péritonéale d'une préparation diluée d'un échantillon, présente l'avantage majeur d'être applicable à toute sorte de prélèvements et se décompose en trois étapes. Tout d'abord, des échantillons sont dilués et injectés aux souris, puis l'apparition des symptômes du botulisme et la survie des souris est suivie pendant 48 heures. (Ferreira, Eliasberg, Harrison, & Edmonds, 2001; Ferreira, 2001) Dans un second temps, les échantillons positifs sont dilués en série. La  $DL_{50}$  murine des toxines botuliques étant connue, les dilutions permettent d'estimer la concentration de toxine contenue dans l'échantillon, en déterminant la plus forte dilution qui engendre la mort de 50 % des souris. Finalement, afin de déterminer le sérotype responsable de l'infection il est nécessaire de tester au moins huit groupes de souris : un groupe pour chaque sérotype plus un groupe "témoin négatif". Chaque groupe de souris reçoit une injection de l'échantillon contaminé, à une concentration permettant de causer la mort des souris par botulisme, ainsi qu'un anticorps spécifique d'un seul sérotype. La survie de chaque groupe est observée pendant deux jours et seules les souris ayant reçu l'anticorps spécifique du sérotype à l'origine

## Partie 4 : Le botulisme

de l'infection survivront. Ce test permet la détection d'une seule  $DL_{50}$  de BoNT par souris, soit une concentration en toxine dans l'échantillon d'environ 10 à 20  $pg.ml^{-1}$ . Ce test est néanmoins difficilement applicable dans les cas rares de contamination par deux sérotypes différents, et nécessite de trois à six jours pour obtenir les résultats définitifs.

En parallèle de ce test clinique, il existe un test non léthal de paralysie flasque *in vivo*, approuvé par l'Agence Européenne des Médicaments (*European Medicines Agency*, EMA) pour doser la toxine botulique. (Bitz, 2010) Ce test basé sur l'injection sous cutané d'une quantité non létale de préparation contenant la toxine botulique, et sur l'évaluation de la paralysie flasque de la patte de souris induite par la toxine. Plus la solution est concentrée, plus la paralysie est importante, et une échelle de cinq niveaux permet d'estimer l'intensité de la paralysie. (Adler *et al.*, 2010; Straughan, 2006)

Un test *ex vivo* d'étude de la paralysie du muscle de l'hémidiaphragme permet aussi de détecter la présence de toxine botulique. Ce test est basé sur la mesure de la diminution du potentiel de contraction musculaire en présence de la toxine botulique, en réponse à un stimulus électrique. (Rasetti-Escargueil, Liu, Rigsby, Jones, & Sesardic, 2011) Il permet de détecter jusqu'à 2  $DL_{50}$  de BoNT/A ou BoNT/E, 20  $DL_{50}$  de BoNT/D et 60  $DL_{50}$  de BoNT/B ce qui est suffisant pour le dosage de préparations médicales de toxines botulique et pour l'étude d'anticorps neutralisant. Les résultats peuvent être obtenus 3 heures après dissection. Il nécessite le sacrifice de moins de souris que le test de létalité, puisque de deux à quatre souris suffisent par échantillons, ce qui le rend éthiquement plus acceptable.

### 4.6.2) Les tests *in vitro*

Les tests de diagnostic clinique *in vitro* pourraient être préférés aux tests *in vivo* grâce à leur rapidité (résultats en quelques heures) et à leur simplicité. (Ekong, 2000) Si dans le passé, la plupart de ces tests avaient une limite de détection faible, les récentes innovations apportées les rendent aussi performants que les méthodes de diagnostic *in vivo*. (Ferreira, 2001) Les tests ELISA spécifiques de la toxine botulique sont disponibles depuis le début des années 1980 (Dezfulian & Bartlett, 1985; Dezfulian, Hatheway, Yolken, & Bartlett, 1984; Oguma *et al.*, 1982), mais ils présentent généralement une limite de détection 10 à 100 fois inférieure au modèle *in vivo*. Ils doivent donc être couplés à une technique puissante d'amplification du signal, afin d'obtenir un seuil de détection comparable ou supérieur aux techniques *in vivo*. (Ferreira, 2001) Wictome *et al* (Wictome *et al.*, 1999), ont développé un

## Partie 4 : Le botulisme

test *in vitro* qui repose sur l'utilisation de colonnes comparables à des colonnes de purifications par immuno-affinité sur lesquelles un anticorps monoclonal spécifique de BoNT/B est greffé. Un peptide substrat de BoNT/B est alors chargé sur la colonne, puis la quantité de peptides clivés est détectée par une méthode semblable à un ELISA. Ce test permet en 5 heures la détection de BoNT/B à une concentration pouvant aller jusqu'à  $0,5 \text{ pg.ml}^{-1}$  ( $0,5 \text{ DL}_{50}$  murine de BoNT/B par millilitre), et il est donc plus sensible que le test de létalité chez la souris. Notre laboratoire a mis au point un protocole de détection de BoNT/A à l'aide de colonnes qui sont aussi comparables à des colonnes de purifications par immuno-affinité. (Attrée, Guglielmo-Viret, Gros, & Thullier, 2007) L'anticorps monoclonal murin de capture, mAb 11F7 (anti-BoNT/A<sub>1</sub>-HC), a été greffé sur la matrice de colonnes Abicap® (Senova GmbH, Jena, Allemagne), puis l'échantillon est chargé sur la colonne. Un anticorps polyclonal biotinylé de lapin (anti-BoNT/A) est alors ajouté, puis la colonne est incubée en présence d'HRP (*HorseRadish Peroxidase*) conjugué à la streptavidine. La révélation est réalisée par incubation avec du TMB. Le seuil de détection de BoNT/A sous forme de complexes avec ces colonnes est égal à  $67,5 \text{ ng.l}^{-1}$  ( $5 \text{ DL}_{50}$  murine de BoNT/A par millilitre). Le protocole a été adapté pour pouvoir utiliser jusqu'à 5 ml d'échantillon, permettant de concentrer la toxine dans la colonne et donc d'abaisser le seuil de détection de BoNT/A sous forme de complexes à  $13,5 \text{ ng.l}^{-1}$  ( $1 \text{ DL}_{50}$  murine de BoNT/A par millilitre). Ce test est donc aussi sensible que le test de létalité chez la souris et il est réalisable en moins d'une heure, et il équipe les hopitaux militaires français.

Des tests *in vitro* endopeptidasiques chimioluminescents ont aussi été développés pour doser les lots de toxines botuliques et pour identifier des anticorps neutralisants. (R. G. A. Jones, Ochiai, Liu, Ekong, & Sesardic, 2008) Un peptide synthétique, SNAP25 ou VAMP2 selon le sérotype de toxine à tester, est adsorbé sur une plaque ELISA, puis la toxine spécifique du peptide est incubée. Après lavages, un anticorps monoclonal, spécifique d'un épitope accessible uniquement après clivage du substrat de la toxine, est incubé. Ce test permet la détection de  $40 \text{ fg.ml}^{-1}$  ( $0,01 \text{ DL}_{50}$ ) de BoNT/A ou  $4,8 \text{ pg.ml}^{-1}$  ( $0,2 \text{ DL}_{50}$ ) de BoNT/E.

## **4.7) Usage thérapeutique des toxines botuliques**

### **4.7.1) Historique**

Dès 1822, Kerner, après avoir étudié la toxine botulique, avait émis l'hypothèse que celle-ci pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques. Selon lui, de faibles doses de toxine botulique pourraient être bénéfiques pour le traitement de pathologies caractérisées par un état d'hyper excitation du système nerveux, telle qu'une hypersudation. Néanmoins, Kerner n'a jamais réussi à purifier la toxine et n'a donc pas eu l'occasion de réaliser des essais thérapeutiques. Il fallut attendre le 20<sup>ème</sup> siècle pour que des travaux d'Hermann SOMMER dans le laboratoire militaire de Camp Dietrick (aujourd'hui Fort Dietrick) permettent en 1920 de purifier BoNT/A. En 1946, les travaux de Carl LAMANNA et James DUFF sur la concentration et la cristallisation de protéines ont permis à Edward J. SCHANTZ (1908-2005) de produire les premiers lots uniformisés de toxine botulique, ce qui était un pré-requis indispensable pour son utilisation pharmaceutique. (Lamanna, Eklund, & McElroy, 1946) Des travaux de Daniel DRACHMAN en 1964 ont montré que l'injection d'infimes doses de la toxine produite par Schantz engendrait une paralysie flasque des muscles situés dans les pattes de poussins. (Drachman, 1964) A la fin des années 1960, Allan SCOTT, un chirurgien ophtalmologique, se rapprocha de Schantz afin de réfléchir à la formulation d'une solution injectable de toxine botulique, utilisable pour le traitement de l'hyperactivité des muscles oculaires. Initialement, le traitement du strabisme nécessitait de léser le muscle hyperactif pour que l'œil retrouve une fonction physiologique. Des résultats chez l'animal ont démontré que l'injection de quelques pico-grammes de toxine botulique induisait une longue paralysie flasque, confinée au muscle ciblé et sans effets secondaires notables. (A. B. Scott, Rosenbaum, & Collins, 1973). Les premiers essais chez l'Homme ont été effectués avec succès à partir de 1977 chez des volontaires sains et chez des personnes atteintes de strabisme. (A. B. Scott, 1981) Le succès de cette étude a conduit, en décembre 1989, la FDA à approuver le lot 79-11 de BoNT/A (préparé en novembre 1979) pour le traitement du strabisme et du blépharospasme. Ce lot a été commercialisé par Allergan (Irvine, Etats-Unis d'Amérique) sous le nom d'Oculinum puis sous les noms de Botox<sup>®</sup> et Vistabel<sup>®</sup>. (Ting & Freiman, 2004)

Au Royaume-Uni, on peut noter que les lots thérapeutiques de toxine botulique ont été produits au centre de recherche militaire CAMR (Center for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Royaume-Uni). Ces lots de toxines ont été utilisés, par exemple, par les médecins du Moorfields Eye Hospital et du National Hospital for Nervous Diseases pour le traitement de la contraction non contrôlée des muscles péri-oculaires. (Elston, 1985)

## Partie 4 : Le botulisme

Initialement seule la BoNT/A (commercialisée sous les noms de Botox<sup>®</sup>, Dysport<sup>®</sup> et Xeomin<sup>®</sup>) était utilisée en clinique. Cependant, depuis le 21 décembre 2000, une préparation de BoNT/B a été approuvée pour le traitement de la dystonie cervicale et est commercialisée sous les noms Neurobloc<sup>®</sup> (Eisai Ltd, acquisition d'US WorldMeds, Louisville, Etats-Unis d'Amérique) et Myobloc<sup>®</sup> (Elan Pharmaceuticals, Dublin, Irlande, filiale d'US WorldMeds, Louisville, Etats-Unis d'Amérique).

### 4.7.2) Utilisation actuelle et limites

Depuis la validation en 1989 par la FDA du premier lot de BoNT/A pour le traitement du strabisme et des blépharospasmes, le champ d'application thérapeutique de la toxine botulique s'est étendu à de nombreuses pathologies dont certains désordres musculaires chroniques (comme la dystonie cervicale), troubles urologiques, pathologies dermatologiques ou encore certaines maladies inflammatoires. La formulation leader du marché, le Botox<sup>®</sup>, est approuvée en thérapeutique dans 25 indications cliniques, dans 85 pays, et a été administrée à plus d'un million de personnes dans le monde. Ces dernières années, l'usage de la toxine botulique a pris un essor supplémentaire avec son utilisation en médecine esthétique. Depuis 2011, le volume des ventes de Botox<sup>®</sup> à but esthétique est supérieur à celui des ventes à but thérapeutique. Depuis son autorisation de mise sur le marché en 2002, le chiffre d'affaire du Botox<sup>®</sup> a évolué exponentiellement, de 25 millions de dollars en 2003 à 1,6 milliard de dollars en 2011 (rapports annuels d'Allergan), et ce malgré l'apparition de sociétés concurrentes proposant d'autres formulations de toxine botulique. Entre 1989 et 2009, plus de 29 millions d'injections de toxine botulique ont été effectués. On peut aussi noter que près de 2 500 articles scientifiques et médicaux évoquant le Botox<sup>®</sup> sont référencés. (Allergan, 2012)

Il existe cependant certaines limites à l'usage thérapeutique des toxines botuliques. En effet, beaucoup de maladies pour lesquelles une formulation de toxine botulique est prescrite sont chroniques, or l'effet des toxines botuliques n'est pas persistant (de l'ordre de quelques mois) et nécessite donc plusieurs injections. Cet usage itératif pose un problème d'immunogénicité car le système immunitaire du patient peut développer une réponse immunitaire humorale dirigée contre la toxine botulique. Actuellement, trois formulations de BoNT/A (Botox<sup>®</sup> / Vistabel<sup>®</sup>, Xeomin<sup>®</sup> / Bocouture<sup>®</sup> et Dysport<sup>®</sup> / Azzalure<sup>®</sup>) et deux de BoNT/B (Myobloc<sup>®</sup> et NeuroBloc<sup>®</sup>) sont disponibles. Dans le cas où une résistance est observée pour l'un de ces sérotypes, l'autre peut lui être substitué.

## 4.8) Traitement et prophylaxie du botulisme

Il existe actuellement peu de traitements spécifiques des intoxications par la toxine botulique et ceux-ci sont imparfaitement tolérés. (R. E. Black & Gunn, 1980) Néanmoins, associés aux traitements non spécifiques, ils ont permis de diminuer la mortalité du botulisme de 60 % avant 1950 à environ 5 % actuellement. (Shapiro, Hatheway, & Swerdlow, 1998) Les cas naturels de botulisme sont rares, ce qui permet une prise en charge personnalisée du patient dans un service de soins intensifs. Cependant, dans le cas où plusieurs personnes seraient intoxiquées simultanément avec de la toxine botulique, comme lors de l'utilisation d'une arme biologique, il serait difficile de faire face à l'afflux de victime. (S. S. Arnon *et al.*, 2001) Il est donc nécessaire de développer de nouveaux traitements pouvant être produits en grandes quantités, spécifiques, moins immunogènes et plus faciles à administrer à un grand nombre de personnes.

### 4.8.1) La vaccination

La vaccination est connue depuis les travaux d'Edward JENNER (1749-1823) en 1778 et de Louis PASTEUR (1822-1895) entre 1880 et 1885. Néanmoins, l'utilisation thérapeutique de la toxine botulique rend l'approche vaccinale contre le botulisme difficilement concevable. Néanmoins, aux Etats-Unis d'Amérique, des vaccins ont été développés et peuvent être prescrits pour les personnes à risques, comme les militaires qui peuvent être exposés aux armes biologiques, certains professionnels du secours à la personne qui pourraient être amenés à intervenir en cas d'acte bioterroriste, ou pour certains professionnels travaillant quotidiennement au contact de la toxine botulique comme les chercheurs ou les médecins injectants la toxine. En s'appuyant sur les travaux réalisés sur le tétanos, il a été suggéré de procéder à une vaccination en utilisant des toxines inactivées, éventuellement précipitées avec de l'alum, de l'éthanol froid, du chlorure de sodium ou un acide, afin d'accroître leur pureté. L'inactivation est généralement effectuée par un traitement ménagé par le formaldéhyde, qui permet de conserver l'immunogénicité de la toxine tout en supprimant sa toxicité. (James E Keller, 2008) Cependant, ce composé chimique peut engendrer des modifications structurales pouvant diminuer partiellement ou complètement l'apparition d'une réponse protectrice, et il est toxique à haute dose. L'iodacetamide est un composé non toxique *in vivo* pouvant remplacer le formaldéhyde. L'inactivation de la toxine

## Partie 4 : Le botulisme

botulique par alkylation par l'iodacetamide permet en effet d'obtenir une toxine inactivée induisant une réponse 600 fois plus neutralisante chez la souris qu'avec une toxine inactivée avec du formaldéhyde. Un tel résultat permet donc de diminuer le nombre d'injections nécessaire à l'obtention d'un titre neutralisant. Cependant les protocoles actuels utilisant l'iodacetamide présentent l'inconvénient majeur de n'inactiver que 95 % de l'activité catalytique de la toxine botulique, ce qui rend l'usage de la toxine ainsi inactivée difficilement concevable chez l'Homme. (Rusnak & Smith, 2009)

Un vaccin pentavalent expérimental, destiné aux personnes à fort risque d'exposition à la toxine botulique, a été développé et produit en quantité limitée depuis 1957 (initialement produit par Parke-Davis en 1957 puis modifié et produit par le *Michigan Department of Public Health*). Il permet d'obtenir une protection contre BoNT/A, B, C, D et E. (Fiock, Cardella, & Gearinger, 1963; Siegel, 1988) Il est préparé à partir des toxines de ces cinq sérotypes, inactivées avec 0,6 % de formaldéhyde, et complémenté avec du phosphate d'alum (adjuvant) et du thimérosal (conservateur). Cependant plusieurs problèmes de tolérance du vaccin ont été observés, conduisant le CDC à ne plus fournir ce produit depuis le 30 novembre 2011.

Afin de remplacer ce vaccin pentavalent, un vaccin recombinant heptavalent est actuellement en cours de développement. (Baldwin *et al.*, 2008) Il a été démontré que la région de la chaîne lourde impliquée dans la fixation à la cellule cible (HC<sub>C</sub>) comportait au moins un épitope protecteur et pouvait être immunogène. (Clayton, Clayton, Brown, & Middlebrook, 1995; Nowakowski *et al.*, 2002; Ravichandran *et al.*, 2007; Shearer *et al.*, 2010) Les régions recombinantes non toxiques HC<sub>C</sub> de chacun des sept sérotypes (comprenant de 407 à 437 acides aminés) ont été produites dans *Pichia pastoris* (Byrne, Smith, Montgomery, & Smith, 1998; Potter, Zhang, Smith, & Meagher, 2000) et dans *Escherichia coli* (Baldwin *et al.*, 2005; Tavallaie *et al.*, 2004), et ont servi de base au développement de ce vaccin heptavalent. Le choix des souches de *C. botulinum* dont sont issus les sept HC<sub>C</sub> a été réalisé sur la base de leurs propriétés sérologiques et de leurs capacités à produire facilement la toxine. Des souris ont reçues quatre injections (à 0, 14, 28 et 42 jours) du vaccin formé par le mélange équimolaire des sept régions HC<sub>C</sub> recombinantes, adjuvanté avec de l'alum (1 µg de chaque HC<sub>C</sub>, 7 µg au total). Ces souris ont survécu jusqu'à des injections de 100 000 DL<sub>50</sub> du sérotype de la toxine botulique correspondant au sérotype de la région HC<sub>C</sub> utilisé pour la vaccination. (Baldwin *et al.*, 2005, 2008; Pier *et al.*, 2008).

D'autres vaccins utilisant des approches différentes sont en cours de développement. (Aoki, Smith, & Atassi, 2010) Certains sont basés sur l'immunisation avec la toxine botulique



## Partie 4 : Le botulisme

entière, mais inactivée suite à l'introduction de mutations ponctuelles. Ces mutations ont été choisies car elles inactivent la toxine sans modifier sa structure tridimensionnelle et son immunogénicité. (Pier *et al.*, 2008; Webb, Smith, Wright, Brown, & Smith, 2009) D'autres candidats vaccins utilisent, par exemple, des vecteurs recombinants d'adénovirus codant pour la chaîne lourde de la toxine botulique BoNT/C mais qui sont incapable de répliquer. (Zeng *et al.*, 2007) Des vaccins à ADN nu sont aussi en cours de développement. Cependant ces deux stratégies ne sont actuellement pas aussi efficaces que la vaccination utilisant des toxines inactivées ou des protéines recombinantes. (Jathoul, Holley, & Garmory, 2004; Rusnak & Smith, 2009; Shyu *et al.*, 2000;) Plusieurs voies d'administration des vaccins ont aussi été étudiées, comme la vaccination par voie muqueuse (orale ou intra nasale), par voie sous-cutanée, ou par voie intramusculaire. (Edelman *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005; Ravichandran *et al.*, 2007; Rusnak & Smith, 2009; Torii *et al.*, 2002)

### 4.8.2) La sérothérapie

Actuellement le traitement spécifique du botulisme repose sur l'injection d'immunoglobulines dérivant de sérums immuns d'origine animale ou humaine, en complément d'un éventuel traitement antibiotique comme le metronidazole ou la benzylpenicilline dans le cas de d'une colonisation bactérienne. (Swenson, Thornsberry, McCroskey, Hatheway, & Dowell, 1980; Wells & Wilkins, 1996; Wenham & Cohen, 2008) Le cheval est un animal de choix pour l'obtention de sérums. En effet, après immunisation (principalement avec des toxines inactivées), celui-ci peut fournir un grand volume de sérum, permettant une commercialisation à grande échelle et à coût modéré. (D. Li, Mattoo, & Keller, 2012) Compte tenu de la rapidité d'action de la toxine botulique, les sérums doivent être rapidement injectés après intoxication car les anticorps sont inefficaces après que la toxine ait pénétré dans la cellule. Cinq préparations médicales d'anticorps sont approuvées, ou en voie d'approbation, par la FDA :

- Un sérum équin trivalent dirigé contre BoNT/A, B and E (Novartis, Bâle, Suisse / CDC, diffusion par le CDC stoppée)
- Un sérum équin heptavalent (dirigé contre BoNT/A à G) (Cangene Corporation, Winniped, Canada /CDC)
- Un sérum équin bivalent dirigé contre BoNT/A et B (BAT-AB, Sanofi Pasteur Limited, Paris, France / Institut Butantan Brésil)

## Partie 4 : Le botulisme

- Un sérum expérimental monovalent dirigé contre BoNT/E (BAT-E, Sanofi Pasteur Limited / Institut Butantan Brésil)
- Une préparation d'immunoglobulines d'origine humaine sélectionnées pour leur titre contre BoNT/A et B (BabyBIG<sup>®</sup>, California Department of Public Health).

En Europe, les cas de botulisme de l'adulte sont traités par l'antitoxine équine Behring dirigé contre BoNT/A, B and E (Novartis, Bâle, Suisse / CDC). Cette préparation, injectée par voie intra-veineuse, contient 750 IU d'anti BoNT/A, 500 IU d'anti BoNT/B et 50 IU d'anti BoNT/E par millilitre. La même dose est injectée aux adultes et aux enfants (s'ils ne sont pas traités pas le BabyBIG<sup>®</sup>, voir plus bas) : une injection initiale de 500 mL, suivie d'une à deux perfusions lentes de 250 mL, en fonction de l'état du patient.

Aux Etats-Unis d'Amérique, le CDC avait approuvé l'usage du sérum trivalent. Celui-ci était composé de F(ab')<sub>2</sub> d'origine équine, neutralisant BoNT/A, B et E. Pour remplacer les antitoxines de Sanofi Pasteur dirigées contre BoNT/A, B et E, dont les brevets sont échus depuis le 12 mars 2010, le CDC a annoncé la mise à disposition d'une antitoxine expérimentale d'origine équine, dirigée contre l'ensemble des sept sérotypes. (CDC, 2010; Hibbs *et al.*, 1996; LOPH, 2011) Cette antitoxine produite par Cangene est maintenant le seul traitement disponible pour les cas de botulisme affectant les adultes aux Etats-Unis d'Amérique, elle a été approuvée par la FDA le 22 mars 2013. (Cangene, 2013) Elle est composée de plus de 90 % de Fab et F(ab')<sub>2</sub> et de moins de 2 % d'immunoglobuline entière (IgG).

Cependant, bien qu'efficace, ces antitoxines sont toutes d'origine équine et peuvent donc être reconnues par le système immunitaire de l'Homme. (R. E. Black & Gunn, 1980; Hibbs *et al.*, 1996) Ces préparations peuvent donc causer des réactions allergiques, pouvant aller jusqu'à un choc anaphylactique. Les enfants, plus sensibles que les adultes à de tels phénomènes, sont traités avec une préparation d'immunoglobulines d'origine humaine (BabyBIG<sup>®</sup>), obtenue à partir de personnes ayant été immunisées avec le vaccin pentavalent (BoNT/A, B, C, D et E) et dont le sérum présentait un titre élevé contre BoNT/A et B. Actuellement le BabyBIG<sup>®</sup> est le seul traitement approuvé (FDA, 2003) pour les cas de botulisme infantile causés par BoNT/A et B, les deux sérotypes à l'origine de presque tous les cas chez l'enfant. (Stephen S Arnon, Schechter, Maslanka, Jewell, & Hatheway, 2006)

### 4.8.3) Les anticorps neutralisants monoclonaux

Différentes technologies élaborées depuis 1975 ont permis d'obtenir des anticorps monoclonaux murins, chimériques, humanisés et entièrement humains, récemment.

#### 4.8.3.1) Neutralisation de BoNT/A

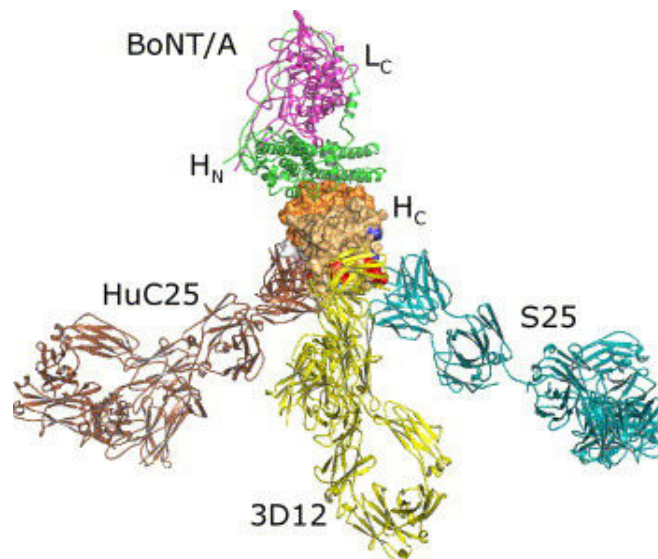
Plusieurs équipes ont initialement isolé des anticorps neutralisants murins. C'est le cas de l'équipe de James MARKS qui, dès 1997 a obtenu des scFv neutralisant BoNT/A à partir de souris immunisées avec la chaîne lourde de BoNT/A (BoNT/A-HC) purifiée. (P Amersdorfer *et al.*, 1997) Dans cette étude, Amersdorfer *et al* (P Amersdorfer *et al.*, 1997) ont immunisé des souris deux fois (0 et 2 semaines) avec la chaîne lourde de BoNT/A, avant de les soumettre à une intoxication simultanée ("*challenge*") avec 100 000 DL<sub>50</sub> de BoNT/A deux semaines après la deuxième injection. Seules les souris ayant survécu ont été sacrifiées pour isoler les anticorps à partir de leurs rates. L'isolement a été effectué par la technologie d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages, contre la toxine BoNT/A immobilisée, ou en solution, afin d'éviter les éventuels problèmes de dénaturation protéique pouvant apparaître lors de la fixation d'une protéine à un support solide. Après criblage, 10 scFv interagissant avec BoNT/A ont été identifiés. Un deuxième protocole a aussi été utilisé en parallèle. Les souris ont été immunisées trois fois (0, 2 et 4 semaines) avant d'être sacrifiées, sans avoir subi de challenge par la toxine. Avec ce protocole 18 scFv interagissant avec BoNT/A ont été isolés. Les 28 anticorps isolés grâce à ces deux protocoles présentent des affinités de 1,1 à 73 nM, et ciblent quatre épitopes distincts. Cependant, seul deux de ces quatre épitopes se sont avérés protecteurs dans le test de paralysie du nerf de l'hémi-diaphragme. L'équipe de MARKS a observé que seuls 50 % des scFvs interagissant avec la chaîne lourde de BoNT/A interagissent aussi avec l'holotoxine, suggérant que seule une partie de la chaîne lourde est exposée à la surface de l'holotoxine. Parmi les scFvs isolés, les scFv S25 et C25, sont les plus neutralisants *in vivo*, puisqu'à un rapport molaire ([anticorps] / [BoNT/A]) égale à 1 000, ils induisent un retard de paralysie de 152 et 270 %, respectivement, dans le test de paralysie du muscle de l'hémi-diaphragme. Un effet synergique de ces deux anticorps a été observé, puisque leur combinaison (mélange équimolaire de S25 et C25, concentration finale de 20 nM) induit un retard de paralysie de 390 %. Dans un autre travail, réalisé à partir de personnes immunisées avec le vaccin pentavalent (BoNT/A à E),

## Partie 4 : Le botulisme

Marks *et al* ont isolé, par la technique d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages, l'anticorps humain 3D12 dont l'affinité pour BoNT/A est de 37 nM. (Peter Amersdorfer *et al.*, 2002; Mullaney, Pallavicini, & Marks, 2001) Les épitopes reconnus par les anticorps S25, C25 et 3D12 ont été localisés : S25 et 3D12 interagissent avec la région C-terminale de la chaîne lourde, et C25 interagit avec un épitope à l'interface entre la région C et N-terminale de la chaîne lourde (Figure 73). Les épitopes de S25, 3D12 et C25 ont respectivement été situés entre les résidus 1115 et 1223, 1131 et 1264 et 889 et 1295. Mullaney *et al* ont essayé de localiser plus précisément ces épitopes, mais aucun des trois anticorps n'est apparu interagir avec des fragments de la chaîne lourde de BoNT/A d'une taille de 54 acides aminés, ce qui semble montrer que l'épitope est conformationnel. Afin de pouvoir tester ces trois scFv *in vivo*, Nowakowski *et al* (Nowakowski *et al.*, 2002) les ont convertis en IgG. *In vivo*, la co-injection intra-péritonéenne de 50 µg de l'une des trois IgG et de 20 DL<sub>50</sub> de BoNT/A n'empêche pas la mort des souris bien que leur temps de survie soit prolongé. Cependant, lors de la co-injection de deux anticorps (25 µg de chaque IgG), chacune des trois paires (C25+S25, C25+3D12 ou S25+3D12) a permis la survie de toutes les souris intoxiquées avec 100 DL<sub>50</sub> de BoNT/A. La paire la plus protectrice (C25+3D12) permet 90 % de survie lors d'une intoxication simultanée avec 1 000 DL<sub>50</sub> de BoNT/A. La co-injection des trois anticorps (16,7 µg de chaque IgG) permet la survie de toutes les souris lors d'une intoxication simultanée avec 5 000 DL<sub>50</sub> de BoNT/A, et 50 % de survie en utilisant 20 000 DL<sub>50</sub>. Nowakowski *et al* ont suggéré que cette augmentation de la protection pouvait être due à une augmentation de l'affinité fonctionnelle ; la modification de la conformation de la toxine après la fixation du premier anticorps augmenterait l'affinité du second puis du troisième anticorps. Il est aussi possible que la fixation du premier anticorps monoclonal transformerait la toxine initialement monovalente en un antigène multivalent. De plus le modèle selon lequel la toxine botulique utilise deux récepteurs pour pénétrer dans la cellule (gangliosides et SV2 voir synaptotagmine I, dans le cas de BoNT/A) peut expliquer que deux anticorps soit nécessaires pour neutraliser efficacement la toxine. Selon les normes internationales en vigueur, une IU (Unité Internationale) permet chez la souris de neutraliser 10 000 DL<sub>50</sub> de BoNT/A. (Bowmer, 1963) Le titrage du mélange composé des trois anticorps est apparue être de 45 IU.mg<sup>-1</sup>, ce qui la rend 90 fois plus neutralisante que le BabyBIG<sup>®</sup>. L'anticorps C25 a été humanisé (huC25) puis sujet à un processus de maturation d'affinité. L'un des mutants, l'IgG CR2, a une affinité améliorée à la fois pour BoNT/A<sub>1</sub> (de 45,1 nM avec huC25 à 10 pM avec CR2) et BoNT/A<sub>2</sub> (de 19,3 nM avec huC25 à 290 pM avec CR2), et il est devenu réactif vis-à-vis de BoNT/A<sub>3</sub> (150 pM). KALB *et al* ont démontré

## Partie 4 : Le botulisme

que CR2 inhibe partiellement l'activité catalytique de BoNT/A<sub>1</sub> et BoNT/A<sub>2</sub>. (Kalb *et al.*, 2009)



**Figure 73 : Modélisation de l'interaction entre les anticorps S25, C25 et 3D12 et BoNT/A.**

Selon cette modélisation (logiciel Pymol, DeLanoScientific), les trois anticorps peuvent se fixer simultanément à la chaîne lourde. (Levy *et al.*, 2007)

D'autres équipes, comme celle d'Adekar, ont obtenues des immunoglobulines neutralisant BoNT/A en ciblant sa chaîne légère et sa chaîne lourde. Les IgG 4LCA (dirigée contre la chaîne légère) et 6A (dirigée contre la chaîne lourde) ont ainsi été isolées à partir du sang de volontaires ayant été immunisés cinq fois par le vaccin pentavalent. (Adekar, Jones, *et al.*, 2008; Adekar, Takahashi, *et al.*, 2008) Les affinités de ces IgG ont été mesurées en solution, par la technologie Kinexa<sup>®</sup>, comme égales à 31 pM (4LCA) et 6,9 pM (6A). L'efficacité de neutralisation des anticorps ciblant la chaîne légère peut être étudiée *in vitro*, en particulier en utilisant un test endopeptidasiq (R. G. A. Jones *et al.*, 2008) ou un test de clivage du substrat de la toxine en culture cellulaire (Eubanks *et al.*, 2007; J E Keller, Neale, Oyler, & Adler, 1999). Adekar *et al* (Adekar, Takahashi, *et al.*, 2008) ont utilisé un test cellulaire pour analyser la capacité de neutralisation des IgG 4LCA et 6A. En se plaçant à un rapport molaire ([IgG 4LC4 ou 6A] / [BoNT/A]) de 6 000/1 les IgG 4LCA et 6A inhibent respectivement 92 % et 84 % de l'activité catalytique de la toxine. *In vivo*, un mélange équimolaire (50 µg de chaque IgG) de 4LCA et 6A protège l'ensemble des souris intoxiquées simultanément avec 1 000 DL<sub>50</sub> de BoNT/A, soit avec un rapport molaire molaire ([IgG 4LC4 + 6A] / [BoNT/A]) de 25 000/1, qui est 40 fois et 400 fois meilleur que lorsque 4LCA et 6A, respectivement, sont utilisés seul.

#### 4.8.3.2) Neutralisation de BoNT/B

Actuellement, peu d'anticorps recombinants dirigés contre BoNT/B ont été isolés. Zhou *et al* (H. Zhou, Zhou, Pellett, Johnson, & Janda, 2009) ont décrit l'isolement d'un anticorps neutralisant BoNT/B à partir d'une banque humaine naïve de scFv, criblée contre la chaîne lourde de BoNT/B en solution. Les scFv C4 et F2 ont été isolés et interagissent à la fois avec l'holotoxine BoNT/B et avec sa chaîne lourde. Ces deux scFv ont été convertis au format Fab, et leurs affinités, mesurées en résonance plasmonique de surface, sont de 320 nM (Fab C4) et 400 nM (Fab F2). (H. Zhou *et al.*, 2009) L'efficacité de neutralisation du Fab F2 a été analysée dans le test cellulaire d'étude du clivage VAMP2, et l'inhibition de 50 % de l'activité de BoNT/B est obtenue avec un rapport molaire minimal ( $[Fab\ F2] / [BoNT/B]$ ) de 1 000.

Chen *et al* (C. Chen *et al.*, 2012) ont isolés trois IgG murines, 8E10, 5G10 et 2F4, dirigées contre la chaîne lourde de BoNT/B. L'anticorps 8E10 reconnaît un épitope situé dans la région impliquée dans la fixation aux gangliosides avec une affinité de 2,2 nM. Les anticorps 5G10 et 2F4, eux, interagissent avec des épitopes situés dans la région impliquée dans la fixation au récepteur de haute affinité, avec des affinités respectives de 2,9 nM et 5,8 nM. *In vivo*, lors d'une intoxication simultanée avec 20 DL<sub>50</sub> de BoNT/B, chaque anticorps injecté séparément à la dose de 100 µg par souris permet à tous les animaux de survivre pendant 96 heures. La combinaison équimolaire des trois anticorps ou la combinaison de 8E10 et 5G10 (100 µg d'anticorps au total dans chacune des deux combinaisons) permettent d'obtenir 100 % de survie lors d'une intoxication simultanée avec 640 DL<sub>50</sub> de BoNT/B et 50 % de survie lors d'une intoxication simultanée avec 1 280 DL<sub>50</sub>, soulignant l'action synergique de ces anticorps. On peut remarquer que lorsque ces anticorps sont testés par paires, la combinaison de 5G10 et 2F4 n'est pas protectrice bien qu'ils reconnaissent des épitopes différents. Ce résultat met en évidence l'intérêt de cibler simultanément des épitopes situés dans la région impliquée dans la fixation aux gangliosides et dans la région impliquée dans la fixation au récepteur spécifique de haute affinité. (Tavallaie *et al.*, 2004) Il a été récemment observé que l'épitope de BoNT/B reconnu par 8E10 (1259 SKWY 1262) est également présent dans BoNT/A, E et F. L'anticorps 8E10 peut interagir avec les chaînes légères natives et dénaturées de BoNT/A, B, E et F. L'affinité de 8E10 pour ces quatre sérotypes est comprise entre 2,592 nM (BoNT/B) et 7,690 nM (BoNT/F). Des expériences *in vivo* de compétition avec 20 DL<sub>50</sub> de chacun des cinq sérotypes ont été effectuées. Le taux de protection induit par l'anticorps 8E10 est de 100 % dans le cas

## Partie 4 : Le botulisme

de BoNT/B, 83 % dans le cas de BoNT/A et F et 67 % dans le cas de BoNT/E. Cependant l'origine murine de ces anticorps rend difficile leur usage clinique.

### 4.8.3.3) Neutralisation de BoNT/E

A partir de souris immunisées avec BoNT/E inactivée, Tsuzuki *et al* (Tsuzuki *et al.*, 1988) ont isolés 17 hybridomes sécrétant des anticorps interagissant avec BoNT/E. Des tests de protection ont été réalisés chez les souris mettant en évidence que cinq de ces IgG neutralisent BoNT/E lors d'intoxications simultanées avec 2,5 DL<sub>50</sub> murines de BoNT/E. Les épitopes reconnus par ces cinq IgG ont été localisés par Kubota *et al* au niveau de la chaîne lourde de BoNT/E. (Kubota *et al.*, 1997) Dans l'objectif d'isoler des anticorps neutralisant BoNT/E en ciblant sa chaîne légère, Tsuzuki *et al* (Tsuzuki *et al.*, 1988) ont immunisé des souris BALB/c avec la chaîne légère de BoNT/E. Aucun des 306 hybridomes ainsi isolés, sécrétant des anticorps interagissant en ELISA avec la chaîne légère de BoNT/E, ne s'est avéré neutralisant.

A partir de volontaires humains immunisés avec le vaccin pentavalent contenant la toxine BoNT/E<sub>3</sub> inactivée, Marks *et al* ont isolé un scFv, 4E17, interagissant avec BoNT/A (K<sub>D</sub>=1,34 nM), BoNT/B (K<sub>D</sub>=100 nM), BoNT/E (K<sub>D</sub>=14,1 nM) et dans une moindre mesure avec BoNT/F (K<sub>D</sub>>1000 nM). (C Garcia-Rodriguez *et al.*, 2011) Des variants du scFv 4E17 ont été générés par *VL shuffling*. Cette banque de variants a été criblée par la technique d'exposition de fragment d'anticorps à la surface des levures, et le scFv 4E17.1 a été isolé. Celui-ci est apparu présenter des affinités de 3,5 à 61 fois plus élevées que le scFv original pour les quatre sérotypes : BoNT/A (0,09 nM), BoNT/B (28 nM), BoNT/E (0,23 nM) et BoNT/F (16,8 nM). Le scFv 4E17.1 a ensuite été exprimé sous forme d'une IgG1 entière et testé *in vivo*. Les tests de protection ont mis en évidence que 25 µg de cette immunoglobuline permettaient de protéger complètement des souris ayant reçu 200 DL<sub>50</sub> de BoNT/E. L'épitope de BoNT/E ciblé par 4E17.1 est localisé au niveau de l'extrémité de la région N-terminale de la chaîne lourde de BoNT/A, B et E (région 750-758 pour BoNT/A, région 738-746 pour BoNT/B et région 723-731 pour BoNT/E), empêchant donc la pénétration cellulaire. (Fischer *et al.*, 2008; C Garcia-Rodriguez *et al.*, 2011)



#### 4.8.4) Les inhibiteurs synthétiques

Des recherches ont porté sur l'identification de petites molécules synthétiques inhibant la toxicité des toxines botuliques. En effet celles-ci sont faciles à produire et elles pourraient pénétrer dans les cellules. Grâce à l'utilisation de criblages à haut débit, différentes études ont identifié des molécules inhibitrices qui pourraient être utilisées en prophylaxie et en thérapeutique. (Burnett *et al.*, 2003; Cardinale *et al.*, 2011) Ces recherches sont principalement centrées sur l'inhibition de l'activité catalytique des chaînes légères de BoNT/A, B et E. (Kumar, Agarwal, & Swaminathan, 2012; B. Li, Cardinale, *et al.*, 2011; B. Li, Peet, *et al.*, 2011; Salzameda *et al.*, 2011; Stowe *et al.*, 2010) Des travaux ont notamment mis en évidence que des ions tels que le calcium, le sulfate et l'acétate pouvaient inhiber l'activité catalytique des chaînes légères de BoNT/A, B et E en se fixant de façon non spécifique au niveau de régions proches du site catalytique, ce qui diminuerait la flexibilité de la chaîne légère. (Mizanur, Gorbet, Swaminathan, & Ahmed, 2012) Néanmoins ces ions présentent l'inconvénient d'être peu spécifiques et risquent donc de perturber d'autres mécanismes cellulaires. Différentes molécules inhibitrices plus complexes comme le 2-mercapto-3-phénylpropionyl-RATKML ou des dérivés de l' $\alpha$ -mercaptoamide sont plus spécifiques et interagissent plus fortement avec la chaîne légère de BoNT/A. Ces molécules présentent des constantes d'inhibition de l'ordre de 300 nM. (J. J. Schmidt & Stafford, 2002; Sukonpan *et al.*, 2004) Ces molécules ont été optimisées en modifiant leurs structures afin d'augmenter leur spécificité pour la toxine botulique et d'accroître leur efficacité, permettant de diminuer leurs  $CI_{50}$ . Cependant de telles modifications sont apparues augmenter la toxicité cellulaire. (B. Li, Cardinale, *et al.*, 2011) Actuellement, les essais cliniques ont échoués et aucun inhibiteur synthétique de la toxine botulique n'est disponible dans la pharmacopée.



# *Partie 5 : Résultats*

## **Introduction générales aux travaux expérimentaux**

Les anticorps sont des outils permettant la prise en charge effective du risque biologique provoqué. Ils permettent la neutralisation de la majorité des agents du risque biologique provoqué et ils peuvent aussi bien être utilisés en thérapie ou en prophylaxie, pour les personnes dont le risque d'exposition vis-à-vis de ces agents est élevé. Plusieurs travaux de notre laboratoire ayant décrits l'isolement d'anticorps recombinants neutralisant la ricine ou les toxines du bacille du charbon, une stratégie expérimentale similaire a été utilisé pour l'isolement d'anticorps recombinants neutralisant les toxines botuliques, dans le cadre du projet européen AntiBotABE. C'est dans ce contexte scientifique que ce sont inscrits mes travaux de thèse dont l'objectif était l'isolement d'anticorps recombinants neutralisant la toxine botulique A en ciblant sa chaîne lourde et la toxine botulique E en ciblant sa chaîne légère.

La stratégie expérimentale de notre laboratoire repose sur l'immunisation de macaques. Néanmoins, les chimpanzés sont des primates non humains phylogénétiquement plus proches de l'Homme et leurs anticorps pourraient donc être plus similaires aux anticorps humains que ne le sont les anticorps de macaques. Une revue de la littérature a été réalisée afin d'identifier les études ayant utilisés des macaques et des chimpanzés pour isoler des anticorps recombinants. Cette revue de la littérature nous a conduits à remettre en question notre stratégie expérimentale afin de savoir si les macaques et les chimpanzés peuvent être utilisés indifféremment pour l'isolement d'anticorps à visée thérapeutique. Le troisième article, publié en premier auteur dans le journal *Current Drug Discovery Technologies*, présente les résultats de la comparaison bioinformatique des domaines variables des anticorps de macaques ou de chimpanzés avec les domaines variables des anticorps humains les plus proches. Cette étude nous a permis de déterminer si l'une des deux espèces permettait d'isoler des anticorps plus proches des anticorps humains, et donc potentiellement mieux tolérés.

Les articles 2 et 3 ainsi que le projet d'article 4 présentent le travail expérimental principal de cette thèse puisqu'ils décrivent l'isolement d'anticorps neutralisant les toxines botuliques A et E dans le cadre du projet AntiBotABE. L'article numéro 2, soumis dans le journal *PLOS one* par notre partenaire allemand, décrit l'isolement d'un anticorps neutralisant la toxine A en ciblant sa chaîne légère. L'article 3, qui sera soumis prochainement, décrit

## *Partie 5, résultats : introduction générale*

l'isolement du premier anticorps recombinant neutralisant la toxine botulique E en ciblant sa chaîne légère. Enfin le projet d'article 4 est complémentaire de l'article 4 puisqu'il présente l'isolement d'un anticorps neutralisant la toxine botulique A en ciblant sa chaîne lourde.

En trois ans il n'était pas possible de localiser l'épitope des anticorps isolés dans le cadre du projet AntiBotABE, et compte tenu de l'intérêt de ces anticorps pour la biodéfense, leurs épitopes ne peuvent pas être publiés. Cependant, la localisation de l'épitope d'un anticorps représente l'aboutissement de notre stratégie expérimentale, puisque lors du processus de brevetage d'un anticorps la connaissance de l'épitope ciblé est une information importante ; breveter simultanément l'anticorps et son épitope permet qu'aucun autre anticorps ciblant le même épitope ne puisse être breveté à son tour. En outre, les techniques de localisation d'épitopes sont l'une des techniques permettant de déterminer par quel mécanisme l'anticorps agit. Le deuxième article, publié dans le journal PLOS one, décrit donc la localisation de l'épitope de l'anticorps 2LF, qui avait été isolé en 2007 dans notre laboratoire. La localisation de l'épitope de cet anticorps a été réalisée à l'aide d'une nouvelle approche expérimentale utilisable pour la localisation d'épitopes partagés.

Un article de revue, publié dans le journal Bioterrorism & Biodefense, est présenté en annexe en page 255, à la suite de la partie conclusion et perspective. Cette revue représente une introduction générale aux travaux de thèse puisqu'il résume notre stratégie expérimentale consistant à utiliser des anticorps recombinants pour neutraliser les toxines du risque biologique provoqué. Cet article s'appuie sur les travaux menés précédemment dans notre laboratoire, qui ont conduit à l'isolement d'anticorps neutralisant les toxines du bacille du charbon et la ricine.

## Article 1 :

### **Isolement d'anticorps thérapeutiques à partir de primates non-humains**

*Article accepté, premier auteur*

#### Introduction de l'article 3 :

Une revue de la littérature a été réalisée, et 22 études décrivant l'isolement d'anticorps à partir de primates non humains immunisés ont été dénombrées. L'ensemble de ces travaux décrivent la construction de banques (hyper-)immunes dont la diversité varie de  $10^5$  à  $10^9$  clones, et dont le criblage a permis l'isolement d'anticorps dirigés contre différents agents biologiques comme le virus de la dengue 2 et 4, la toxine botulique A, la ricine ou encore le virus Ebola. Dans ces 22 études, 10 utilisent des macaques (*Macaca fascicularis* et *Macaca mulatta*) et 12 utilisent des chimpanzés (*Pan troglodytes*). Sur les 10 études ayant utilisé des macaques, sept sont issues de notre laboratoire, et les 12 études utilisant des chimpanzés sont toutes issues du *National Institutes of Health* (Bethesda, Etats-Unis d'Amérique). Cette revue de la littérature nous a conduit à remettre en question notre stratégie expérimentale, notamment pour savoir si les chimpanzés ne permettaient pas d'isoler des anticorps plus proches des anticorps humains que ne le permettent les macaques. Cependant, aucune étude publiée n'avait comparé le degré d'identité peptidique des domaines variables des anticorps de macaques et de chimpanzés avec les anticorps humains, donc ce travail a été réalisé.

Alors que les macaques ont divergé de l'Homme il y a 30 millions d'années, les chimpanzés ont divergé il y a seulement six millions d'années. Les séquences peptidiques des anticorps de chimpanzés pourraient donc être plus proches des séquences des anticorps humains que ne le sont les séquences des anticorps de macaques. Les chimpanzés pourraient ainsi être préférés aux macaques pour isoler des anticorps à visée thérapeutique. Cependant, les chimpanzés sont classés parmi les animaux en voie de disparition par la Convention Internationale pour le Commerce des Espèces en Voie de Disparition (*Convention for International Trade of Endangered Species*, CITES), rendant leur accès très limité. Aux Etats-Unis d'Amérique, bien que l'utilisation des chimpanzés soit autorisée, elle est très réglementée. En particulier, sur des recommandations de l'Institut National de Médecine des

Etats-Unis d'Amérique datant de 2011, le *National Institutes of Health* a annoncé en janvier 2013 qu'il renonçait à l'utilisation des chimpanzés pour ses études, à de rares exception près, comme l'isolement d'anticorps. Dans d'autres pays, comme en France, l'utilisation expérimentale des chimpanzés est proscrite. Cependant, il existe une antenne du Service de Santé des Armées, à Franceville au Gabon, qui dispose d'une animalerie élevant des Chimpanzés et les recherches effectuées sur ces chimpanzés sont régulées par les comités d'éthiques gabonais. En conséquence, si les anticorps des chimpanzés sont réellement de nature plus humaine que les anticorps de macaques, il nous serait peut être possible de changer de stratégie expérimentale, et de travailler en collaboration avec cette antenne. Contrairement aux chimpanzés, les macaques peuvent être élevés dans des réserves ou en captivité, et ne sont donc pas en voie de disparition, facilitant ainsi leur accession et leur utilisation, comme nous le faisons. Si les chimpanzés ne présentent pas d'avantages significatifs à être utilisé pour l'isolement d'anticorps, notre laboratoire continuera donc à utiliser des macaques, dont l'accès est plus simple.

Un travail d'analyse de séquences a donc été réalisé, afin de déterminer si les domaines variables des anticorps de chimpanzés sont plus proches de leurs homologues humains, que les domaines variables des anticorps de macaques. Cette analyse porte sur l'étude de 107 et de 40 séquences peptidiques de domaines variables d'anticorps isolés à partir de macaques et de chimpanzés, respectivement. Les séquences peptidiques des anticorps de macaques ont été obtenues à partir des banques de séquences en ligne, mais ces banques ne contenaient pas de séquences d'anticorps de chimpanzés. Les 40 séquences de domaines variables des anticorps de chimpanzés, ont donc dues être traduites à partir des publications correspondantes, ce qui explique que le nombre de séquences d'anticorps de chimpanzés analysé soit plus faible.



# Isolation of Antibodies From Non-human Primates for Clinical Use

Arnaud Avril<sup>1</sup>, Jeffrey Froude<sup>1,3</sup>, Jacques Mathieu<sup>2</sup>, Thibaut Pelat<sup>\*1</sup> and Philippe Thullier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de biotechnologie des anticorps et des toxines, Département de microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA-CRSSA), 38702 La Tronche Cedex, France; <sup>2</sup>Département de microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA-CRSSA), 38702 La Tronche Cedex, France; <sup>3</sup>US Army Medical Research and Materiel Command, Fort Detrick, MD 21702, USA

**Abstract:** Antibodies intended for clinical use have been isolated from non-human primates (NHP), chimpanzees (*Pan troglodytes*) and macaques (*Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*), essentially with the use of the phage-display technology. All studies presenting such isolations have been reviewed and presented here, following the main steps of this technology, and advantages and disadvantages of NHP species were analyzed. Optimization of the tolerance of chimeric NHP-human antibodies by germline humanization was mentioned, and the recent alleviation of legal constraints was revealed. The methodology combining the use of phage-displayed libraries built from immunised NHP with germline humanization should be chosen more frequently to develop well-tolerated IgGs, directed against infectious or human antigens.

**Keywords:** non-human primates, macaque, chimpanzee, antibodies, phage, humanization, clinical, patent.

## INTRODUCTION

Human antibodies represent the latest generation of recombinant antibodies, which is a rapidly evolving and expanding class of therapeutic molecules, and human antibodies may be isolated from convalescents or vaccinees. This option may not be utilized to isolate antibodies of all specificities, particularly not antibodies targeting human antigens, as these antigens are not immunogenic in humans. Due to this limitation, two main strategies have been designed to isolate human antibodies. The first strategy utilizes the human primary response, recapitulated in phage-displayed naïve libraries. However, antibody fragments isolated from these libraries generally present low affinities, functionally equivalent to IgM thus in the micromolar range. The second strategy takes advantage of the immune systems secondary response, which involves an affinity maturation process so that corresponding antibodies present high affinities, in the nanomolar range. When human immunisation is not conceivable, the second strategy utilizes animals engineered to be functionally equivalent to humans, as their loci encoding antibodies were replaced by their human counterparts [1-3]. However, these animals are difficult to obtain and it was suggested early on that non-human primates (NHP) may be utilized for the same purpose [4, 5].

NHP or Anthroidea represent a large taxon with genus Strepsirrhini (essentially Lemurs and Galago) estimated to have branched out 77 million years ago, and with Ceboidea (essentially Marmoset, Squirrel and Titi monkeys) estimated

to have diverged 43 million ago. Cercopithecoidea (Baboon, Macaque and Vervet) and Hominoidea (Human, Chimpanzee, Gorilla and Orangutan) diverged 30 million years ago. Within Hominoidea, the human and chimpanzee species are the most proximal as they separated one from the other only 6 million years ago, and in fact the human/chimpanzee divergence is utilized as a calibration point for the differences between Anthroidea species. By this measure, macaques are five times more different than chimpanzees to humans [6, 7].

Chimpanzees (*Pan troglodytes*) and macaques (*Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*) have both been utilized for the isolation of recombinant antibodies. Chimpanzees have been chosen for their proximity with humans. They are listed on Appendix I of the Convention for International Trade of Endangered Species (CITES) (<http://cites.org/eng/app/appendices.php>) because *Pan troglodytes* are threatened by extinction, and trade in the corresponding specimens is permitted only under exceptional circumstances. Regarding macaques, only trade in *Macaca silenus* is restricted. *M. fascicularis* (also called cynomolgus or crab-eating monkey) and *M. mulatta* (also called rhesus monkey) are not listed in any CITES appendices and are much more accessible, all the more that they are raised for experimental purposes, for instance in Mauritius and China.

Twenty two studies published in the scientific literature, presenting the isolation of antibodies from NHPs are reviewed here. Twelve involved chimpanzees and originated from the same research group [8-19], while the ten other studies involved macaques [20-29] and we co-authored seven of these ten articles [20-26]. All these studies are based on phage-displayed libraries, and they will be presented here according to the main steps of the phage tech-

\*Address correspondence to this author at the Unité de biotechnologie des anticorps et des toxines, Département de microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA-CRSSA), 38702 La Tronche Cedex, France; Tel: + 33 (0)4 76 63 97 24; Fax: 69 17; E-mail: [t.pelat@orange.fr](mailto:t.pelat@orange.fr)

nology. Of note, macaque antibodies were also isolated by cellular technologies in the past, but these studies were only published as patents [30-32] and will not be presented here. This presentation of the isolation of recombinant antibody fragments from NHP utilizing the phage technology will allow general rules to be drawn, but differences between macaques and chimpanzees will also be noted. In addition, several details of our procedure will be presented and justified for the first time. The expression of the variable regions corresponding to these NHP antibody fragments in fusion with constant region, to form full-sized IgGs, is not specific to the isolation of antibodies from NHP and will not be reviewed in the present article. Such chimeric NHP-human IgGs, sometimes called "primatized" IgGs, are represented by galaximab (IDEC 114) [33], keliximab [34], and lumiliximab [35] which was tested in clinical trials and proved well tolerated [36].

### NHP Immunisation

Experiments with NHP are more strictly regulated than those utilizing other mammals, particularly regarding ethical aspects, surveillance and adequate facilities. NHP specimens chosen for experimentation should have their CITES and sanitary certificates, and macaques might be acclimated in housing facilities for six weeks prior to immunisation. Of the ten studies involving macaques [20-29], only one utilized a specimen of *Macaca mulatta* (rhesus macaque) while the others utilized *M. fascicularis* (see table 1 for features of the studies reviewed here). Studies utilizing chimpanzees for isolation of recombinant antibodies have utilized two animals in parallel [8-14,16-18], certainly due to the risk of raising immune responses of low neutralizing capacities in non-syngenic animals. However, the two most recent studies were successful with one chimpanzee only [15,19], as were all studies with macaques. Regarding our use of macaques, animals are strictly selected according to blood count and clinical observation. Bone marrow is sampled before immunisation, then retro-amplified with primers specific for IgG VH or VL: if a positive response is observed, it indicates an ongoing humoral immune response, whatever the immunogen may be. Such a response leads to our refusal of the animal since the following immune library would not be focused on the antigen of interest but the macaque may be utilized for other, non-immunological studies. It might be noted that one macaque has been utilized for two different studies [23, 26], and a chimpanzee was also utilized twice [18, 19].

A large range of immunogens has been administered in NHPs to raise the response allowing antibody isolation, from human vaccines [8-9, 15, 21] to RNA administered in the liver [16, 17]. The immunogens should not endanger the animal's health. Surface proteins of fungal (CRf2) or bacterial (poly- $\gamma$ -D-glutamic acid or  $\gamma$ DPGA) origins, toxin sub-units such as protective antigen (PA), lethal factor (LF), edema factor (EF), ricin chain A (RTA), botulinum neurotoxin A1 light chain (BoNT/A1-L) have been utilized. Immunogens also successfully utilized to isolate NHP antibody fragments include live attenuated Simian immunodeficiency virus (SIV), Hepatitis E virus (HEV), Hepatitis A virus (HAV), inactivated Venezuelan equine encephalitis viruses (VEEV), and live vectors displaying viral surface proteins of the Ebola virus (EBOV). It might be noted that a mixture of

toxin sub-units (PA/EF/LF) was once utilized with success [13]. In another study, the animal has been boosted with immunogens related (dengue type 2 virus (DENV-2)) but not identical to the immunogen used for priming (dengue type 4 virus (DENV-4)), in an attempt to isolate cross-neutralizing antibodies but with limited success. Alternatively, the injection of a soluble protein after the administration of a live vaccine (HEV) successfully directed the immune response toward a target more specifically than the vaccine. The existence of galaximab, lumiliximab and keliximab, which are all directed against human antigens (respectively CD80, CD23 and CD4), shows that NHP may respond to such antigens despite their proximity with the NHP immunological self. Correspondingly, we have observed that immunisation with human antigens may raise responses with equivalent serum titers than with more distant (viral, bacterial, vegetal) antigens. There is a theoretical risk that these responses may only target regions that differ between humans and NHPs, as these regions do not always bear the epitopes of interest. To mitigate this risk, immune serum may be tested for the presence of antibodies with the desired specificities or activities at the end of immunisation, before any other additional step.

Regarding adjuvants, only alum was utilized in experiments involving chimpanzees. In experiments involving macaques, alum and Freund's adjuvant were utilized in the past but alum should be preferred due its better tolerance, even if additional injections are requested than with more powerful adjuvants. The titers reached after the immunisations were usually measured not against the immunogen but against the targeted pathogen and, when indicated, they ranged from 1/10,000 to 1/400,000. Our immunisation procedures aim at reaching a hyper-immune response, defined as an immune response which does not increase with further injections. Generally, a total of four injections is necessary but a maximum of six injections has been utilized. However, two previous studies have utilized a single injection of a live vaccine, which was sufficient to lead to successful antibody isolation [27, 28].

### Library Construction

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), bone marrow, spleen and inguinal lymph nodes have been the source of B-lymphocytes from which the NHP immune libraries have been built. Spleen removal necessitates the animal sacrifice and lymph nodes are not always perceptible. The transit of the activated B-cells from lymph nodes, where they are activated, to the bone marrow, where they are responsible for the long-term response, is apparently short as it has been previously missed in certain experiments, even with blood drawn three times a week. Bone marrow was then chosen as a niche where these activated B-cells accumulate, and might be best sampled. Before the last boost, the absence of RT-PCR products is verified similarly than before initiation of the immunisation, to avoid an immune response directed toward an inter-current pathogen. After the final boost, sampling of a maximum of 3 ml of bone marrow is performed two times a week under general anaesthesia (Imalgene, Merial, Lyon, France), and the frequency of the sampling may be increased to three times a week when amplification products begin to be observed [37]. The procedure is stopped as soon as the response decreases, in terms of the number of

**Table 1. Mean features of the reviewed articles. The main features of all published studies presenting isolations of antibodies from non-human primates are presented in this table (NA: not accessible).**

Antigen	NHP Specie	Immunogen	Starting Biological Material	Optimal Amplification (d=day, wk=week)	Size of the Library	Antigen Used for Screening	Number of Analyzed Clone	Affinities	Number of Neutralizing Clones
ATT [21] ( <i>C. tetani</i> )	<i>Macaca fascicularis</i>	Tetavax vaccine (Aventis Pasteur)	PBMC	4 d	5 10 <sup>5</sup>	Tetanus toxoid	1	0.4 nM	NA
PA <sub>83</sub> [22] ( <i>B. anthracis</i> )	<i>Macaca fascicularis</i>	Recombinant toxin sub-unit	Bone marrow	35 d	10 <sup>7</sup>	Recombinant PA83	NA	7.7 to 2.5 nM	5
LF [24] ( <i>B. anthracis</i> )	<i>Macaca fascicularis</i>	Recombinant toxin sub-unit	Bone marrow	10 d	1.8 10 <sup>8</sup>	Recombinant LF	39	6.98 to 1.02 nM	5
RTA [23] ( <i>R. communis</i> )	<i>Macaca fascicularis</i>	Toxin sub-unit (A chain of ricin )	Bone marrow	7 d and 10 d	2 10 <sup>8</sup>	Ricin	19	4.9 nM to 40 pM	4
Crf2 [26] ( <i>A. fumigatus</i> )	<i>Macaca fascicularis</i>	Crf2 protein	Bone marrow	24 d	1.5 10 <sup>7</sup>	Recombinant Crf2	6	410 to 0.96 nM	NA
VEEV [25]	<i>Macaca fascicularis</i>	1x vaccine Fluvac Innovator Triple EFT plus EHV + 5x VRS purified β-PL inactivated VEEV TC83	Bone marrow	10 d	1.6 10 <sup>7</sup>	Purified VEEV TC83	1	NA	1
BoNT/A1-L [20] ( <i>C. botulinum</i> )	<i>Macaca fascicularis</i>	Recombinant toxin sub-unit	Bone marrow	6 d and 10 d	3.3 10 <sup>8</sup>	Botulinum neurotoxin A1	14	7.5 nM to 1.52 nM	1
SIV [28]	<i>Macaca fascicularis</i>	SIV (SMM-3 strain)	PBMC	NA	6.5 10 <sup>5</sup>	Recombinant glycoprotein gp148	NA	NA	6
Glycoprotein EBOV [29]	<i>Macaca fascicularis</i>	Recombinant vesicular stomatitis vector expressing Ebola (Zaire) glycoprotein then Ebola-Zaire and Sudan virus	Spleen & Bone marrow	NA	1 10 <sup>9</sup>	Recombinant glycoprotein	15	NA	NA
SIV GP120 [27]	<i>Macaca mulatta</i>	SIVsmF236	Inguinal lymph node	312 wk	3 10 <sup>7</sup>	Recombinant gp120 Preparations of SIVsmH4, SIVmac251, or HIV-2/ST	NA	NA	2
DENV-4 [17]	<i>Pan troglodytes</i>	RNC 10 <sup>6</sup> PFU of each Virus	Bone Marrow	Library D4: 6 wk Library D1-4: 12 wk	1x10 <sup>8</sup> to 3x10 <sup>8</sup>	Library D4: DENV-4 virions Library D1-4: captured DENV-4 virions	6	4.61 to <1.0 nM	2
DENV-2 [16]	<i>Pan troglodytes</i>	RNC 10 <sup>6</sup> PFU of each Virus	Bone Marrow	12 wk	2x10 <sup>8</sup> to 4x10 <sup>8</sup>	DENV-2 virions	6	NA	6
Polio [8] (oral polio vaccine followed by inactivated polio vaccine)	<i>Pan troglodytes</i>	Oral (t=2 mo) I.m. (t=7yr2mo)	Bone Marrow	NA (BM samples on 10d, 20d, 30d, 40d)	1x10 <sup>8</sup>	OPV virions	19	NA	6
VACV B5 protein 275t [10] (Smallpox)	<i>Pan troglodytes</i>	VACV (WR)	Bone Marrow	11 wk	5x10 <sup>7</sup>	Recombinant truncated B5	18	0.7 to 0.2 nM	2
VACV A33 [9]	<i>Pan troglodytes</i>	VACV (WR)	Bone Marrow	11 wk	NA	Recombinant truncated A33	16	20 to 0.14 nM	3
γDPGA Capsule [14] ( <i>B. anthracis</i> )	<i>Pan troglodytes</i>	γDPGA conjugated to recombinant PA	Bone Marrow	NA (BM samples taken on 5, 7 and 13 wk)	NA	γDPGA	5	0.3 to 0.1 nM	2

Table 1. Contd....

Antigen	NHP Specie	Immunogen	Starting Biological Material	Optimal Amplification (d=day, wk=week)	Size of the Library	Antigen Used for Screening	Number of Analyzed Clone	Affinities	Number of Neutralizing Clones
LF [11] ( <i>B. anthracis</i> )	<i>Pan troglodytes</i>	50 µg of each PA, LF, EF	Bone Marrow	NA	NA	Recombinant LF	3	7.4 to 0.69 nM	2
EF [12] ( <i>B. anthracis</i> )	<i>Pan troglodytes</i>	50 µg of each PA, LF, EF	Bone Marrow	NA	NA	Recombinant EF	4	0.12 to 0.05 nM	1
PA [13] ( <i>B. anthracis</i> )	<i>Pan troglodytes</i>	50 µg of each PA, LF, EF	Bone Marrow	8 wk	5x10 <sup>7</sup>	Recombinant PA	4	0.05 to 0.04 nM	2
HEV [18] (Hepatitis E strain)	<i>Pan troglodytes</i>	HEV Strain SAR-55 (Pakistan) followed by booster of purified SAR-55 ORF2 protein	Bone Marrow	3 wk	NA	Recombinant ORF2	7	4.5 to 1.7 nM	2
HAV [19] (Hepatitis A strain)	<i>Pan troglodytes</i>	HAV strain HM-175 followed by a boost of HAV Vaccine HAVRIX containing the HM-175 capsid	Bone Marrow	3 wk	NA	Formalin-inactivated HAV virions	24	NA	4
JE-VAX [15] (Japanese encephalitis virus)	<i>Pan troglodytes</i>	JE-VAX (3 monthly injections) followed by a boost of attenuated JEV SA14-14.2	Bone Marrow	8 wk	2x10 <sup>8</sup> to 1x10 <sup>9</sup>	Multiple Strategies: (1) JEV Virions (2) epitope masking (3) Domain III-specific E	(1) 4 (2) 5 (3) 2	110 to 0.35 nM	8

primers allowing amplification or in terms of amplification intensity. This procedure respects the animal's health if applied up to a five week maximum but optimal amplification is frequently observed earlier, around the 10<sup>th</sup> day for immunisation with soluble antigens, in accordance with the time course of antibody secretion. When the RT-PCR amplification shows no amplification before the final boost, increases up to a peak after this final boost and finally decreases, the peak amplification represents the IgG VH and VL repertoires utilized for the hyper-immune response induced by the immunisation. Such a cloned repertoire corresponds to the hyper-immune response so that corresponding libraries may be rather called "hyper-immune" than "immune" libraries [37], and antibody fragments presenting high affinities (single digit nanomolar) have always been isolated from these libraries. In contrast, several studies involving chimpanzees relied on a single, late sampling, from 3 to 11 weeks after the final boost. It is possible that the B-lymphocytes best stimulated, by the surface antibodies with the highest affinities, were selected by such a late sampling. However, more recent studies from the same research group have turned to iterative sampling, on three or four dates selected between the first and the 13th week after the final boost.

The primers utilized for the amplification of DNA encoding antibody fragments might be human when chimpanzees are utilized [13, 38], showing the proximity between the two species. Regarding macaques, specifically designed primers are necessary and the publication [27] of these primers, for  $\gamma$  and  $\kappa$  isotypes, was key to our successes. They are usable with both *M. fascicularis* and *M. mulatta* species and  $\lambda$  primers were later developed [23], when the genome of *M. mulatta* was sequenced.

The cloning of the repertoire in the form of a phage-displayed library has utilized several phagemidic vectors, such as pComb3H and the related pComb3X [39], pHal-14 [24, 40], pAk100 [41] or pMAB143 [29, 39]. The Fab and the single-chain variable fragment (scFv) formats were both utilized, and we turned to the latter format after one of our libraries recombined in the former. However, the presence of a peptidic linker in the scFv format carries a risk, at least theoretically, of bringing structural constraints influencing the antigen binding site conformation differently than in the final IgG format. The Fab format does not need such a linker, and it was chosen for all studies involving chimpanzees. Recently, one of the cloning sites of pHal-14, NcoI, was present within a majority of the amplified DNA and led to the isolation of many incomplete scFvs, but did not prevent the isolation of an antibody fragment with the desired activity [20]. The vector was modified to re-clone the library with other restriction sites, and the greater diversity of the new library allowed the isolation of an scFv with a better activity (manuscript in preparation). The cloning of the repertoire may be realized in a single step, but it might be preferred to pre-clone the RT-PCR products in a commercial vector prepared for TA cloning as a way to save the repertoire, allowing the re-construction of the library if needed.

The sizes of the phage-displayed libraries built from immunised NHPs varies from 10<sup>5</sup> to 10<sup>9</sup>, with most of the libraries ranging from 5x10<sup>7</sup> to 5x10<sup>8</sup>. This size is far inferior to the size of naïve libraries, which is in the range of 10<sup>10</sup> to 10<sup>12</sup> different clones. This difference is due to the fact that naïve libraries aim at recapitulating the full repertoires of germline-encoded VH and VL domains from several donors, when immune libraries only aim at recapitulating the reper-

toire utilized for a single immune response. The size reached by a library is largely limited by the efficacy of the ligation step, which depends on the quality of amplified and vector DNA. With an immune humoral response regarded as stimulating between  $10^3$  and  $10^4$  B-cells, the number of possible VH/VL random associations ranges from  $10^6$  to  $10^8$ . The size of an immune library should be greater than this number of associations and a size of  $5 \times 10^8$  is, in effect, advisable. However, for antigens with a limited number of immunodominant epitopes, or that elicit a majority of neutralizing epitopes, a smaller size may be sufficient as demonstrated twice [21, 28].

### Library Screening

The screening of a phage-displayed library aims to isolate antibody fragments binding the pathogen with a high affinity, but a high diversity of these antibody fragments is also useful to increase the chances of targeting neutralizing epitopes. Toxins may be chosen as screening antigen instead of their sub-units utilized for immunisation, or live pathogenic viruses instead of killed viruses or vaccine strains, in order to select antibody fragments binding the pathogen in its native conformation. This was the case in only 6 [15-17, 20, 23, 25] of the 22 studies reviewed here and in the other studies, the non-toxic immunogen administered to NHPs was utilized for screening. This choice may be explained by difficulties in accessing or handling the targeted pathogen but, before initiating those studies, the vaccinating properties of the immunogen were verified on small mammals. A recombinant protein representing a single domain of a surface protein, shared between viruses of the same family, was once utilized with success to isolate broadly-reacting antibody fragments [15]. This example tends to show that immune libraries may allow the isolation of antibody fragments with rare specificities if the screening procedure is designed for this purpose. The antigen was immobilized on solid phase for all studies except one, where it was in a soluble and biotinylated form, expected to better respect the natural conformation of the protein [28]. For the same purpose, the immobilisation was sometimes indirect, through antibodies and the polyclonal antibodies of the immunized NHPs themselves have been utilized (for example see [17]). To isolate antibody fragments that do not compete with a pre-existing antibody, the pre-existing antibody may be pre-incubated on the antigen to mask its epitope before screening the library, and this "epitope masking" strategy was successfully utilized once [15]. The number of successive screening steps were generally three to four and the maximum number of washes reached was 40, testifying to the high affinities that were expected, but such a high stringency may risk limiting the diversity of isolated antibody fragments. At the end of the screening, isolated scFvs were sometimes expressed as crude supernatants in small volumes to test their reactivities in ELISA, but a high variability was previously observed in such a procedure. Sequencing at least one hundred clones isolated after screening, then expressing and purifying the non-redundant scFvs to measure their affinities, may be preferred for a more precise and complete evaluation of the potential of each screened library. In the 22 studies reviewed here, 15 indicated affinities [9-15, 17, 18, 20-24, 26] and 10

observed sub-nanomolar [9-15, 21, 23, 26], thus excellent, values. In the 19 studies aiming at isolating neutralizing antibody fragments [8-20, 22, 24, 25, 27, 28, 42], all succeeded and 16 isolated more than one [8-20, 23, 24].

### Sequences of Isolated Antibody Fragments and their Similarity with Human Counterparts

This review focuses on the use of NHP to isolate antibodies for clinical use, and sequences of macaque and chimpanzee variable regions were compared to see if one of the two species is more human-like, thus predicted to be less immunogenic. For this study, the degrees of identity of NHP variable regions with their most similar, human germline sequences were measured, because germline sequences represent the human immunological self that is perfectly tolerated, so that a higher degree of identity predicts better tolerance. All macaque sequences of variable regions (74 VH, 33 VL) available in the IMGT database (<http://www.imgt.org/IMGTlect/>) were analysed. However, no chimpanzee V region is represented in IMGT nor in other databases so that the 22 VH and 18 VL sequences available in articles [8-11, 13, 15-19] had to be manually retranscribed. The degrees of identities between the macaque or chimpanzee variable regions and their most similar human, germline counterparts were calculated with Domain-GapAlign (<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainDisplay.cgi>) [43] and statistical tests were performed on Prism 5.01 (GraphPad, San Diego, CA).

The overall identity of the macaque VH and VL sequences with their most similar, human, germline counterparts is 78.5% when it is 80.7% (see table 2 for the percentages presented in this section) for chimpanzees and the difference between the two species was not significant ( $p=0.06$ ). The same results were observed when VH (74.8% identity for macaques, 75.9% for chimpanzees,  $p=0.37$ ) were considered separately from VL (83.6% identity for macaques, 85.9% identity for chimpanzees,  $p=0.08$ ).

Framework regions (FRs) originating from macaques or chimpanzees were compared since FRs are less mutated than complementarity determining regions (CDRs) during affinity maturation, and may better demonstrate if variable regions from a species are more similar to their human, germline counterparts. The identity of all (VH and VL) FRs is 85.9% for macaque and 88% for chimpanzees, showing a significant ( $p=0.02$ ) advantage to chimpanzees. When the FRs of VH and VL were considered separately, the chimpanzee FRs located in VL showed a significant difference ( $p=0.01$ ), but not those located in VH ( $p>0.05$ ). An ANOVA comparison of the various FRs (FR1 to 4) located in VL (VL-FRs) of macaques and chimpanzees showed that only VL-FR3 was significantly more human, thus potentially less immunogenic, in chimpanzees (92,4%) than in macaques (87,8%) ( $p<0.05$ ).

The study of CDRs, though more difficult than the study of FRs, is of interest because CDRs are exposed at the surface of antigen binding sites and, because the immunological response against therapeutic antibodies is humoral, they particularly represent the potential B-cell epitopes that must be avoided. The overall identity of macaque CDRs with their

**Table 2.** Mean identities of the framework and complementary-determining regions of antibodies isolated from macaques and chimpanzees with their human germline counterparts. Variable regions of macaque and chimpanzees were analyzed to determine if antibodies from one species are more human-like than from the other: the only significant difference was observed in VL-FR3, which is more human-like in chimpanzees.

Mean identity % with the most similar human germline regions		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Macaques	VH	86.8	65.16	84.54	53.04	83.83	29.21	83.87
	VL	87.26	64.65	85.9	76.1	87.87	58.82	87.96
	VH+VL	86.99	64.95	85.11	62.67	85.52	41.57	85.58
Chimpanzees	VH	86.45	68.64	82.09	61.66	86.1	32.11	87.49
	VL	88.22	64.84	89.87	73.61	92.44	61.32	89.37
	VH+VL	87.25	66.93	85.59	67.04	88.95	45.57	90.06

human, germline counterpart was measured at 53.5% when it was 56% for chimpanzees, with no significant difference between the two species ( $p=0.34$ ). Because CDR3s are diversified with point mutations and with nucleotides added at random at the junction regions, while CDR1s and CDR2s are only diversified by point mutations, they might be analysed separately. No significant difference was observed between the CDR3s of the two species (41.6% for macaques, 45.6% for chimpanzees,  $p=0.33$ ), nor between CDR1s and CDR2s of the two species (63% for macaques, 66.6% for chimpanzees,  $p=0.15$ ). As expected, the identity of macaque and chimpanzee CDRs with their human counterparts (54.1% identity for both macaques and chimpanzee) is lower than the identity of macaque and chimpanzee FRs (86.4% identity for both macaques and chimpanzees,  $p<0.0001\%$ ), due to the preferential diversification of CDRs during affinity maturation, which results in a higher risk of immunogenicity for CDRs than for FRs.

The high identity values observed between variable regions originating from NHP and their human germline counterparts predict a low immunogenicity of macaque and chimpanzee variable regions when administered to humans. The risk of immunogenicity is rather due to CDRs than to FRs, due to both their sequences and their localization. The closer phylogenetic proximity existing between humans and chimpanzees than between humans and macaques only resulted in chimpanzees VL-FR3 presenting a statistically higher percentage of identity with human, germline sequences than those originating from macaques. It is possible that the limited number of sequences observed in the present study may have limited its capacity to indicate a difference as significant. In all cases, the advantage of utilizing chimpanzees versus macaques for the isolation of therapeutic antibodies appears limited. The results above justify the choice of NHP to isolate antibodies intended for therapeutic purposes but, given the complexities associated with accessing chimpanzees when their region identified as having a potentially lower immunogenicity is limited (VL-FR3), macaques may be preferred.

### Humanization

Previous studies [44, 45] comparing variable regions originating from macaque IgGs with their human counter-

parts, or comparing germline-encoded V genes with human V genes, have shown that macaque and human variable regions are not identical. In particular, it was observed that the differences existing between human and macaque V genes are four-fold greater than the inter-human polymorphism, and such differences may be immunogenic. The humanization of NHP-derived variable regions would thus optimize their tolerance. Such a humanization of macaque-derived variable regions, part of an Fab [22], was realized only once [42]. It utilized human germline regions as templates because they represent the "human immunological self", which is perfectly tolerated. To limit the risk of altering the affinity, this humanization was limited to the FRs of the Fab, which were 87.6% identical to their most similar human germline counterparts. After germline humanization, this identity percentage increased to 97.8% which, interestingly, was higher than the percentage (91.9%) presented by the variable regions of a human antibody (87K7C) [46] with the same specificity [42]. Consequently, after germline humanization, NHP-derived antibodies may be less immunogenic than fully human antibodies. A recent study based on T-cell epitope detection confirmed the very low immunogenicity risk of a germline-humanized antibody originating from a macaque (manuscript in preparation).

### Legal Aspects

Legal restrictions regarding the clinical use of antibodies originating from chimpanzees do not exist to our knowledge, but these animals are difficult to access. Legal restrictions regarding the clinical use of antibodies originating from macaques applied in Europe only if the targeted antigens were of human origin. In effect, the European patent EP1266965B1 [32] was based on the notion that macaque proteins are different than their human counterparts but that, paradoxically, antibodies are similar in the two species. In this situation, macaques may raise an immune response against human proteins and the macaque antibodies raised by these human antigens were regarded as human, so that they could be readily utilized for therapy. This notion was based particularly on the observation of differences existing between macaque and human CD4 and CD54, but no significant difference was observed between 29 V regions of macaque IgGs and their human counterparts. However, when these 29 sequences were later re-analyzed with mathematical

and statistical tools [47], a significant difference with their human counterparts was shown. This result was in adequacy with another study showing the existence of differences between macaque and human germline V genes [45]. For these reasons, and others more formal, the validity of EP1266965B1 was put in question before the European Patent Office but the authors of the patent declined to participate to its oral defence. Consequently, EP1266965B1 was invalidated on August 20th, 2010 by a decision referenced P31109EP-D1-PCT. In the US, the legal restrictions regarding the clinical use of macaque antibodies depend on a patent referenced 5,658,570, which is based on similar observations than EP1266965B1.

## DISCUSSION

The studies reviewed here show that the isolation of antibody fragments from non-human primates is an efficient path for the isolation of therapeutic antibodies. Details of the phage-display technology that specially apply to libraries derived from NHP have been exposed, and legal restrictions have been alleviated. Macaques may be preferred to chimpanzees for ease of access, leading to the development of chimeric macaque-human antibodies. However, for an optimized tolerance of these antibodies, germline humanization should be considered.

## CONCLUSION

The combined use of phage-displayed libraries built from immunised macaques and germline humanization provides a safe and efficient path to develop well-tolerated IgGs for clinical use, directed against infectious or human antigens, and it should be utilized more frequently.

## ABBREVIATIONS

BoNT/A1-L	=	Botulinum neurotoxin A1 light chain
CDR	=	Complementarity determining region
DENV	=	Dengue virus
EBOV	=	Ebola virus
EF	=	Edema factor
FR	=	Framework region
HAV	=	Hepatitis A virus
HEV	=	Hepatitis E virus
Ig	=	Immunoglobulin
LF	=	Lethal factor
NHP	=	Non-human primates
PA	=	Protective antigen
RTA	=	Ricin chain A
scFv	=	Single-chain variable fragment
SIV	=	Simian immunodeficiency virus
VEEV	=	Venezuelan equine encephalitis virus
VH	=	Ig heavy chain variable region

VL = Ig light chain variable region

$\gamma$ DPGA = Poly- $\gamma$ -D-glutamic acid

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

## DISCLAIMER

JWF's contribution to this review was made possible by a formal Engineer-Scientist Exchange Program established between the governments of France and the USA. All opinions are solely those of the authors and do not reflect official government views.

## ACKNOWLEDGEMENTS:

This work has been financed in part by grant agreement n° CO 09Co302-1 from Direction générale de l'armement, and by agreement n° 241832 granted to the AntiBotABE project ([www.antibotabe.com](http://www.antibotabe.com)) by the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013).

## REFERENCES

- [1] Bruggemann M, Neuberger MS. Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice. *Immunol Today* 1996; 17: 391-7.
- [2] Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, *et al.* High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 845-51.
- [3] Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, *et al.* Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 722-7.
- [4] Van Meel FC, Steenbakkens PG, Oomen JC. Human and chimpanzee monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1985; 80: 267-76.
- [5] Ehrlich PH, Moustafa ZA, Justice JC, *et al.* Human and primate monoclonal antibodies for *in vivo* therapy. *Clin Chem* 1988; 34: 1681-8.
- [6] Steiper ME, Young NM. Primate molecular divergence dates. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 41: 384-94.
- [7] Goodman M, Grossman LI, Wildman DE. Moving primate genomics beyond the chimpanzee genome. *Trends Genet* 2005; 21: 511-7.
- [8] Chen Z, Chumakov K, Dragunsky E, *et al.* Chimpanzee-human monoclonal antibodies for treatment of chronic poliovirus excretors and emergency postexposure prophylaxis. *J Virol* 2011; 85: 4354-62.
- [9] Chen Z, Earl P, Americo J, *et al.* Characterization of chimpanzee/human monoclonal antibodies to vaccinia virus A33 glycoprotein and its variola virus homolog *in vitro* and in a vaccinia virus mouse protection model. *J Virol* 2007; 81: 8989-95.
- [10] Chen Z, Earl P, Americo J, *et al.* Chimpanzee/human mAbs to vaccinia virus B5 protein neutralize vaccinia and smallpox viruses and protect mice against vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1882-7.
- [11] Chen Z, Moayeri M, Crown D, *et al.* Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun* 2009; 77: 3902-8.
- [12] Chen Z, Moayeri M, Zhao H, Crown D, Leppla SH, Purcell RH. Potent neutralization of anthrax edema toxin by a humanized monoclonal antibody that competes with calmodulin for edema factor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 13487-92.
- [13] Chen Z, Moayeri M, Zhou YH, *et al.* Efficient neutralization of anthrax toxin by chimpanzee monoclonal antibodies against protective antigen. *J Infect Dis* 2006; 193: 625-33.
- [14] Chen Z, Schneerson R, Lovchik J, *et al.* Pre- and postexposure protection against virulent anthrax infection in mice by humanized



- monoclonal antibodies to *Bacillus anthracis* capsule. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 739-44.
- [15] Goncalvez AP, Chien CH, Tubthong K, *et al.* Humanized monoclonal antibodies derived from chimpanzee Fabs protect against Japanese encephalitis virus *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 2008; 82: 7009-21.
- [16] Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Purcell RH, Lai CJ. Chimpanzee Fab fragments and a derived humanized immunoglobulin G1 antibody that efficiently cross-neutralize dengue type 1 and type 2 viruses. *J Virol* 2004; 78: 12910-8.
- [17] Men R, Yamashiro T, Goncalvez AP, *et al.* Identification of chimpanzee Fab fragments by repertoire cloning and production of a full-length humanized immunoglobulin G1 antibody that is highly efficient for neutralization of dengue type 4 virus. *J Virol* 2004; 78: 4665-74.
- [18] Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol* 2000; 74: 5548-55.
- [19] Schofield DJ, Satterfield W, Emerson SU, Purcell RH. Four chimpanzee monoclonal antibodies isolated by phage display neutralize hepatitis A virus. *Virology* 2002; 292: 127-36.
- [20] Chahboun S, Hust M, Liu Y, *et al.* Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin. *BMC Biotechnol* 2011; 11: 113.
- [21] Chassagne S, Laffly E, Drouet E, Herodin F, Lefranc MP, Thullier P. A high-affinity macaque antibody Fab with human-like framework regions obtained from a small phage display immune library. *Mol Immunol* 2004; 41: 539-46.
- [22] Laffly E, Danjou L, Condemine F, *et al.* Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralize the protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* by binding to the segment of PA between residues 686 and 694. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3414-20.
- [23] Pelat T, Hust M, Hale M, Lefranc MP, Dubel S, Thullier P. Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC Biotechnol* 2009; 9: 60.
- [24] Pelat T, Hust M, Laffly E, *et al.* High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2758-64.
- [25] Rulker T, Voss L, Thullier P, *et al.* Isolation and characterisation of a human-like antibody fragment (scFv) that inactivates VEEV *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2012; 7: e37242.
- [26] Schutte M, Thullier P, Pelat T, *et al.* Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2009; 4: e6625.
- [27] Glamann J, Burton DR, Parren PW, *et al.* Simian immunodeficiency virus (SIV) envelope-specific Fabs with high-level homologous neutralizing activity: recovery from a long-term-nonprogressor SIV-infected macaque. *J Virol* 1998; 72: 585-92.
- [28] Samuelsson A, Chiodi F, Ohman P, Putkonen P, Norrby E, Persson MA. Chimeric macaque/human Fab molecules neutralize simian immunodeficiency virus. *Virology* 1995; 207: 495-502.
- [29] Druar C, Saini SS, Cossitt MA, *et al.* Analysis of the expressed heavy chain variable-region genes of *Macaca fascicularis* and isolation of monoclonal antibodies specific for the Ebola virus' soluble glycoprotein. *Immunogenetics* 2005; 57: 730-8.
- [30] Anderson DR, Brams P, Hanna N, Shestowsky WS, Heard C. Treatment of psoriasis using anti-B7.1 (CD80) antibodies US patent 6,709,654, March 23, 2004.
- [31] Hanna N, Newman RA, Reff ME. Recombinant anti-CD4 antibodies for human therapy US patent 6,136,310, October 24, 2000.
- [32] Newman R, Hanna N, R. R Recombinant antibodies for human therapy. EP1266965, July 24, 1991.
- [33] Vinjamaram S, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ. The use of galiximab in non-Hodgkin lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008; 8: 277-82.
- [34] Mason U, Aldrich J, Breedveld F, *et al.* CD4 coating, but not CD4 depletion, is a predictor of efficacy with primatized monoclonal anti-CD4 treatment of active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 220-9.
- [35] Quintas-Cardama A, O'Brien S. Targeted therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Target Oncol* 2009; 4: 11-21.
- [36] Robak T. Novel monoclonal antibodies for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 156-71.
- [37] Pelat T, Hust M, Thullier P. Obtention and engineering of non-human primate (NHP) antibodies for therapeutics. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 1633-8.
- [38] Sblattero D, Bradbury A. A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions. *Immunotechnology* 1998; 3: 271-8.
- [39] Barbas CF. Phage display : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2001; p 1 v. in various pagings.
- [40] Dübel S. Handbook of therapeutic antibodies. Wiley-VCH: Weinheim, 2007; p 3 v. (xxxiii, 1188 p.).
- [41] Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, *et al.* Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 1997; 201: 35-55.
- [42] Pelat T, Bedouelle H, Rees AR, Crennell SJ, Lefranc MP, Thullier P. Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by *in vitro* and *in silico* engineering. *J Mol Biol* 2008; 384: 1400-7.
- [43] Ehrenmann F, Lefranc MP. IMGT/DomainGapAlign: IMGT standardized analysis of amino acid sequences of variable, constant, and groove domains (IG, TR, MH, IgSF, MhSF). *Cold Spring Harb Protoc* 2011; 2011: 737-49.
- [44] Thullier P, Chahboun S, Pelat T. A comparison of human and macaque (*Macaca mulatta*) immunoglobulin germline V regions and its implications for antibody engineering. *MAbs* 2010; 2: 528-38.
- [45] Thullier P, Huish O, Pelat T, Martin AC. The humanness of macaque antibody sequences. *J Mol Biol* 2010; 396: 1439-50.
- [46] Wild MA, Xin H, Maruyama T, *et al.* Human antibodies from immunized donors are protective against anthrax toxin *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1305-6.
- [47] Abhinandan KR, Martin AC. Analyzing the "degree of humanness" of antibody sequences. *J Mol Biol* 2007; 369: 852-62.

Received: September 19, 2012

Revised: November 17, 2012

Accepted: December 08, 2012

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

### Conclusion de l'article 1 :

Cette étude porte sur 74 domaines variables de la chaîne lourde (*Variable Heavy*, VH) et de 33 domaines variables de la chaîne légère (*Variable Light*, VL) d'anticorps de macaques et sur 22 domaines VH et 18 domaines VL de chimpanzés. Les pourcentages d'identité protéique existant entre les quatre régions charpentes (*Framework Regions*, FR) et les trois régions hypervariables (*Complementary Determining Regions*, CDR) des domaines variables de chaque anticorps de primates non humains et des régions homologues de l'anticorps humain le plus proche, ont été calculés. Aucune des régions des domaines variables des anticorps de chimpanzés n'est significativement plus humaine, que les régions des domaines variables des anticorps de macaques, à l'exception de la troisième région charpente (FR3) de la chaîne légère. En effet, les régions FR3 des chaînes légères des anticorps de macaques et de chimpanzés présentent respectivement 87,87 % et 92,44 % d'identité avec la région FR3 des anticorps humains, et cette différence d'identité est significative ( $p < 0,05$ ). La région FR3 de la chaîne légère des anticorps de chimpanzés est significativement plus humaine, et donc potentiellement moins immunogène, que la région FR3 de la chaîne légère des macaques. Bien qu'elle soit significative, la différence d'identité entre la région FR3 des chimpanzés et des macaques est faible en valeur absolue, et la région FR3 ne représente en moyenne qu'un tiers des acides aminés des domaines variables. Ainsi, dans leur ensemble les domaines variables des anticorps de macaques et de chimpanzés présentent respectivement 78,5 % et 80,7 % d'identité avec leurs homologues humains les plus proches, et cette différence n'est en effet pas significative. Par conséquent, bien que les chimpanzés soient phylogénétiquement plus proches de l'Homme que ne le sont les macaques, leurs anticorps ne présentent pas un caractère significativement plus humain.










Cette étude permet donc de justifier le choix des primates non humains pour l'isolement d'anticorps recombinants et démontre que l'avantage phylogénétique procuré par les chimpanzés pour l'isolement d'anticorps est très limité, en fait presque nul. Compte tenu du fait que les chimpanzés sont protégés et donc difficiles à obtenir, les macaques représentent meilleur choix pour l'isolement des anticorps. Il est néanmoins souhaitable d'humaniser ces anticorps de macaques afin de diminuer leur immunogénicité potentielle, pour obtenir des anticorps indistinguables des anticorps humains.

## **Préambule aux articles 2 et 3 et au projet d'article 4**

### **Isolement de fragments d'anticorps neutralisant les toxines botuliques A, B et E dans le cadre du projet européen AntiBotABE**

Mes travaux expérimentaux de thèse se sont majoritairement déroulés dans le cadre du projet de recherche européen AntiBotABE, et les trois articles ou projets d'articles suivants présentent une partie des résultats de ce projet. En préambule de ces articles, j'ai choisi de présenter l'organisation de ce projet européen afin de replacer mes travaux expérimentaux dans leur contexte.

Actuellement, il n'existe aucun traitement bien toléré qui soit spécifique du botulisme. Il a donc été souhaité d'isoler des anticorps recombinants neutralisant ces toxines, lors d'une réunion sur les anticorps recombinants qui s'est tenue le 07 mars 2007 à l'Hôpital d'Instruction des Armées Bégin. Les moyens humains et financiers disponibles au sein du CRSSA étaient trop limités pour un tel projet, donc il a été nécessaire de trouver des capacités complémentaires. Depuis 1984, l'Union Européenne a mis en place des "projets cadres", dont l'objectif est de fédérer des laboratoires de recherche européens autour de neuf axes principaux, dont un axe "sécurité". Un consortium, regroupant plusieurs laboratoires européens, a donc été formé pour mener à bien un projet visant à isoler un mélange d'anticorps recombinants neutralisant les toxines botuliques A, B et E. Le projet correspondant a été soumis lors de l'appel d'offre du septième projet cadre (2007-2013), publié le 03 novembre 2008. Il a été accepté et a pris le nom d'AntiBotABE (<http://www.antibotabe.com/>). Il est coordonné par le Dr. Philippe THULLIER et aidé par la société Vitamib. Le budget total d'AntiBotABE est de 3 896 413€ (**Tableau 12**) dont 2 966 386€ sont apportés par l'Union Européenne, et il a une durée de 48 mois (de septembre 2010 à septembre 2014).

Nom	Abréviation	Logo	Pays	Budget total
Centre Recherche Service Santé Armée	CRSSA		France	698 000 €
Ministère de la Défense	EVDG		France	136 000 €
Technische Universität Braunschweig	TUBS		Allemagne	554 200 €
Institut Pasteur	IP		France	796 400 €
Health Protection Agency HPA	NIBSC		Royaume-Uni	699 964,16 €
Centre National de la Recherche Scientifique	CNRS		France	265 600 €
LFB Biotechnologies	LFB		France	261 545 €
University of Helsinki	UoH		Finlande	332 204,80 €
Vitamib	Vitamib		France	152 500 €

**Tableau 12 : Liste des membres du consortium AntiBotABE et budget qui leur est alloué.**

La finalité du projet AntiBotABE est l'isolement de molécules thérapeutiques dont le développement est coûteux, et il est nécessaire d'en limiter le nombre. Notre stratégie nous conduit pourtant à préparer le développement d'un mélange d'au moins trois anticorps, nécessaire pour cibler les trois types de toxines. Un tel mélange représente au moins quatre produits à valider lors des essais cliniques puisque chaque anticorps séparément, puis le mélange, doivent être validés. Ce nombre pourrait même être supérieur, notamment à cause de la variabilité des sous-types au sein de chaque sérotype de toxine, et l'isolement d'anticorps réagissant avec plusieurs sous-types d'un sérotype de toxine botulique est donc d'un intérêt économique certain. Les sous-types 1 et 2 de BoNT/A et BoNT/B regroupent la majorité des souches de chacun de ces deux sérotypes et l'objectif du projet AntiBotABE est d'isoler des anticorps neutralisant simultanément BoNT/A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>, d'une part, et BoNT/B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, d'autre part (Tableau 13). Puisque le pourcentage d'homologie entre BoNT/A<sub>1</sub> et BoNT/A<sub>2</sub>, d'une part, et entre BoNT/B<sub>1</sub> et BoNT/B<sub>2</sub>, d'autre part, sont de 90 % et 96 %, respectivement, la probabilité qu'un anticorps isolé neutralise les deux sous-types simultanément est élevée, bien que cette neutralisation croisée ne soit pas assurée. L'ensemble des souches appartenant au sérotype E étant répartie de façon homogène entre les cinq sous-types, le projet ne précise pas

par avance les sous-types à neutraliser ; il indique simplement que le spectre de neutralisation sera établi précisément par des essais *in vivo*, après expression des IgG correspondantes.

Immunogène	Sous-type(s) à neutraliser	Résultat
BoNT/A <sub>1</sub> -HC	A <sub>1</sub> et A <sub>2</sub>	Succès
BoNT/A <sub>1</sub> -LC	A <sub>1</sub> et A <sub>2</sub>	Succès
BoNT/B <sub>2</sub> -HC	B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub>	Succès
BoNT/B <sub>2</sub> -LC	B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub>	Succès
BoNT/E <sub>3</sub> -HC	Non précisé	En cours
BoNT/E <sub>3</sub> -LC	Non précisé	Succès

**Tableau 13 : Liste des immunogènes, et sous-type(s) de toxine botulique que chaque banque doit neutraliser.**

D'autre part, des travaux antérieurs au projet ont mis en évidence que la combinaison d'un anticorps ciblant la chaîne lourde de BoNT/A et d'un anticorps ciblant sa chaîne légère produisait une neutralisation synergique de BoNT/A. (Adekar, Jones, *et al.*, 2008) Nous avons émis l'hypothèse qu'une telle synergie pourrait aussi favoriser la neutralisation des toxines botuliques B et E, donc le projet AntiBotABE (Figure 74) a pour objectif final d'isoler des anticorps ciblant les chaînes légères et les chaînes lourdes des toxines botuliques A (des sous-types A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>), B (des sous-types B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>) et E, soit six anticorps au total. Pour cela, l'Institut Pasteur a fourni les six immunogènes qui nous ont servi à immuniser les six macaques, à partir desquels six banques immunes ont été construites grâce à une collaboration entre notre équipe et l'Université Technique de Braunschweig (*Technische Universität Braunschweig*, TUBS). Nous avons réalisé le criblage de ces six banques, ainsi que la production et les mesures d'affinité des scFv isolés à l'issue des criblages. Les meilleurs scFv ont été envoyés à notre partenaire anglais du *National Institute for Biological Standards and Controls* (NIBSC) afin d'identifier ceux qui neutralisent les toxines botuliques. Le scFv le plus neutralisant de chaque banque sera humanisé par notre partenaire allemand, selon une stratégie développée dans notre laboratoire. Pour ce travail, les mesures d'affinité des différents variants d'humanisation seront réalisées dans notre laboratoire, puisque notre partenaire allemand n'est pas habilité à détenir les toxines botuliques. Chacun des six variants humanisés sera ensuite exprimé sous forme d'IgG entière, par le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB). Les IgG seront testées *in vivo* par notre partenaire finlandais (IgG neutralisant BoNT/E) ainsi que par l'Institut Pasteur et le CNRS (IgG neutralisant BoNT/A et

B), contre différentes souches des toxines botuliques afin d'en établir le spectre de neutralisation.

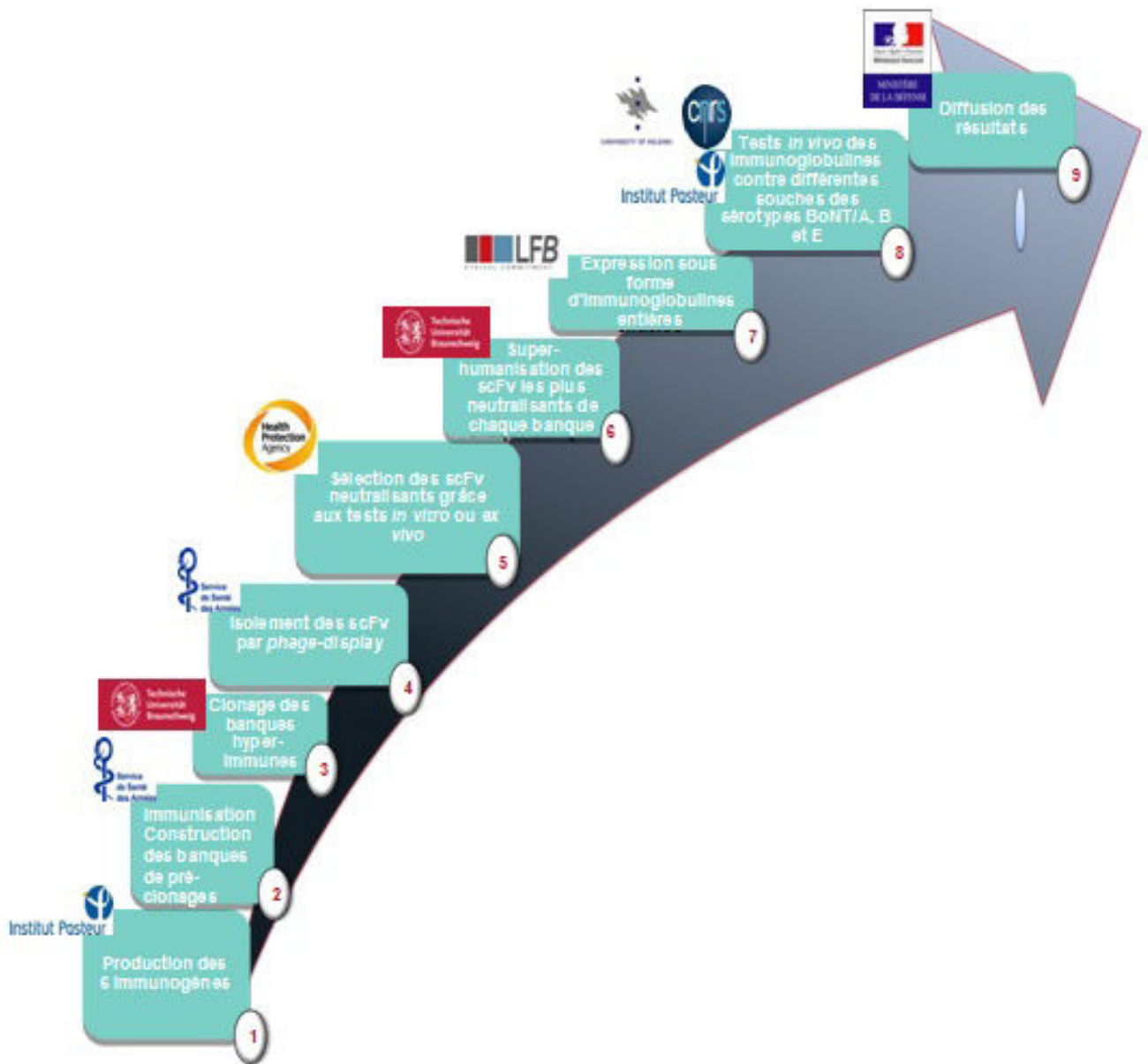


Figure 74 : Etapes successives du projet AntiBotABE

## Article 2 :

# Isolement de quatre scFv neutralisant la toxine botulique A en ciblant sa chaîne légère *Article soumis, co-auteur*

### Introduction de l'article 2 :

Ces travaux ont été principalement réalisés par Sebastian MIETHE, étudiant en thèse dans le laboratoire de notre partenaire allemand, lors de sa venue au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA), mais j'ai participé au criblage de la banque immune, à l'isolement des clones et aux mesures d'affinités.

Dans une étude précédente, réalisée dans le cadre d'AntiBotABE, une banque immune de scFv avait été construite à partir d'un macaque hyper-immunisé avec la chaîne légère de BoNT/A<sub>1</sub>, jusqu'à un titre de 1/100 000. (Chahboun *et al.*, 2011) Néanmoins, seuls 37 % des inserts de cette banque avaient la taille attendue, car des sites restriction spécifiques des enzymes NcoI et HindIII, utilisées pour le clonage, étaient présents dans l'ADN codant certains scFv. Cette difficulté n'avait pas empêché que le scFv 2H8 soit isolé à partir de cette banque et il inhibe 50 % de l'activité catalytique de BoNT/A en ciblant sa chaîne légère, avec un rapport molaire ([scFv]/[BoNT/A]) de 64 000/1. L'objectif final d'AntiBotABE est de préparer le développement d'IgG entières, mais notre partenaire allemand dispose depuis peu d'un système d'expression eucaryote de scFv-Fc, qui est un format intermédiaire entre les scFv et les IgG. Ce système a été testé en exprimant le scFv 2H8 sous cette forme, mais le scFv-Fc ainsi obtenu avait perdu toute réactivité. Afin de déterminer l'origine de cette perte de réactivité, une analyse bioinformatique a été réalisée et un site de glycosylation a été observé dans le CDR3 de la chaîne légère de 2H8. Ce site empêchant l'expression du scFv 2H8 en IgG fonctionnelle il a été retiré du projet, si bien qu'il devenait nécessaire d'isoler un nouvel anticorps neutralisant. Pour la première fois, nous avons donc dû reconstruire la banque immune dans un nouveau vecteur, afin d'augmenter la proportion d'inserts complet, et cribler cette nouvelle banque, afin d'isoler un nouvel anticorps neutralisant. Les résultats de ce nouveau criblage sont présentés dans l'article ci-dessous.



## **Development of neutralizing scFv-Fc raised against botulinum neurotoxin A light chain from an immune macaque library**

Sebastian Miethe <sup>1</sup>, Christine Rasetti-Escargueil <sup>2</sup>, Yvonne Liu <sup>2</sup>, Siham Chahboun <sup>3</sup>, Thibaut Pelat <sup>3</sup>, Arnaud Avril <sup>3</sup>, André Frenzel <sup>1</sup>, Thomas Schirrmann <sup>1</sup>, Philippe Thullier <sup>3</sup>, Dorothea Sesardic <sup>2</sup> and Michael Hust <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Technische Universität Braunschweig, Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Abteilung Biotechnologie, Spielmannstr. 7, 38106 Braunschweig, Germany.

<sup>2</sup> National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Division of Bacteriology, Blanch Lane, South Mimms, Potters Bar, Herfordshire EN6 3QG, UK.

<sup>3</sup> Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA-CRSSA), Département de Microbiologie, Unité de biotechnologie des anticorps et des toxines, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, B.P. 87, 38702 La Tronche Cedex, France

\*Corresponding author

PD Dr. Michael Hust

Technische Universität Braunschweig,

Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik

Abteilung Biotechnologie

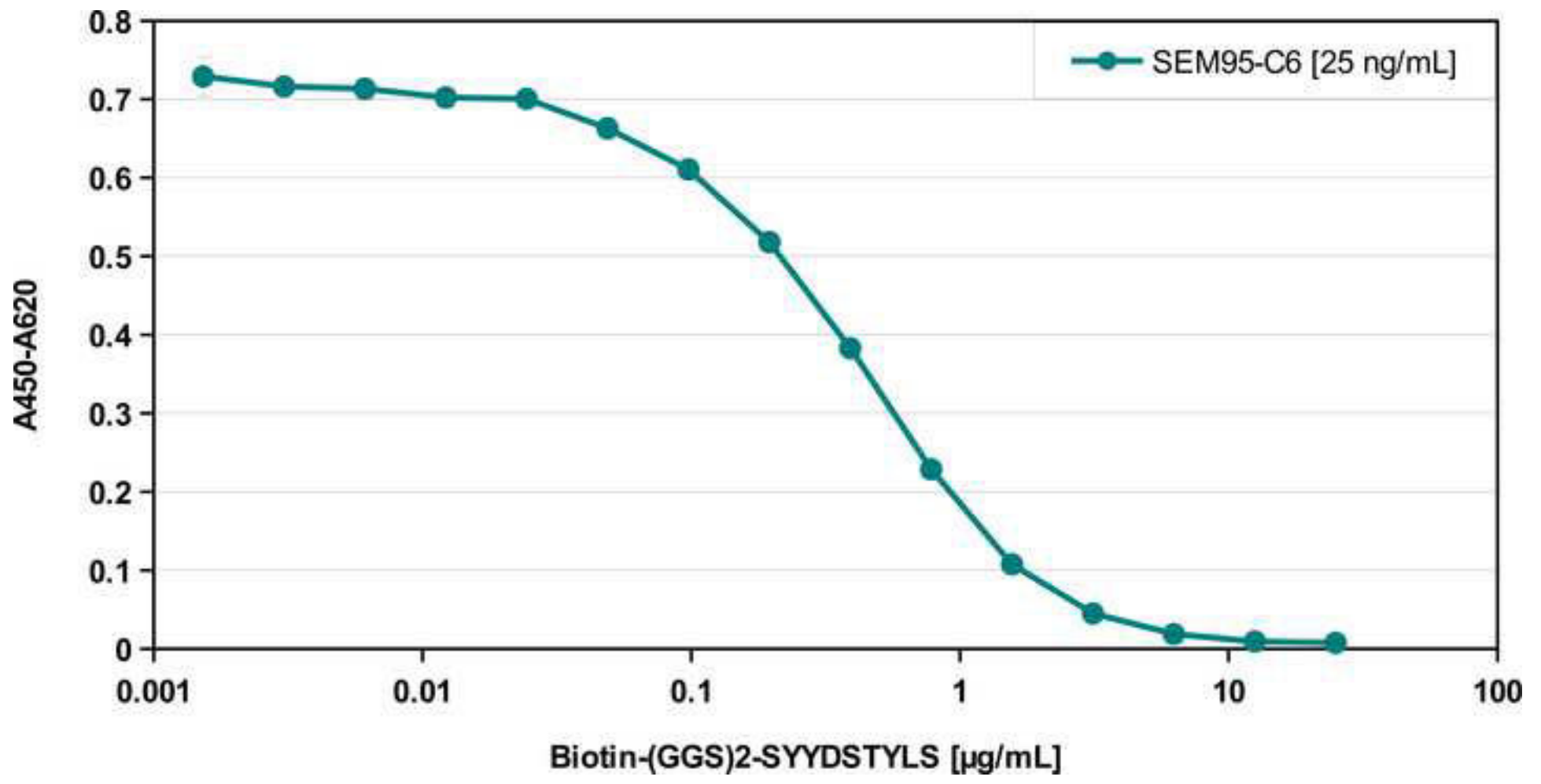
Spielmannstr. 7

38106 Braunschweig, Germany

Email: [m.hust@tu-bs.de](mailto:m.hust@tu-bs.de)

Telephone: +49-531-391-5760

Figure7b  
[Click here to download high resolution image](#)



## Conclusion de l'article 2 :

Afin d'augmenter le pourcentage de scFv entiers qui constituait la banque immune, celle-ci a été reclonee dans un nouveau vecteur, appelé pHAL32. Ce nouveau vecteur présente les mêmes propriétés que le vecteur pHAL14 utilisé pour la construction de la première banque, mais ses sites de clonage sont différents de ceux de pHAL14. Les sites de restriction utilisés dans pHAL32 sont plus longs, et donc plus rares, que ceux utilisés dans pHAL14. En particulier, le site de clonage clivé par NcoI, constitué par six nucléotides (théoriquement 1 site pour 4 096 nucléotides), a été remplacé par un site spécifique de SfiI, constitué de huit nucléotides (théoriquement 1 site pour 65 536 nucléotides).

La banque immune reclonee dans pHAL32 présente une diversité de  $3,2 \cdot 10^8$  clones, dont 80 % possèdent un insert complet contre 37 % précédemment, démontrant l'intérêt du nouveau vecteur. Après trois tours de criblage sur BoNT/A<sub>1</sub>  $1,3 \cdot 10^5$  phages ont été élués, et 276 clones ont été isolés puis induits en petit volume pour exprimer des scFv solubles. Sur ces 276 scFv, 69 réagissaient avec BoNT/A<sub>1</sub> en ELISA, et le séquençage de l'ADN codant ces scFv réactifs a permis l'identification de 22 séquences différentes. Dix-huit scFv différents ont été exprimés avec succès sous forme de scFv-Fc, en les fusionnant avec la région Fc d'une IgG2 murine. Ces 18 scFv-Fc ont été évalués dans le test *in vitro* d'inhibition de l'activité catalytique de BoNT/A<sub>1</sub>. Dans ce test, le substrat est adsorbé à la surface d'un puits ELISA, et clivé lors de l'incubation de la toxine. Un anticorps révèle ensuite ce substrat clivé. Les anticorps à tester sont pré-incubés avec la toxine, et la diminution du signal signe l'activité neutralisante, le cas échéant. Dans le test *in vitro*, cinq scFv-Fc se sont avérés neutralisants. Les scFv-Fc SEM-120-IIIC4 et SEM-120-IIIC1 sont les deux scFv-Fc les plus efficaces, et ils inhibent 40 % de l'activité catalytique de la toxine avec un rapport molaire ([site de fixation à l'antigène]/[BoNT/A]) de 0,4/1 et 2,6/1, respectivement. Le rapport molaire caractérisant l'activité du scFv-Fc SEM-120-IIIC1 est environ 4 000 fois plus favorable que celui l'IgG 4LCA, isolée par Adekar *et al.* (Adekar, Takahashi, *et al.*, 2008)

Les affinités des cinq clones les plus inhibiteurs ont été mesurées, et elles varient de 1,6 nM (SEM120-IIIC1) à 5,8 nM (SEM95-C6) au format scFv, et de 0,8 nM (SEM120-IIIC4) à 1,4 nM (SEM120-IVC5) au format scFv-Fc. Ces résultats mettent en évidence qu'il n'existe pas de corrélation stricte entre l'affinité des clones au format scFv et au format scFv-Fc.

Pour sélectionner la molécule à exprimer sous forme d'IgG, les cinq scFv-Fc inhibant le plus efficacement l'activité catalytique de BoNT/A<sub>1</sub> ont été évalués dans le test *ex vivo*

observant la paralysie induite par BoNT/A<sub>1</sub> d'un diaphragme stimulé par le nerf phrénique. En présence d'un anticorps, un retard d'apparition de cette paralysie témoigne de la neutralisation de la toxine. Ce test est représentatif de la paralysie respiratoire *in vivo*, et ses résultats sont proches de ceux obtenus avec le test de létalité sur souris. (Rasetti-Escargueil *et al.*, 2011) Dans ce test, le scFv-Fc SEM-120IIIC1 est le plus neutralisant, contrairement aux résultats du test *in vitro* d'inhibition de l'activité catalytique. A la concentration de 67 µg.ml<sup>-1</sup>, le scFv-Fc SEM120-IIIC1 retarde de 100 minutes l'apparition de 50 % de la paralysie induite par BoNT/A<sub>1</sub> (87 pg.ml<sup>-1</sup>). En plus d'inhiber l'activité catalytique de la toxine, le scFv SEM-120IIIC1 inhibe sûrement d'autres étapes du mécanisme d'action de la toxine, plus efficacement que le scFv-Fc SEM-120IIIC4. Le scFv-Fc SEM-120IIIC1 doit donc inhiber l'activité catalytique de la toxine et bloquer l'une des trois autres étapes du mécanisme d'action de la toxine, probablement par encombrement stérique. Puisque le test *ex vivo* est plus proche des conditions physiologiques de neutralisation de la toxine que le test *in vitro*, le scfv-Fc SEM120-IIIC1 a été sélectionné pour la suite du projet.

L'index de germinalité de SEM-120IIIC1 est de 86,8 % et 87,6 %, pour le domaine variable de sa chaîne lourde et de sa chaîne légère, respectivement, alors que les valeurs observées en moyenne pour les anticorps humains sont de 80,48 % et 87,6 % (données non publiées). La chaîne légère de SEM-120IIIC1 ayant un index de germinalité plus faible que l'index de germinalité moyens des chaînes légères humaines, SEM-120IIIC1 devra être humanisé pour qu'il soit bien toléré lors de son utilisation thérapeutique.

Au vu de l'ensemble des résultats, le scFv-Fc SEM120-IIIC1 a été sélectionné pour la poursuite du projet AntiBotABE. Après humanisation, il sera exprimé sous forme d'IgG entière et testé *in vivo* contre différentes souches de BoNT/A. Cet anticorps pourra être utilisé en combinaison avec l'anticorps A1HC38, qui neutralise BoNT/A<sub>1</sub> et BoNT/A<sub>2</sub> en ciblant leurs chaînes lourdes et qui a été isolé dans notre laboratoire, afin d'observer une éventuelle neutralisation synergique.

## Article 3 :

# Isolement de quatre scFv neutralisant la toxine botulique E en ciblant sa chaîne légère

## Article à soumettre

### Introduction de l'article 3 :

Cet article présente l'application de notre stratégie afin d'isoler des fragments d'anticorps neutralisant la toxine botulique E en ciblant sa chaîne légère. Parmi les travaux présentés dans cet article, j'ai réalisé la construction des banques de pré-clonage, l'isolement des scFv par la technique d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages, la production des scFv, l'analyse bioinformatique des séquences des scFv et leurs mesures d'affinité.

Bien que les cas naturels de botulisme provoqués par BoNT/E soient plus rares que ceux provoqués par BoNT/A et BoNT/B, les toxines de ce sérotype sont aussi létales et donc susceptible d'être militarisées que les autres sérotypes ; d'un point de vue militaire, sa neutralisation est donc tout aussi importante. Contrairement aux autres sérotypes de toxines botuliques, la toxine BoNT/E est sécrétée par les bactéries sous une forme inactive, et son activation est réalisée *in vivo* par les protéases de l'organisme infecté ou *in vitro* par trypsination. L'étude des séquences protéiques et nucléiques des différentes souches de *Clostridium* sécrétant BoNT/E a permis d'identifier cinq sérotypes de cette toxine (E<sub>1</sub> à E<sub>5</sub>), et les souches identifiées sont réparties de façon homogène entre ces différents sous-types. En l'absence de sous-type prédominant, les sous-types qui doivent être neutralisés n'ont pas été initialement précisés, et le projet indique simplement que le spectre de neutralisation sera précisé lors des essais de protection *in vivo*. La chaîne légère du sous-type E<sub>3</sub> a été utilisée pour l'immunisation des macaques et pour les tests d'inhibition et de neutralisation, car ce sous-type de toxine était le seul qui était détenu par notre partenaire de l'Institut Pasteur, qui nous fournit les immunogènes. Actuellement, aucun anticorps recombinant à visé thérapeutique neutralisant BoNT/E en ciblant sa chaîne légère n'est publié, donc l'importance de ce travail dépasse le projet AntiBotABE.

Compte tenu des faibles quantités de toxine utilisées lors du criblage, il n'a pas été possible de purifier la toxine activée du reste des composants du mélange réactionnel d'activation. Le criblage de la banque immune a donc, pour la première fois dans notre unité, été effectué vis-à-vis d'un antigène non purifié, puisqu'il ne représentait que 44,5 % (en rapport molaire) du mélange protéique. Comme le macaque a été élevé dans des conditions ne l'exposant pas aux antigènes non pertinents, et qu'il a été hyper-immunisé avec BoNT/E<sub>3</sub>-LC jusqu'à un titre maximal et stable de 1/300 000, nous avons émis l'hypothèse que seuls des anticorps spécifiques de BoNT/E<sub>3</sub> étaient synthétisés par le macaque, après le dernier rappel de l'immunisation. La banque immune construite à partir de ce macaque ne contenait notamment pas d'anticorps réagissant avec la trypsine ou l'anti-trypsine, présents lors du criblage.

## **Isolation of several scFv of non-human primate origin, neutralizing type E botulinum toxin by targeting its light chain.**

### **Introduction:**

Botulism results from intoxication by botulinum neurotoxins (BoNTs) secreted by several clostridia, mainly *Clostridium botulinum*, and is characterized by a flaccid paralysis, leading to a respiratory failure. The seven BoNT serotypes (A to G) were all observed to be toxic for non-human primates, but only serotypes A, B, E and in a less extend F, are the causative agents of naturally-occurring, human botulism. (Lacy & Stevens, 1999; Middlebrook & Franz, 1997) In the past, Soviet Union and Iraq were suspected to weaponize BoNTs, and the Japanese cult Aum Shinrikyo attempted to use it for bioterrorism. (S. S. Arnon et al., 2001; Bozheyeva, Gulbarshyn Kunakbayev, Yerlan Yeleukenov, 1999; United Nations Security Council, 1995; Zilinskas, 1997) The risk of contamination of the food chain by BoNTs has been highlighted by several scenarios, (Wein & Liu, 2005) and in fact, BoNTs are regarded as one of the six major biothreat agents by the Centers for Diseases Control ("category A" agents). (S. S. Arnon et al., 2001)

Botulinum neurotoxin E (BoNT/E) is encountered in aquatic sediments, and intoxications are mainly reported in Nordic European, American and Asian regions and in Japan, where fishes are smoked and frequently be eaten without cooking. (Horowitz, 2010) In France, between 1991 and 2011, only 4.4 % of the botulism cases were due to BoNT/E (12 out of 271 cases), and on a global scale, BoNT/E-related intoxications are more scarce than those related to BoNT/A and BoNT/B. However, BoNT/E lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) is estimated to be as low as that of BoNT/A, equal to 1.1 ng.kg<sup>-1</sup> in mice and monkeys (intravenous, subcutaneous and intraperitoneal pathway), (Gill, 1982) so that it is the most lethal known substance, and BoNT/E is as susceptible as BoNT/A to be weaponized. Five BoNT/E



subtypes (E<sub>1</sub> to E<sub>5</sub>) were identified, based on peptidic sequence variability as presenting 95 % to 99 % identity. (Hill et al., 2007)

BoNTs are composed of two subunit: a 100 kDa heavy chain, required for toxin endocytosis, and covalently linked to a 50 kDa light chain, which encompasses the proteolytic site. (Kumaran et al., 2009) Contrary to other BoNT serotypes, BoNT/E is secreted by the bacteria as an unique inactive chain, that requires to be nicked by host proteases for toxicity, and this nicking is associated with a 100-fold increase in toxicity. (Fischer et al., 2008; Kukreja, Sharma, & Singh, 2010) After BoNT/E binding on the neuron surface, endocytosis and translocation into the cytosol, the toxin acts on peripheral cholinergic nerve ending where it cleaves SNAP25 protein between residues 180 and 181, resulting in the inhibition of the acetylcholine vesicles exocytosis. (Simpson, 2004; Tonello, Morante, Rossetto, Schiavo, & Montecucco, 1996)

Paradoxically perhaps, BoNTs are also used as medicine for the relief of muscular spasticity, such as cervical dystonia or strabismus, and their utilization is increasing. For a review see ref. (Dressler, 2012). Vaccination against botulism would prevent such therapeutic use, so that it is ethically disputable. No synthetic inhibitors of BoNTs were approved for botulism therapy, due to their weak tolerance. (Cardinale et al., 2011; Kumar, Agarwal, & Swaminathan, 2012; Salzameda et al., 2011) Treatment of botulism requires admission of the patient in an intensive care unit, mainly for respiratory assistance, but such unit would be quickly saturated in case of a biological attack. (S. S. Arnon, 2001) Anti-toxin antibodies are the sole specific therapeutic molecules available against botulism, and a licensed human-derived Botulinum Immune Globulins (BabyBIG<sup>®</sup>) is used for the treatment of infant botulism, but available only in a very limited quantity. (Stephen S Arnon, Schechter, Maslanka, Jewell, & Hatheway, 2006) Adult botulism is treated by injections of horse-derived Fab and F(ab')<sub>2</sub> preparations (in Europe, Botulismus-Antitoxin Behring, Novartis, and in

USA, the investigational heptavalent antitoxin, Cangene/CDC), but they may induce serious adverse effects, like serum sickness or anaphylaxis, so better antibodies are needed.

Recombinant antibodies are isolated and produced by molecular technologies, and were introduced in the pharmacopea in 1997 with great success. (Grillo-López et al., 1999; Reichert, 2013) They are more human-like, and therefore better tolerated, than antibodies of animal origin. However, because BoNT serotypes differ up to 70 % in their amino acid sequence, it is necessary to neutralize each serotype with specific antibodies. In the pursuit of such treatment, the European "AntiBotABE" project (<http://www.antibotabe.com>) aims at isolating recombinant antibodies neutralizing BoNT/A, B and E, and the present study is part of that project. Here, we aimed at isolating an antibody fragment neutralizing BoNT/E by targeting its light chains.

Previously, the scFv 4E17 was isolated, starting from human volunteers immunized with botulinum pentavalent vaccine, then subjected to molecular evolution technique to identify the scFv 4E17.1. (Fischer et al., 2008; Garcia-Rodriguez et al., 2011) After conversion to full-size antibody, 25 µg of 4E17.1 appeared to protect mice challenged with 200 LD<sub>50</sub> of BoNT/E, (Garcia-Rodriguez et al., 2011) and epitope mapping revealed that this antibody target an epitope located at the N-terminus of the heavy chain. (Fischer et al., 2008; Garcia-Rodriguez et al., 2011) Because a combination of IgGs targeting both the heavy and the light chain of BoNT/A is up to 400-fold more protective than a single antibody, (Adekar et al., 2008; Nowakowski et al., 2002) the AntiBotABE project aims at isolating pairs of antibodies targeting both chains of BoNT/A, B and E. Currently, at the best of our knowledge, no recombinant human-like antibody neutralizing BoNT/E by targeting its light chain has been reported.

To isolate antibody fragments inhibiting the proteolytic activity of BoNT/E<sub>3</sub> by targeting its light chain (BoNT/E<sub>3</sub>-LC), an approach used previously with success was re-

utilized. (Chahboun et al., 2011; Chassagne et al., 2004; Laffly et al., 2005; Pelat et al., 2007; Pelat, Hust, & Thullier, 2009; Rülker et al., 2012) It takes advantage of the phylogenetic proximity between humans and non-human primates to isolate human-like antibodies, and consists in the use of phage-displayed libraries built from immunized macaques. (Thullier, Chahboun, & Pelat, 2010; Thullier, Huish, Pelat, & Martin, 2010a)

## **Materials and Methods:**

### **Ethical statement:**

The animal experiment was approved and performed in compliance with all relevant French ethical guidelines and laws, in particular i) « partie réglementaire du livre II du code rural (Titre I, chapitre IV, section 5, sous section 3 : expérimentation sur l'animal) »; ii) « décret 87-848 du 19/10/1987 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés modifié par le décret 2001/464 du 29/05/2001 »; iii) « arrêté du 29 octobre 1990 relatif aux conditions de l'expérimentation animale pour le ministère de la défense » and; iv) « instruction 844/DEF/DCSSA/AST/VET du 9 avril 1991 relative aux conditions de réalisation de l'expérimentation animale ». The macaques are kept in an animal house with filtered air, and food and water are sterilized.

### **Animal immunization:**

Four sub-cutaneous injections of 80 µg of a recombinant fragment representing BoNT/E<sub>3</sub>-LC (amino acids M1 to G420), expressed in *Escherichia coli*, were administered to a male cynomolgus macaque (*Macaca Fascicularis*) as described previously. (Chahboun et al., 2011) The three first injections were administered with one-month intervals and the fourth injection was administered four months after the third.

**BoNT/E activation:**

BoNT/E was utilized in an active, thus cleaved, form but because it is purchased as a single chain, a proteolytic activation has to be performed. Activation was realized immediately just prior to use, to avoid any risk of denaturation of the activated BoNT/E. For this purpose, 3 µg of BoNT/E<sub>3</sub> holotoxin (Metabionics Inc) at a concentration of 1 µg.µl<sup>-1</sup> in PBS (#4905004, Dominique Dutscher) are incubated for 30 minutes at 37°C with 0.15 µg (at a concentration of 50 µg.ml<sup>-1</sup>) of trypsin (T1426, Sigma Aldrich), in a final volume of 60 µl. The cleavage was stopped by adding a quantity of 0.30 µg (100 µg.ml<sup>-1</sup>) of trypsin inhibitor (T9003, Sigma Aldrich) and by incubating the mixture for an additional 30 minutes at 37°C. The resulting product, called "activated BoNT/E<sub>3</sub>" in the text below, is composed of 44.5 % (molar ratio) of BoNT/E<sub>3</sub>. The quality of the activation was assessed by migration under reducing conditions in capillary electrophoresis (Experion, Bio-Rad, Hercules, USA), by observing the disappearance of the band corresponding to the uncleaved toxin (150 kDa) and the appearance of two bands of 50 and 150 kDa (data not shown).

**ELISA assay:**

The macaque immune response was evaluated by ELISA, performed as described previously except that activated BoNT/E<sub>3</sub> (2 µg.ml<sup>-1</sup>) was utilized as the capture antigen, with the pre-immune serum utilized for negative control. (Pelat et al., 2007)

For phage ELISA, activated BoNT/E was utilized in the same fashion than previously described, (Pelat et al., 2007) but trypsin (50 µg.ml<sup>-1</sup>), trypsin inhibitor (100 µg.ml<sup>-1</sup>), BSA (A3059, 5 µg.ml<sup>-1</sup>), KLH (H7017, Sigma Aldrich, 5 µg.ml<sup>-1</sup>) or LF (Lethal factor, 5 µg.ml<sup>-1</sup>), were utilized as antigen for negative controls.

## **Library construction:**

After the fourth immunization, bone marrow was sampled twice a week for three weeks with each sample volume not exceeding 5 mL, and total RNA was extracted using Tri Reagent (TR118, Molecular Research Center Inc). RNA encoding Fd fragments and  $\kappa$  light chains (L $\kappa$ ) were retro-amplified with specific primers, as presented previously, (Glamann et al., 1998; Pelat, Hust, & Thullier, 2009), and the optimal amplification was chosen for library construction. To obtain two sub-libraries encoding Fd fragment or L $\kappa$ , the corresponding PCR products were pooled and subcloned in pGEM<sup>®</sup>-T vector (A3600, Promega). The library was constructed starting from these two sub-library. The DNA encoding the Fd fragment and the  $\kappa$  light chains were then reamplified with two individual oligonucleotide primer sets introducing restrictions sites allowing the cloning into pHAL35 vector. First the pHAL35 vector and the VL-amplified repertoire were digested with MluI and NotI (New England Biolabs). The vector was then dephosphorylated using calf intestinal phosphatase (MBI Fermentas). The vector and the VL repertoire were purified using the NucleoSpinII Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Therefore, a quantity of 270 ng of DNA encoding the VL repertoire was cloned into 1  $\mu$ g of dephosphorylated vector, using T4 DNA-Ligase (Promega). The ligation product was precipitated with ethanol and sodium acetate. The resulting pellet was washed twice with 70% ethanol and resuspended in 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O before to be electroporated (1.7 kV) in 25  $\mu$ L of XL1-Blue MRF' (Stratagene) then plated on 2xYT agar plates supplemented with 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> ampicillin, 20  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> tetracyclin and 100 mM glucose. The colonies were harvested and suspended in 40 mL 2xYT media. Therefore, plasmids were isolated using the Nucleobond Plasmid Midi Kit (Macherey-Nagel). A quantity of 250 ng of DNA encoding VH was ligated into 1  $\mu$ g of vector containing the VL repertoire using SfiI and HindIII (New England Biolabs). The product of ligation was

electroporated as described previously for VL. The vectors containing VH and VL repertoires were packaged in M13K07 phages.

### **Panning of the anti-BoNT/E<sub>3</sub>-LC antibody library:**

The library was panned in ELISA plates (44-2404-21, Nunc MaxiSorp) according to recommendations previously published. (Andris-Widhopf, Rader, Steinberger, Fuller, & Barbas, 2000; Barbas, Burton, Scott, & Silverman, 2001). For this, after library incubation, wells were washed 5, 10, 20 or 40 times during the successive rounds of panning. Each wash consists of five pipetting up and down, and washes were separated by 5 min. Phage elution and culture were realized in the same fashion as previously described. (Chassagne et al., 2004)

### **scFv sequencing :**

One hundred clones were randomly hand-picked after the fourth round of panning, and cultured in 10 mL SB medium (0105, AthenaES) supplemented with carbenicillin (44577, BioChemika, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). DNA was extracted by QIAcube system (Qiagen) and then sequenced by Beckman Coulter Genomics.

### **scFvs production and affinity measurement:**

DNA encoding selected scFvs was utilized to transform the non suppressor *E. Coli* strain HB2151 (Carter, Bedouelle, & Winter, 1985) in order to express soluble scFvs. The

scFvs were purified with Ni-NTA spin column (31014, Qiagen) and concentrations were measured using capillary electrophoresis.

The affinities were measured by surface plasmon resonance using a BIAcore 3000 instrument (GE Healthcare-Biacore, Uppsala, Sweden). For this, scFvs were coated at a maximum of 800 RU on a CM5 chip (BR100012, GE Healthcare-Biacore) *via* amine coupling, according to the manufacturer's instructions. Volumes of 100  $\mu$ l of at least ten dilutions (HBS-EP buffer, BR100188, GE Healthcare-Biacore) of activated BoNT/E<sub>3</sub> activation mixture (concentrations of BoNT/E<sub>3</sub> ranging from 250 nM to 0.03 nM) were tested. A 30  $\mu$ l.min<sup>-1</sup> flow rate was maintained during each run of 1 hour. After each dilution was tested, the chip was regenerated with 1.5  $\mu$ M glycine buffer (BR100354, GE Healthcare-Biacore) injected during 30 seconds at 10  $\mu$ l.min<sup>-1</sup>. Affinities were calculated using the BIAevaluation software (GE Healthcare-Biacore) according to Langmuir 1:1 adsorption model, and results were verified by internal consistency tests. (Schuck & Minton, 1996)

### **Computational analysis:**

The sequences of the scFvs isolated after the panning were analyzed with IMGT/V-QUEST tool (<http://imgt.cines.fr>) to identify the human V, (D), J germline genes which are most similar to those encoding the isolated scFvs, and to calculate the Germinality Index (GI). (Alamyar, Giudicelli, Li, Duroux, & Lefranc, 2012) The GI is the percentage of identity between the framework regions of the isolated scFvs and those of their most similar human germline sequences, and this analysis represents a first evaluation of scFv immunogenicity. (Laffly et al., 2005)

The G-score represents a second evaluation of the immunogenicity, but it compares the selected scFv sequences with human expressed antibodies. G-scores of selected scFvs



were calculated with the tools available online on University College London website (<http://www.bioinf.org.uk/abs/gscore/>). (Thullier, Huish, et al., 2010)

The diversity of the sequences was represented as a phylogenetic tree using the «one click tool» available online (<http://www.phylogeny.fr>), (A Dereeper et al., 2008; Alexis Dereeper, Audic, Claverie, & Blanc, 2010; Edgar, 2004), as performed once in the past. (Pelat, Hust, Hale, et al., 2009)

Because glycosylation of the variable domains may inhibit the binding of the antigen by steric hinderance, the presence of potential glycosylation sites on variable regions predicted using NetNGlyc 1.0 tool (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

#### **SNAP25 endopeptidase assay:**

Previously published in vitro SNAP25 endopeptidase immuno-assay for BoNT/E toxin (Jones, Ochiai, Liu, Ekong, & Sesardic, 2008) was modified and used to assess inhibitory properties of the scFv. In this assay, the curve presenting ELISA signal as a function of BoNT/E endopeptidase activity has a linear part, utilized in the present study, where a 50% signal decrease corresponds to a 50% decrease in endopeptidase activity. Here, BoNT/E<sub>3</sub> was purchased from Metabionics (with specific activity of  $2.3 \times 10^8$  mouse i.p. LD<sub>50</sub>.ml<sup>-1</sup>). This toxin preparation was diluted to a stock concentration of 87 pg/ml (20 LD<sub>50</sub>.ml<sup>-1</sup>) in reaction buffer (50 mM HEPES, 20 μ M ZnCl<sub>2</sub>, pH7.0, 0.5% (v/v) Tween20<sup>®</sup>, 5 mM DTT). All scFvs were diluted to 10 μg.ml<sup>-1</sup> in reaction buffer and 150 μl was added to all wells in column 1 of a 96-well low binding polypropylene plate (Nunc). 75 μl of reaction buffer was then added to all wells in columns position 2 to 11. Twofold dilutions of antibody samples were performed across the plate, initiated by removing 75 μl from wells in column 1 and completing by discarding 75 μl from wells in position 11. The stock solution of BoNT/A (75 μl) was added to all the wells to provide a final concentration of 43.5 pg.ml<sup>-1</sup> toxin,

corresponding to  $10 \text{ LD}_{50} \cdot \text{ml}^{-1}$ . The toxin/antitoxin mixture was briefly shaken on a plate shaker for 1 min at room temperature, then incubated for 1 hr at  $37^{\circ}\text{C}$ , before being transferred ( $50 \mu\text{l}/\text{well}$ ) to another 96-well ELISA plate previously coated with custom made SNAP-25 peptide (amino acids 137 to 206). The plate was incubated for  $\sim 18$  hr at room temperature and washed 3 times in PBS-0.05% (v/v) Tween 20 (wash buffer). Specific cleavage of SNAP-25 (137-206) peptide by the BoNT/E<sub>3</sub> toxin was detected with a commercial anti-SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Lifespan Biosciences LS-C39152/10719), diluted 1:750 in wash buffer containing 2.5% (w/v) skimmed milk powder, of which  $100 \mu\text{l}$  were added to all wells. The plate was incubated at room temperature for 90 mins, washed and reaction visualised by addition of  $100 \mu\text{l}/\text{well}$  of diluted anti-mouse-HRP conjugate (Sigma), diluted 1:2000 in wash buffer containing 2.5% (w/v) skimmed milk powder.

## **RESULTS:**

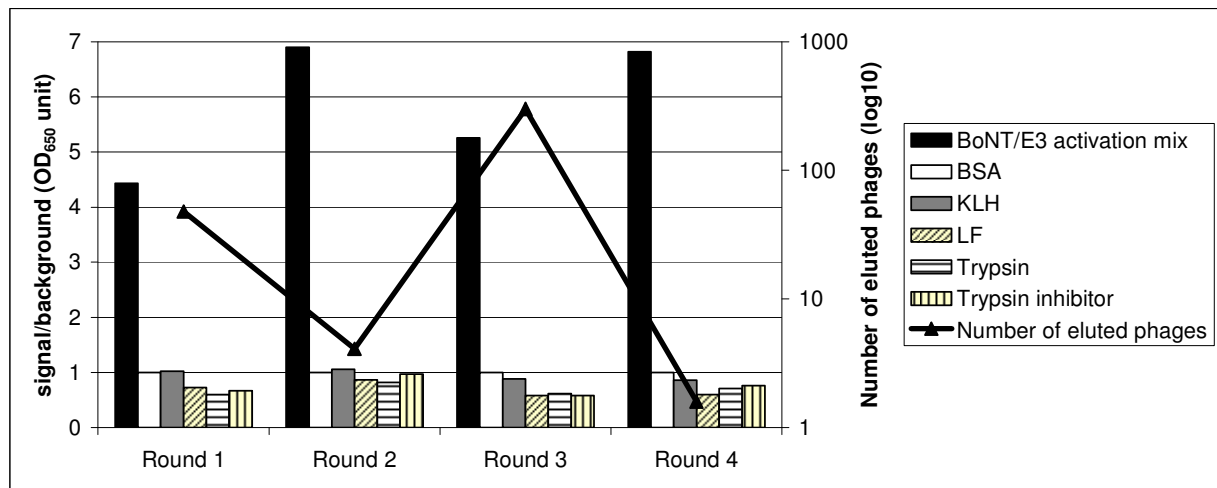
### **Animal immunization and construction of the phage-displayed library:**

A macaque (*Macaca fascicularis*) was immunized with three injections of BoNT/E<sub>3</sub>-LC. Fourteen days after the second and the third injections, a titer equal to  $1/300,000$  was observed. Four months after the third injection, the macaque bone marrow was sampled, but from it, no RNA encoding Fd nor L $\kappa$  was amplified using specific primers. Then, a fourth and last injection of BoNT/E<sub>3</sub>-LC was administered, and the macaque bone marrow was sampled iteratively. Using the same primers, amplification increased and reached an optimum at the 10<sup>th</sup> day after the fourth injection, when all primers pairs allowed a strong amplification. These optimal PCR products were pooled and cloned into pGEM<sup>®</sup>-T vector to obtain two sub-libraries of  $4.1 \times 10^4$  and  $2.3 \times 10^4$  clones encoding the Fd fragments and L $\kappa$  chains,

respectively. The phage-displayed scFv library was built from these two sub-libraries, using pHAL35 and it presented a diversity of  $1 \times 10^8$  clones.

### Library panning for the isolation of scFv directed against BoNT/E<sub>3</sub>:

The phage-displayed scFv library was subjected to four rounds of panning with 5, 10, 20 and 40 washes, respectively. The number of eluted phages increased from  $4.8 \times 10^7$  after the first round up to  $3 \times 10^8$  after the third round (**Figure 1**), indicating a successful enrichment in specific phages, but the number of eluted phages decreased between round 3 and round 4. The reactivity of the eluted clones against activated BoNT/E<sub>3</sub> was assessed in phage-ELISA, and the signal increased 1.5-fold between round 1 and 4 (**Figure 1**). This increased shown the existence of scFvs reacting with activated BoNT/E<sub>3</sub>, but it was inferior to what was observed previously. (Laffly et al., 2005; Pelat et al., 2007; Pelat, Hust, Hale, et al., 2009) No reactivity was observed against trypsin and trypsin inhibitor, nor against BSA, KLH or LF, in the phage ELISA, as expected (**Figure 1**).

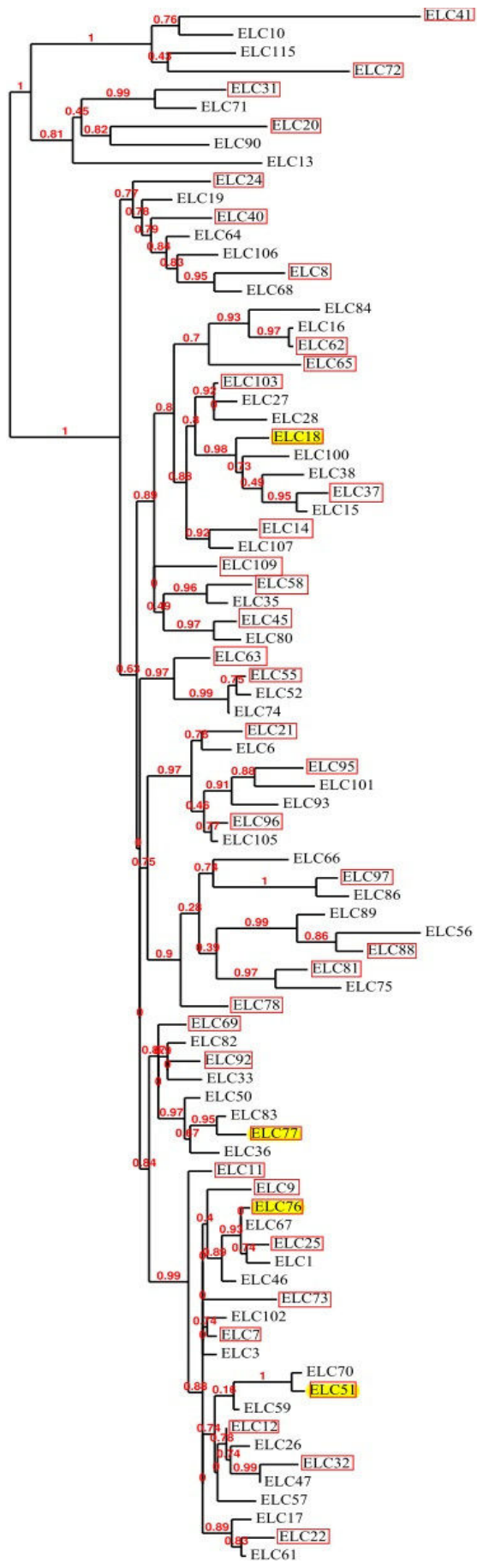


**Figure 1 : Count of eluted phages and evaluation of their specificity in phage-ELISA.**

The eluted phages were counted after each round of panning, and their reactivity and specificity were evaluated by phage-ELISA at the end of the panning. Proteins were coated at a concentration of  $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (BSA, KLH and LF),  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (trypsin) and  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (trypsin inhibitor). A volume of  $100 \mu\text{l}$  of BoNT/E<sub>3</sub> activation mixture was coated. OD<sub>650</sub> were normalized according to BSA signal.

### **Isolation of anti-BoNT/E<sub>3</sub> scFvs**

One hundred clones eluted after the last round of panning were randomly hand-picked and the phagemidic DNA was extracted and sequenced. Only five sequences appeared to be recombined, and the corresponding clones were discarded. Of the 95 remaining results, 78 sequences were identified in a single copy and seven were identified in two or more copies, resulting in a total of 85 different scFv sequences. The diversity was represented in the form of a phylogenetic tree, and at least one sequence of each cluster was selected, resulting in the selection of 38 scFv, which were considered as representing the diversity of the completeness sequences (**Supplementary Data 1**). After transformation of the DNA in E.Coli strain HB2151, all 38 scFvs were successfully expressed and purified.

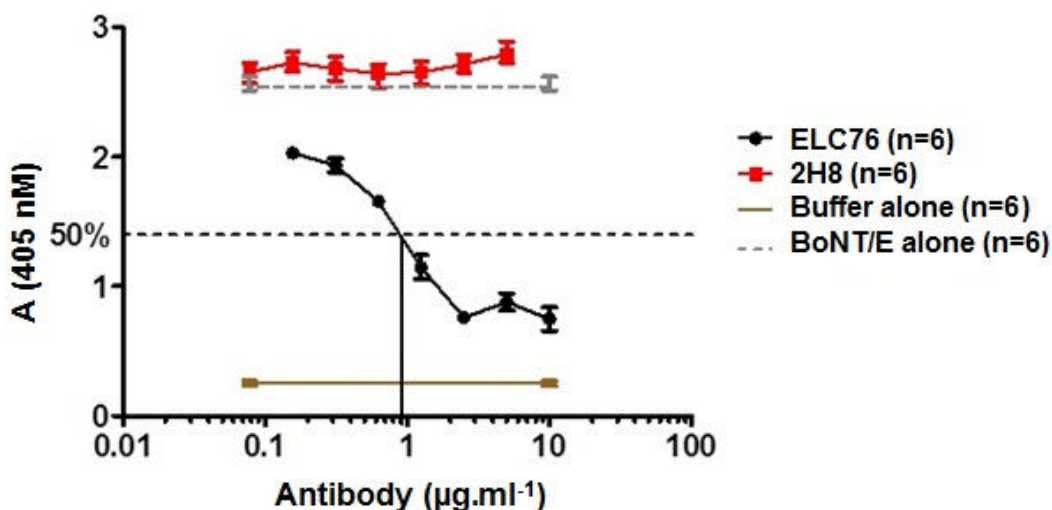


### Supplementary Data 1: sequence diversity.

A tree representing the sequence diversity was realized with phylogeny « one click » tool. Sequence framed in red were selected for be tested in the endopeptidasic assay, according to their diversity and their affinity. Sequences underlined in yellow represent the neutralizing scFv.

### Inhibition of BoNT/E<sub>3</sub> catalytic activity :

The 38 selected-scFv were assessed for their inhibition capacities in the SNAP25 endopeptidase assay. The inhibition of 20 LD<sub>50</sub>.ml<sup>-1</sup> (87 pg.ml<sup>-1</sup>) of BoNT/E endopeptidase activity, by the 38 scFvs was firstly screened at a concentration equal or superior to 10 µg.ml<sup>-1</sup> as inhibiting BoNT/E protease activity were then precisely characterized, with seven scFv concentrations ranging from 0.1 to 10 µg.ml<sup>-1</sup>. After testing, four of the scFvs appeared to neutralize efficiently BoNT/E holotoxine, with concentrations inhibiting 50 % of the activity (IC<sub>50</sub>) of 0.9, 1.3, 1.5 and 3 µg.ml<sup>-1</sup> for scFv ELC76, ELC77, ELC51 and ELC18, respectively. The best inhibitor, ELC76 inhibited 50 % of the toxin activity at molar ratio (scFv ELC76 / holotoxin) of 64,000 / 1 (**Figure 2**). No effect was observed in presence of buffer alone or in presence of scFv 2H8, which is directed against BoNT/A-LC (**Figure 2**). (Chahboun et al., 2011)



**Figure 2 : Inhibition of BoNT/E<sub>3</sub> catalytic activity**

BoNT/E<sub>3</sub> holotoxin (20 LD<sub>50</sub>.ml<sup>-1</sup>, 87 pg.ml<sup>-1</sup>) was incubated alone (gray dotted line) in presence of different concentrations of scFv ELC76 (black curve with black circles) or in presence of different concentration of a negative control, the non-relevant scFv 2H8 (red curve with red squares). The black dotted line represents the 50 % of endopeptidase activity inhibition. The EC<sub>50</sub> is regarded as the scFv concentration inhibiting 50 % of BoNT/E endopeptidase activity (black dotted line). Curves are the results of six independent experiments (n=6).

### **Affinity determination:**

The affinities of the four neutralizing scFvs were determined by surface plasmon resonance and were equal to 0.57 nM, 1 nM, 7.3 nM and 9.17 nM for scFv ELC18, ELC76, ELC77 and ELC51, respectively. The four neutralizing scFvs did not react against trypsin nor anti-trypsin in surface plasmon resonance (no signal, data not shown). No strict correlation was observed between affinity and IC<sub>50</sub> (**Table 1**).

<b>ScFV</b>	<b>Affinity</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
ELC18	0.1 nM	3 µg.ml <sup>-1</sup>
ELC51	9.17 nM	1.5 µg.ml <sup>-1</sup>
ELC76	1 nM	0.9 µg.ml <sup>-1</sup>
ELC77	0.094 nM	1.3 µg.ml <sup>-1</sup>

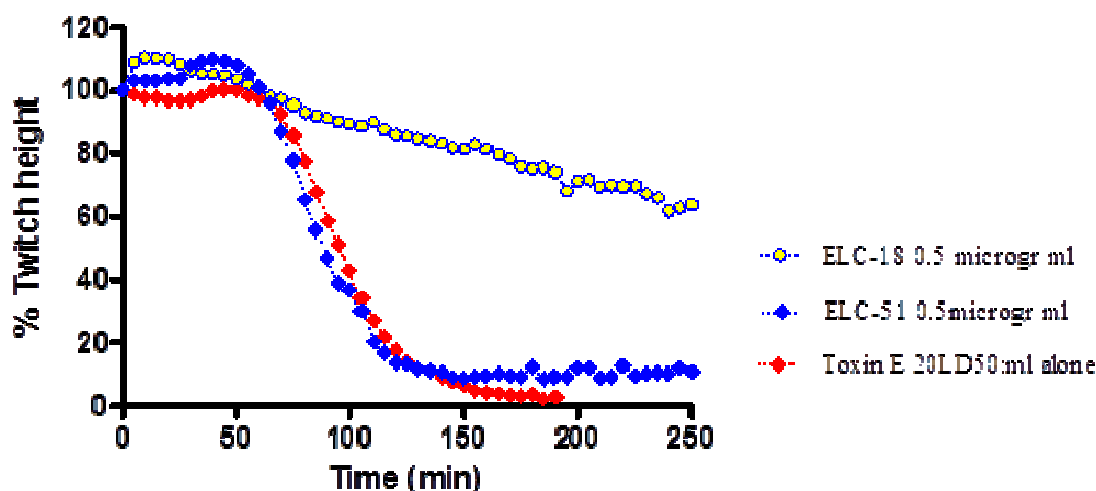
**Table 1 : Affinities and IC<sub>50</sub> of the scFv of best interest.** Affinities of the scFv were measured by plasmon surface resonance, and median Inhibiting Concentration (IC<sub>50</sub>) were assessed in the SNAP25 endopeptidase assay.

### ***Ex vivo* neutralization assay**

The three unglycosylated scFv which inhibited BoNT/E<sub>3</sub> catalytic activity were assessed in the mouse phrenic nerve-hemidiaphragm test. In this test, scFv ELC18 was the best neutralizing scFv because at a concentration of 0.5 µg.ml<sup>-1</sup>, the 50 % paralysis decrease was delayed for more than 250 minutes (**figure 3**).



### Neutralisation of type E botulinum toxin (Metabiologics) by anti-light chain scFv antibodies



**Figure 3: Neutralization of BoNT/E<sub>3</sub>.**

Neutralization of BoNT/E<sub>3</sub> (20 DL<sub>50</sub>.ml<sup>-1</sup>, 87 pg.ml<sup>-1</sup>) by variable concentration of scFv.

### Analysis of antibody glycosylation sites

All scFv sequences were analyzed to detect the presence of glycosylation site, i.e. NXS/T consensus tripeptide. Among the four neutralizing scFvs, only ELC77 encompassed such consensus sequence (83 NLS 85), and was discarded from further developments.

### Computational analyse:

After sequencing, the computational analysis using IMG2/V-QUEST tool was performed to retrieve the human germline V, (D), J genes most similar to the three selected scFvs (**Table 2**). All heavy chain V genes were of IGHV4 family and all light chain V gene were of IGKV1 family, but the combination of V, (D), J were unique. The Germinality Index (GI) (Thullier, Huish, et al., 2010) and the G-scores were calculated for the three scFv (**Table 3**). The scFv ELC76 is the best inhibitor and also the most human scFv, with a mean GI equal

to 90.56 % and a mean G-score equal to -0.024, and as observed previously, its light chain was more human than its heavy chain.

	VH			VL	
	V	D	J	V	J
ELC18	IGHV4-28*01	IGHD2-21*01	IGHJ3*01	IGKV1-9*01	IGKJ2*03
ELC51	IGHV4-39*07	IGHD2-15*01	IGHJ5*01	IGKV1-17*01	IGKJ3*01
ELC76	IGHV4-39*07	IGHD2-15*01	IGHJ5*01	IGKV1-6*01	IGKJ4*01

**Table 2 : Identification of the human germline gene closer to the sequences of the three neutralizing scFv.** Human antibody germline genes closest to the sequences of the four best neutralizing scFvs were retrieved using IMGT/V-QUEST.

scFv	GI (%)			G-Score		
	VH	VL	Mean GI	VH	VL	Mean G-score
ELC18	85.71	89.88	87.79	-1.212	-0.954	-1.083
ELC51	87.91	82.02	84.96	-0.593	-1.081	-0.837
ELC76	86.81	94.31	90.56	-0.686	0.638	-0.024

**Table 3 : Humanness of the three neutralizing scFv.**

The GI and the G-score of the three best neutralizing scFv were calculated using respectively IMGT/DomainGapAlign and UCB webserver tools.

## Discussion:

We report for the first time the isolation of a scFv which inhibiting BoNT/E catalytic activity by targeting its light chain. Recombinant antibodies are of particular interest to neutralize biological warfare agents as *Bacillus anthracis*, the ricin or the BoNTs, because they can be used for therapy, and also for prophylaxis, for personals at high exposure risk. (Froude, Stiles, Pelat, & Thullier, 2011; Froude, Thullier, & Pelat, 2011) Non-human primates are phylogenetically close to humans, and their antibody sequences were shown to be similar to human ones and thus would be useful for the isolation of well tolerated therapeutic antibodies. (Froude, Stiles, et al., 2011; Thullier, Huish, et al., 2010) The anti-BoNT/A scFvs isolated from immune libraries had been shown to be more reactive and more neutralizing than scFvs isolated from naive libraries, (Amersdorfer et al., 2002) so here, an immune-library directed against BoNT/E-LC was built. Contrary to humans, macaques can be immunized

with antigen of biodefense interest, (Avril, Froude, Mathieu, Pelat, & Thullier, 2013) so this strategy was successfully re-utilized here for BoNT/E.

A macaque (*Macaca fascicularis*) was immunized with the non-toxic BoNT/E<sub>3</sub>-LC, and the immunization course led to a titer of 1/300,000 for activated BoNT/E<sub>3</sub> after the second immunization, and this high titer did not increase with the third, thus corresponding to a hyper-immune response. Due to the long period separating the third and the fourth injection, just before this last injection no DNA encoding Fd fragment of the  $\gamma$  chain or Lk regions was amplified. Bone marrow was sampled twice a week during 17 days, and best amplification was observed at day 10<sup>th</sup>, in a timely fashion corresponding to the kinetic of IgG secretion. Because macaques were protected from environmental antigens, the amplification observed corresponds to DNA encoding antibodies specifically directed against the immunogen, BoNT/E<sub>3</sub>-LC, and the library corresponds to the definition of a «hyper-immune library». (Pelat & Thullier, 2009) The «hyper-immune library» built presented a diversity of  $1 \times 10^8$  clones, which is similar to previous works that had led to nanomolar neutralizing antibodies isolation. (Chahboun et al., 2011; Pelat, Hust, Hale, et al., 2009) Despite the macaque was immunized with BoNT/E-LC, we aimed at isolating antibodies directed against the natural form of BoNT/E, that is to say the activated holotoxin, so prior all experiments, BoNT/E was activated *in vitro*. Because we realized the activation each day to avoid any risk of denaturation, only small quantities of BoNT/E<sub>3</sub> were digested each time, so considering the yield of purification, it was impossible to purify the toxin from the other components of the activation mix. Therefore, another originality of the present study was that the antigen utilized for the panning was a mix of three different molecules. We hypothesized that such a panning could be a success because the «hyper-immune library» was by construction, focused on BoNT/E<sub>3</sub>. After panning, no reactivity against trypsin or trypsin inhibitor was observed as expected, and phages were only reactive against activated BoNT/E<sub>3</sub>. Nevertheless, contrary to

results observed previously, the number of eluted phages was maximal after the third round and not after the fourth. We hypothesized that phages diversity after the fourth round of panning was more limited than after the third, and we kept open the possibility to come back to that third round if necessary. However, this possibility was not utilized as 85 different scFv sequences were identified. A tree representing the sequences diversity was generated, and we hypothesized that sequences that are closed in this tree, present a high degree of similarity and thus should target the same epitope on BoNT/E<sub>3</sub>. In this fashion, 38 scFvs considered as representative of the sequences diversity were selected on the tree, then expressed and tested in the SNAP25 endopeptidase assay. (Jones et al., 2008) The scFv ELC76 is the most efficient of the four neutralizing scFv, with an IC<sub>50</sub> equal to 30 nM and a molar ratio equal to 64,000 / 1, which is identical to 2H8 scFv, which neutralized BoNT/A-LC in a similar endopeptidase test with the same molar ratio. (Chahboun et al., 2011) Contrary to scFv, IgG induced a higher steric hindrance which should improved the IC<sub>50</sub> and the molar ratio after conversion of the best scFv to full-length IgG. Affinities of the four neutralizing scFv were measured by surface plasmon resonance. The scFv ELC18, was the best binder with an affinity equal to 0.1 nM, whereas ELC76 affinity was 1 nM.

Because scFv cannot be used *in vivo* for therapy, and because IgG should be more efficient than scFv, AntiBotABE project includes the expression of the best selected scFv as a full-length IgG. Contrary to scFv produced in bacterial cells, IgG are produced in mammalian cells, which are able to glycosylate proteins, and glycosylation of the antibody variable region could hinder antigen binding *in vivo*. The scFv ELC77 was predicted to be glycosylated in its FR3, and was discarded from further development. It is the first time we implement such a procedure, after encountered such a difficulty elsewhere, and such an analysis should probably be implemented earlier in future studies, when analysing the diversity of sequences.

The three unglycosylated-scFv which inhibited BoNT/E<sub>3</sub> catalytic activity were assessed in the mouse phrenic nerve-diaphragm assay. This *ex vivo* assay closely mimics *in vivo* respiratory paralysis caused by BoNT and has been shown to be in excellent agreement with the mouse *in vivo* assay to assess the neutralizing activity of antibodies for the main toxin serotypes A, B and E. (Rasetti-Escargueil, Jones, Liu, & Sesardic, 2009; Rasetti-Escargueil, Liu, Rigsby, Jones, & Sesardic, 2011) In this test ELC18 was the best neutralizing scFv, whereas in the *in vitro* assay it was the lower neutralizing scFv. This difference should be explained by the fact that the *ex vivo* test allowed the identification of scFv inhibiting BoNT/E<sub>3</sub> catalytic activity, but also thus inhibiting the binding to the plasma membrane, the receptor-mediated endocytosis, and the escape from the endosome. ELC18 should inhibited several of these steps better than ELC76. Because the *ex vivo* test was closer from the physiological conditions than the *in vitro* assay, ELC18 was selected for further development.

It is considered that the more human-like antibodies are the well tolerated, because they should be considered as part of the «immunological-self». (Hwang & Foote, 2005; Pelat & Thullier, 2009; Tan et al., 2002; Thullier, Huish, et al., 2010) Even though they are close from their human counterpart, macaque IgG are not identical and could induce a human anti-macaque-antibody response, which could decrease the therapeutic activity. (Thullier, Chahboun, et al., 2010; Thullier, Huish, et al., 2010) To limit this risk, several tools were developed to predict the antibody tolerance, as GI and G-score, which compare the variable region of a given antibody with the human germline V, (D), J genes, and with expressed antibodies, respectively. (Pelat et al., 2008; Thullier, Huish, et al., 2010) ELC18 had a mean GI and G-score equal to 87.79 % and -1.083. (Chassagne et al., 2004; Pelat et al., 2008) A sequence with a G-score of zero have the same identity level with its human counterparts than the average identity level observed when human antibodies are compared between them. Positive scores correspond to higher than average identity level. The humanness of ELC18

predict a high tolerance, but it was nevertheless possible to germline-humanized ("super-humanized") it to optimize its tolerance. Such a work was previously realized for Fab 35PA<sub>83</sub>, an antibody fragment previously isolated in our laboratory, which neutralized the lethal toxin of *Bacillus anthracis*. (Pelat et al., 2008) According to affinity, inhibition potency, absence of glycosylation site and humanness, ELC18 was selected as the best clone that will be expressed as full-length IgG.

The scFv ELC18 was selected against BoNT/E<sub>3</sub>, but five subtypes of BoNT/E were currently described, and it would be interesting to neutralize each of them with a single IgG. Thus, after expression as full-length IgG, *in vivo* protection assays will be realized against different strains of these five subtypes.

It has been previously shown that combination of one antibody targeting the heavy chain and one antibody targeting the light chain of BoNTs, produced a synergistic neutralization. (Adekar et al., 2008; Nowakowski et al., 2002) Thus, ELC18 will be tested with the anti-BoNT/E-HC scFv currently being isolated as part of AntiBotABE project.

## References:

- Adekar, S. P., Takahashi, T., Jones, R. M., Al-Saleem, F. H., Ancharski, D. M., Root, M. J., Kapadnis, B. P., et al. (2008). Neutralization of botulinum neurotoxin by a human monoclonal antibody specific for the catalytic light chain. *PloS one*, 3(8), e3023. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2515629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Alamyar, E., Giudicelli, V., Li, S., Duroux, P., & Lefranc, M.-P. (2012). IMGT/HighV-QUEST: the IMGT® web portal for immunoglobulin (IG) or antibody and T cell receptor (TR) analysis from NGS high throughput and deep sequencing. *Immunome research*, 8(1), 26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647994>
- Amersdorfer, P., Wong, C., Smith, T., Chen, S., Deshpande, S., Sheridan, R., & Marks, J. D. (2002). Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine*, 20(11-12), 1640–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858873>
- Andris-Widhopf, J., Rader, C., Steinberger, P., Fuller, R., & Barbas, C. F. (2000). Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *Journal of immunological methods*, 242(1-2), 159–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10986398>
- Arnon, S. S. (2001). Botulinum Toxin as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285(8), 1059–1070. doi:10.1001/jama.285.8.1059
- Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., et al. (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 285(8), 1059–70. doi:10.1001/jama.285.8.1059

- Arnon, Stephen S, Schechter, R., Maslanka, S. E., Jewell, N. P., & Hatheway, C. L. (2006). Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism. *The New England journal of medicine*, 354(5), 462–71. doi:10.1056/NEJMoa051926
- Avril, A., Froude, J. W., Mathieu, J., Pelat, T., & Thullier, P. (2013). Isolation of antibodies from non-human primates for clinical use. *Current drug discovery technologies*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410051>
- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2001). *Phage Display: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed.) (pp. 10.12–10.15). New-York: CSHL Press.
- Bozheyeva, Gulbarshyn Kunakbayev, Yerlan Yeleukenov, D. (1999). Former Soviet Biological Weapons Facilities in Kazakhstan: Past, Present, and Future. *Center for Nonproliferation Studies, Monterey Institute of International Studies*, (Occasional paper No.1), 1–20.
- Cardinale, S. C., Butler, M. M., Ruthel, G., Nuss, J. E., Wanner, L. M., Li, B., Pai, R., et al. (2011). Novel Benzimidazole Inhibitors of Botulinum Neurotoxin/A Display Enzyme and Cell-Based Potency. *The botulinum journal*, 2(1), 16–29. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3509773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Carter, P., Bedouelle, H., & Winter, G. (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic acids research*, 13(12), 4431–43. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=321798&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chahboun, S., Hust, M., Liu, Y., Pelat, T., Miethe, S., Helmsing, S., Jones, R. G., et al. (2011). Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin. *BMC biotechnology*, 11, 113. doi:10.1186/1472-6750-11-113
- Chassagne, S., Laffly, E., Drouet, E., Hérodin, F., Lefranc, M.-P., & Thullier, P. (2004). A high-affinity macaque antibody Fab with human-like framework regions obtained from a small phage display immune library. *Molecular immunology*, 41(5), 539–46. doi:10.1016/j.molimm.2004.03.040
- Dereeper, A, Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W465–9. doi:10.1093/nar/gkn180
- Dereeper, Alexis, Audic, S., Claverie, J.-M., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology*, 10, 8. doi:10.1186/1471-2148-10-8
- Dressler, D. (2012). Clinical applications of botulinum toxin. *Current opinion in microbiology*, 15(3), 325–36. doi:10.1016/j.mib.2012.05.012
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792–7. doi:10.1093/nar/gkh340
- Fischer, A., Garcia-Rodriguez, C., Geren, I., Lou, J., Marks, J. D., Nakagawa, T., & Montal, M. (2008). Molecular architecture of botulinum neurotoxin E revealed by single particle electron microscopy. *The Journal of biological chemistry*, 283(7), 3997–4003. doi:10.1074/jbc.M707917200
- Froude, J. W., Stiles, B., Pelat, T., & Thullier, P. (2011). Antibodies for biodefense. *mAbs*, 3(6), 517–27. doi:10.4161/mabs.3.6.17621
- Froude, J. W., Thullier, P., & Pelat, T. (2011). Antibodies against anthrax: mechanisms of action and clinical applications. *Toxins*, 3(11), 1433–52. doi:10.3390/toxins3111433
- Garcia-Rodriguez, C., Geren, I. N., Lou, J., Conrad, F., Forsyth, C., Wen, W., Chakraborti, S., et al. (2011). Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 24(3), 321–31. doi:10.1093/protein/gzq111
- Gill, D. M. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological reviews*, 46(1), 86–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Glamann, J., Burton, D. R., Parren, P. W., Ditzel, H. J., Kent, K. A., Arnold, C., Montefiori, D., et al. (1998). Simian immunodeficiency virus (SIV) envelope-specific Fabs with high-level homologous neutralizing activity: recovery from a long-term-nonprogressor SIV-infected macaque. *Journal of virology*, 72(1), 585–92. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Grillo-López, A. J., White, C. A., Varns, C., Shen, D., Wei, A., McClure, A., & Dallaire, B. K. (1999). Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Seminars in oncology*, 26(5 Suppl 14), 66–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561020>

- Hill, K. K., Smith, T. J., Helma, C. H., Ticknor, L. O., Foley, B. T., Svensson, R. T., Brown, J. L., et al. (2007). Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *Journal of bacteriology*, 189(3), 818–32. doi:10.1128/JB.01180-06
- Horowitz, B. Z. (2010). Type E botulism. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 48(9), 880–95. doi:10.3109/15563650.2010.526943
- Hwang, W. Y. K., & Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(1), 3–10. doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.001
- Jones, R. G. A., Ochiai, M., Liu, Y., Ekong, T., & Sesardic, D. (2008). Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *Journal of immunological methods*, 329(1-2), 92–101. doi:10.1016/j.jim.2007.09.014
- Kukreja, R. V, Sharma, S. K., & Singh, B. R. (2010). Molecular basis of activation of endopeptidase activity of botulinum neurotoxin type E. *Biochemistry*, 49(11), 2510–9. doi:10.1021/bi902096r
- Kumar, G., Agarwal, R., & Swaminathan, S. (2012). Discovery of a fluorene class of compounds as inhibitors of botulinum neurotoxin serotype E by virtual screening. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 48(18), 2412–4. doi:10.1039/c2cc17158a
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Furey, W., Navaza, J., Sax, M., & Swaminathan, S. (2009). Domain organization in Clostridium botulinum neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation. *Journal of molecular biology*, 386(1), 233–45. doi:10.1016/j.jmb.2008.12.027
- Lacy, D. B., & Stevens, R. C. (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *Journal of molecular biology*, 291(5), 1091–104. doi:10.1006/jmbi.1999.2945
- Laffly, E., Danjou, L., Condemine, F., Vidal, D., Drouet, E., Lefranc, M.-P., Bottex, C., et al. (2005). Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralize the protective antigen (PA) of Bacillus anthracis by binding to the segment of PA between residues 686 and 694. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3414–20. doi:10.1128/AAC.49.8.3414-3420.2005
- Middlebrook, J. L., & Franz, D. R. (1997). Botulinum toxins. In Brigadier General Russ Zajtchuk MC U.S. Army Borden Institute (Ed.), *Medical aspects of chemical and biological warfare* (p. Chapter 33: 643–654). Washington DC: Office of The Surgeon General Department of the Army, United States of America.
- Nowakowski, A., Wang, C., Powers, D. B., Amersdorfer, P., Smith, T. J., Montgomery, V. A., Sheridan, R., et al. (2002). Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11346–50. doi:10.1073/pnas.172229899
- Pelat, T., Bedouelle, H., Rees, A. R., Crennell, S. J., Lefranc, M.-P., & Thullier, P. (2008). Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by in vitro and in silico engineering. *Journal of molecular biology*, 384(5), 1400–7. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.033
- Pelat, T., Hust, M., Hale, M., Lefranc, M.-P., Dübel, S., & Thullier, P. (2009). Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC biotechnology*, 9, 60. doi:10.1186/1472-6750-9-60
- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M.-P., et al. (2007). High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of Bacillus anthracis by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(8), 2758–64. doi:10.1128/AAC.01528-06
- Pelat, T., Hust, M., & Thullier, P. (2009). Obtention and engineering of non-human primate (NHP) antibodies for therapeutics. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(14), 1633–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105119>
- Pelat, T., & Thullier, P. (2009). Non-human primate immune libraries combined with germline humanization: an (almost) new, and powerful approach for the isolation of therapeutic antibodies. *mAbs*, 1(4), 377–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2726609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rasetti-Escargueil, C., Jones, R. G. A., Liu, Y., & Sesardic, D. (2009). Measurement of botulinum types A, B and E neurotoxicity using the phrenic nerve-hemidiaphragm: improved precision with in-bred mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 53(5), 503–11. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.019
- Rasetti-Escargueil, C., Liu, Y., Rigsby, P., Jones, R. G. A., & Sesardic, D. (2011). Phrenic nerve-hemidiaphragm as a highly sensitive replacement assay for determination of functional botulinum toxin antibodies. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 57(7-8), 1008–16. doi:10.1016/j.toxicon.2011.04.003
- Reichert, J. M. (2013). Global antibody development trends. *mAbs*, 1(1), 86–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2715178&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>



- Rülker, T., Voß, L., Thullier, P., O'Brien, L. M., Pelat, T., Perkins, S. D., Langermann, C., et al. (2012). Isolation and characterisation of a human-like antibody fragment (scFv) that inactivates VEEV in vitro and in vivo. *PLoS one*, 7(5), e37242. doi:10.1371/journal.pone.0037242
- Salzameda, N. T., Eubanks, L. M., Zakhari, J. S., Tsuchikama, K., DeNunzio, N. J., Allen, K. N., Hixon, M. S., et al. (2011). A cross-over inhibitor of the botulinum neurotoxin light chain B: a natural product implicating an exosite mechanism of action. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(6), 1713–5. doi:10.1039/c0cc04078a
- Schuck, P., & Minton, A. P. (1996). Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors. *Analytical biochemistry*, 240(2), 262–72. doi:10.1006/abio.1996.0356
- Simpson, L. L. (2004). Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 44, 167–93. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121554
- Tan, P., Mitchell, D. A., Buss, T. N., Holmes, M. A., Anasetti, C., & Foote, J. (2002). “Superhumanized” antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(2), 1119–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097421>
- Thullier, P., Chahboun, S., & Pelat, T. (2010). A comparison of human and macaque (*Macaca mulatta*) immunoglobulin germline V regions and its implications for antibody engineering. *mAbs*, 2(5), 528–38. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2958574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Thullier, P., Huish, O., Pelat, T., & Martin, A. C. R. (2010). The humanness of macaque antibody sequences. *Journal of molecular biology*, 396(5), 1439–50. doi:10.1016/j.jmb.2009.12.041
- Tonello, F., Morante, S., Rossetto, O., Schiavo, G., & Montecucco, C. (1996). Tetanus and botulism neurotoxins: a novel group of zinc-endopeptidases. *Advances in experimental medicine and biology*, 389, 251–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861019>
- United Nations Security Council. (1995). *Tenth Report of the Executive Committee of the Special Commission Established by the Secretary-General Pursuant to Paragraph 9(b)(I) of Security Council Resolution 687 (1991), and Paragraph 3 of Resolution 699 (1991) on the Activities of the Special Commi*. New-York.
- Wein, L. M., & Liu, Y. (2005). Analyzing a bioterror attack on the food supply: the case of botulinum toxin in milk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9984–9. doi:10.1073/pnas.0408526102
- Zilinskas, R. A. (1997). Iraq's biological weapons. The past as future? *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 278(5), 418–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9244334>

### Conclusion de l'article 3 :

Afin d'isoler le premier anticorps recombinant à visé thérapeutique neutralisant la toxine botulique E en ciblant sa chaîne légère, un macaque a été hyper-immunisé avec cette chaîne légère recombinante. Les trois premières injections ont été réalisées à un mois d'intervalle et la quatrième et dernière injection a été réalisée quatre mois après la troisième, afin de permettre à la réponse immunitaire du macaque de diminuer. Avant la dernière injection de l'immunogène, aucune amplification de l'ADN codant les domaines variables des anticorps n'a été observée. Après la dernière immunisation, les fragments d'ADN amplifiés codent donc uniquement pour des anticorps spécifiques de l'immunogène. Les amplicons obtenus ont été utilisés pour générer deux banques de pré-clonages : une pour les chaînes lourdes, d'une diversité de  $4,1.10^4$  clones et une pour les chaînes légères, d'une diversité de  $2,3.10^4$  clones. Ces deux banques de pré-clonages ont ensuite été combinées dans le vecteur phagemidique pHAL35, pour créer une banque hyper-immune d'une diversité finale de  $1.10^8$  clones. Cette banque de scFv a été criblée par la technique d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages vis-à-vis d'un mélange contenant uniquement 44,5 % de BoNT/E<sub>3</sub> activée, en rapport molaire. Afin de s'assurer de la spécificité des phages élus, un ELISA phage a été réalisé à l'issue du criblage en utilisant le mélange d'activation comme antigène de capture, tandis que la trypsine et l'inhibiteur de trypsine constituaient les témoins négatifs. Les phages élus réagissaient avec le mélange d'activation mais pas avec la trypsine et l'inhibiteur de trypsine, indiquant qu'ils étaient uniquement spécifiques de la toxine BoNT/E<sub>3</sub> activée. Notre hypothèse expérimentale, selon laquelle le macaque ne synthétise pratiquement que des anticorps spécifiques de l'immunogène, et que la banque immune ne contenait donc pas d'anticorps réagissant avec la trypsine et l'anti-trypsine, s'est donc avérée juste.

Cent clones issus du quatrième tour de criblage ont été isolés et séquencés, et 85 séquences différentes ont été identifiées. Nous n'avons jamais observé une telle diversité, et la durée de ce volet du projet AntiBotABE ne permettait pas de produire l'ensemble de ces scFv ; nous avons décidé de n'en produire que la moitié, dans un premier temps. Nous avons émis l'hypothèse que les scFv dont les séquences sont proches, ont des épitopes identiques. L'ensemble des séquences a donc été analysé à l'aide d'un outil informatique (outil "one click" du site Phylogeny, <http://www.phylogeny.fr>) réalisant un alignement des séquences des domaines variables, calculant leur degré d'identité et représentant leur diversité sous la forme d'un arbre "pseudo phylogénique". Sur un tel arbre, les séquences appartenant aux mêmes

embranchements présentent un degré d'identité élevé. Afin de produire les scFv représentatifs de l'ensemble de la diversité des séquences, au moins un scFv a été choisi par embranchement, et au total 38 séquences ont ainsi été sélectionnées. Lors de la production en cellule eucaryote, la glycosylation du domaine variable des anticorps peut engendrer un encombrement stérique qui dégrade l'interaction avec l'antigène. Ce problème ayant été rencontré avec le scFv-Fc 2H8, les sites de glycosylation ont été recherchés avant l'expression des scFv, à l'aide d'un outil bioinformatique (outil " NetNGlyc 1.0", <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ; le scFv ELC77 présentait un site de glycosylation et n'a donc pas été retenu pour la suite de l'étude. Les 38 séquences sélectionnées ont été évaluées dans le test *in vitro* d'inhibition de l'activité catalytique de BoNT/E<sub>3</sub>, et trois scFv inhibiteurs ont été identifiés. Dans ce test, les scFv ELC76, ELC51 et ELC18 inhibent l'activité catalytique de BoNT/E<sub>3</sub> avec des rapports molaires [nombre de site de fixation à l'antigène]/[toxine] de 64 000/1, 192 000/1 et 384 000/1, respectivement.

Les affinités des trois scFv inhibiteurs identifiés ont été mesurées contre BoNT/E<sub>3</sub> activée, par résonance plasmonique de surface, et elles sont de 0,1 nM, 9,17 nM et 1 nM pour les scFv ELC18, ELC51 et ELC76, respectivement. En résonance plasmonique de surface, aucun scFv n'interagit avec la trypsine ou l'anti-trypsine, confirmant la spécificité des scFv.

Les trois scFv identifiés comme inhibiteurs dans le test *in vitro* ont été évalués dans le test *ex vivo* de paralysie hemidiaphragmatique. Dans ce test, le scFv ELC18 est le plus neutralisant, puisqu'à la concentration de 0,5 µg.ml<sup>-1</sup> il induit un retard de paralysie supérieur à 250 minutes, alors que dans le test *in vitro* il était le moins inhibiteur. Comme dans l'article précédent (isolement d'un fragment d'anticorps neutralisant BoNT/A en ciblant sa chaîne légère), une telle différence peut s'expliquer par le fait qu'en plus de l'inhibition directe de l'activité catalytique de la toxine, le scFv ELC18 doit aussi engendrer un encombrement stérique bloquant l'adhésion aux motoneurones, la pénétration cellulaire de la toxine ou le passage de la chaîne légère dans le cytosol. C'est la première fois qu'une publication décrit l'isolement d'un scFv neutralisant BoNT/E en ciblant sa chaîne légère, dans ce test. Puisque le test *ex vivo* est plus représentatif des mécanismes de neutralisation *in vivo* que le test *in vitro*, le scFv ELC18 a été sélectionné pour la suite de l'étude. L'humanité d'ELC18 a été évaluée, et son index de germinalité moyen est de 87,79 % et son G-score moyen est de -1,083, soulignant la nécessité de l'humaniser pour augmenter sa tolérance lors de l'utilisation thérapeutique. Le scFv ELC18 pourra être testé en combinaison avec les scFv dirigés contre la chaîne lourde de BoNT/E<sub>3</sub>, qui sont actuellement en train d'être isolés dans notre

laboratoire, afin d'identifier un éventuel effet synergique. Après humanisation, ELC18 sera exprimé sous forme d'IgG entière pour être testé *in vivo* contre plusieurs souches de BoNT/E. Ce scFv est le premier publié à neutraliser BoNT/E en ciblant sa chaîne légère.

## **Projet d'article en premier auteur :**

### **Isolement d'un scFv neutralisant les sérotypes 1 et 2 de la toxine botulique A en ciblant sa chaîne lourde**

#### **Introduction du projet d'article :**

Dans le cadre du projet AntiBotABE, le scFv SEM120-IIIC1, neutralisant BoNT/A en ciblant sa chaîne légère, a été isolé. L'objectif de ce projet est d'isoler en parallèle un anticorps neutralisant BoNT/A<sub>1</sub> et BoNT/A<sub>2</sub> en ciblant leurs chaînes lourdes (BoNT/A-HC), afin d'inhiber la pénétration de ces deux sous-types de toxines dans les motoneurones, et de neutraliser synergiquement BoNT/A avec SEM120-IIIC1.

#### **Construction de la banque hyper-immune :**

Un macaque a été immunisé avec la chaîne lourde de BoNT/A<sub>1</sub> (BoNT/A<sub>1</sub>-HC). Trente jours après la troisième injection un titre de 1/400 000 a été observé, et ce titre n'a pas augmenté après la quatrième injection, indiquant qu'une réponse hyper-immune a été obtenue. Quatre mois après la troisième injection, un prélèvement de moelle osseuse a été réalisé, et en utilisant des amorces spécifiques des domaines VH et VL, aucun produit d'amplification n'a été détecté. Une quatrième et dernière injection de BoNT/A<sub>1</sub>-HC a donc été réalisée. En utilisant ces mêmes amorces, une amplification optimale a été observée 10 jours après la dernière injection. Puisqu'avant la dernière injection aucune amplification n'avait été détectée, ces amplicons sont considérés comme codant des fragments d'anticorps spécifiques de BoNT/A<sub>1</sub>-HC. Les produits d'amplification du jour 10 ont été utilisés pour générer deux banques de pré-clonage, d'une diversité de  $8,4 \cdot 10^6$  et  $1,6 \cdot 10^5$  clones pour les banques contenant l'ADN codant les fragments Fd et les chaînes légères  $\kappa$ , respectivement. Ces deux banques ont été combinées pour générer une banque hyper-immune d'une diversité de  $6,9 \cdot 10^7$  clones, dans le vecteur pHAL32.

### Criblage de la banque hyper-immune :

La banque de scFv exposés à la surface des phages a été criblée sur BoNT/A<sub>1</sub> en trois tours (5, 10 et 20 lavages), et le nombre de phages élués a augmenté de  $1,1 \cdot 10^5$  (premier tour) à  $6 \cdot 10^5$  (troisième tour) (Figure 1). Une telle augmentation correspond généralement à l'enrichissement de la banque en phages spécifiques. Après le criblage, la réactivité contre BoNT/A<sub>1</sub> des phages élués après chaque tour de criblage a été évaluée en ELISA, et une augmentation du signal d'un facteur 9 a été observée entre le tour 1 et le tour 3, soulignant que les phages élués au tour 3 sont les plus réactifs. (Figure 1). Aucune réactivité n'a été constatée contre la KLH ou BoNT/B<sub>1</sub>, indiquant que les phages élués sont uniquement spécifiques de BoNT/A<sub>1</sub>.

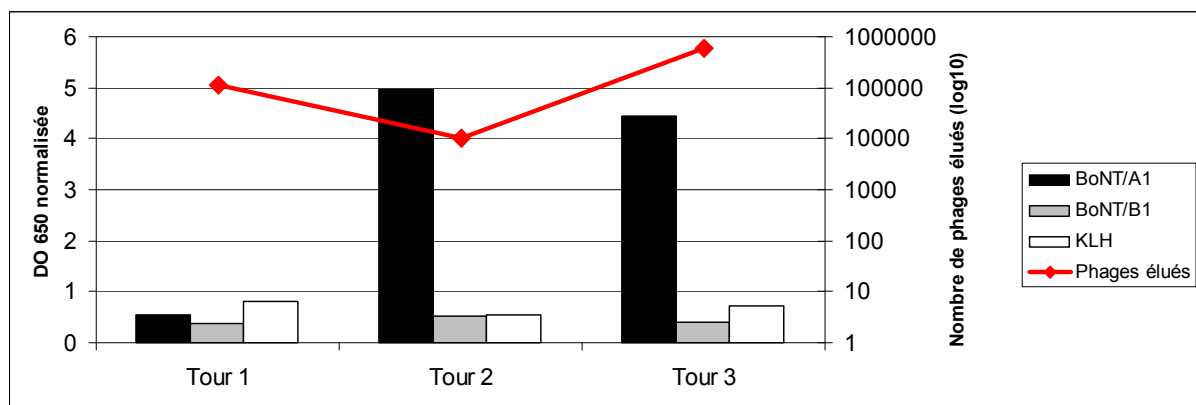


Figure 1 : Compte et réactivité des phages élués.

Les phages élués ont été comptés après chaque tour de criblage (courbe rouge). Leur réactivité contre BoNT/A<sub>1</sub> (noir), BoNT/B<sub>1</sub> (gris) et la KLH (blanc) a été évaluée en ELISA. Tous les antigènes ont été utilisés à la concentration de  $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### Isolement des scFv et mesures d'affinité.

Cent clones ont été isolés à l'issus du troisième tour de criblage, leur ADN ont été séquencés et 64 séquences différentes ont été identifiées. Cinquante deux séquences (81.25 % des séquences identifiées) ont été identifiées en une seule copie, et 12 séquences (18.75 %) ont été retrouvées en plus d'une copie. Les séquences ont été analysées à l'aide d'un outil bioinformatique ("NetNGlyc 1.0 tool", <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) afin d'identifier d'éventuels sites de glycosylation dans ces séquences. Aucun site de glycosylation n'ayant été détecté, les 64 séquences codant les scFv ont été transformées dans *E. Coli* HB2151, puis exprimées sous forme de scFv solubles qui ont été purifiés. Leurs affinités pour

BoNT/A<sub>1</sub>, mesurées par résonance plasmonique de surface, varient de 1,3 nM (A1HC7) à 50 nM, et les affinités des 24 scFv les plus affins sont représentées dans le [tableau 1](#).

Clone	Affinité (nM)	Clone	Affinité (nM)
A1HC3	6,3	A1HC45	5,25
A1HC6	2,2	A1HC47	2,6
A1HC7	1,4	A1HC49	1,3
A1HC17	4,79	A1HC58	5
A1HC26	3,2	A1HC62	5,1
A1HC31	1,5	A1HC64	5
A1HC32	2,6	A1HC65	4
A1HC33	3,3	A1HC67	3,1
A1HC34	5,1	A1HC68	3,3
<b>A1HC38</b>	<b>1,9</b>	A1HC74	2,3
A1HC39	5	A1HC80	1,6
A1HC43	5	A1HC81	3,3

**Tableau 1 : Affinité des 24 scFv les plus affins.**

Les affinités des 64 scFv ont été mesurées en résonance plasmonique de surface contre BoNT/A<sub>1</sub>. Les 24 scFv dont l'affinité est inférieure ou égale à 10 nM sont représentés ici. Les mesures d'affinités ont été obtenues en injectant les scFv en flux, sur la toxine fixée sur la puce.

### Analyse bioinformatique :

Les 24 scFv (37.5 % des scFv) dont l'affinité est inférieure à 10 nM ont été analysés avec des outils bioinformatiques. IMGT/V-QUEST a été utilisé afin d'identifier quels sont les gènes germinaux des anticorps humains qui sont les plus proches des séquences codant les domaines variables des scFv ([Tableau 2](#)). Pour les chaînes lourdes, trois familles de gènes IGHV sont représentés : trois occurrences de IGHV1-69\*04, 15 occurrences de IGHV3-49\*03, une occurrence de IGHV3-21\*04 et une occurrence de IGHV3-71\*01, ainsi que deux occurrences de IGHV5-51\*01 et une occurrence de IGHV5-a\*04. Ces régions VH sont combinées avec quatre familles de gènes IGHJ (IGHJ2, 4, 5 et 6). Pour les chaînes légères, deux familles de gènes IGKV (IGKV1 et 3) sont représentées : IGKV1-39\*01 and IGKV1-16\*01 (5 occurrences chacune), IGKV1-17\*01 (4 occurrences), IGKV1-27\*01, IGKV1-13\*02 et IGKV1-9\*01 (2 occurrences chacune) et finalement une occurrence de IGKV1D-13\*01, et trois occurrences de IGKV3 (IGKV3-7\*02, IGKV3-11\*01 et IGKV3-20\*01). Ces gènes IGKV sont associés avec quatre familles de gènes IGKJ (IGK 1, 2, 3 et 4). L'ensemble de ces réarrangements se traduit par une diversité de séquence élevée.

Les index de germinalité correspondent au pourcentage d'acides aminés identiques entre les régions charpentes (FR) des scFv isolés et les régions FR des gènes germinaux des anticorps humains les plus proches. Les index de germinalité de ces 24 scFv ont été mesurés, et ils varient entre 81,13 % et 87,72 % (tableau 3). Ces pourcentages soulignent la proximité des scFv isolés avec les séquences germinales des anticorps humains.

Clone	Chaîne lourde			Chaîne légère	
	V	D	J	V	J
A1HC3	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1D-13*01	IGKJ3*01
A1HC6	IGHV3-21*04	IGHD4-17*01	IGHJ5*02	IGKV3-7*02	IGKJ3*01
A1HC7	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ4*01
A1HC17	IGHV5-51*01	IGHD6-19*01	IGHJ5*02	IGKV3-11*01	IGKJ3*01
A1HC26	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-17*01	IGKJ4*01
A1HC31	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-27*01	IGKJ2*03
A1HC32	IGHV5-a*04	IGHD1-26*01	IGHJ5*02	IGKV1-13*02	IGKJ1*01
A1HC33	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-13*02	IGKJ4*01
A1HC34	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-16*01	IGKJ4*01
<b>A1HC38</b>	<b>IGHV5-a*04</b>	<b>IGHD1-26*01</b>	<b>IGHJ5*02</b>	<b>IGKV1-39*01</b>	<b>IGKJ3*01</b>
A1HC39	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-16*01	IGKJ4*01
A1HC43	IGHV1-69*04	IGHD3-22*01	IGHJ6*02	IGKV1-27*01	IGKJ3*01
A1HC45	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-16*01	IGKJ4*01
A1HC47	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ4*01
A1HC49	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-16*01	IGKJ2*01
A1HC58	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV3-20*01	IGKJ3*01
A1HC62	IGHV5-51*01	IGHD5-12*01	IGHJ2*01	IGKV1-17*01	IGKJ4*01
A1HC64	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-9*01	IGKJ2*03
A1HC65	IGHV3-71*01	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-9*01	IGKJ1*01
A1HC67	IGHV1-69*04	IGHD2-15*01	IGHJ6*02	IGKV1-17*01	IGKJ2*01
A1HC68	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ4*01
A1HC74	IGHV1-69*04	IGHD2-15*01	IGHJ6*02	IGKV1-17*01	IGKJ2*03
A1HC80	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ3*01
A1HC81	IGHV3-49*03	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGKV1-16*01	IGKJ4*01

**Tableau 2 : Identification des gènes germinaux des anticorps humains les plus proches des séquences variables des 24 scFv isolés.**

Ces gènes ont été identifiés en utilisant IMGT/V-QUEST.



Clone	Index de Germinalité (IG)		
	Chaîne lourde	Chaîne légère	IG moyen
A1HC3	79,12	92,04	85,58
A1HC6	90,69	71,91	81,3
A1HC7	78,02	88,76	83,39
A1HC17	80,21	89,88	85,045
A1HC26	80,21	92,13	86,17
A1HC31	78,02	89,77	83,895
A1HC32	77,08	89,53	83,305
A1HC33	82,41	91,01	86,71
A1HC34	79,12	88,37	83,745
<b>A1HC38</b>	<b>82,22</b>	<b>86,51</b>	<b>84,365</b>
A1HC39	79,12	86,51	82,815
A1HC43	83,51	84,09	83,8
A1HC45	80,21	92,13	86,17
A1HC47	79,12	83,14	81,13
A1HC49	80,21	87,64	83,925
A1HC58	84,44	91,01	87,725
A1HC62	83,51	89,77	86,64
A1HC64	78,02	89,88	83,95
A1HC65	78,01	95,5	86,755
A1HC67	85,71	84,88	85,295
A1HC68	78,02	89,88	83,95
A1HC74	84,61	85,21	84,91
A1HC80	76,92	86,36	81,64
A1HC81	82,41	92,13	87,27

Tableau 3 : Index de germinabilité (IG) des 24 scFv sélectionnés.

### Analyse des propriétés de neutralisation des scFv isolés :

Les propriétés de neutralisation des 24 scFv dont l'affinité est meilleure que 10 nM ont été évaluées dans le test *ex vivo* de paralysie du muscle hémidiaphragmatique. Chaque scFv a d'abord été testé à une concentration élevée, pour déterminer ceux retardant significativement la diminution de 50 % de la contraction musculaire, et donc neutralisant BoNT/A<sub>1</sub>. Dans ce test, les scFv A1HC17, A1HC45 et A1HC38 retardent significativement l'apparition de la paralysie induite par BoNT/A<sub>1</sub> (20 DL<sub>50</sub>.ml<sup>-1</sup> soit 87 pg.ml<sup>-1</sup>) à la concentration de

27.25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 12.75  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  et 5.21  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivement (Tableau 4). Comme A1HC38 est le scFv le plus neutralisant, il a été caractérisé plus précisément contre BoNT/A<sub>1</sub> et BoNT/A<sub>2</sub>. A la concentration de 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , A1HC38, induit un retard de paralysie de 20 minutes contre BoNT/A<sub>2</sub>, et de plus de 200 minutes contre BoNT/A<sub>1</sub>. Ce scFv est le seul scFv publié neutralisant les deux sous-types simultanément, et il a été sélectionné pour être humanisé puis exprimé sous forme d'IgG entière. Il sera testé *in vivo* en association avec l'IgG SEM-120-IIIC1, neutralisant BoNT/A en ciblant sa chaîne légère, contre différentes souches de BoNT/A.

Concentration	Retard de paralysie induit par BoNT/A <sub>1</sub> (min)	Retard de paralysie induit par BoNT/A <sub>2</sub> (min)
14 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	ND	80
5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	>220	20
1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	130	ND
0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	50	ND
0,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	nul	ND

**Tableau 4 : Retard de paralysie induit par BoNT/A<sub>1</sub> et BoNT/A<sub>2</sub> en présence du scFv A1HC38.**

Les mesures ont été réalisées dans le test de paralysie du muscle hémidiaphragmatique. BoNT/A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> ont été utilisées à la concentration de 20 DL<sub>50</sub>.ml<sup>-1</sup> (87 pg.ml<sup>-1</sup>), et une concentration d'A1HC38 entre 0,1 et 14  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  a été utilisée. En absence d'A1HC38, la diminution de 50 % de la contraction musculaire a été obtenue après 110 minutes d'incubation avec BoNT/A<sub>1</sub> seule ou BoNT/A<sub>2</sub> seule. Le retard de paralysie représente le temps supplémentaire, dû à la présence du scFv, qui est nécessaire pour observer une diminution de 50 % la contraction musculaire. Les temps sont représentés en minutes. ND : Non Déterminé

## Article 5 :

# Localisation de l'épitope d'un fragment d'anticorps (scFv) neutralisant la toxine létale du bacille du charbon, dirigée contre LF mais réagissant aussi avec EF

*Article accepté*

### Introduction de l'article 5 :

Cet article présente la localisation de l'anticorps 2LF, isolé en 2007 dans notre laboratoire. J'ai pris part à la réalisation des essais de neutralisation *in vivo* ainsi qu'aux mesures d'affinités des différents variants générés par *alanine shaving et alanine scanning*.

Jusqu'en 2007, les anticorps recombinants neutralisant la toxine létale du charbon (*Lethal Toxin*, LT), étaient tous dirigés contre l'antigène protecteur (*Protective Antigen*, PA). Le scFv 2LF, isolé dans notre laboratoire à partir d'un macaque immunisé avec le facteur létal (*Lethal Factor*, LF), a été le premier scFv isolé à cibler cette sous-unité et il neutralise la toxine létale en inhibant l'interaction entre les sous-unités PA et LF. Puisque les sous-unités LF et EF interagissent avec la sous-unité PA grâce à leurs domaines N-terminaux (LF<sub>N</sub> et EF<sub>N</sub>, respectivement), les structures et les propriétés physico-chimiques des domaines LF<sub>N</sub> et EF<sub>N</sub> doivent être proches. En conséquence, un anticorps ciblant un épitope exposé à la surface du domaine LF<sub>N</sub> peut potentiellement interagir avec le domaine EF<sub>N</sub> et neutraliser la toxine œdémateuse (*Edema Toxin*, ET), en inhibant l'interaction entre EF et PA. L'anticorps murin 10G4, isolé par Little *et al* (Little, Leppla, & Friedlander, 1990), inhibe l'interaction entre PA et LF en interagissant avec LF<sub>N</sub>, similairement à 2LF, et il neutralise simultanément LT et ET ; nous avons donc émis l'hypothèse qu'une telle neutralisation croisée peut être espérée pour l'anticorps 2LF. Cependant, l'épitope précis de 10G4 localisé sur EF<sub>N</sub> n'est pas connu. Contrairement à l'anticorps 35PA83, l'anticorps 2LF ne sera pas breveté et n'entrera pas en essais cliniques donc il est possible de publier son épitope, et il a été décidé d'entreprendre un tel travail. Afin de déterminer si notre hypothèse d'interaction et de neutralisation croisée est fondée, l'interaction entre 2LF et EF a été testée expérimentalement. L'anticorps 2LF interagit avec EF à la fois en ELISA et en résonance plasmonique de surface, avec une affinité de

5 nM, donc la première partie de notre hypothèse est vérifiée. Puisque l'affinité de 2LF pour LF est de 1,02 nM, l'épitope de 2LF sur EF ne doit pas être complètement identique à celui qui est localisé sur LF. Afin de déterminer si l'épitope ciblé est conformationnel ou linéaire, un western-blot en condition dénaturante a été réalisé et, dans ces conditions, 2LF interagit avec LF et EF, indiquant qu'il cible un épitope au moins partiellement linéaire. L'ensemble de ces résultats *in vitro* sont favorables à notre hypothèse. Nous avons ensuite réalisé des tests de protection *in vivo*, afin d'évaluer les capacités de neutralisation du scFv 2LF vis-à-vis de la toxine œdémateuse formée de LF et PA, et pour cela, le scFv 2LF a été converti en IgG. L'injection chez la souris de 10 µg de cet anticorps pré-incubé avec 20 µg de toxine ET (soit un rapport molaire [IgG 2LF]/[toxine ET] de 1/1), inhibe complètement la formation d'œdèmes. Ce résultat valide notre hypothèse de réactivité croisée de 2LF avec EF, et de neutralisation croisée de ET par 2LF. Les travaux de localisation d'épitopes ont été restreints aux régions identifiées *in silico* comme étant à la fois partiellement conservées entre LF et EF et exposées au solvant. Les régions de LF ainsi identifiées ont été intégralement mutées en alanine (*alanine shaving*), et les variants générés ont été testés en résonance plasmonique de surface, pour repérer les mutations altérant effectivement l'interaction entre 2LF et LF (*cf paragraphe "2.4.3) Localisation de l'épitope d'un anticorps"*). Les acides aminés formant régions testées positivement en *alanine shaving* ont alors été mutés un par un en alanine (*alanine scanning*) pour déterminer précisément ceux formant l'épitope de 2LF, et les résultats de la localisation d'épitope sont présentés dans cet article.

# Mapping the Epitopes of a Neutralizing Antibody Fragment Directed against the Lethal Factor of *Bacillus anthracis* and Cross-Reacting with the Homologous Edema Factor

Philippe Thullier<sup>1</sup>, Arnaud Avril<sup>1</sup>, Jacques Mathieu<sup>2</sup>, Christian K. Behrens<sup>3</sup>, Jean-Luc Pellequer<sup>4</sup>, Thibaut Pelat<sup>1\*</sup>

**1** Unité de Biotechnologie des Anticorps, et des Toxines, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France, **2** Département de Microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France, **3** Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, Les Ulis, France, **4** Service de Biochimie et Toxicologie Nucléaire, CEA, IBEB, Bagnols-sur-Cèze, France

## Abstract

The lethal toxin (LT) of *Bacillus anthracis*, composed of the protective antigen (PA) and the lethal factor (LF), plays an essential role in anthrax pathogenesis. PA also interacts with the edema factor (EF, 20% identity with LF) to form the edema toxin (ET), which has a lesser role in anthrax pathogenesis. The first recombinant antibody fragment directed against LF was scFv 2LF; it neutralizes LT by blocking the interaction between PA and LF. Here, we report that scFv 2LF cross-reacts with EF and cross-neutralizes ET, and we present an *in silico* method taking advantage of this cross-reactivity to map the epitope of scFv 2LF on both LF and EF. This method identified five epitope candidates on LF, constituted of a total of 32 residues, which were tested experimentally by mutating the residues to alanine. This combined approach precisely identified the epitope of scFv 2LF on LF as five residues (H229, R230, Q234, L235 and Y236), of which three were missed by the consensus epitope candidate identified by pre-existing *in silico* methods. The homolog of this epitope on EF (H253, R254, E258, L259 and Y260) was experimentally confirmed to constitute the epitope of scFv 2LF on EF. Other inhibitors, including synthetic molecules, could be used to target these epitopes for therapeutic purposes. The *in silico* method presented here may be of more general interest.

**Citation:** Thullier P, Avril A, Mathieu J, Behrens CK, Pellequer J-L, et al. (2013) Mapping the Epitopes of a Neutralizing Antibody Fragment Directed against the Lethal Factor of *Bacillus anthracis* and Cross-Reacting with the Homologous Edema Factor. PLoS ONE 8(5): e65855. doi:10.1371/journal.pone.0065855

**Editor:** Nicholas J. Mantis, Wadsworth Center, New York State Dept. Health, United States of America

**Received:** January 13, 2012; **Accepted:** May 3, 2013; **Published:** May 31, 2013

**Copyright:** © 2013 Thullier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by Direction Générale de l'Armement (DGA) grant 09co302-1, <http://www.defense.gouv.fr/dga>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have the following interests. Christian Behrens is employed by Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

\* E-mail: [t.pelat@orange.fr](mailto:t.pelat@orange.fr)

## Introduction

In 2001, the intentional release of anthrax spores through the U.S. postal system confirmed that *Bacillus anthracis* can cause high morbidity and mortality, despite the use of powerful antibiotherapy and resuscitation techniques. The pathogenesis of *B. anthracis* is largely due to a tripartite protein complex consisting of a component binding cellular receptors, the protective antigen (PA), and two catalytic components, the lethal factor (LF) and the edema factor (EF). PA and LF combine to form the lethal toxin (LT), and PA and EF combine to form the edema toxin (ET). However, only LT is recognized as being essential for anthrax pathogenesis (for a review, see [1–2]). EF and LF bind to PA with high affinities ( $K_D = 1$  nM) [3]; their binding is competitive and involves their N-terminal domains, which present a conserved structure [4–6].

For antibiotic treatments of anthrax to be effective, they must be administered rapidly after infection [7] as lethal amounts of anthrax toxins are quickly secreted into the bloodstream. Antibiotic efficacy is also limited by the existence of *B. anthracis*

antibioresistance [8–10]. However, it was demonstrated in animal models of anthrax that the passive transfer of neutralizing antibodies directed against either PA or LF can improve the outcome of the disease [11]. Consequently, considerable efforts have been devoted, since 2001, to the development of recombinant antibodies to be used to complement antibiotic therapy (for a review, see [12–13]), and they resulted in the recent FDA approval of raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax [14]. However, concerns have been raised about the use of anti-PA antibodies alone [15], because it was feared that PA could be naturally or voluntarily modified so as to escape binding by anti-PA antibodies while retaining its biological activity [16]. Consequently anti-LF antibodies have also been considered for anthrax therapy [15]. Another possible advantage of such antibodies is that they could potentially synergize with anti-PA antibodies [17–20].

The first recombinant anti-LF antibody fragment, scFv 2LF, was isolated using an original strategy, based on the construction of phage-displayed libraries from immunized macaques (*Macaca fascicularis*). Macaque and human antibodies are similar and, if

needed for therapeutic purposes, the immunogenicity of macaque antibodies can be decreased by germline humanization [21–22]. The neutralization of the lethal toxin by scFv 2LF is due to the inhibition of the interaction between PA and LF, i.e. by the inhibition of the formation of the toxin [18]. This mechanism is shared by other LF-neutralizing antibodies [19–20,23–25] but their epitopes remain to be accurately mapped.

One LF-neutralizing antibody, 10G4, cross-reacts with EF [23] and we hypothesized that scFv 2LF also cross-reacts with EF. This cross-reactivity was observed and it prompted us to map accurately the epitopes of scFv 2LF on both LF and EF, in a study involving four different steps. First, the cross-reactivity of scFv 2LF with EF was tested and the cross-neutralization of ET was characterized. Second, an *in silico* method was developed to identify regions exposed to the solvent and shared between LF and EF, as these regions were regarded as epitope candidates. In the third part, these epitope candidates were tested by mutating their residues to alanine, thereby mapping the epitope precisely. Lastly, the homolog of this epitope on EF was experimentally demonstrated to constitute the epitope of scFv 2LF on EF.

In this work, antigen residues were considered to be part of the epitope only if they contributed directly to antibody binding. Epitopes are generally composed of only a few such residues [26] and they can be identified by mutation to alanine [27]. This approach is based on the fact that interactions between antibodies and antigens depend on interactions between amino-acid side chains. The side chain of alanine is constituted of a methyl group thus it is very small, and substituting one of the key residues constituting an epitope with alanine weakens the interaction between the antigen and the antibody [28]. Therefore, the involvement of a residue in an epitope may be tested by mutating it to alanine: a mutation weakening the affinity for the antibody shows that the residue is part of the epitope. For epitope mapping generally, the first step is for whole regions regarded as epitope candidates to be mutated to alanine (or “shaved to alanine”). In a second step, the residues constituting the regions previously tested positively are each individually mutated to alanine (or “scanned to alanine”) to confirm and map precisely the epitope (for a review see [29]).

## Results

### ScFv 2LF cross-reacts with EF and cross-neutralizes ET

In ELISA, and in western blot under reducing conditions, scFv 2LF reacted with both EF and LF (figure 1). The reactivity under reducing conditions indicated that the scFv 2LF epitopes on LF and EF are essentially linear. In a Biacore experiment, the affinity of scFv 2LF for EF was found to be 5 nM (figure 2), which is 5-fold lower than the affinity of scFv 2LF for LF (1.02 nM) [18]. This difference indicates that the epitopes of scFv 2LF on EF and LF are not strictly identical.

The capacity of scFv 2LF to neutralize ET was tested *in vivo*. Twenty  $\mu$ g of edema toxin (ET) injected into mouse footpads caused edema (figure 3A, left panel), culminating at the 12<sup>th</sup> hour after injection and returning to normal after 108 hours (figure 3B). The edema was not reduced by premixing 2  $\mu$ g of IgG-2LF with 20  $\mu$ g ET. However, premixing 5  $\mu$ g of IgG 2LF with 20  $\mu$ g ET resulted in the edema being 25% smaller than that caused by ET alone, and the duration of edema (60 h vs. 108 h) being 45% shorter (figure 3A, middle panel, and figure 3B). Ten  $\mu$ g of IgG 2LF premixed with 20  $\mu$ g ET completely inhibited edema formation (figure 3A, right panel, and figure 3B), and injection of PBS only did not induce edema. These data demonstrate that, in addition to neutralizing LT, scFv 2LF also neutralizes ET.

### Identification of epitope candidates by a new *in silico* method

ScFv 2LF blocks the interaction between LF and PA so that its epitope is presumably located in the N-terminal domain of LF, LF<sub>N</sub> [18]. Also, scFv 2LF cross-reacts with EF and LF, so its epitope is presumably highly conserved between the two proteins. To interact with an antibody, an epitope has indeed to be exposed to the solvent. Regions highly conserved between LF<sub>N</sub> and its homolog, the N-terminal domain of EF (EF<sub>N</sub>), were thus considered to be epitope candidates if they were exposed to the solvent. An *in silico* method was designed to search for such regions, and its main features were that (i) it was based on a sliding window of five residues, corresponding to the lengths of most epitopes, and residues constituting the extremities of candidate sequences were analyzed in detail (ii) the mean identity between the LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> sequences was calculated as equal to 35% (figure 4), and this value was used as a threshold, above which regions were selected as candidates if they appeared to be exposed to the solvent (iii) the solvent exposure of candidates was verified statistically.

Starting from the N-terminus, the first region exposed to the solvent and conserved between LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> is located between positions 96 and 102 (figure 5), as it presents 56% identity. Residue 96 is an alanine, thus it is unlikely to participate significantly in the scFv 2LF binding and it was excluded from the candidate region. Position 103 was added as the corresponding residues in LF (K103) and EF (N103) are exposed to the solvent. The first epitope candidate was thus refined as LF(97–103) and its mean solvent exposure was 53% (table 1).

The second selected candidate region is located between residues 136 and 142, and its percentage identity is 57% (figure 5). Residue K143 was added to this candidate region as it is exposed on LF. The second candidate region retained for further testing was thus LF(136–143), with a mean solvent exposure of 47% (table 1).

The region between LF residues 180 and 184 shares 60% identity with EF, and is exposed to the solvent on both proteins (figure 5). It was refined as LF(178–184), as residues K178 and N179 were added to compensate for the lack of homologs on EF. The mean solvent exposure of LF(178–184) is 52% (table 1).

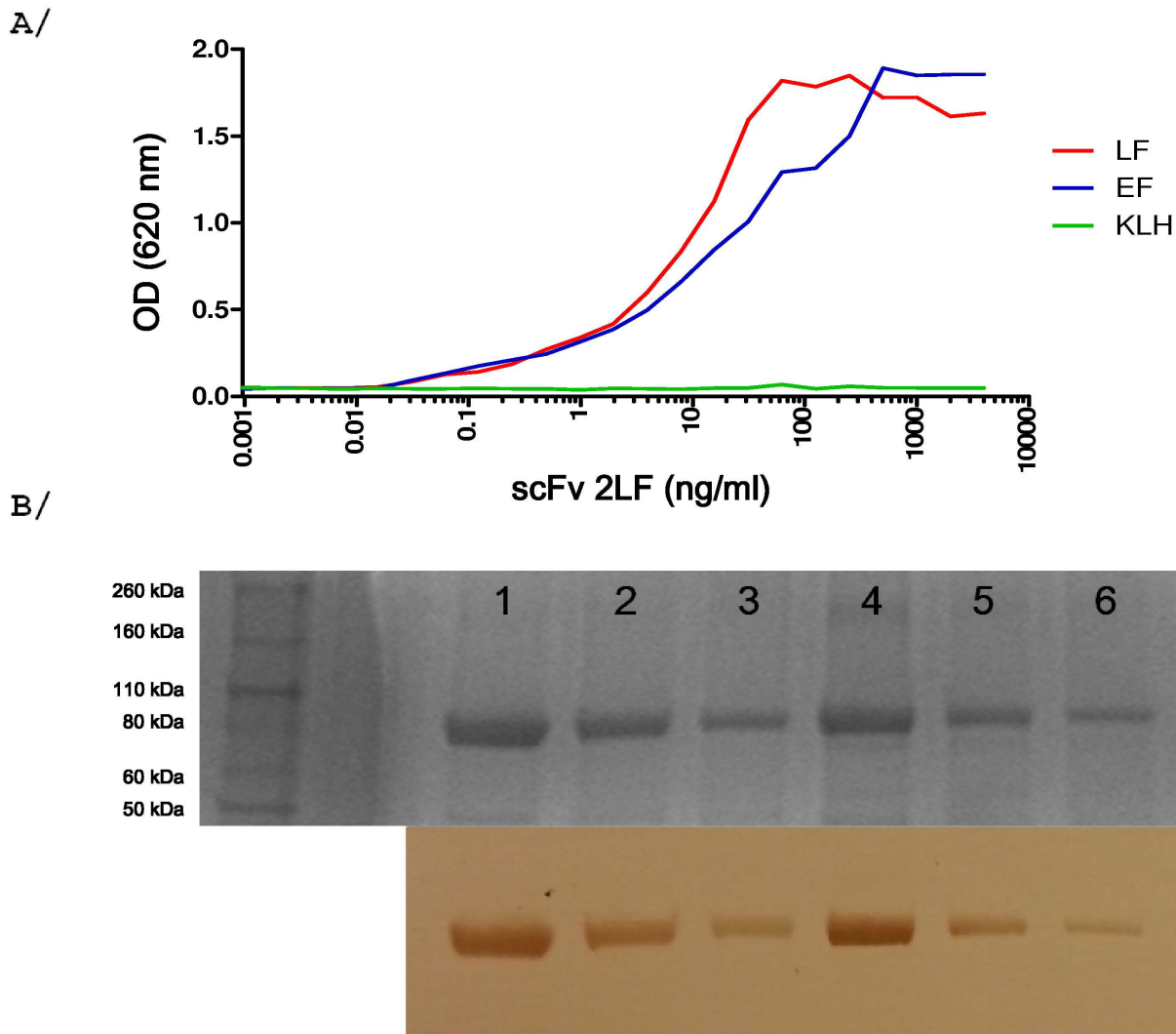
The region located between 227 and 237 is very similar in LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> (73%), and exposed to the solvent (figure 5). Because residue 237 is an alanine, only the region between residues 227 and 236 was retained for further study. It was divided into two regions, LF(227–231) and LF(231–236), to limit the number of residues needing to be tested in the following steps of the study. The mean solvent exposures of LF(227–231) and of LF(231–236) are 48% and 44%, respectively (table 1).

Five regions, LF(97–103), LF(136–143), LF(178–184), LF(227–231) and LF(231–236), were thus selected as epitope candidates and their mean solvent exposure is 48.1%. The rest of the LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> regions sharing an identity greater than 35% had a mean solvent exposure of 19.7%, which is significantly lower ( $p < 0.0001$ ) than the selected regions. The five selected LF regions were thus confirmed as epitope candidates; they are constituted of 32 residues, thus far less than the 261 residues constituting LF<sub>N</sub>.

### Evaluation of the epitope candidates by alanine shaving

If the mutation to alanine (or “shaving to alanine”) of a region selected as an epitope candidate reduced the binding of the mutated LF to scFv 2LF, compared to the unmutated LF, the region was selected for subsequent analysis.

First, it was verified that the unmutated LF produced in our laboratory had a reactivity for scFv 2LF ( $k_d = 2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )



**Figure 1. Evaluation of the reactivity of scFv 2LF with EF by ELISA and western blot.** A/ Reactivity of scFv 2LF with EF in ELISA. Reactivity of scFv 2LF with EF is represented in blue, and LF (red) and KLH (green) were used as positive and negative controls, respectively. ScFv 2LF reacted with EF, though less strongly than with LF at high scFv concentrations. B/ Reactivity of scFv 2LF with EF in western blots under reducing conditions (lower part). EF (5, 2 and 1 μg/ml in lanes 4, 5 and 6, respectively) and LF as a positive control (5, 2 and 1 μg/ml in lanes 1, 2 and 3, respectively) were separated by SDS-PAGE electrophoresis (upper part) and their sizes verified to be 90 kDa by separation under reducing conditions. ScFv 2LF reacted similarly with EF and LF under reducing conditions.  
doi:10.1371/journal.pone.0065855.g001

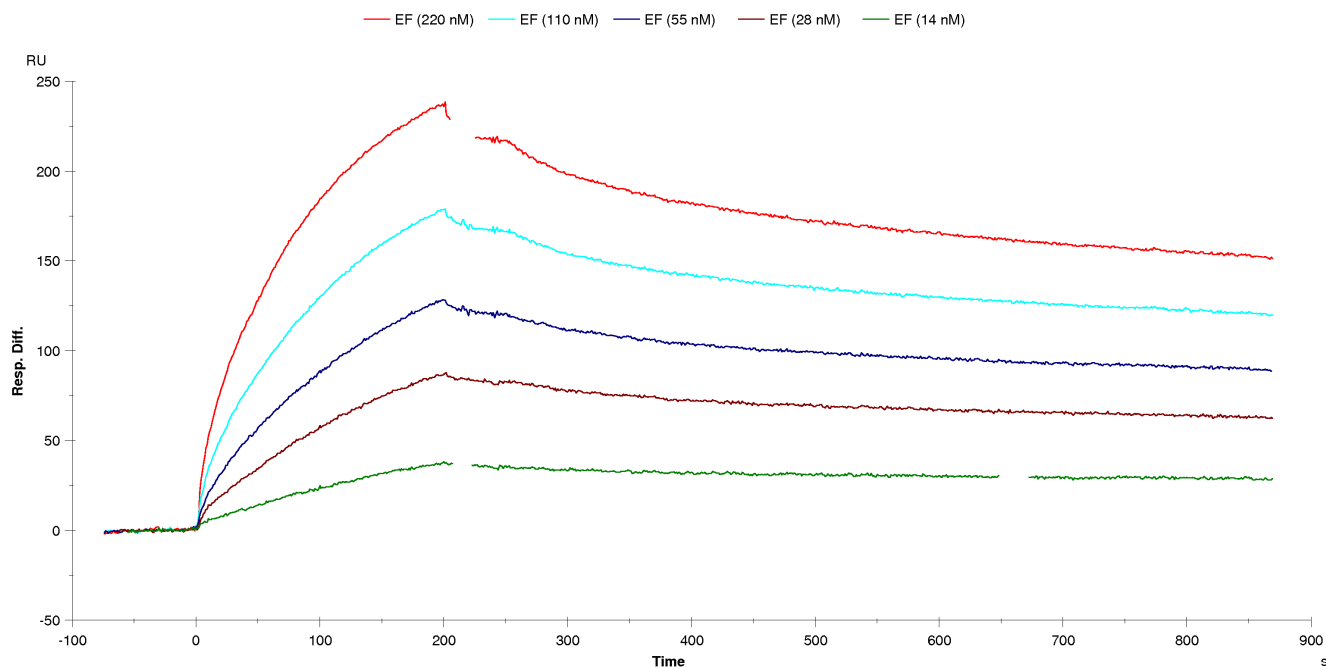
equivalent to that of a commercially available LF ( $k_d = 2.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). The residues of region LF(97–103) were substituted with alanine and the interaction between the mutated LF and scFv 2LF was tested. The observed  $k_d$  was  $1.32 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (figure 6A), thus equivalent to the value observed for the unmutated LF, so that this region was not studied further. Similarly, mutating the residues of region LF(136–143) to alanine led to a  $k_d$  of  $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (figure 6A), and therefore this second epitope candidate was also rejected. Substitution of the residues of LF(178–184) and of LF(231–236) caused a complete loss of reactivity with scFv 2LF. It was verified that these two variants still reacted with the anti-LF polyclonal antibodies (figure 7), showing that they had been immobilized on the sensorchip and that the loss of reactivity with scFv 2LF was not an artefact. These two regions were thus selected as candidates. Mutation of LF(227–231) to alanine reduced the reactivity with scFv 2LF to a  $k_d$  of  $1.26 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; this result suggested that LF(227–231) contributes to the interaction with scFv 2LF but that

it is not essential for this interaction, and it was included in subsequent evaluations. Thus, alanine shaving identified three regions, LF(178–184), LF(227–231) and LF(231–236), constituted of 17 residues, as candidates to be further studied by alanine scanning. These three regions are close to each other on the three-dimensional structure of LF (figure 6B).

#### Precise identification of the epitope on LF and EF

Each of the residues constituting LF(178–184), LF(227–231) and LF(231–236) were individually mutated to (“scanned to”) alanine. The mutations of residues H229, R230, Q234, L235 and Y236 weakened the binding between LF and scFv 2LF, as the corresponding values of  $k_d$  were at least 3-fold lower than that of the unmutated sequence (figure 8 and table 2). Mutation to alanine of the other residues constituting these three regions did not substantially modify LF reactivity. The LF variant in which H229, R230, Q234, L235 and Y236 were all replaced with





**Figure 2. Biacore experiment to measure the affinity of scFv 2LF for EF.** Sensorgrams were obtained at EF concentrations of 220 nM (red curve), 110 nM (light blue), 55 nM (dark blue), 28 nM (brown) and 14 nM (green) on a CM5 chip sensitized by 250 response units of scFv 2LF. The affinity of scFv 2LF for EF was measured as 5 nM. doi:10.1371/journal.pone.0065855.g002

alanine did not bind scFv 2LF, but it was verified that it still reacted with the anti-LF polyclonal antibodies (figure 9), demonstrating that the scFv 2LF epitope on LF is constituted by LF(229–230) plus LF(234–236). This epitope is linear as expected, but discontinuous.

We tested whether the homolog of this epitope in EF constitutes the epitope of scFv 2LF on EF. For this, a recombinant EF was produced in our laboratory and confirmed to present a reactivity with scFv 2LF similar to that of the commercially available EF ( $k_d = 5.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , table 2). The homologs of LF(229–230) and of LF(234–236) were identified by sequence alignment (figure 4) as EF(253–254) and EF(258–260), respectively. These five residues were all mutated to alanine and the mutated EF was not recognized by scFv 2LF but it reacted with the anti-LF polyclonal antibodies, showing that it retained its general conformation (figure 9). The epitope of scFv 2LF on EF is thus EF(253–254) plus EF(258–260).

#### Identification of the epitope candidates by existing *in silico* methods

Twelve *in silico* prediction methods, available through web servers or stand-alone programs, were used to map on LF<sub>N</sub> the epitope of scFv 2LF (figure 10). To be in a consensus epitope, a residue must have been predicted as part of the epitope by at least six of the 12 methods. Twelve consensus epitopes were identified: LF(27–35), LF(49–55), LF(86–91), LF(98–104), LF(109–116), LF(124–125), LF(136–139), LF(164–169), LF(176–188), LF(191–210), LF(227–232) and LF(252–261), including a total of 98 residues. Although this consensus region was large, it did not include three (LF(234–236)) of the five residues demonstrated in the present study as constituting the epitope.

#### Discussion

The scFv 2LF was isolated from a phage-displayed library built from a macaque immunized with the LF sub-unit of the lethal anthrax toxin (LT). It binds LF and neutralizes LT by blocking the interaction between its two components, LF and PA [18]. Here, we show that scFv 2LF also binds EF (20% identity with LF), a component of the edema toxin (ET), constituted of EF and PA. An IgG was derived from scFv 2LF and was shown to neutralize ET *in vivo* (figure 3). The scFv 2LF was previously showed as competing with PA for the interaction with LF, and it was hypothesized that it also competes with PA for the interaction with EF. Because EF and LF interact with PA through their amino-terminal domains, LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub>, it was also hypothesized that the epitopes of scFv 2LF are located in these domains [4–6]. These epitopes were expected to be well conserved but not identical, because the  $K_D$  characterizing the interaction between scFv 2LF and EF is about 5-fold less favorable than the  $K_D$  characterizing the interaction between scFv 2LF and LF.

An *in silico* analysis was used to search for epitope candidates, defined as LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> regions exposed to the solvent and presenting a high degree of identity. The degree of identity was averaged over a sliding window of five residues, a common size for an epitope, and regions with identity greater than the mean identity between LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> were selected. Five epitope candidates totaling 32 amino acids were thereby identified in the candidate domain, LF<sub>N</sub>, composed of 261 amino acids. This elimination of 87% of the residues greatly facilitated the subsequent experimental investigations, based on mutations to alanine.

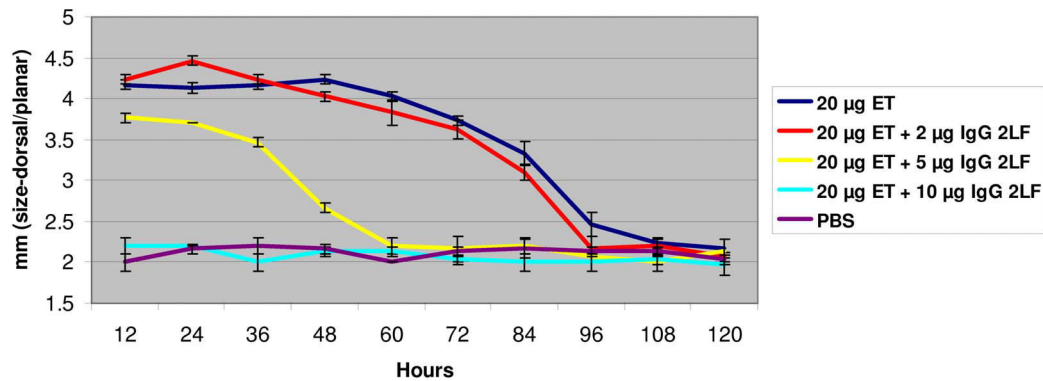
The performance of the *in silico* method developed here was compared with that of 12 existing methods. The consensus epitope candidates (the epitope candidates indicated by at least half of these methods) consisted of 98 amino acids, thus was three times larger than the epitope candidates identified by our analysis. Four



A



B



**Figure 3. IgG 2LF inhibits the formation of edema induced by the edema toxin (ET).** (A) Photographs taken 12 hours after injection in mouse footpads of 20 µg ET (left picture), or of 20 µg ET pre-mixed with 5 µg (middle picture) or with 10 µg (right picture) of IgG 2LF. Ten µg of IgG 2LF pre-mixed with 20 µg ET completely inhibited edema formation, whereas 5 µg of IgG 2LF reduced both the size and the duration of the edema; 2 µg of IgG 2LF had no appreciable effect. (B) Evolution of the sizes (dorsal/plantar) of mouse footpads after injection of 20 µg ET (blue), or of 20 µg ET pre-mixed with 2 µg (red) or 5 µg (yellow) or 10 µg (light blue) of IgG 2LF. Injection of PBS only (purple) was used as a negative control. Curves represent triplicate measurements for each timepoint. Pre-mixing with 10 µg of IgG 2LF completely abolished the formation of edema by 20 µg ET, and pre-mixing with 5 µg of IgG 2LF limited the size of the edema and reduced its duration. Pre-mixing of 20 µg ET with 2 µg of IgG 2LF had no appreciable effect.

doi:10.1371/journal.pone.0065855.g003

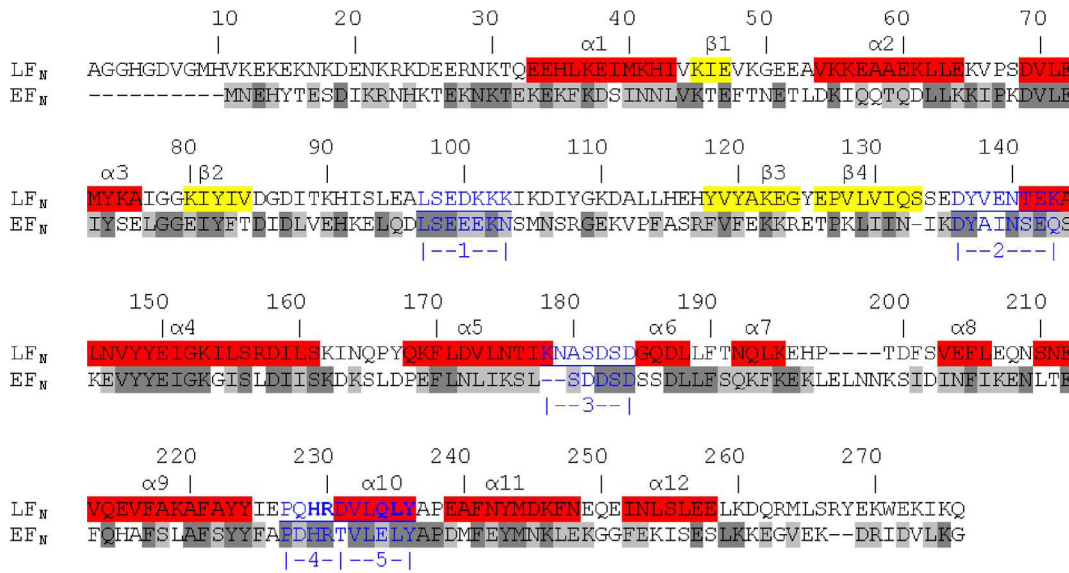
out of five epitope candidates (LF(97–103), LF(136–143), LF(178–184), and LF(227–231)) identified in the present *in silico* study overlap with these consensus epitope candidates. Regarding the fifth epitope candidate identified by our analysis, LF(231–236), only residues 231 and 232 were among the consensus epitope candidates. Therefore, the consensus approach missed LF(234–236) though it constitutes three of the five residues of the epitope. Only four of the twelve pre-existing methods indicated LF(234–236) as epitope candidate; these comparisons highlight the usefulness of the *in silico* analysis presented here.

Alanine shaving [30] and alanine scanning [27] are complementary approaches to determine experimentally which regions are involved in protein-protein interactions [31–32]: alanine shaving identifies regions containing an epitope, whereas alanine scanning maps precisely the epitope. Here, alanine shaving was utilized to test the five epitope candidates selected by the *in silico* study. Shaving LF(178–184) and LF(231–236) completely abolished the interaction with scFv 2LF, and shaving LF(227–231) partially reduced the interaction. In these three regions, alanine scanning identified five residues involved in the interaction with scFv 2LF: H229, R230, Q234, L235 and Y236. The simultaneous mutation of these five amino acids to alanine completely abolished LF reactivity with scFv 2LF, demonstrating that they constitute the

epitope of scFv 2LF on LF. This epitope partially corresponds to the  $\alpha$  helix 10, localized in the LF(231–236) region. Alanine scanning showed that LF(178–184) has no direct role in the interaction between LF and scFv 2LF, even though this region was tested positively by alanine shaving. It is possible that LF(178–184) contributes to the conformation of  $\alpha$  helix 10, so that its role in scFv 2LF binding is indirect. This discordance between results obtained by alanine shaving and scanning exemplify that alanine scanning is not only useful for precise epitope mapping, but also necessary to confirm the results of alanine shaving.

Three of the amino acids constituting the scFv 2LF epitope, Q234, L235 and Y236, are included in the LF(231–236) region, and alanine shaving of this region completely abolished the interaction with scFv 2LF. These three residues are therefore essential for the interaction. The two other residues, H229 and R230, are located within the LF(227–231) region, whose shaving only reduced the strength of the interaction, so that their role is likely to be less important.

The homolog on EF of the scFv 2LF epitope in LF was localized by sequence alignment as EF(253–254) and EF(258–260). The mutation to alanine of these two regions confirmed that they constitute the scFv 2LF epitope of EF. The residues H229, R230, L235 and Y236, part of the scFv 2LF epitope on LF, are strictly



**Figure 4. Alignment of the sequences of LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub>, and prediction of their secondary structures according to the LF 3D-structure (1J7N).** The  $\alpha$  helices (1 to 12) are colored in red and  $\beta$  strands (1 to 4) in yellow. The residues that are identical, very similar and different between LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> are highlighted in the EF<sub>N</sub> sequence in dark gray, light gray and white, respectively. The five linear regions identified as epitope candidates are indicated in blue, underlined and numbered: region 1 is LF(97–103), region 2 is LF(136–143), region 3 is LF(178–184), region 4 is LF(227–231) and region 5 is LF(232–236). The residues of LF<sub>N</sub> constituting the scFv 2LF epitope are indicated in bold.  
doi:10.1371/journal.pone.0065855.g004

conserved in EF, respectively at positions 253, 254, 259 and 260. The glutamine residue at position 234 in LF corresponds to a glutamic acid residue at position 258 in EF; physicochemical properties of these two amino-acids differ only slightly but these differences presumably explain the 5-fold weaker interaction of scFv 2LF with EF than with LF.

If no epitope candidate had been tested positively by mutations to alanine, a second series of candidates would have been defined. For this, the mean exposure of residues constituting LF<sub>N</sub> (29%) would have been utilized as the solvent exposure threshold, in addition to the similarity threshold. These two thresholds, each defined as a mean value characterizing the antigens, would have identified five additional regions as epitope candidates, constituted of a total of 25 residues, and these regions would have been tested similarly than the first series.

Our first attempt to map the scFv 2LF epitope utilized five synthetic peptides corresponding to the candidates selected by the *in silico* analysis. Their reactivity with 2LF was tested by ELISA. The peptide corresponding to LF(97–103) was the only peptide

that bound to the 2LF antibody, but it did not compete with LF for scFv 2LF binding (data not shown). For this reason, we used a different approach involving mutagenesis techniques guided by the same *in silico* results. As reported above, the mutagenesis experiments gave different results than the identification of LF(97–103) as epitope. This example illustrates how soluble peptides may present conformations different than those existing in the context of whole proteins, and consequently be misleading for epitope mapping (also see [20] for a discussion of peptide-antibody interactions). It also indicates that epitope mapping with peptides should be confirmed by competition experiments, which is not always the case in published studies.

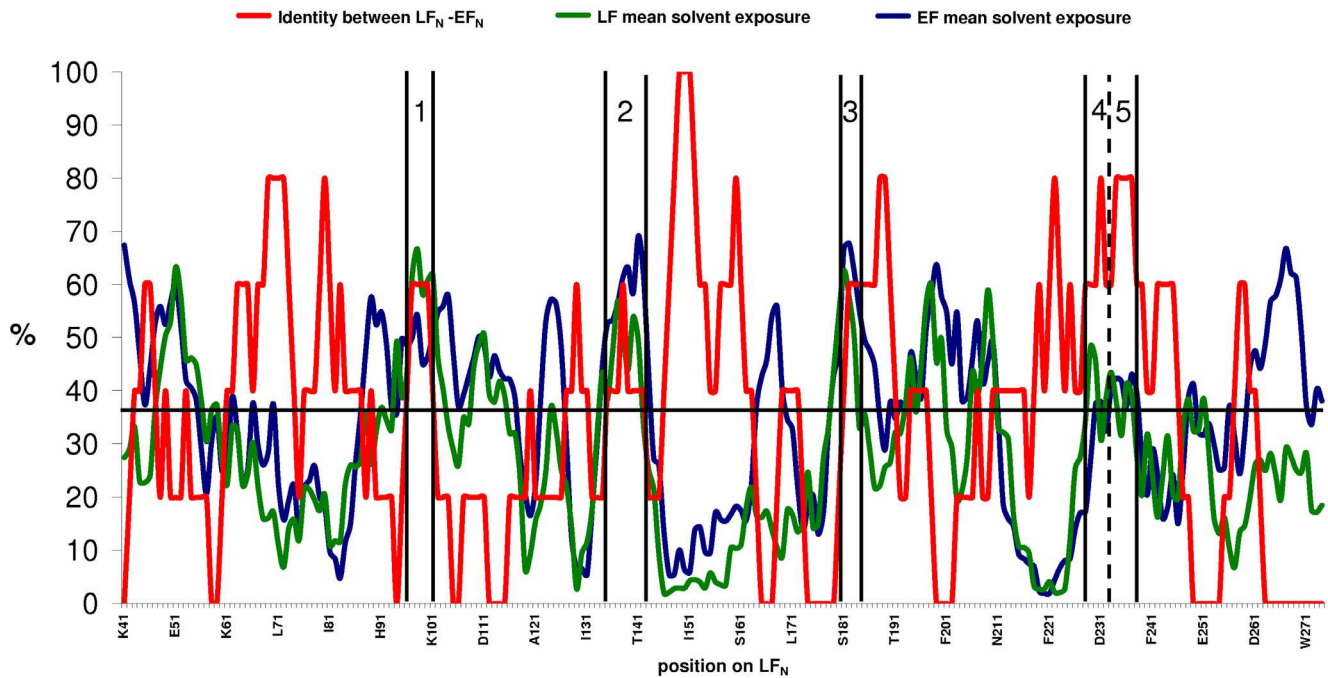
Recently a crystal structure consisting of a PA dimer bound to LF<sub>N</sub> has been resolved, allowing identification of the role of each residue involved in the PA/LF interaction [33]. The hydrophobic residues L188, Y223, H229, V232, L235 and Y236 of LF are closely involved in an interaction with an hydrophobic region of PA. In particular, Y236 appears to be essential by forming an hydrogen-bonding network with PA residues. Thus, targeting

**Table 1. Mean identity between each epitope candidate in LF and the homologous region in EF, and mean solvent exposure of each epitope candidate.**

Epitope candidate	length	Mean identity between the amino-acid sequence and the homologous region in EF (%)	Mean solvent exposure (%)
LF(97–103)	7	57	53
LF(136–143)	8	50	47
LF(178–184)	7	43	52
LF(227–231)	5	60	48
LF(231–236)	6	67	44

The identities between EF and LF epitope candidates are higher than the threshold, equal to 35%. The calculated mean solvent exposure for the five epitope candidates is 48%.

doi:10.1371/journal.pone.0065855.t001

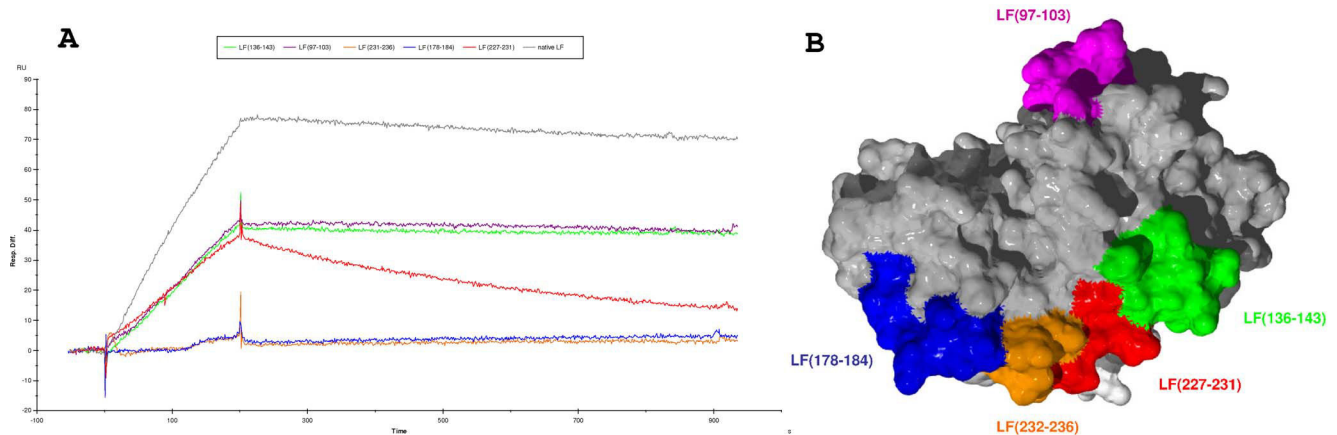


**Figure 5. Identification of epitope candidates by the combined analysis of sequence identity and solvent exposure.** The curve in red represents the percentage of identity between  $LF_N$  and  $EF_N$ , averaged over a sliding window of five residues. The mean identity between  $LF_N$  and  $EF_N$ , 35% (horizontal black line), was chosen as the threshold above which regions were selected as epitope candidates. The curves in green and blue indicate the solvent exposure of  $LF_N$  and  $EF_N$ , respectively, averaged over a sliding window of five residues. The five regions of  $LF_N$  and  $EF_N$  exposed to the solvent, and sharing an identity higher than the threshold, were selected as epitope candidates. These regions are numbered 1 to 5, and their ends are indicated by vertical black lines.  
doi:10.1371/journal.pone.0065855.g005

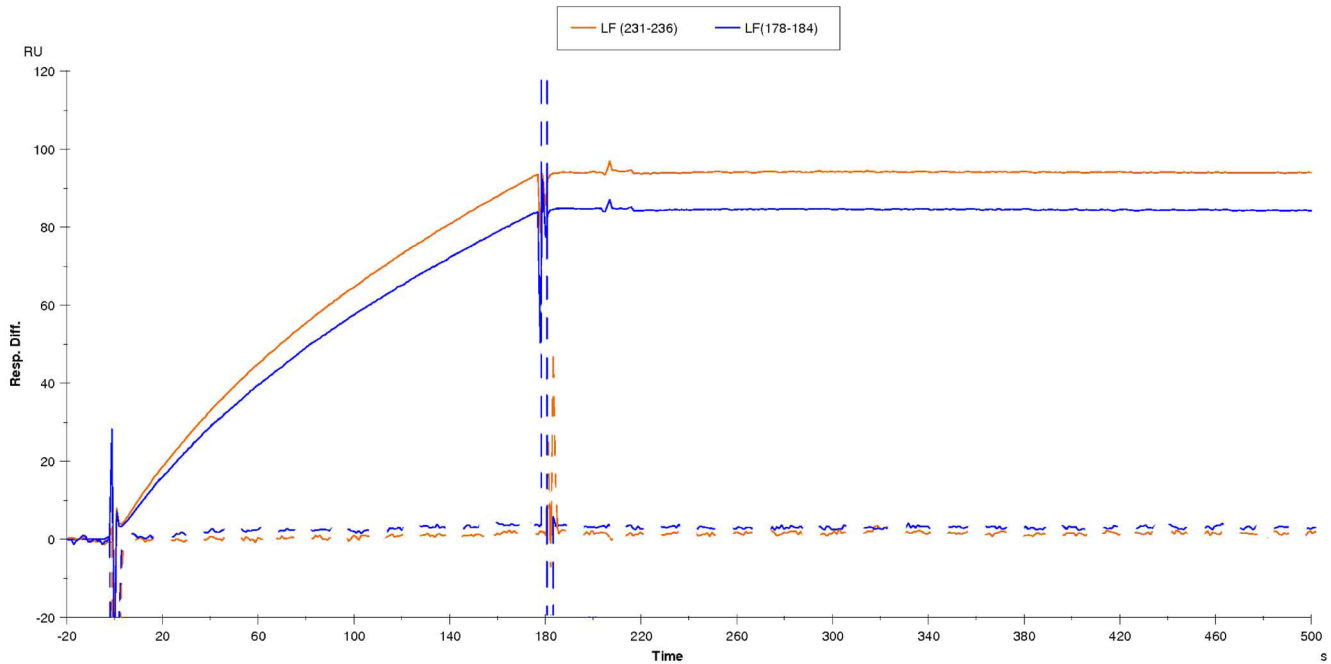
three (H229, L235, Y236) of the five LF residues essential for the formation of the lethal toxin (figure 11) is sufficient to destabilize that formation. This mechanism differs from the indirect competition by steric hindrance or conformational changes

described as the neutralization mechanisms of other antibodies ([17], also see [12] for a review).

In conclusion, we show in the present study that scFv 2LF cross-neutralizes the edema toxin and the lethal toxin, and we describe a



**Figure 6. Biacore experiment to evaluate the reactivity of the five LF variants in which each epitope candidate had been shaved to alanine, and localization of these epitope candidates on a view of the  $LF_N$  surface.** A/ The Biacore experiment was performed on a CM5 chip sensitized by scFv 2LF. The curve corresponding to the LF variant in which LF(97–103) was shaved is in purple, the curves corresponding to the shaving of LF(136–143), LF(178–184), LF(227–231) and LF(231–236) are in green, blue, red and orange, respectively. The positive control (commercially available LF) curve is in gray. Only the reactivities of LF variants in which LF(178–184), LF(227–231), LF(231–236) had been shaved were significantly (three-fold or more) lower than the positive control value. B/ The same color code as in A indicated the five epitope candidates on an apical view of the  $LF_N$  surface. The three regions selected after alanine shaving, LF(178–184), LF(227–231) and LF(231–236), are proximal. The figure was drawn using Swiss PDB viewer and Pov-ray rendering [49].  
doi:10.1371/journal.pone.0065855.g006



**Figure 7. Biacore experiment to evaluate the reactivity between anti-LF polyclonal antibodies and the two LF variants, in which LF(178–184) or LF(231–236) had been shaved in alanine.** A CM5 chip was sensitized using LF variants in which LF(178–184) (blue) or LF(231–236) (red) had been shaved in alanine, as these variants did not react with scFv 2LF and their presence and general conformation had to be verified. The diluted (1:100) serum of a macaque, drawn before immunization with LF, was used as a negative control and did not react with these two LF variants (dashed curves). The serum from the same animal after hyper-immunization with LF reacted with these two LF variants (continuous curves), showing that they had been immobilized on the CM5 chip. The curves are representative of two separate Biacore experiments, realized in the same conditions except for the variants used for sensitization.  
doi:10.1371/journal.pone.0065855.g007

novel *in silico* method based on this cross-reactivity to map its epitopes. This *in silico* method performed better than several existing methods, and may be of more general interest than the present study. The results of the *in silico* method were confirmed and refined by mutations to alanine (alanine shaving followed by alanine scanning), and these methods were found to be more robust than methods based on peptide utilization. The epitopes of scFv 2LF are constituted of LF(229–230) plus LF(234–236) in LF, and of EF(253–254) plus EF(258–260) in EF. These epitopes are located in the region containing helix  $\alpha 10$  and it may be possible to target this region with other inhibitors, such as synthetic molecules [34], or by vaccination, to neutralize both LT and ET in order to improve anthrax outcome.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All animal studies presented here were specifically approved by the Institut de Recherche Biomédicale des Armées ethics committee under authorization n° 2006/42.1, and were conducted according to European 2010/63/UE guidelines.

### ELISA and western blot

The cross-reactivity of scFv 2LF with EF was tested by ELISA. Briefly, microtiter plates were coated with 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EF (List Biological Laboratories, Campbell, CA), while LF (List Biological Laboratories) and KLH (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were utilized as positive and negative controls respectively. After blocking with PBS-BSA 3%, the plates were incubated with serial dilutions of scFv 2LF. The plates were then washed with

PBS-Tween 0.1%, and bound scFv 2LF was detected using a monoclonal anti-polyhistidine antibody conjugated to peroxidase (A7058, Sigma-Aldrich). The reactivity of scFv 2LF with EF was further tested by western blotting under reducing conditions. Three samples of LF and EF were diluted (5, 2 and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in RunBlue LDS Sample Buffer (Expedeon, San Diego, USA) with  $\beta$ -mercaptoethanol, heated for 10 min at 80°C and separated by electrophoresis on a 12% SDS-PAGE gel using the Rapid Reducing Running Buffer (Expedeon). The samples were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-Psq, Millipore, Molsheim, France) using a Trans-Blot SD semi-dry electrophoretic transfer cell (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The membrane was blocked, then incubated with a scFv 2LF solution (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Bound scFv 2LF was revealed with a monoclonal anti-polyhistidine antibody conjugated to peroxidase (A7058, Sigma-Aldrich).

### Affinity measurements

Affinity constants ( $K_D$ ) and dissociation constants ( $k_d$ ) of scFv 2LF for LF, EF and their variants were measured by surface plasmon resonance (SPR) with a Biacore X (Biacore, Uppsala, Sweden) instrument. ScFv 2LF was immobilized at a maximum of 250 resonance units on a CM5 chip (Biacore) via amine coupling. A flow rate of 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  was maintained during measurements. A minimum of seven dilutions of LF, EF and their variants (220 to 14 nM) in HBS-EP buffer (Biacore) was tested for 1500 s. After each dilution, the chip was regenerated with glycine 1.5 buffer (Biacore), run at 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  for 30 s. Results were analyzed with the Biaevaluation software (a 1:1 (Langmuir) binding model for  $K_D$  measurements, and a 1:1 (Langmuir) dissociation model for  $k_d$



**Table 2.** ScFv 2LF dissociation rate constants with each LF variant, measured by Biacore experiments.

	residues	$k_d$ ( $s^{-1}$ )
Shaving (SH)	97–103	$1.32 \times 10^{-4}$
	136–143	$3 \times 10^{-4}$
	178–184	/
	227–231	$1.26 \times 10^{-3}$
	231–236	/
Scanning	K178	$2 \times 10^{-4}$
	N179	$2.12 \times 10^{-4}$
	S181	$3.1 \times 10^{-4}$
	D182	$3.9 \times 10^{-4}$
	S183	$2.9 \times 10^{-4}$
	D184	$1.3 \times 10^{-4}$
	P227	$5.6 \times 10^{-4}$
	Q228	$6 \times 10^{-4}$
	H229	$10 \times 10^{-4}$
	R230	$9.34 \times 10^{-4}$
	D231	$5.3 \times 10^{-4}$
	V232	$5.24 \times 10^{-4}$
	L233	$4.8 \times 10^{-4}$
	Q234	$9.54 \times 10^{-4}$
	L235	$8.95 \times 10^{-4}$
Y236	$8.55 \times 10^{-4}$	
Native LF	/	$2.3 \times 10^{-4}$
Native EF	/	$5.1 \times 10^{-4}$

The five residues whose mutation to alanine resulted in a 3-fold, or larger, decrease of the dissociation constant are shown in bold. doi:10.1371/journal.pone.0065855.t002

measurements). If an LF or EF variant did not interact with scFv 2LF, its presence was verified by a Biacore experiment using anti-LF polyclonal antibodies. For this, the variant was immobilized on a CM5 chip as described above, and serum drawn from the macaque hyper-immunized with LF was used for detection (diluted 1:100 in HBS-EP buffer) while the pre-immune serum (diluted 1:100 in HBS-EP buffer) was used as a control [18].

### *In vivo* neutralization test

ScFv 2LF was reformatted as a full-sized IgG, IgG 2LF, by expression of its variable regions in fusion with human constant regions (Fc) of  $\gamma 1$  and  $\kappa$  isotypes. Human constant regions were preferred to their murine counterparts because the IgG has therapeutic potential, and a human Fc ensures better tolerance. The *in vivo* neutralization test was adapted from a previous study [35]. The edema toxin (ET) was obtained by mixing equal weights of PA and EF. Twenty  $\mu$ g of ET, premixed with 0, 2, 5 or 10  $\mu$ g of IgG 2LF in a final volume of 25  $\mu$ l in PBS, or 25  $\mu$ l of PBS alone as a control, were injected into the right rear footpad of five Balb/c mice. The sizes (dorsal/plantar) of the footpads were measured in triplicate, with digital vernier caliper.

### Identification of epitope candidates by combined identity and solvent exposure analysis

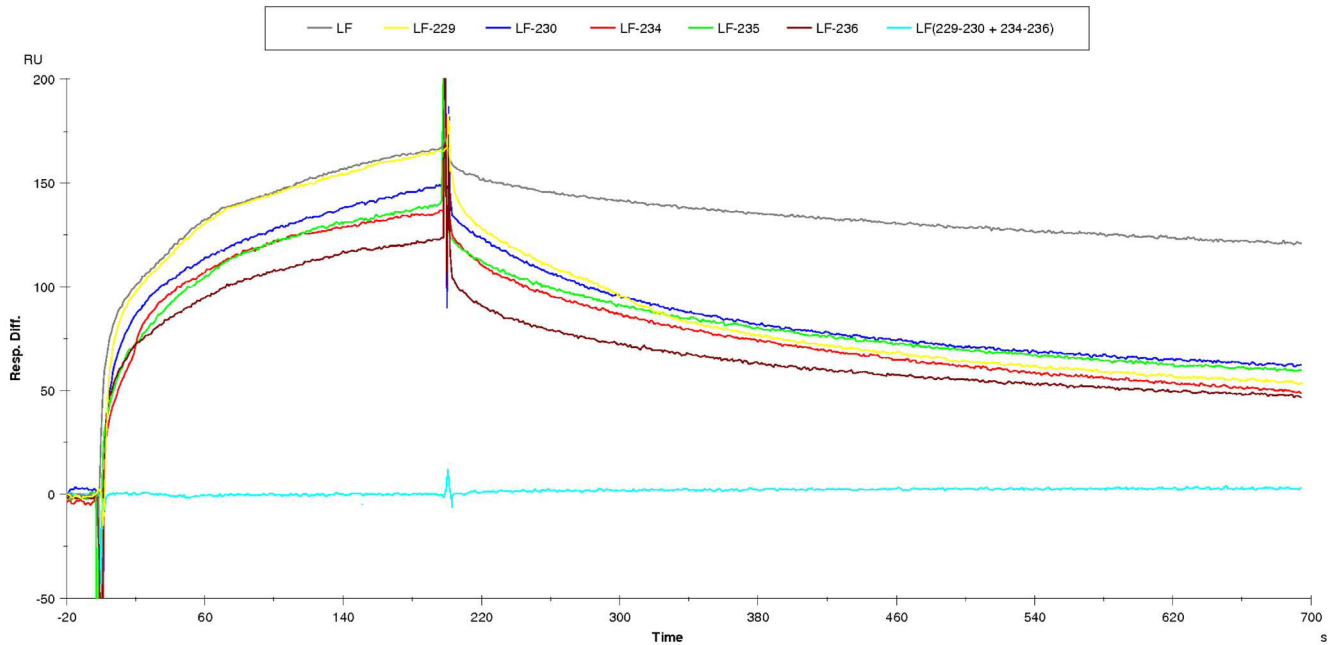
LF and EF sequences were retrieved under the access numbers P15917 and P40136, respectively. The ends of LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> were defined in accordance with sequence annotations (LF<sub>N</sub> begins at residue E27 and EF<sub>N</sub> begins at residue N64) and the two sequences were aligned with the CLUSTALW tool at the PBIL server (<http://pbil.univ-lyon1.fr>), using standard parameters (figure 4). For each position in LF<sub>N</sub>, a score of 1 or 0 was attributed when the EF<sub>N</sub> counterpart residue was identical or different, respectively. When alignment gaps occurred, a score of 0 was attributed to the LF residues having no counterparts in EF. A curve averaging the identity percentage over a window of five residues was calculated to visualize the portions shared between EF<sub>N</sub> and LF<sub>N</sub>, as a length of five residues was considered as corresponding to the length of epitopes [36]. X-ray crystallographic structures for LF (1J7N) [4] and EF (1XFV) [37] were retrieved from the Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). The solvent exposure for each residue on LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> structures was calculated using the ASAView tool [38], then averaged using a sliding window of five amino acids. The three curves representing these three averaged parameters (identity between LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub>, solvent exposure of EF and solvent exposure of LF) are shown in figure 5. Epitope candidates were identified as regions where LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub> identity, averaged on a sliding window of 5 residues, is superior to the mean identity between LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub>, and where solvent exposure is high. The identity between LF<sub>N</sub> and EF<sub>N</sub>, the nature and the solvent exposure of each residue were studied individually to determine the ends of regions selected as epitope candidates. Once the epitope candidates were precisely defined, their solvent exposures were statistically tested (unpaired t test, GraphPad Prism 5, La Jolla, CA).

### Alanine shaving and scanning

Alanine shaving and scanning are two complementary methods, both consisting of directed mutagenesis of residues to alanine to reduce their side chains to methyl groups; this eliminates the interactions involving the side chains of these residues. Alanine shaving is the replacement of several contiguous amino acids in the antigen, and tests for the presence of an epitope in the corresponding region. When alanine shaving indicates that a region contains an epitope, each of the residues has to be individually mutated to alanine to localize the epitope precisely. It might be remarked that mutation to glycine, which has no side-chain beyond the  $\beta$ -carbon, introduces a conformational flexibility which may indirectly alter the epitope and the affinity, so that mutation to glycine is inappropriate for epitope mapping [29].

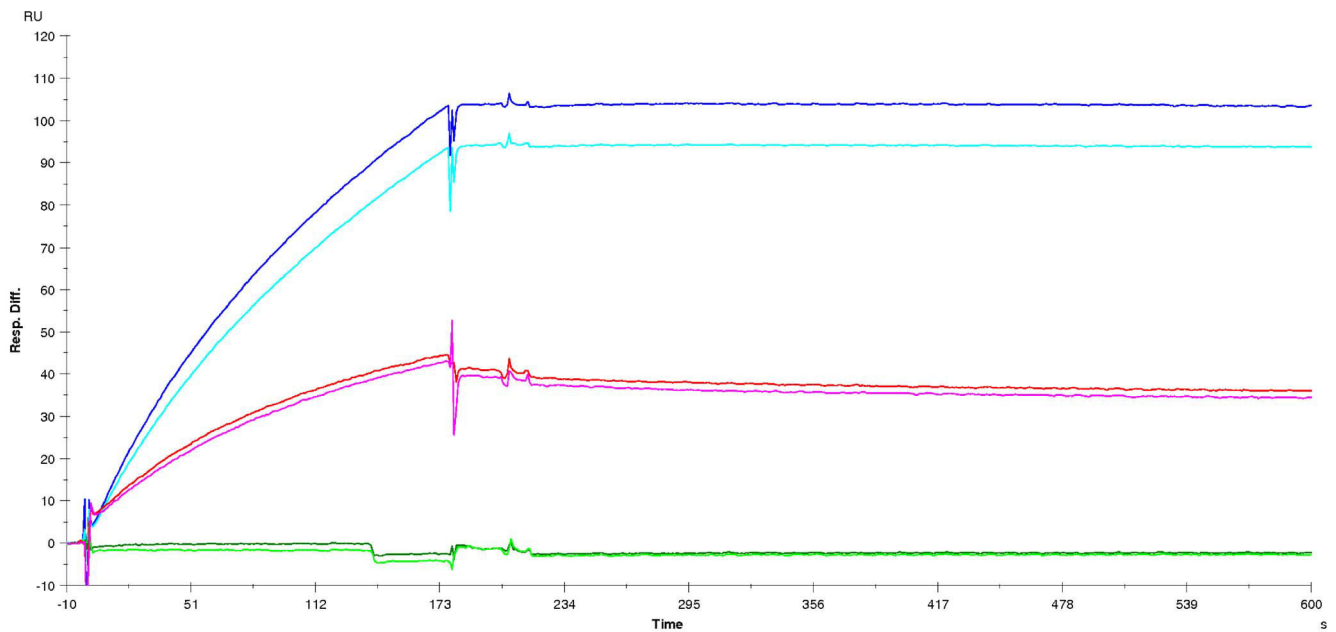
Six genes, encoding LF and its variants, in which an epitope candidate had been shaved to alanine, were synthesized (Entelechon, Regensburg, Germany), inserted into the vector pET15B (Merck chemical, Darmstadt, Germany) and expressed as described below. The interaction between a variant and scFv 2LF was regarded as significantly altered if the  $k_d$  was more than a three-fold lower than observed with the parental LF. For alanine scanning, each residue was individually mutated to alanine (Entelechon) and the corresponding variants were expressed as described below. If the mutation of a residue to alanine decreased the  $k_d$  by more than a three-fold, the mutated residue was regarded as being part of the epitope. All residues identified as composing the epitope were then simultaneously mutated to alanine, and the reactivity of the variant was tested by Biacore. The epitope was confirmed if all immunoreactivity was lost.

Expression and purification of LF, EF and their variants were as described for scFv 2LF [18], except that cytoplasmic extracts were



**Figure 8. Biacore experiment to evaluate the reactivity between scFv 2LF and the five LF variants, in which H229, R230, Q234, L235 or Y236 had been individually mutated in alanine, or the LF variant where these five residues had been simultaneously mutated in alanine.** A CM5 chip was sensitized with scFv 2LF. LF (control, in grey) and its five variants in which H229 (yellow), R230 (blue), Q234 (red), L235 (green) or Y236 (brown) had been individually mutated in alanine reacted in flux. The LF variant in which these five positions had been simultaneously mutated in alanine is presented in cyan. Dilutions of LF and its variants giving an equivalent maximal signal are presented, to allow the comparison of the dissociation phases (after the maximal signal and the artefactual spikes) when dissociation constants are measured (between the 500<sup>th</sup> and 700<sup>th</sup> seconds). Values were calculated on several curves for each variant, and are presented on table 2: the five variants with punctual mutations present at least a three-fold more rapid dissociation than the control, and the variant with the five simultaneous mutations presents no reactivity.

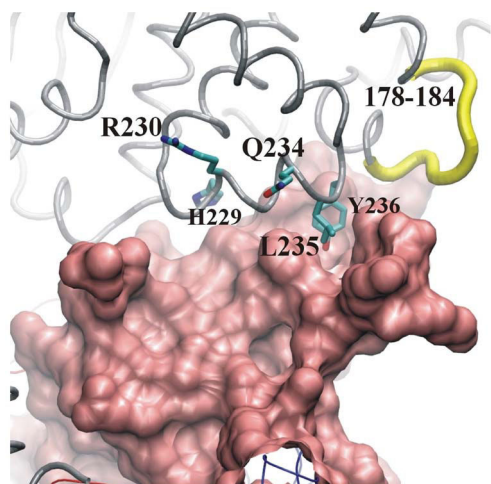
doi:10.1371/journal.pone.0065855.g008



**Figure 9. Biacore experiment to evaluate the reactivity between anti-LF polyclonal antibodies and LF, EF or their variants in which the epitope of scFv 2LF had been shaved in alanine.** A CM5 chip was sensitized with LF (deep blue) or its variant (light blue) in which residues 229, 230, 234, 235 and 236 (corresponding to scFv 2LF epitope on LF) had been simultaneously substituted by alanine. Another CM5 chip was sensitized with EF (red) or its variant (rose) in which residues 253, 254, 258, 259 and 260 (corresponding to scFv epitope on EF) had been simultaneously mutated in alanine. The serum of a macaque drawn before or after immunization with LF was utilized in flux. The serum drawn before immunization did not react with LF nor with EF as expected (in green). The serum drawn after immunization reacted with both variants, though slightly less than with the parental molecules, showing that they had been immobilized on the chip and that their general conformations had been retained despite the shaving.

doi:10.1371/journal.pone.0065855.g009





**Figure 11. Complex between PA and LF as observed in the X-ray crystal structure 3KWV [33].** The  $\alpha$  carbons constituting LF are drawn as a gray tube, and PA is represented as its molecular surface (pink). The region LF(178–184), the shaving of which abolished reactivity between scFv 2LF and LF, is represented by a yellow tube. Residues of the core of the LF epitope are shown as sticks, colored according to the atom type (carbon in cyan), and are located on  $\alpha$  helix 10. The figure was drawn using VMD [50].  
doi:10.1371/journal.pone.0065855.g011

obtained by sonication (1 min pulses of 6 seconds and 10 Watts, separated by pauses of 1 s) (Vibracell 7240S, Bioblock scientifique, Illkirch, France). A band corresponding to each variant was detected by SDS-PAGE in these cytoplasmic extracts, but not in those purified from non-transformed *Escherichia coli* (controls).

## References

- Mock M, Fouet A (2001) Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55: 647–671.
- Moayeri M, Leppla SH (2009) Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med* 30: 439–455.
- Elliott JL, Mogridge J, Collier RJ (2000) A quantitative study of the interactions of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. *Biochemistry* 39: 6706–6713.
- Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renatus M, Petosa C, et al. (2001) Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* 414: 229–233.
- Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC (1997) Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 385: 833–838.
- Lacy DB, Mourez M, Fouassier A, Collier RJ (2002) Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. *J Biol Chem* 277: 3006–3010.
- Burnett JC, Henchal EA, Schmaljohn AL, Bavari S (2005) The evolving field of biodefence: therapeutic developments and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 4: 281–297.
- Patra G, Vaissaire J, Weber-Levy M, Le Doujet C, Mock M (1998) Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J Clin Microbiol* 36: 3412–3414.
- Lightfoot N, Scott R, Turnbull B (1990) Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. *Salisbury Med Bull Suppl* 68.
- Durmaz R, Doganay M, Sahin M, Percin D, Karahocagil MK, et al. (2012) Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 2783–2790.
- Little SF, Ivins BE, Fellows PF, Friedlander AM (1997) Passive protection by polyclonal antibodies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs. *Infect Immun* 65: 5171–5175.
- Froude JW, 2nd, Thullier P, Pelat T (2011) Antibodies against anthrax: mechanisms of action and clinical applications. *Toxins (Basel)* 3: 1433–1452.
- Chen Z, Moayeri M, Purcell R (2011) Monoclonal Antibody Therapies against Anthrax. *Toxins* 3: 1004–1019.
- Fox JL (2013) Anthrax drug first antibacterial mAb to win approval. *Nat Biotechnol* 31: 8.
- Baillie LW (2006) Past, imminent and future human medical countermeasures for anthrax. *J Appl Microbiol* 101: 594–606.
- Rosovitz MJ, Schuck P, Varughese M, Chopra AP, Mehra V, et al. (2003) Alanine-scanning mutations in domain 4 of anthrax toxin protective antigen reveal residues important for binding to the cellular receptor and to a neutralizing monoclonal antibody. *J Biol Chem* 278: 30936–30944.
- Brossier F, Levy M, Landier A, Lafaye P, Mock M (2004) Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect Immun* 72: 6313–6317.
- Pelat T, Hust M, Laffly E, Condemine F, Bortex C, et al. (2007) High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2758–2764.
- Albrecht MT, Li H, Williamson ED, LeButt CS, Flick-Smith HC, et al. (2007) Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect Immun* 75: 5425–5433.
- Chen Z, Moayeri M, Crown D, Emerson S, Gorshkova I, et al. (2009) Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun* 77: 3902–3908.
- Pelat T, Thullier P (2009) Non-human primate immune libraries combined with germline humanization: an (almost) new, and powerful approach for the isolation of therapeutic antibodies. *Mabs* 1: 377–381.
- Pelat T, Bedouelle H, Rees AR, Crennell SJ, Lefranc MP, et al. (2008) Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by in vitro and in silico engineering. *J Mol Biol* 384: 1400–1407.
- Little SF, Leppla SH, Friedlander AM (1990) Production and characterization of monoclonal antibodies against the lethal factor component of *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect Immun* 58: 1606–1613.
- Zhao P, Liang X, Kalbfleisch J, Koo HM, Cao B (2003) Neutralizing monoclonal antibody against anthrax lethal factor inhibits intoxication in a mouse model. *Hum Antibodies* 12: 129–135.
- Lim NK, Kim JH, Oh MS, Lee S, Kim SY, et al. (2005) An anthrax lethal factor-neutralizing monoclonal antibody protects rats before and after challenge with anthrax toxin. *Infect Immun* 73: 6547–6551.
- Ma B, Wolfson HJ, Nussinov R (2001) Protein functional epitopes: hot spots, dynamics and combinatorial libraries. *Curr Opin Struct Biol* 11: 364–369.
- Jin L, Fendly BM, Wells JA (1992) High resolution functional analysis of antibody-antigen interactions. *J Mol Biol* 226: 851–865.

Purity was estimated at 25% and was insufficient for precise measurement of concentrations, which in turn prevented the measurement of the affinity constant ( $K_D$ ). Since the dissociation constant ( $k_d$ ) correlates with binding affinity [36] and its measurement does not depend on concentration values, the present study was based on  $k_d$  measurements.

## Identification of the epitope candidates by existing *in silico* methods

In addition to the *in silico* method developed here, 12 prediction methods available through web servers or stand-alone programs (8 predicting continuous epitopes, 4 predicting discontinuous epitope) were used to identify epitope candidates: BEPITOPE (continuous, Pellequer's method with TURNEE scale, default settings) [39], BEPITOPE (continuous, Pellequer's method with TURN33 scale, default settings, [39]), BepiPred (continuous, default settings,[40]), Ellipro (continuous, default settings, [41]), LEP-LP (continuous, default settings, [42]), BCPREDS (continuous, default settings, [43]), Epitopia (continuous, default settings, [44]), COBEpro (continuous, default settings, [45]), CBTOPE (discontinuous, default settings, [46]), Ellipro (discontinuous, default settings, [41]), DiscoTope (discontinuous, default settings, [47]), BEpro (discontinuous, default settings, select residues with score  $\geq 0.5$  [48]). A consensus epitope was defined as a region for which half of the methods predicted an epitope.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PT TP. Performed the experiments: PT AA CB JLP TP. Analyzed the data: PT AA JM JLP TP. Contributed reagents/materials/analysis tools: PT CB JLP TP. Wrote the paper: PT JLP TP.



28. Thorn KS, Bogan AA (2001) ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics* 17: 284–285.
29. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ (2007) Hot spots—a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* 68: 803–812.
30. Jin L, Wells JA (1994) Dissecting the energetics of an antibody-antigen interface by alanine shaving and molecular grafting. *Protein Sci* 3: 2351–2357.
31. Zhang Y, Raudah S, Teo H, Teo GW, Fan R, et al. (2010) Alanine-shaving mutagenesis to determine key interfacial residues governing the assembly of a nano-cage maxi-ferritin. *J Biol Chem* 285: 12078–12086.
32. Morrison KL, Weiss GA (2001) Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol* 5: 302–307.
33. Feld GK, Thoren KL, Kintzer AF, Sterling HJ, Tang, II, et al. (2010) Structural basis for the unfolding of anthrax lethal factor by protective antigen oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1383–1390.
34. Jiao GS, Kim S, Moayeri M, Cregar-Hernandez L, McKasson L, et al. (2010) Antidotes to anthrax lethal factor intoxication. Part 1: Discovery of potent lethal factor inhibitors with in vivo efficacy. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 6850–6853.
35. Kulshreshtha P, Bhatnagar R (2011) Inhibition of anthrax toxins with a bispecific monoclonal antibody that cross reacts with edema factor as well as lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Mol Immunol* 48: 1958–1965.
36. Pellequer J-L, Van Regenmortel MHV (1993) Affinity of monoclonal antibodies to large multivalent antigens: influence of steric hindrance on antibody affinity constants calculated from Scatchard plots. *MI* 30: 955–958.
37. Shen Y, Zhukovskaya NL, Guo Q, Florian J, Tang WJ (2005) Calcium-independent calmodulin binding and two-metal-ion catalytic mechanism of anthrax edema factor. *EMBO J* 24: 929–941.
38. Ahmad S, Gromiha M, Fawareh H, Sarai A (2004) ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics* 5: 51.
39. Odorico M, Pellequer J-L (2003) BEPITOPE: predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins. *JMR* 16: 20–22.
40. Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2: 2.
41. Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Füsseder N, Bourne PE, et al. (2008) ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 9: 514.
42. Chang HT, Liu CH, Pai TW (2008) Estimation and extraction of B-cell linear epitopes predicted by mathematical morphology approaches. *J Mol Recognit* 21: 431–441.
43. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V (2008) Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit* 21: 243–255.
44. Rubinstein ND, Mayrose I, Martz E, Pupko T (2009) EpiToPIA: a web-server for predicting B-cell epitopes. *BMC Bioinformatics* 10: 287.
45. Sweredoski MJ, Baldi P (2009) COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. *Protein Eng Des Sel* 22: 113–120.
46. Ansari HR, Raghava GP (2010) Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res* 6: 6.
47. Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O (2006) Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* 15: 2558–2567.
48. Sweredoski MJ, Baldi P (2008) PEPITO: improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure. *Bioinformatics* 24: 1459–1460.
49. Kaplan W, Littlejohn TG (2001) Swiss-PDB Viewer (Deep View). *Brief Bioinform* 2: 195–197.
50. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33–38, 27–38.

### Conclusion de l'article 5 :

Afin d'identifier les épitopes candidats, une analyse *in silico* a d'abord été réalisée. Les séquences de LF<sub>N</sub> et EF<sub>N</sub> ont été alignées informatiquement pour calculer leur pourcentage d'identité protéique, et il est de 35 %. A partir des structures cristallographiques de LF et EF, le pourcentage d'exposition au solvant de chaque acide aminé a été calculé. Puisque la taille moyenne des épitopes B est de cinq acides aminés, le degré moyen d'identité et d'exposition au solvant des différentes régions d'LF<sub>N</sub> a été calculé avec une fenêtre glissante de cette taille. Cinq régions dont l'identité moyenne des cinq acides aminés est supérieure à l'identité moyenne entre LF<sub>N</sub> et EF<sub>N</sub> (région partiellement conservée) et dont les acides aminés sont exposés au solvant, ont été identifiées et considérées comme des épitopes potentiels. Des expériences d'*alanine shaving* ont alors été réalisées pour déterminer quelles sont, parmi ces régions, celles contenant des acides aminés impliqués dans l'interaction avec 2LF. Des productions cytoplasmiques des variants correspondant ont été réalisées mais elles contenaient une concentration élevée de contaminants, empêchant la détermination de la concentration des variants et donc le calcul des affinités. Toutefois, la mesure du coefficient de dissociation est indépendante de la concentration, et ce coefficient représente une bonne caractérisation de l'interaction anticorps-antigène ; il a donc été choisi pour mener la suite de l'étude. Deux des cinq mutants présentaient une constante de dissociation égale à celle observée avec la sous-unité LF native, donc les acides aminés mutés en alanine dans ces mutants ne composent pas l'épitope. A l'inverse, deux mutants n'interagissaient plus avec 2LF et un autre présentait une constante de dissociation dégradée d'un facteur supérieur ou égal à trois, donc l'épitope de 2LF est formé par certains des 15 acides aminés composant ces trois régions. Afin de déterminer plus précisément quels sont les acides aminés qui forment l'épitope, des expériences d'*alanine scanning* ont alors été réalisées. Pour cela 16 mutants ponctuels ont été générés, en mutant en alanine un seul des résidus précédemment identifiés. Les mutants dont l'acide aminé muté était H229, R230, Q234, L235 ou Y236 présentaient des constantes de dissociation dégradées par un facteur supérieur ou égal à trois, donc ces résidus forment l'épitope. Afin de confirmer que l'épitope est bien formé par ces acides aminés, un mutant dans lequel ces cinq acides aminés ont été mutés simultanément en alanine, a été généré. Ce mutant ne réagit pas avec 2LF, confirmant que l'épitope de 2LF sur LF est bien formé par la séquence **HRDVLQLY**, qui constitue la région [229-230]-[234-236]. Comme 2LF interagit aussi avec EF, les acides aminés homologues à ceux formant l'épitope de 2LF sur LF ont été recherchés *in silico* sur EF, et cinq acides aminés formant l'épitope candidat de

2LF sur EF ont été identifiés. Afin de déterminer expérimentalement si ces acides aminés forment bien l'épitope, un mutant d'EF dans lequel ces acides aminés ont été mutés en alanine, a été généré. L'anticorps 2LF ne réagit pas avec ce mutant, confirmant que l'épitope de 2LF sur EF est bien localisé sur la région homologue identifiée, [253-254]-[258-260], constituée des acides aminés **HRTVLELY**.

L'anticorps 2LF neutralise simultanément LT et ET en interagissant avec un épitope neutralisant partiellement conservé entre LF et EF, il serait possible de tirer partie de cette neutralisation croisée pour développer un candidat vaccin protégeant contre les deux toxines du charbon, LT et ET. Le domaine N-terminal de LF pourrait ainsi être exprimé sous forme recombinante pour servir à l'élaboration de ce candidat vaccin. Après vaccination, les anticorps synthétisés par l'organisme qui sont dirigés contre cette protéine recombinante, pourraient neutraliser simultanément LT et ET. Ce travail de localisation de l'épitope pourrait aussi servir de modèle pour l'isolement de molécules synthétiques ("équivalents fonctionnels") neutralisant simultanément les toxines LT et ET, en interagissant avec les régions formant les épitopes de 2LF sur LF et EF.

L'épitope de 2LF sur EF identifié expérimentalement a été comparé aux épitopes prédit par 12 outils *in silico* de prédiction d'épitopes. Pour être considéré comme épitopique, il est nécessaire qu'un acide aminé soit identifié par au moins 6 des 12 méthodes. Ces outils bioinformatiques ont identifié 12 épitopes, représentant un total de 99 acides aminés. Ces méthodes ont donc prédit à tort plusieurs acides aminés comme étant épitopiques, mais n'ont pas identifié les résidus [234-236] comme faisant partie de l'épitope, ce qui montre la limite de ces méthodes de prédiction et montre aussi l'intérêt de notre approche expérimentale.

*Partie VI :*  
*Perspectives*  
*et*  
*conclusion*  
*générale*

## 6) Perspectives et conclusion générale

### 6.1) Contexte dans lesquels s'inscrivent mes travaux de thèse

#### 6.1.1) La situation française

Les anticorps polyclonaux extraits de sérum ont été utilisés en thérapie ("sérothérapie") à partir de 1888 mais leur origine animale les rendait très immunogènes, ce qui diminuait leur tolérance et leur efficacité. La technologie des hybridomes murins, découverte en 1975 par Kohler et Milstein (Köhler & Milstein, 1975), a permis l'isolement d'anticorps monoclonaux, qui ont révolutionné le domaine du diagnostic *in vitro* en permettant de détecter spécifiquement des molécules antigéniques, contrairement aux anticorps polyclonaux. Cette technologie a aussi permis d'isoler l'Orthoclone OKT3<sup>®</sup> (Muromomab-CD3), qui a été le premier anticorps monoclonal à être utilisé en thérapie, et qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché, en 1986. Cependant, à l'exception des anticorps comme l'Orthoclone OKT3<sup>®</sup>, qui induisent une immunosuppression, ces molécules ne sont pas mieux tolérées que les anticorps polyclonaux d'origine animale. Il a fallu attendre l'essor de la biologie moléculaire pour que plusieurs générations successives d'anticorps recombinants soient développées, afin de diminuer de plus en plus la proportion de résidus non-humains contenue dans ces anticorps, et permettre l'avènement d'une nouvelle ère pour la sérothérapie.

Bien que la France aie fait partie des nations pionnières de la sérothérapie, elle n'a pas tiré partie du renouveau observé ces dernières décennies avec l'avènement des anticorps recombinants. En effet, malgré un chiffre d'affaire en France en 2011 d'environ deux milliards d'euros (45 % du chiffre d'affaire des bio-médicaments), peu d'anticorps recombinants sont isolés et produits dans notre pays, engendrant un déficit commercial important dans ce secteur. (Direction des Affaires Scientifiques, 2012) Face au retard pris par la France, différentes initiatives ont été mises en place pour favoriser la recherche et le développement français d'anticorps recombinants. Le Groupement De Recherche "AntiCorps et Ciblage THérapeutique" (GDR 3260 - ACCITH), dirigé par le Pr. H. Watier, constitue l'une de ces initiatives. Il regroupe 90 équipes de recherche, dont la nôtre, et son objectif principal est de valoriser la recherche translationnelle française portant sur les anticorps recombinants thérapeutiques, en créant une synergie entre les chercheurs fondamentaux, les chercheurs concernés par l'application des découvertes fondamentales et les médecins. Une autre de ces initiatives est le LABoratoire d'EXcellence ("LABEX") MabImprove (<http://mabimprove.univ-tours.fr>), qui ambitionne l'isolement "de meilleurs anticorps, mieux

développés et mieux utilisés". Face à l'ampleur de cette tâche et contrairement aux autres laboratoires d'excellence, MabImprove est fondé sur un partenariat entre les universités de deux villes, Tours et Montpellier. Les deux laboratoires fondateurs sont associés à un réseau de laboratoires académiques, dont le nôtre, fédérant ainsi 14 équipes de recherches et 200 chercheurs. MabImprove est dirigé par le Pr. Hervé WATIER et le Dr. André PÈLEGRIN, et il est financé par l'Etat dans le cadre du programme "investissement sur l'avenir" (<http://investissement-avenir.gouvernement.fr/>), à hauteur de huit millions d'euros sur 10 ans.

### **6.1.2) Contexte juridique**

Compte tenu de leur proximité phylogénétique avec l'Homme, les primates non humains représentent des outils de choix pour l'isolement d'anticorps thérapeutiques, mais il existe certaines limites juridiques qui contraignent cette utilisation.

La société Biogen IDEC a breveté en Europe (1992, EP1266965) l'utilisation thérapeutique des domaines variables des anticorps de primates non humains dirigés contre les antigènes humains. (*cf paragraphe "2.3.2) Limitations juridiques restreignant l'utilisation des anticorps de macaques"*). Contrairement aux travaux de Biogen IDEC sur lesquels se base ce brevet, une étude publiée par notre laboratoire a démontrée l'existence de différences entre les anticorps macaques et humains, qui ne peuvent donc pas être considérés comme "indistinguables" des anticorps humains. (Philippe Thullier, Huish, *et al.*, 2010) Notre unité, soutenue par notre partenaire industriel, le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB), a donc déposé un recours et le brevet européen a été révoqué le 22 août 2010. Cette révocation ouvre de nouvelles perspectives de recherche puisqu'il est maintenant possible d'isoler des anticorps thérapeutiques dirigés contre des antigènes humains, à partir de primates non humains.

D'autre part, la technologie des phages, utilisée dans les travaux d'isolement d'anticorps présentés dans cette thèse, est issue d'une publication de 1985. Cet article décrit l'exposition de peptides à la surface de phages et leur criblage vis-à-vis des anticorps. Son auteur, George Pieczenik SMITH, est généralement considéré comme l'inventeur de cette technologie. Pourtant, le *Cambridge Antibody Technology* (CAT, AstraZeneca) a considéré que la technique que ce laboratoire a développée par la suite, consistant à exposer des fragments d'anticorps à la surface des phages et à cribler cette banque vis-à-vis d'antigènes, était différente de la technique de Smith et donc brevetable. Ainsi le CAT a breveté la construction des banques combinatoires (brevets EP0368684 et US6248515), l'exposition de

fragments d'anticorps à la surface des phages (brevets EP0589877, EP2055777 et US5969108), et l'utilisation de la technologie d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages pour l'isolement d'anticorps dirigés contre des antigènes du Soi (US5885793). Ces brevets ont été considérés comme infondés par certaines sociétés, qui n'en n'ont pas tenu compte et qui ont isolé des anticorps en utilisant ces techniques. Par exemple, Novartis a commercialisé le Ranibizumab (Lucentis®), un Fab dirigé contre le VEGF, isolé à partir d'hybridomes murins mais dont les étapes de maturation d'affinité ont eu recours à la technologie d'exposition à la surface des phages. Novartis a attaqué MedImmune en justice pour demander la révocation de ces brevets estimés infondés, et MedImmune a riposté en attaquant Novartis en justice pour violation de propriété intellectuelle. Ces plaintes ont été déposées dans différents pays européens, dont en France le 03 février 2010. Pour la France, Philippe THULLIER a été mandaté pour expertiser la validité scientifique des brevets de MedImmune. Suite à la remise de son rapport, qui tendait à indiquer que les brevets de MedImmune reposent sur une technologie qui n'apporte pas d'innovation par rapport à celle publiée par Smith, les deux sociétés ont retiré leurs plaintes et aucun procès n'a eu lieu en France. Au Royaume-Uni, le jugement rendu le 05 juillet 2011 a donné raison à Novartis, en considérant que les brevets de MedImmune n'étaient pas suffisamment innovants et n'étaient donc pas valides mais la société MedImmune a décidé de faire appel de cette décision. A l'inverse, le 10 novembre 2011 en Allemagne, l'importation et la commercialisation du Ranibizumab ont été jugées contraire au respect de la propriété intellectuelle car elles violaient l'un des brevets de MedImmune, et Novartis fait appel de cette décision. Cependant, en Allemagne, un jugement rendu le 24 janvier 2012, a conclu à l'invalidité d'un des brevets détenu par MedImmune.

Actuellement, la révocation du brevet européen restreignant l'utilisation thérapeutique des anticorps de primates non humains, ainsi que la jurisprudence tendant à invalider les brevets limitant l'utilisation de la technologie d'exposition à la surface des phages, ouvrent de nouvelles perspectives de recherche pour notre laboratoire. Mes travaux de thèse se sont pleinement inscrits dans cette dynamique, puisque j'ai isolé des anticorps par la technologie d'exposition à la surface des phages, à partir de macaques immunisés. Ces anticorps pourront donc librement entrer en développement clinique et être utilisés en thérapie.

### 6.1.3) Contexte scientifique

Le premier anticorps recombinant a été commercialisé en 1993, et dès 1995 une thématique de recherche sur les anticorps recombinants a été mise en place au sein du Service de Santé des Armées, par le Dr. Philippe THULLIER. Les premiers travaux, publiés en 1999, ont ainsi décrit l'isolement d'un fragment d'anticorps recombinant neutralisant le virus de la dengue en ciblant sa protéine d'enveloppe. (P Thullier *et al.*, 1999) Plus largement, l'objectif durant cette période était d'améliorer la prise en charge des pathologies infectieuses rencontrées par les militaires français, en particulier les pathologies rencontrées en outre-mer. Toutefois, en 1999, la thématique du département de microbiologie du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA) a été ré-orientée vers les agents du risque biologique provoqué. Alors qu'à l'origine, l'approche choisie était de construire des banques immunes humaines à partir de lymphocytes B de personnes convalescentes, cette approche n'est plus devenue réaliste pour des agents qui ne sont que rarement rencontrés de façon naturelle, et contre lesquels pratiquement aucune vaccination n'est réalisée. Cette réorientation a donc nécessité de mettre en place une nouvelle stratégie, consistant à construire des banques immunes à partir de macaques immunisés. Grâce à cette réorientation stratégique, des anticorps recombinants neutralisant les toxines de *Bacillus anthracis* ont pu être isolés au CRSSA peu de temps après l'épisode de l'envoi de lettres contaminées par des spores du charbon aux Etats-Unis d'Amérique.

Les anticorps isolés dans notre laboratoire ont été obtenus à partir de macaques (*Macaca fascicularis*) immunisés dont l'utilisation expérimentale est autorisée en France. Cependant, l'utilisation des chimpanzés (*Pan troglodytes*) est autorisée sous certaines conditions dans d'autres pays, comme les Etats-Unis d'Amérique, et un laboratoire du *National Institutes of Health* (Bethesda, Etats-Unis d'Amérique) utilise ces animaux, qui sont phylogénétiquement plus proches de l'Homme que ne le sont les macaques. Les anticorps de chimpanzés pourraient donc être de nature plus humaine que ceux des macaques et dans ce cas, les chimpanzés pourraient ainsi être préférés aux macaques pour l'isolement d'anticorps à visée thérapeutique, ce qui remettrait en cause cet élément de notre stratégie. Cependant, aucun travail n'avait comparé la proximité existant entre les anticorps de macaques ou ceux de chimpanzés et leurs homologues humains, et j'ai participé à cette analyse importante pour la stratégie de l'unité. Bien que la région FR3 de la chaîne légère des anticorps de chimpanzés soit significativement plus humaine que celle des macaques, j'ai observé que les domaines variables des anticorps de chimpanzés, dans leur ensemble, ne sont pas significativement plus



humains que ceux de macaques. En outre, la région FR3 ne représente qu'environ un quart des acides aminés du domaine variable d'un anticorps, donc le modeste avantage conféré aux anticorps de chimpanzés pourra être supprimé lors de l'éventuelle humanisation. Cette étude a donc permis de justifier notre approche expérimentale consistant à isoler des anticorps à partir de macaques et à les humaniser. Par conséquent, celle-ci continuera d'être utilisée par notre laboratoire pour nos futurs projets, et c'est en particulier la stratégie utilisée dans le projet AntiBotABE.

## **6.2) Perspectives découlant des innovations apportées pendant mes travaux de thèse**

### **6.2.1) Isolement d'anticorps à large spectre thérapeutique**

Afin d'améliorer la prise en charge du botulisme, l'objectif du projet AntiBotABE est d'isoler des anticorps recombinants neutralisant trois sérotypes de toxines botuliques (BoNT/A, B et E). Compte tenu des différences existant entre ces trois sérotypes, et de la définition des sérotypes elle-même, trois anticorps neutralisant chacun les toxines d'un sérotype devraient être isolés. Puisque chaque sérotype comporte plusieurs sous-types, il pourrait même être nécessaire d'isoler plusieurs anticorps pour neutraliser l'ensemble de ces sous-types. Le projet a toutefois été construit avec l'objectif d'éviter de multiplier les anticorps, donc des anticorps neutralisant simultanément plusieurs sous-types de toxine ont été recherchés. A partir de banques immunes construites en immunisant des macaques avec la toxine d'un seul sous-type, des anticorps neutralisant simultanément les sous-types 1 et 2 de BoNT/A ou B ont ainsi été isolés. Pour isoler de tels anticorps, un criblage original, consistant à cribler la banque sur un sous-type puis sur le second, a été développé. Les banques immunes dirigées contre BoNT/B<sub>2</sub>-HC et BoNT/B<sub>2</sub>-LC ont été criblées selon ce principe, et des scFv neutralisant ces deux sous-types de toxine en ciblant la chaîne lourde ou la chaîne légère ont été identifiés. Nous avons voulu appliquer cette même stratégie à la banque de fragments d'anticorps dirigés contre la chaîne lourde de BoNT/A<sub>1</sub>, mais en raison de problèmes d'instabilité de la toxine BoNT/A<sub>2</sub> ainsi que du fragment d'anticorps recombinant correspondant, seul un criblage conventionnel a finalement été réalisé. Les scFv neutralisant les deux sous-types de toxine ont été identifiés après le criblage, lors des tests de neutralisation.

La diversité du vivant est rencontrée plus largement que dans le cas des seules toxines botuliques, et la neutralisation d'autres agents biologiques proches mais non identiques (comme différentes souches virales, par exemple) pourrait être souhaitée. Pour isoler des anticorps présentant des capacités de neutralisation croisées, il serait possible de reprendre la stratégie que nous avons employée et de cribler les banques de fragments d'anticorps successivement sur plusieurs souches considérées comme représentatives de l'ensemble de la diversité antigénique d'un agent biologique. A l'issue du criblage, seuls les phages spécifiques des différentes souches utilisées lors du criblage seront isolés.

Une autre approche pour éviter d'isoler des anticorps de spécificité trop étroite pourrait consister à rechercher à l'aide d'outils bioinformatiques, par exemple, la région de la protéine cible qui est la mieux conservée entre différentes souches, et à muter en alanine les acides aminés de cette région qui seraient les moins conservés. En criblant une banque de fragments d'anticorps vis à vis d'un tel mutant, les anticorps interagiraient préférentiellement avec les acides aminés non mutés en alanine, formant un épitope commun à un grand nombre de souches. Des molécules ayant un large spectre de neutralisation pourraient ainsi être isolées.

### **6.2.2) Criblage des banques d'anticorps vis à vis d'un mélange de protéines**

Contrairement aux autres sérotypes de toxine botulique, BoNT/E est sécrétée sous une forme inactive, et son activation est réalisée *in vivo* par les protéases de l'organisme hôte. Cette forme active est celle qui doit être neutralisée, et donc celle qui doit être utilisée préférentiellement pour le criblage. Pour éviter que la toxine activée ne se dénature, nous avons activé la toxine *in vitro* par trypsination puis inhibé cette réaction avec l'anti trypsine, avant chaque tour de criblage. Cependant, seules de petites quantités de toxine sont utilisées donc il n'a pas été possible de purifier la toxine des autres composants du mélange d'activation. Pour isoler des anticorps ciblant BoNT/E<sub>3</sub> activée, nous avons donc utilisé une approche originale, consistant à cribler la banque immune vis-à-vis d'un mélange dans lequel l'antigène d'intérêt ne représente que 44,5 % (en rapport molaire) des protéines totales. Comme le macaque utilisé pour la construction de la banque n'était pas exposé à des antigènes non pertinents, et qu'il a été immunisé avec la chaîne légère de BoNT/E<sub>3</sub> jusqu'à un titre élevé et stable, nous avons émis l'hypothèse qu'après immunisation il n'avait synthétisé que des anticorps spécifiques de l'immunogène. La banque construite à partir de la réponse hyper-immune de cet animal ne devrait donc pas contenir d'anticorps réagissant avec la trypsine et

l'anti-trypsine, en particulier, permettant en conséquence le criblage sur le mélange réactionnel d'activation de BoNT/E<sub>3</sub>. L'ELISA phage réalisé à l'issue du criblage a démontré que les phages élus réagissaient vis-à-vis de ce mélange mais pas vis-à-vis de la trypsine et de l'anti-trypsine ; les phages élus étaient donc uniquement spécifiques du troisième composant du mélange d'activation, c'est à dire BoNT/E<sub>3</sub> activée, validant ainsi notre hypothèse.

Ce protocole de criblage original pourrait être utilisé pour isoler des anticorps dirigés contre des protéines dont la purification est difficile, comme les protéines membranaires qui sont fréquemment dénaturées lors de leur purification. Dans ce cas, une protéine recombinante dérivée du domaine extra-membranaire de la protéine cible pourrait être produite et utilisée pour immuniser un primate non humain. La banque immune construite à partir de cet animal ne contiendra pas de fragments d'anticorps spécifiques d'autres protéines que l'immunogène. Ainsi, bien que la protéine membranaire d'intérêt ne représente qu'une faible partie des protéines de surface, le criblage de cette banque immune pourrait être réalisé directement sur les cellules, par exemple.

### **6.2.3) Production d'un nombre limité de scFv représentatifs de la diversité de l'ensemble des séquences**

Après criblage de la banque immune dirigée contre BoNT/E<sub>3</sub>-LC et séquençage des clones isolés, 85 séquences différentes ont été identifiées, ce qui représentait une diversité que nous n'avions jamais rencontré auparavant. Cette diversité pouvait être due à la nature de l'immunogène, ou encore être dépendante de l'animal immunisé lui-même. Toutefois, le temps imparti par le projet AntiBotABE pour la production des scFv de cette banque immune ne permettait pas de produire l'ensemble de ces scFv donc il a été décidé de n'en produire que la moitié, dans un premier temps. Pour sélectionner ces scFv, nous avons émis l'hypothèse que les scFv dont les séquences sont proches ont des épitopes identiques et nous avons cherché à classer les scFv selon la proximité de leurs séquences. Les 85 séquences ont donc été analysées, à l'aide d'un outil bioinformatique (outil "one click" du site Phylogeny, <http://www.phylogeny.fr>) qui effectue un alignement des séquences des domaines variables, calcule leur identité et représente leur diversité sous la forme d'un arbre "pseudo phylogénétique". Dans cet arbre, les séquences classées sur les mêmes embranchements présentent un degré d'identité élevé, et au moins un scFv a été exprimé par embranchement. Ainsi, 35 scFv ont été sélectionnés et exprimés, et trois d'entre eux neutralisaient BoNT/E<sub>3</sub>.

Cette stratégie de sélection des scFv à exprimer pourra être généralisée à l'ensemble des banques dont la diversité est élevée, afin d'isoler plus rapidement des anticorps neutralisants. L'interaction avec l'antigène dépendant principalement des CDR, il aurait aussi été possible de sélectionner les scFv d'après la diversité des séquences de leurs CDR, et non pas de l'intégralité de la séquence du domaine variable. Cependant une telle analyse n'est pas automatisée et elle n'a pas été retenue durant ma thèse.

### **6.3) Perspectives à plus long terme**

#### **6.3.1) Identification et optimisation des mécanismes d'élimination des complexes anticorps-toxine**

Actuellement les mécanismes précis d'éliminations des complexes anticorps/toxines circulants ne sont pas connus. Il semblerait que ces complexes solubles soient principalement éliminés par phagocytose, en interagissant avec les récepteurs aux fragments Fc présents à la surface des cellules phagocytaires. Selon d'autres hypothèses, le complément pourrait aussi favoriser leur élimination, en interagissant simultanément avec ces complexes et les récepteurs CR1 exprimés à la surface des érythrocytes. Les complexes immuns seraient alors transportés par les érythrocytes vers le foie et la rate, où les macrophages et des cellules spécialisées, comme les cellules de Küpffer, les dégraderaient. (Pascual & Schifferli, 1995) Afin de déterminer précisément les mécanismes d'élimination des complexes immuns, nous pourrions conjuguer l'un des anticorps isolé dans le cadre du projet AntiBotABE avec des molécules fluorescentes, puis effectuer des études en microscopie confocale *ex vivo* ou *in vivo*. Ces études permettraient de déterminer quels sont les organes impliqués dans l'élimination des complexes immuns.

Lorsque les mécanismes d'élimination des complexes anticorps-toxines botuliques auront été identifiés, il pourrait être possible de muter des acides aminés de la région Fc, afin d'optimiser l'interaction entre les anticorps et les cellules effectrices impliquées dans l'élimination de ces complexes (*cf paragraphe "2.5.4) Ingénierie de la région Fc"*).

#### **6.3.2) Allongement de la fenêtre thérapeutique**

Après une attaque utilisant des toxines du risque biologique provoqué, les anticorps doivent être administrés le plus rapidement possible afin qu'ils puissent neutraliser ces toxines

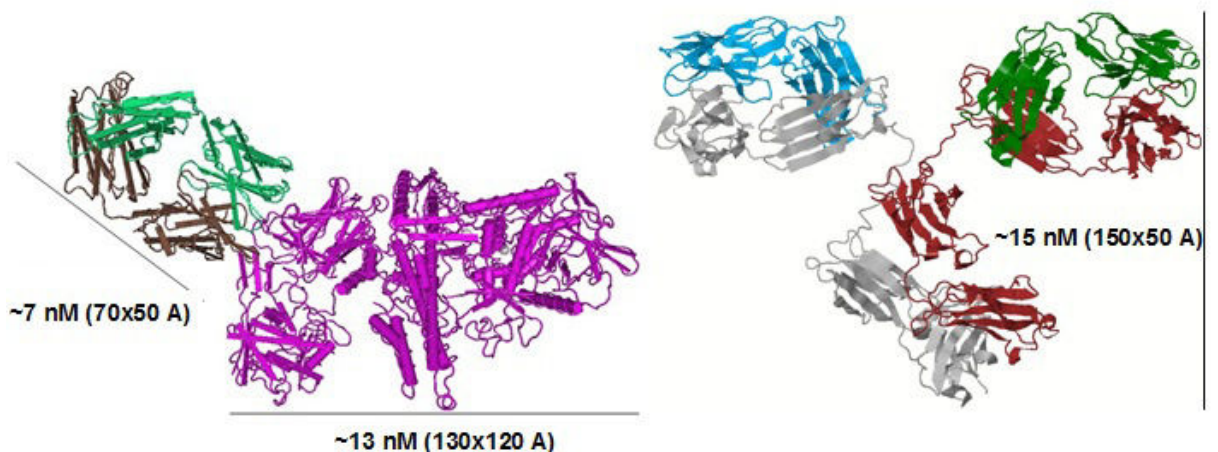
avant qu'elles ne pénètrent dans leurs cellules cibles. Dans le cas de la toxine botulique, celle-ci pénètre rapidement dans les motoneurons, rendant l'injection d'anticorps neutralisant inefficace probablement quelques heures après contamination. Une telle attaque pouvant passer inaperçue jusqu'à l'apparition des premiers symptômes visibles, la fenêtre thérapeutique des anticorps risque alors d'être trop courte pour que les anticorps puissent être administrés efficacement aux premières victimes ("sentinelles épidémiologiques").

Dans le cas où les cliniciens considéreraient que cette fenêtre thérapeutique est trop courte pour une prise en charge optimale des victimes, il serait souhaitable de modifier les anticorps pour qu'ils puissent franchir la membrane plasmique et inhiber dans les cellules l'activité catalytique de la toxine. Pour cela deux approches sont envisageables, celles des *intrabodies* et celle des *transbodies* (cf paragraphe "2.5.2.2) *Approches permettant le ciblage du compartiment intracellulaire*"). Les *intrabodies* sont une technologie qui repose sur l'introduction de l'ADN codant l'anticorps dans les cellules, en utilisant un virus comme vecteur, par exemple. Après pénétration du virus, l'anticorps sera directement synthétisé dans la cellule à partir de l'ADN apporté par le virus et il pourra alors neutraliser la toxine présente dans le cytoplasme. Les *intrabodies* peuvent être utilisés en complément des anticorps circulants afin de neutraliser simultanément les toxines intracellulaires et extracellulaires. La seconde approche est celle des *transbodies*, et elle consiste à fusionner l'anticorps avec un domaine de transduction cytoplasmique, comme la protéine TAT (*Trans-Activator of Transduction*) ou la pénétroïne, pour qu'il puisse franchir la membrane plasmique et neutraliser la toxine intracellulaire. Cette stratégie est plus efficace que celle des *intrabodies* pour obtenir un effet thérapeutique très rapide. Les toxines botuliques n'induisant pas la mort des neurones intoxiqués, la cellule retrouvera sa fonction normale après action neutralisante de l'anticorps intracellulaire.

### 6.3.3) Localisation de l'épitope des anticorps isolés

Durant mes travaux de thèse, des anticorps neutralisant les toxines botuliques A, B et E ont été isolés, mais leurs mécanismes précis de neutralisation sont inconnus. Le mécanisme d'action de la toxine comporte son interaction avec les récepteurs de faibles et de forte affinité des motoneurons, son internalisation, le passage de sa chaîne légère de la vésicule d'endocytose vers le cytoplasme et le clivage du substrat. Chacune de ces étapes est associée à un segment spécifique de la toxine, et le ciblage d'un de ces segments par un anticorps neutralise l'activité de la toxine (Figure 75). Afin de déterminer quelle est l'étape inhibée par

les anticorps isolés lors du projet, un travail de localisation d'épitope pourrait être effectué (cf paragraphe "2.4.3) Localisation de l'épitope d'un anticorps"). Ce travail pourrait être réalisé grâce au protocole expérimental déjà utilisé dans notre laboratoire pour localiser l'épitope de l'anticorps 2LF, en limitant la recherche d'épitope au niveau des régions exposées à la surface de la chaîne recombinante utilisée lors de l'immunisation. (Philippe Thullier *et al.*, 2013) Les résultats de cette localisation d'épitope pourraient faciliter la recherche de combinaison d'anticorps synergiques. En effet, pour neutraliser synergiquement la toxine, il est possible d'inhiber simultanément deux étapes différentes de son mécanisme d'action, en combinant des anticorps ciblant deux segments distincts. Il pourrait être judicieux, par exemple, d'identifier deux anticorps ciblant les deux segments de la toxine impliqués dans l'interaction aux récepteurs de faible affinité et de haute affinité. Une telle recherche d'anticorps non compétitifs pourrait être réalisée en recriblant la banque vis-à-vis d'un mutant de la toxine, dans lequel les acides aminés formant l'épitope du premier anticorps sont mutés en alanine (*alanine shaving*). Aucun de nos scFv ne neutralise BoNT/E<sub>3</sub> en ciblant sa chaîne lourde, donc un tel travail pourrait notamment être réalisé pour identifier des combinaisons d'anticorps neutralisant synergiquement cette toxine. Dans le futur, ce principe pourrait aussi être élargi et appliqué à la neutralisation des virus, en particulier, afin d'identifier des paires d'anticorps ciblant les protéines d'enveloppes impliquées dans l'interaction avec les récepteurs de faibles affinités et de hautes affinités.



**Figure 75 : Interaction d'un scFv et de la toxine botulique.**

Gauche) Toxine botulique interagissant avec un scFv isolé par Garcia-Rodriguez *et al* (Consuelo Garcia-Rodriguez *et al.*, 2007; Madej *et al.*, 2012) Vert : chaîne lourde du scFv ; Marron : chaîne légère du scFv ; Violet : toxine botulique. Droite) Représentation à l'échelle d'une IgG. L'encombrement stérique engendré par une IgG est plus important que celui engendré par un scFv. A : Angstrom.

#### 6.3.4) Développement cliniques des anticorps isolés

Afin de faciliter la prise en charge médicale des personnes contaminées par la toxine létale de *Bacillus anthracis*, notre laboratoire a isolé l'anticorps 35PA83, qui neutralise la toxine létale en ciblant l'antigène protecteur (*Protective Antigen*, PA). (Laffly *et al.*, 2005) Pour que la France ne soit pas dépendante des anticorps neutralisant la toxine létale de *B. anthracis* développés par d'autres pays, cet anticorps entre en développement clinique grâce à un financement de la Direction Générale de l'Armement (DGA).

Le projet AntiBotABE a pour objectif l'isolement et l'humanisation d'anticorps neutralisant BoNT/A, B et E, mais il ne comporte pas le développement clinique (Tableau 14) de ces anticorps. Pour effectuer un développement comparable, aux Etats-Unis d'Amérique, la société Xoma (Berkeley, Etats-Unis d'Amérique) collabore avec l'équipe du Pr. James MARKS pour isoler des anticorps recombinants neutralisant BoNT/A, B, C, D et E. Pour financer ces travaux Xoma a signé des contrats d'une valeur totale de 120 millions de dollars avec le *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* et Xoma 3AB, un mélange de trois anticorps neutralisant BoNT/A, est actuellement en phase I d'essais clinique (étude N°NCT01357213).

Dans notre cas, notre stratégie nous a conduits à développer un mélange de six anticorps (Tableau 15), donc le coût total de leur développement devrait dépasser celui du développement du Xoma 3AB. De tels financements nécessaires au développement clinique du mélange d'anticorps pourraient éventuellement être obtenus grâce à l'Agence Européenne de Défense (<http://www.eda.europa.eu/>). En effet, cette agence met en relation des laboratoires de recherches avec différents partenaires industriels ou institutionnels afin de soutenir des projets ayant un intérêt pour la défense européenne.



Phases précliniques		Phases cliniques				
Etudes <i>in vitro</i>	Etudes <i>in vivo</i> chez l'animal	Phase I Etude de tolérance	Pré-AMM		Post AMM	
			Phase II Etude de l'efficacité pharmacologique		Phase III Etude de l'efficacité thérapeutique	Phase IV Etudes de sécurité sanitaire post-commercialisation
			Ila	Ilb		
Recherche de molécules d'intérêt. Confirmation <i>in vitro</i> de l'efficacité de la molécule.	L'effet observé <i>in vitro</i> est étudié <i>in vivo</i> . Détermination de la dose maximale tolérée par l'animal, de la dose sans effet observable et de la dose sans effet toxique observable. Estimation des doses équivalentes chez l'Homme.	Etude de la tolérance de la molécule sur un nombre limité de personnes saines ou en impasse thérapeutique. (sauf pour l'oncologie où les molécules sont administrées directement à des malades). L'exposition à la molécule est courte. L'étude porte généralement sur 20 à 80 personnes.	Confirmation de l'efficacité pharmacologique, généralement sur 50 à 200 personnes saines. L'exposition à la molécule est courte et une seule dose est testée. Les molécules dont la toxicité est élevée, comme souvent en oncologie, entre directement en phase Ila et sont testées sur des malades.	Recherche de la dose optimale : effet thérapeutique maximale et effets secondaires minimaux. Etude de la meilleure voie d'administration, des interactions médicamenteuses et des effets secondaires. L'étude porte généralement sur 100 à 300 malades.	Le traitement est comparé à un placebo et aux éventuels autres traitements existant avant de confirmer qu'il confère un avantage thérapeutique plus important. Etudes sur plusieurs milliers de personnes.	Suivi à long terme de l'efficacité du traitement et de la survenue d'effets secondaires rares.
<b>Durée</b>	<b>Jusqu'à 6 ans</b>		<b>De 5 à 10 ans</b>			
<b>Coût moyen estimé</b>	<b>615 000 000 €</b>					

**Tableau 14 : Descriptif des essais cliniques.**

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché. En 2011 environ 420 études cliniques étaient en cours et elles incluaient approximativement 427 000 personnes. En moyenne, sur 5 000 molécules synthétiques candidates en phases préclinique seules cinq entrent en essais clinique et seule une obtient une AMM. Seules 40 % des molécules réussissent la phase I et la moitié d'entre elles seulement réussiront la phase II. (DiMasi, Hansen, & Grabowski, 2003)



Partie 6 : Perspectives et conclusion générale

Volet du projet	Construction de la banque		Criblage	Tests de neutralisation			Germinalisation	Expression en IgG entière	Test de protection <i>in vivo</i>	Valorisation scientifique	
	Immunogène	Diversité de la banque hyper-immune	Nombre de clones isolés	Neutralisation <i>in vitro</i>	Neutralisation <i>ex vivo</i>	Sous-type(s) neutralisé(s)				Diffusion des résultats aux praticiens	Publications
BoNT/A-HC	BoNT/A <sub>1</sub> -HC	1,9.10 <sup>7</sup>	64	ND	3	A <sub>1</sub> et A <sub>2</sub>	A1HC38				1 en cours de rédaction
BoNT/A-LC	BoNT/A <sub>1</sub> -LC	2,56.10 <sup>8</sup>	22	12	3	A <sub>1</sub>	SEM-120-IIIC1				1 accepté et 1 en cours
BoNT/B-HC	BoNT/B <sub>2</sub> -HC	1.10 <sup>8</sup>	10	ND	1	B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub>	B2.7				1 en cours de rédaction
BoNT/B-LC	BoNT/B <sub>2</sub> -LC	1,2.10 <sup>8</sup>	31	2	0	B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub>	BLC3				1 en cours de rédaction
BoNT/E-HC	BoNT/E <sub>3</sub> -HC	5,9.10 <sup>7</sup>	54	ND	0 (triplette en cours)						
BoNT/E-LC	BoNT/E <sub>3</sub> -LC	1.10 <sup>8</sup>	85	3	3	E <sub>3</sub>	ELC18				1 à soumettre

Tableau 15 : Bilan du projet AntiBotABE.

Vert : phases accomplies. Orange : phases en cours. Rouge : phases non débutées. ND : Non Déterminé.

### 6.3) Conclusion générale des travaux de thèse

Mes travaux de thèse ont été effectués au sein de l'Unité de Biotechnologies des Anticorps et des Toxines, qui est spécialisée dans l'isolement d'anticorps recombinants à partir de primates non humains. Des travaux précédents de notre laboratoire avait conduit à l'isolement d'anticorps neutralisant des agents du risque biologique provoqué comme la ricine et les toxines du charbon. Cette stratégie expérimentale a été celle utilisée durant ma thèse et elle m'a permis d'isoler des anticorps recombinants neutralisant les toxines botuliques.

Notre laboratoire a contribué à l'invalidation du brevet restreignant l'utilisation thérapeutique des anticorps de primates non humains dirigés contre des antigènes non humains, et les brevets limitant l'utilisation de la technologie des phages tendent à être eux aussi invalidés. Notre laboratoire pourra donc tirer partie de ce contexte juridique favorable pour élargir notre stratégie et isoler, à partir de primates non humains immunisés, des anticorps dirigés contre des antigènes humains, par la technologie d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages.

Notre unité est rattachée au CRSSA, structure qui sera dissoute au 1<sup>er</sup> juillet 2013. A partir de cette date notre centre de recherche sera déménagé sur le site de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) à Brétigny-sur-Orge. En attendant la fin de la construction des nouveaux laboratoires, notre laboratoire sera hébergé par un laboratoire d'accueil et nos travaux seront limités. Après cette période, nos travaux sur les agents du risque biologique provoqué pourront être poursuivis pour neutraliser de nouveaux agents, en ciblant les facteurs de virulences B5 et H3 de *Variola major* (agent de la variole) ou F1 et LcrV de *Yersinia pestis* (agent de la peste), par exemple.

# *Annexes*

# *Article de revue*

**Article de revue :**  
**Développement d'anticorps dirigés contre les toxines du**  
**risque biologique provoqué**  
*Article publié, co-auteur*

**Introduction de l'article de revue :**

La prise en charge effective du risque biologique provoqué est considérée comme une priorité. Les anticorps peuvent être utilisés pour cette prise en charge, puisque plusieurs travaux ont décrit l'isolement d'anticorps neutralisant les agents de ce risque, qui comptent en particulier différentes toxines, comme les toxines botuliques, la toxine létale du bacille du charbon et la ricine. Les affinités des anticorps neutralisant ces toxines doivent être élevées afin que les complexes anticorps-toxine formés ne se dissocient pas, neutralisant ainsi l'activité de la toxine jusqu'à l'élimination de ces complexes par l'organisme. Les banques immunes permettent d'isoler des anticorps dont les affinités sont généralement supérieures à celles des anticorps isolés à partir de banques naïves, donc elles peuvent être préférées pour l'isolement de tels anticorps neutralisants. Par exemple, Amersdorfer *et al* ont constaté que les scFv qu'ils avaient isolés à partir d'une banque immune construite à l'occasion de l'essai clinique d'un vaccin, présentaient des affinités pour BoNT/A qui étaient jusqu'à 60 fois meilleures que celles des scFv isolés à partir d'une banque naïve. (Peter Amersdorfer *et al.*, 2002) Comme il n'est que rarement possible d'immuniser des volontaires humains avec des agents du risque biologique provoqué, une approche originale tirant parti de la proximité phylogénétique entre les primates non humains et l'Homme, a été développée et elle consiste à immuniser ces animaux avec un antigène d'intérêt. Les primates non humains utilisés pour l'immunisation sont maintenus dans des conditions ne les exposant pas aux antigènes non pertinents et effectivement, avant immunisation, aucune amplification des régions d'ADN codant les domaines variables des anticorps, n'est observée. Ils sont ensuite immunisés itérativement avec un antigène, éventuellement mélangé à un adjuvant fort, jusqu'à obtenir un titre élevé qui n'augmente plus lors de nouvelles injections et une telle réponse est dite "hyper-immune". Ces injections successives permettent aux anticorps de subir le processus de maturation d'affinité *in vivo*, améliorant ainsi leur affinité. Les banques d'anticorps construites à partir de ces primates non-humains sont dites "hyper-immunes" et elles comportent des

anticorps de haute affinité, spécifiques de l'immunogène, qu'il est possible d'isoler par la technique de *phage-display*.

L'une des limites liée à l'utilisation thérapeutique des anticorps est dépendante de la brièveté de leur fenêtre thérapeutique. En effet, les anticorps ne peuvent pas franchir les membranes plasmiques des cellules donc, après pénétration des toxines dans leurs cellules cibles, ils deviennent inefficaces. Néanmoins, les anticorps peuvent être utilisés de façon prophylactique afin de protéger les personnes, comme les militaires, dont le risque d'exposition vis-à-vis de ces agents est élevé. Une telle utilisation requière des anticorps dont la nature est la plus humaine possible, afin qu'ils soient bien tolérés et donc que leur demi-vie soit suffisamment longue pour réduire la fréquence d'administration. A cette fin, différentes générations successives d'anticorps recombinants ont été développées, dans le but de réduire de plus en plus la proportion d'acides aminés non-humains qu'ils contiennent. Les anticorps isolés à partir de primates non humains immunisés peuvent aussi être humanisés pour augmenter leur tolérance. Parmi les différentes techniques d'humanisation existantes, la "germinalisation" consiste à muter les résidus de l'anticorps d'intérêt qui sont différents de la séquence germinale de l'anticorps humain le plus proche, pour les remplacer par les acides aminés humains correspondant si ceux-ci ne diminuent pas l'affinité de l'anticorps pour sa cible (*cf paragraphe "2.2.3) La 2ème génération d'anticorps : les anticorps humanisés"*). En fonction du nombre de mutation qu'il est possible d'introduire, les anticorps germinalisés pourraient devenir aussi bien tolérés que les anticorps humains, leur permettant d'avoir une demi-vie pouvant aller jusqu'à 21 jours, qui est compatible avec une utilisation prophylactique.

## Development of Anti-Toxins Antibodies for Biodefense

Thibaut Pelat<sup>1</sup>, Arnaud Avril<sup>1</sup>, Siham Chahboun<sup>1</sup>, Jacques Mathieu<sup>2</sup> and Philippe Thullier<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unité de biotechnologies des anticorps et des toxines, Département de biologie des agents transmissibles, Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA-SSA), 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche, France

<sup>2</sup>Département de biologie des agents transmissibles, Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA-CRSSA), 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche, France

### Abstract

Antibodies (Abs) may significantly improve the outcome of diseases caused by toxins of military interest, in particular ricin and botulinum toxins. The efficacy of Abs to neutralize ricin was demonstrated *in vivo* utilizing Abs of animal origin but recombinant antibodies (rAbs), which would be better tolerated, are preferred for clinical use. Animal Abs are utilized at present as medical countermeasure to neutralize botulinum toxins, but they show limitations and rAbs are also preferred for this clinical use. Of note, anthrax is an infective disease depending on toxins for its pathogenicity, and it was demonstrated that anti-anthrax toxins Abs could be of benefit when used as adjunct to antibiotics. We used an original strategy, starting from libraries derived from lymphocytes of non-human primates (NHP) immunized with the toxin of interest, to isolate Abs directed against all these toxins. The libraries are screened by the phage-display technology to isolate the best candidates, which are then tested for their toxin neutralization properties. Abs neutralizing the anthrax lethal toxin (35PA83, 2LF) and ricin (43RCA) have been isolated and at present, Abs neutralizing the botulinum toxins (BoNT) A, B and E are being isolated.

**Keywords:** Antibodies; Anthrax toxins; Ricin; Botulinum toxins; Humanization.

**Abbreviations:** scFv: Single chain Fv; Fab: Fragment antigen-binding; Ig: Immunoglobulin; PA: Protective antigen; LF: Lethal factor; LT: Lethal toxin.

### Introduction

Antibodies of animal origin have been utilized to demonstrate the efficacy of Abs to neutralize toxins, but their use in clinics is limited by their poor tolerance [1], as is the case for the treatment of botulism. The functional equivalents of these animals Abs should be developed in their recombinant form, a class of therapeutic molecules which is presently growing at a rapid pace. The good tolerance of rAbs is the result of their nature, which has become increasingly human over the three successive generations of rAbs – chimerized Abs, humanized Abs and human Abs - that have been introduced in clinical use [2]. The majority of these rAbs are focused against oncological and auto-immune diseases, but recent clinical trials showed an increasing interest in the field of toxin inhibitors and anti-infective drugs [3]. Defense against deliberately caused biological attack (or biodefense) may benefit from the emergence of this new therapeutic class, since Abs have proved to be protective in models of the six diseases often considered most at risk of being caused intentionally [4-5]: ricin poisoning [6], botulinum neurotoxins (BoNTs) [7], anthrax [8], plague [9], tularemia [10] and smallpox [11]. Ricin is a lethal toxin that inhibits protein synthesis. It is easily extracted from an ubiquitously grown plant, *Ricinus communis*, and thus readily available for use as a bioweapon [12]. BoNTs are regarded as the most toxic substances on Earth, causing naturally-occurring food poisoning, and reaching LD50 values equal to 1 ng/kg for the intravenous and subcutaneous routes or 3 ng/kg for the pulmonary route [13]. *Bacillus anthracis*, the agent responsible of anthrax, secretes a toxin on which it relies for pathogenesis, and Abs targeting this toxin improve the outcome of the disease.

### Obtaining therapeutic antibodies: a review of existing strategies, from polyclonal antibodies to the third generation of recombinant antibodies

The sera obtained after immunization of animals were used in

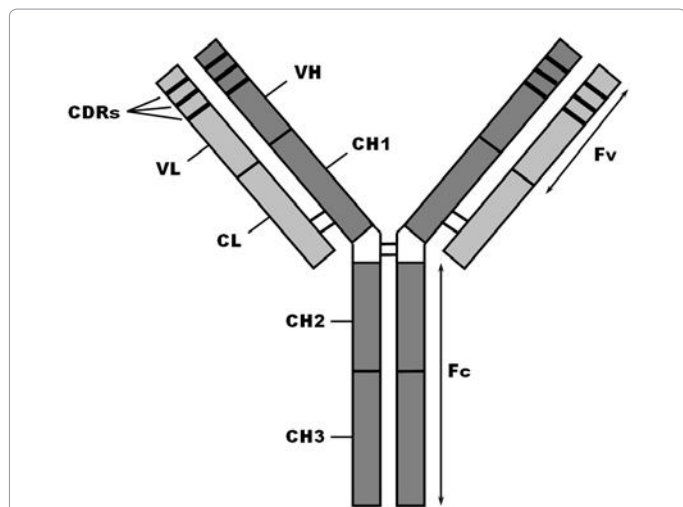
medicine from the late 18th century. This use was recognized by the first Nobel Prize for Medicine, which was awarded to a German military doctor, Emil von Behring, for developing a serum therapy against diphtheria and tetanus toxins. The benefit of these sera was, however, greatly limited by major intolerance phenomena since they consist of proteins that the human body recognizes as foreign, and which trigger deleterious immune responses, aimed at their elimination. In the mid-20th century, cell biology allowed the isolation of Abs called monoclonal antibodies (mAbs) because each one is secreted identically by one clone of cells, representing in this respect the opposite of polyclonal sera. Hybridoma technology is the technical support for isolating such mAbs, and it earned Köhler and Milstein the Nobel Prize for Medicine in 1984, which was shared with Jerne. MABs, which are usually immunoglobulins G (IgG, Figure 1), afford advantages in terms of reproducibility and are major research tools. However, these products have hardly contributed anything to medicine due to their animal origin (mostly murine), causing similar intolerance problems as seen with the use of polyclonal sera. At the end of the 20th century, molecular biology techniques made it possible to chimerize and then humanize these murine mAbs, that is, to obtain Abs derived from the previous ones but whose regions of animal origin have been reduced to improve their tolerance (Figure 2). The Abs obtained by these molecular techniques were named recombinant Abs (rAbs), reflecting the fact that DNA from different sources has been combined into a single molecule. The regions of animal origin that have been preserved are those that interact closely with the antigen, i.e. the variable regions

**\*Corresponding author:** Philippe Thullier, Unité de biotechnologies des anticorps et des toxines, Département de biologie des agents transmissibles, Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA-CRSSA), 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche, France, E-mail: [pthullier@yahoo.com](mailto:pthullier@yahoo.com)

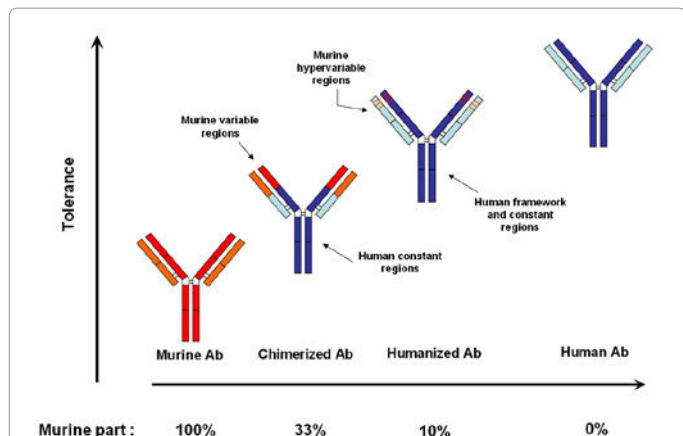
**Received** September 15, 2011; **Accepted** November 15, 2011; **Published** November 18, 2011

**Citation:** Pelat T, Avril A, Chahboun S, Mathieu J, Thullier P (2011) Development of Anti-Toxins Antibodies for Biodefense. J Bioterr Biodef S7:001. doi:10.4172/2157-2526.S7-001

**Copyright:** © 2011 Pelat T, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



**Figure 1:** Immunoglobulin G (IgG). IgG consists of four polypeptide chains, two light chains (L) and two heavy chains (H). Each light chain is linked to a heavy chain by a disulphide bridge and the two heavy chains are also linked to each other by disulphide bridges in the hinge region of the molecule. Comparison of the peptide sequences of the heavy and light chains was able to differentiate two regions: the variable part representing the binding site for Ag (Fv) and the constant part, which gives IgG its effector properties (Fc). A more accurate analysis of the peptide sequences showed that they contained several counterpart units: 2 for L and 2 for H. For L one can distinguish a variable domain (VL) and a constant domain (CL), and for H a variable domain (VH) and three constant domains (CH1, CH2 and CH3). The combination between a VH domain and the adjacent variable domain VL forms the recognition site for Ag. The antigen binding site is formed by six loops, three on the surface of VL and 3 on the surface of VH, called hypervariable regions or CDRs.



**Figure 2:** Murine, chimerized, humanized and human Abs. In red and orange, the portions of murine origin of the H and L chains respectively, in dark blue and light blue portions of human origin of the H and L chains respectively.

in the case of chimerized Abs, or the smaller hypervariable regions in the case of humanized Abs. At the end of the 20th century, two different technological advances made it possible to isolate rAbs independently of animal origin, paving the way for the third generation of rAbs, the fully human Abs. The first of these technological advances was the replacement of the murine chromosomal locus encoding the Abs with its human counterpart, to obtain so-called humanized mice [14,15]. The second was to obtain several very large-sized sets of Abs fragments (scFv or Fab, see Figure 3) called “naïve” libraries (1010 or 1012 clones) [16,17], essentially recapitulating the primary immune

response depending on IgMs and directed against all antigens. These libraries can be screened through phage-display technology. However, naïve libraries and humanized mice are very expensive as they were generally developed by private companies (Morphosys in Germany, CAT in Great Britain and Dyax in the United States for naïve libraries; Medarex in the United States and Kirin in Japan for humanized mice), none of which are French and we have sought to become independent to develop rAbs for biodefense.

An alternative to naïve libraries is the production of immune libraries deriving from human subjects immunized against the target pathogen. Unlike naïve libraries, one immune library must be built for each of these agents but immune libraries are smaller in size (about 108 clones) than naïve libraries. The advantage of these immune libraries is that they recapitulate the secondary immune response, depending on IgG and thus use the affinity maturation process allowed by the immune system. This is in opposition to naïve libraries, whose Abs often have to be improved by *in vitro* mutation techniques. It is important to note that the phage-display technology makes it possible to only isolate antibody fragments (scFv or Fab, Figure 3), corresponding to the variable regions [18]. The affinity and neutralizing properties of these Ab fragments can be assessed *in vitro*. To be tested *in vivo*, these Ab fragments have to be expressed in fusion with Ab constant regions to obtain whole immunoglobulins G (IgGs), which have a sufficient half-life for these tests.

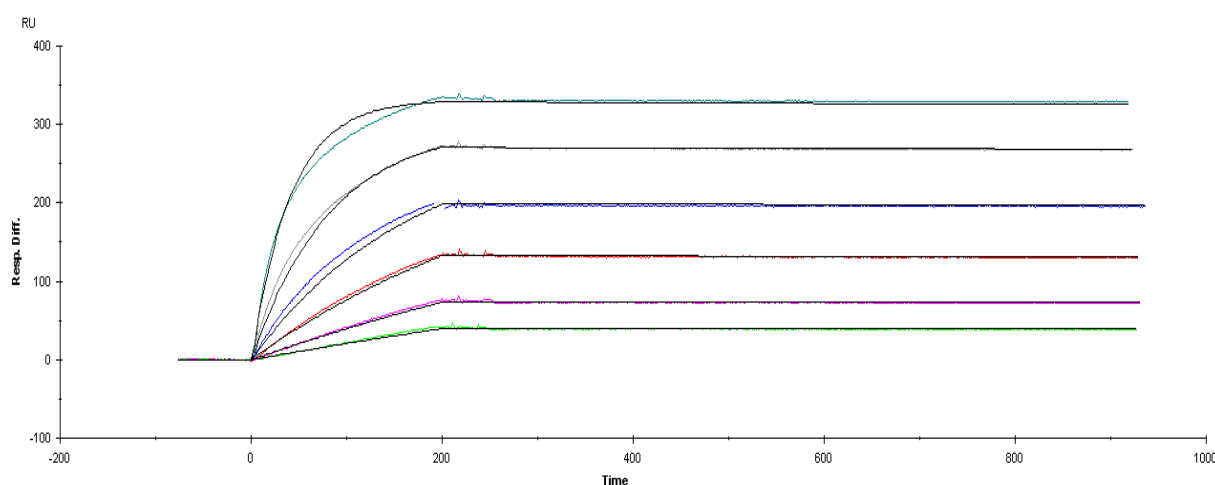
### Obtaining therapeutic antibodies for the treatment of toxin-induced diseases belonging to the biological risk by our unit: use of immune libraries derived from NHP

In general, but especially in the case of biodefense and bioterrorism, construction and use of immune libraries is limited by the lack of immunized human subjects, who would be donors of lymphocytes to be used for the construction of these libraries. Macaques (*Macaca fascicularis*) are primates close to humans and their Abs can be expected to also be close to human Abs [19]. The macaque locus encoding Abs is greater than that of humanized mice, and thus allows for greater diversity and better affinity [20]. In the absence of immunized human donors of lymphocytes and for ethical, theoretical and practical reasons, it is thus advisable to use macaques for the construction of immune libraries. With this approach, we first obtained a Fab fragment directed against tetanus toxin, regarded as a model toxin [21]. Then, using antigens of military interest, we obtained the Fab 35PA83 directed against the protective antigen (PA), one of the two sub-units of the anthrax lethal toxin (LT). Fab 35PA83 presented a high affinity (3.4 nM) and effectively neutralized LT in the standardized neutralization test (IC50 = 5.6 nM) [22]. It was shown that Fab 35PA83 inhibits the interaction of PA with the second toxin sub-unit, blocking the formation of the toxin itself. The affinity of Fab 35PA83 was improved *in vitro* [23], then the Fab was expressed as a full-sized IgG whose affinity for the protective antigen (PA) was measured as 0.02 nM (Figure 4). Raxibacumab®, a recombinant IgG developed for therapeutic purposes against anthrax, has the same target than IgG 35PA83 and is currently stockpiled under the Bioshield program in the US. It bound its antigen with a 2.78 nM affinity [24]. Anthim® and Thravixa®, other comparable recombinant antibodies also under clinical development, showed affinities of respectively 0.33 nM [25] and 0.08 nM [26] for PA, so it appears that IgG 35PA83 presents the best affinity among those antibodies. IgG 35PA83 neutralization capacity was first tested in a model of anthrax where the A/J strain of mice was utilized. A/J mice lack complement so that the Sterne anthrax strain, which lacks a capsule and is generally





**Figure 3:** Ab fragments smaller in size than a whole Ab can be produced efficiently in *E. coli* and thus they prove to be better suited to laboratory studies. Stable Fab fragments (50 kDa as against 150 kDa for the whole Ab) have been developed, both chains are kept in the form of heterodimers by the interactions between the variable domains of the heavy and light chains (VH and VL), but above all, by disulphide bridges between the constant domains (CH1 and CL). Smaller fragments called ScFv (25 kDa), consisting of only one VH and one VL linked by a peptide bond (or "linker"), were also developed.



**Figure 4:** Measurement of IgG 35PA83 affinity for PA. The affinity of the full-sized IgG 35PA83, deriving from the Fab 35PA83, was measured by surface plasmon resonance using a Biacore X instrument (Biacore, Uppsala, Sweden). A CM5 sensor chip (Biacore) was utilized and around 1000 RU of IgG 35PA83 were immobilized. Sensorgrams were obtained after injections of 41.7 to 1.3 nM of PA83, and analysed using the BIAevaluation software (Biacore). Association ( $k_a$ ) and dissociation constants ( $k_d$ ) were measured as  $k_a = 5.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and  $k_d = 1.36 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  resulting in a  $KD = 2.32 \times 10^{-11} \text{ M}$ . Experiments using a long dissociation allowed to obtain the equivalent KD value of  $2.6 \times 10^{-11} \text{ M}$ .

regarded as vaccinal, is lethal in these mice. The validity of this model, usable in a level 2 safety laboratory only, is well accepted [27]. In this model, IgG 35PA83 demonstrated its ability to increase the therapeutic window and shorten the duration of antibiotherapy of anthrax.

In effect, it was showed that when antibioprophyllaxis using doxycycline was performed for only 7 days after exposure to anthrax, the mice died soon after this treatment was stopped. However, when 35PA83 IgG (2 mg/kg) was added to the antibioprophyllaxis on the 7th day, all mice survived. Also, when a treatment exclusively consisting of ciprofloxacin was started 12 hours after exposure to anthrax, no animal survived. When 35PA83 IgG was added to ciprofloxacin, 80% of the animals survived, corresponding to an increased therapeutic window. IgG 35PA83 was also tested in a second anthrax model utilizing New Zealand rabbits, infected with a lethal strain of anthrax isolated in a fatal human case in France [28], thus requesting a level 3 safety laboratory. In this model, which is standard for testing antibody efficacy against anthrax, a single dose of 2.5 mg/kg of IgG 35PA83 co-administered with the spores protected all infected animals. In this rabbit model but using another lethal strain of anthrax (Ames), 40mg/kg of Raxibacumab®, or doses of 4 mg/kg of Anthima® or of Thrivixa® [29], were requested for an equivalent result thus also reflecting an apparently greater efficacy of IgG 35PA83. Isolation of the following

Fab fragments was marked by difficulties related to the instability of the libraries, and we moved to produce Ab fragments in scFv format, which is smaller than the Fab format (Figure 3). This has enabled us to isolate an scFv, 2LF, neutralizing the LT but directed against its second sub-unit, the lethal factor (LF), in accordance with the anthrax experts recommendations for future treatments [30,31]. 2LF development aims at preventing any risk of LT escaping anti-PA antibodies, by natural or induced mutation. Synergies with the anti-PA will be tested, given that such synergies between anti-PA and anti-LF have already been observed [32]. ScFv 2LF has a high affinity to LF ( $KD = 1.02 \text{ nM}$ ) and is highly neutralizing in the standardized *in vitro* assay as well as *in vivo* assay [31]. Its epitope was localized in the domain I of LF and thus 2LF inhibits the formation of the LF-PA complex, i.e. the LT formation. 2LF was the first recombinant fragment of Ab having this activity and it has just been expressed in the form of IgG for *in vivo* testing, similarly as for the IgG derived from Fab 35PA83. In addition, we isolated an scFv, 43RCA, of very high affinity to ricin toxin ( $KD = 40 \text{ pM}$ ), which is one of the best affinities ever published without *in vitro* maturation. ScFv 43RCA neutralized ricin *in vitro* and *in vivo* [33]. This scFv was expressed as IgG and tested in mice intoxicated by instillation of ricin. IgG 43RCA, also administered by instillation, remained completely effective 6 hours after this intoxication (Pr K.-M. Chu-Wang, University of Medicine, New York, USA, personal

communication). Recently, we received European funding for a project, AntibotABE ([www.antibotabe.com](http://www.antibotabe.com)), aimed at isolating scFvs against the heavy chain (Hc region) and the light chain of the three botulinum toxin serotypes highly pathogenic for humans, BoNT/A, B and E. The same strategy as previously will be utilized. The AntiBotABE consortium consists of nine partners, academic teams and private companies from four different countries, and aims at expressing these scFvs as recombinant IgGs, of potential value for biodefense in four years. Until now, NHP immune libraries directed against Hc fragments of BoNT/A, B, E and the light chain of BoNT/A have been panned, and neutralizing scFvs are sought among the most affine candidates. Macaques are still undergoing immunization with the light chain of BoNT/B.

### Engineering of NHP antibodies: presentation and clinical value of germline humanization, towards the fourth generation of recombinant antibodies?

Our strategy is very efficient to isolate neutralizing Abs, which however are not human but derive from NHPs. We have shown that there are differences between human and NHP Abs, so that NHP Abs have to be humanized [34,35]. For this humanization, we use human germline sequences as templates because they are part of the human immunological self and should thus be optimally tolerated. This is in opposition to human IgGs, which are mutated during the affinity maturation process and do not represent molecules that are always well tolerated, as shown recently by adalimumab [36,37]. Our approach is thus to “germline-humanize” i.e. to mutate Ab variable regions to make them closer to human germline sequences. For instance the framework regions of parental 35PA83, which were 87.6% identical to their closer human germline sequences (retrieved using IMGT tools [38]), were germline-humanized, resulting in a degree of identity increased to 97.8% [39]. The germline-humanized version of 35PA83 is thus very similar to human germline sequences and likely to be very well tolerated, while retaining its affinity and its neutralization properties. An identical process was applied to 2LF and 43RCA with similar promising results. On the particular case of 43RCA, it was verified by Antitope (Cambridge, United Kingdom) that germline-humanization had suppressed all T epitopes, and the immunogenicity of the germlinized 43RCA in Humans was therefore predicted to be also suppressed. Multiple injections of germline-humanized Abs should not raise an immune response so that these Abs could be used for prophylaxis. In fact, germline-humanized Abs could represent the fourth generation of rAbs.

### Conclusion

Antibodies neutralizing ricin, anthrax toxins and more recently botulinum 203 toxins have been isolated by a strategy consisting of building and screening phage-displayed libraries derived from immunized macaques, then of humanizing the best candidates. The excellent tolerance of our antibodies should allow them to be used not only for therapy, but also for prophylaxis.

### Acknowledgments

This review was made possible by Direction Générale de l'Armement funding, under n° 09co302-1.

### References

1. Black RE, Gunn RA (1980) Hypersensitivity reactions associated with botulinum antitoxin. *Am J Med* 69: 567-570.

2. Bellet D, Dangles-Marie V (2005) [Humanized antibodies as therapeutics] *Med Sci (Paris)* 21: 1054-1062.
3. Pai JC, Sutherland JN, Maynard JA (2009) Progress towards recombinant anti-infective antibodies. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 4: 1-17.
4. Thullier P, Pelat T, Vidal D (2009) [Recombinant antibodies against bioweapons]. *Med Sci (Paris)* 25: 1145-1148.
5. Froude JW, Stiles B, Pelat T, Thullier P (2011) Antibodies for biodefense. *mAbs* 3: 517-527
6. Pratt TS, Pincus SH, Hale ML, Moreira AL, Roy CJ, et al. (2007) Oropharyngeal aspiration of ricin as a lung challenge model for evaluation of the therapeutic index of antibodies against ricin A-chain for post-exposure treatment. *Exp Lung Res* 33: 459-481.
7. Rodriguez GC, Geren IN, Lou J, Conrad F, Forsyth C, et al. (2011) Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin. *Protein Eng Des Sel* 24: 321-331.
8. Subramanian GM, Cronin PW, Poley G, Weinstein A, Stoughton SM, et al. (2005) A phase 1 study of PAmAb, a fully human monoclonal antibody against *Bacillus anthracis* protective antigen, in healthy volunteers. *Clin Infect Dis* 41: 12-20.
9. Xiao X, Zhu Z, Dankmeyer JL, Wormald MM, Fast RL, et al. (2010) Human anti-plague monoclonal antibodies protect mice from *Yersinia pestis* in a bubonic plague model. *Plos one* 5: e13047.
10. Lu Z, Roche MI, Hui JH, Unal B, Felgner PL, et al. (2007) Generation and characterization of hybridoma antibodies for immunotherapy of tularemia. *Immunol Lett* 112: 92-103.
11. McCausland MM, Benhnia MR, Crickard L, Laudenslager J, Granger SW, et al. (2010) Combination therapy of vaccinia virus infection with human anti-H3 and anti-B5 monoclonal antibodies in a small animal model. *Antivir Ther* 15: 661-675.
12. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J (2005) Ricin poisoning: a comprehensive review. *Jama* 294: 2342-2351.
13. Gill DM (1982) Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* 46: 86-94.
14. Bruggemann M, Neuberger MS (1996) Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice. *Immunol Today* 17: 391-397.
15. Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, et al. (2000) Double trans chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 722-727.
16. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, et al. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 14: 309-314.
17. Little M, Welschof M, Braunagel M, Hermes I, Christ C, et al. (1999) Generation of a large complex antibody library from multiple donors. *J Immunol Methods* 231: 3-9.
18. Barbas CF (2001) Phage display : a laboratory manual. Cold Spring Harbor NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
19. Andris-Widhopf J, Steinberger P, Fuller R, Rader C, Barbas CF (2001) Protocol 9.36: Libraries of nonhuman primate antibody fragments. In *Phage display : a laboratory manual*. Edited by Barbas CF. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
20. Pelat T, Hust M, Thullier P (2009) Obtention and engineering of non-human primate (NHP) antibodies for therapeutics. *Mini Rev Med Chem* 9: 1633-1638.
21. Chassagne S, Laffly E, Drouet E, Herodin F, Lefranc MP, et al. (2004) A high-affinity macaque antibody Fab with human-like framework regions obtained from a small phage display immune library. *Mol Immunol* 41: 539-546.
22. Laffly E, Danjou L, Condemine F, Vidal D, Drouet E, et al. (2005) Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralize the protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* by binding to the segment of PA between residues 686 and 694. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3414-3420.

23. Laffly E, Pelat T, Cedrone F, Blesa S, Bedouelle H, et al. (2008) Improvement of an antibody neutralizing the anthrax toxin by simultaneous mutagenesis of its six hypervariable loops. *J Mol Biol* 378: 1094-1103.
24. Mazumdar S (2009) Raxibacumab. *Mabs* 1: 531-538.
25. Mohamed N, Clagett M, Li J, Jones S, Pincus S, et al. (2005) A high-affinity monoclonal antibody to anthrax protective antigen passively protects rabbits before and after aerosolized *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infect Immun* 73: 795-802.
26. Sawada-Hirai R, Jiang I, Wang F, Sun SM, Nedellec R, et al. (2004) Human anti-anthrax protective antigen neutralizing monoclonal antibodies derived from donors vaccinated with anthrax vaccine adsorbed. *J Immune Based Ther Vaccines* 2: 5.
27. Welkos SL, Keener TJ, Gibbs PH (1986) Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 51: 795-800.
28. Berthier M, Fauchere JL, Perrin J, Grignon B, Oriot D (1996) Fulminant meningitis due to *Bacillus anthracis* in 11-year-old girl during Ramadan. *Lancet* 347: 828.
29. Froude JW, Stiles B, Pelat T, Thullier P (2011) Antibodies for biodefense. *Mabs* 3: 517-527.
30. Baillie LWJ (2006) Past, imminent and future human medical countermeasures for anthrax. *J Appl Microbiol* 101: 594-606.
31. Pelat T, Hust M, Laffly E, Condemine F, Bottex C, et al. (2007) High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2758-2764.
32. Brossier F, Levy M, Landier A, Lafaye P, Mock M (2004) Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect Immun* 72: 6313-6317.
33. Pelat T, Hust M, Hale M, Lefranc MP, Dubel S, et al. (2009) Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC Biotechnol* 9: 60.
34. Thullier P, Huish O, Pelat T, Martin AC (2010) The humanness of macaque antibody sequences. *J Mol Biol* 396: 1439-1450.
35. Thullier P, Chahboun S, Pelat T (2010) A comparison of human and macaque (*Macaca mulatta*) immunoglobulin germline V regions and its implications for antibody engineering. *Mabs* 2: 528-538.
36. Bartelds GM, de Groot E, Nurmohamed MT, Hart MH, van Eede PH, et al. (2010) Surprising negative association between IgG1 allotype disparity and anti-adalimumab formation: a cohort study. *Arthritis Res Ther* 12: R221.
37. Van Schouwenburg PA, Bartelds GM, Hart MH, Aarden L, Wolbink GJ, et al. (2010) A novel method for the detection of antibodies to adalimumab in the presence of drug reveals "hidden" immunogenicity in rheumatoid arthritis patients. *J Immunol Methods* 362: 82-88.
38. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP (2004) IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res* 32: W435-440.
39. Pelat T, Bedouelle H, Rees AR, Crennell SJ, Lefranc MP, et al. (2008) Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by *in vitro* and *in silico* engineering. *J Mol Biol* 384: 1400-1407.

This article was originally published in a special issue, **LC-MS Drug discovery & development** handled by Editor(s). Dr. Chengjie Ji, Groton Laboratories, USA

### Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

#### Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

#### Special features:

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: [www.omicsonline.org/submission](http://www.omicsonline.org/submission)

### Conclusion de l'article de revue :

Cette revue représente une introduction directe aux travaux expérimentaux présentés ci-après, puisqu'elle décrit la stratégie utilisée dans notre unité pour isoler des anticorps recombinants et qu'elle présente les anticorps déjà obtenus par cette stratégie. A partir de trois macaques immunisés avec l'une des deux sous-unités constitutives de la toxine létale du bacille du charbon (le facteur létal, *Lethal Factor*, LF ou l'antigène protecteur, *Protective Antigen*, PA) ou avec la ricine, trois banques hyper-immunes ont été construites puis criblées par la technologie d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages. Le Fab 35PA83, isolé dans notre laboratoire à partir de l'une de ces banques, présente une affinité de 3,4 nM pour la sous-unité PA alors que l'affinité des premiers scFv publiés, isolés à partir d'une banque naïve humaine, était de 50 nM, au mieux. (N. M. Cirino *et al.*, 1999) Le Fab 35PA83 neutralise la toxine létale avec une  $CI_{50}$  de 5,6 nM dans le test standardisé de neutralisation *in vitro*. Il a été converti en IgG entière, dont l'affinité pour la sous-unité PA a été mesurée à 0,02 nM, et une dose de 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> de cette IgG, co-administrée avec 100 DL<sub>50</sub> de spores d'une souche virulente du bacille du charbon, protège l'ensemble des animaux. Cette affinité est meilleure que celle des trois anticorps recombinants neutralisant la toxine létale en ciblant la sous-unité PA actuellement essais cliniques, dont les affinités sont de 0,082 nM (Thravaxia<sup>®</sup>), 0,33 nM (Anthim<sup>™</sup>) et 2,78 nM (Raxibacumab<sup>®</sup>). Compte tenu des résultats favorables de 2LF, afin de permettre à la France de ne pas être dépendante des anticorps neutralisant la toxine létale du bacille du charbon développés par d'autres pays, la Direction Générale de l'Armement finance actuellement le développement clinique de cette IgG.

Jusqu'en 2007 seuls des anticorps ciblant la sous-unité PA avaient été isolés, donc des agresseurs potentiels peuvent muter intentionnellement cette sous-unité afin de rendre inefficaces l'ensemble des anticorps disponibles. L'une des parades possible est d'isoler des anticorps neutralisant la toxine létale en ciblant LF, et notre laboratoire a été le premier, en 2007, à avoir isolé un tel fragment d'anticorps : le scFv 2LF. Ce scFv, isolé à partir d'un macaque immunisé avec la sous-unité LF, a une affinité pour la sous-unité LF de 1,02 nM, et il est le premier scFv isolé à neutraliser *in vitro* ( $CI_{50}=1,20 \pm 0,06$  nM) et *in vivo* la toxine létale en ciblant cette sous-unité.

Cette même stratégie a été appliquée avec succès pour isoler l'anticorps 43RCA dont l'affinité pour la ricine est de 40 pM, soit l'une des meilleures affinités obtenues pour un anticorps recombinant isolé par la technologie d'exposition à la surface des phages, et n'ayant pas été soumis à un processus de maturation d'affinité *in vitro*. Cet anticorps neutralise la

ricine avec une  $CI_{50}$  de  $23 \text{ ng.ml}^{-1}$ , c'est à dire avec un rapport molaire [scFv]/[ricine] de 4/1, qui est favorable.

L'utilisation de cette même stratégie a été proposée, dans le cadre du projet AntiBotABE, pour isoler des anticorps recombinants dirigés contre les toxines botuliques A, B et E.

*Présentations  
des travaux  
lors de congrès*

## Présentations orales :

---

**Arnaud Avril**, Siham Chahboun, Thibaut Pelat, Michael Hust, Dorothea Sesardic, Christine Rasetti-Escargueil, Rob Tierney, Yvonne Liu, Philippe Thullier.

*Isolation of several scFv of non-human primate origin, neutralizing type E botulinum toxin by targeting its light chain.*

Journée de la recherche médicale de Grenoble 2013, 7 juin 2013, La Tronche-Grenoble.

**Arnaud Avril**, Thibaut Pelat, Michael Hust, Siham Chahboun, Estelle Mosca, Stefan Dübel, Philippe Thullier.

*Isolation of scFv neutralizing type E botulinum toxin and targeting its heavy chain.* Congrès Congrès "Anticorps et Ciblage Thérapeutique" (ACITH), 19-21 septembre 2011, Strasbourg-Illkirch.

## Communications affichées :

---

**Arnaud Avril**, Siham Chahboun, Thibaut Pelat, Michael Hust, Dorothea Sesardic, Christine Rasetti-Escargueil, Rob Tierney, Yvonne Liu, Philippe Thullier.

*Isolation of several scFv of non-human primate origin, neutralizing type E botulinum toxin by targeting its light chain.*

Journée de la recherche médicale de Grenoble 2013, 7 juin 2013, La Tronche-Grenoble.

**Arnaud Avril**, Thibaut Pelat, Michael Hust, Siham Chahboun, Estelle Mosca, Stefan Dübel, Philippe Thullier.

*Isolement de scFvs neutralisants les toxines botuliques A et E via le ciblage de leurs chaînes lourdes.*

Séminaire du département de microbiologie, 15 et 16 octobre 2012, Val-de-Grâce, Paris.

**Arnaud Avril** Thibaut Pelat, Siham Chahboun, Estelle Mosca, Philippe Thullier.

*Isolement de scFvs neutralisants les toxines botuliques A et E via le ciblage de leurs chaînes lourdes.*

Biennale de la recherche de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 26-28 juin 2012.

**Arnaud Avril**, Thibaut Pelat, Michael Hust, Siham Chahboun, Estelle Mosca, Stefan Dübel, Philippe Thullier.

*Isolation of scFv neutralizing type E botulinum toxin and targeting its heavy chain.*

Journée de la biologie de l'université Joseph Fourier, 3 novembre 2011, Grenoble-Saint-Martin-d'Hère.

**Arnaud Avril**, Thibaut Pelat, Michael Hust, Siham Chahboun, Estelle Mosca, Stefan Dübel, Philippe Thullier. *Isolation of scFv neutralizing type E botulinum toxin and targeting its heavy chain.* Congrès "Anticorps et Ciblage Thérapeutique" (ACITH), 19-21 septembre 2011, Strasbourg-Illkirch.

# *Références*



A

- Aaron, Z. (2001, November 26). Taking a Germ Bullet. *Los Angeles Times*. Los Angeles.
- Abdel-Aziz. (1996). *The mujahideen poisons handbook*. Retrieved from [http://gliftor.dead-planet.net/chemical-terrorism/pdfs/Mujahideen\\_Poisons.pdf](http://gliftor.dead-planet.net/chemical-terrorism/pdfs/Mujahideen_Poisons.pdf)
- Abhinandan, K. R., & Martin, A. C. R. (2007). Analyzing the “degree of humanness” of antibody sequences. *Journal of molecular biology*, 369(3), 852–62. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.100
- Adams, G. P., Schier, R., Marshall, K., Wolf, E. J., McCall, A. M., Marks, J. D., & Weiner, L. M. (1998). Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer research*, 58(3), 485–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9458094>
- Adams, G. P., Schier, R., McCall, A. M., Crawford, R. S., Wolf, E. J., Weiner, L. M., & Marks, J. D. (1998). Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *British journal of cancer*, 77(9), 1405–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2150193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Adekar, S. P., Jones, R. M., Elias, M. D., Al-Saleem, F. H., Root, M. J., Simpson, L. L., & Dessain, S. K. (2008). Hybridoma populations enriched for affinity-matured human IgGs yield high-affinity antibodies specific for botulinum neurotoxins. *Journal of immunological methods*, 333(1-2), 156–66. doi:10.1016/j.jim.2008.01.015
- Adekar, S. P., Takahashi, T., Jones, R. M., Al-Saleem, F. H., Ancharski, D. M., Root, M. J., Kapadnis, B. P., *et al.* (2008). Neutralization of botulinum neurotoxin by a human monoclonal antibody specific for the catalytic light chain. *PloS one*, 3(8), e3023. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2515629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Adler, S., Bicker, G., Bigalke, H., Bishop, C., Blümel, J., Dressler, D., Fitzgerald, J., *et al.* (2010). The current scientific and legal status of alternative methods to the LD50 test for botulinum neurotoxin potency testing. The report and recommendations of a ZEBET Expert Meeting. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 38(4), 315–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20822324>
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 980250. doi:10.1155/2012/980250
- Ahsan, C. R., Hajnóczky, G., Maksymowych, A. B., & Simpson, L. L. (2005). Visualization of binding and transcytosis of botulinum toxin by human intestinal epithelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315(3), 1028–35. doi:10.1124/jpet.105.092213
- Akamatsu, Y., Pakabunto, K., Xu, Z., Zhang, Y., & Tsurushita, N. (2007). Whole IgG surface display on mammalian cells: Application to isolation of neutralizing chicken monoclonal anti-IL-12 antibodies. *Journal of immunological methods*, 327(1-2), 40–52. doi:10.1016/j.jim.2007.07.007
- Akari, H., Iwasaki, Y., Yoshida, T., & Iijima, S. (2009). Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiology and immunology*, 53(1), 53–7. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00087.x
- Alberts, B. (2005). Modeling attacks on the food supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9737–8. doi:10.1073/pnas.0504944102
- Aldhous, P. (1990). Biological warfare. Gruinard Island handed back. *Nature*, 344(6269), 801. doi:10.1038/344801b0
- Alibek, K., & Handelman, S. (1999). *Biohazard: The Chilling True Story of the Largest Covert Biological Weapons Program in the World - Told from Inside by the Man Who Ran It*. (R. House, Ed.). New York.
- Allergan. (2012). *Allergan 2011 annual report* (p. 174). Irvine. Retrieved from <http://www.allergan.com/assets/pdf/2011AnnualReport.pdf>
- Almagro, J. C., Beavers, M. P., Hernandez-Guzman, F., Maier, J., Shaulsky, J., Butenhof, K., Labute, P., *et al.* (2011). Antibody modeling assessment. *Proteins*, 79(11), 3050–66. doi:10.1002/prot.23130
- Al-Saleem, F. H., Ancharski, D. M., Joshi, S. G., Elias, M., Singh, A., Nasser, Z., & Simpson, L. L. (2012). Analysis of the mechanisms that underlie absorption of botulinum toxin by the inhalation route. *Infection and immunity*, 80(12), 4133–42. doi:10.1128/IAI.00669-12
- Amersdorfer, P., Wong, C., Chen, S., Smith, T., Deshpande, S., Sheridan, R., Finnern, R., *et al.* (1997). Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries. *Infection*

## Références

- and immunity, 65(9), 3743–52. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Amersdorfer, Peter, Wong, C., Smith, T., Chen, S., Deshpande, S., Sheridan, R., & Marks, J. D. (2002). Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine*, 20(11-12), 1640–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858873>
- Anderson, F. (2000). *Crucible of War: The Seven Years' War and the Fate of Empire in British North America, 1754-1766* (pp. 1754–1766). New-York: Goodwill Industries of Denver.
- Anderson, N. M., Larkin, J. W., Cole, M. B., Skinner, G. E., Whiting, R. C., Gorris, L. G. M., Rodriguez, A., et al. (2011). Food safety objective approach for controlling *Clostridium botulinum* growth and toxin production in commercially sterile foods. *Journal of food protection*, 74(11), 1956–89. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-082
- ANSM. (2001). Plan BIOTOX. Retrieved from [http://ansm.sante.fr/Dossiers-thematiques/Biotox-Piratox-Piratome/Biotox-Piratox-Piratome/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Dossiers-thematiques/Biotox-Piratox-Piratome/Biotox-Piratox-Piratome/(offset)/0)
- Antharavally, B. S., & DasGupta, B. R. (1998). Covalent structure of botulinum neurotoxin type B; location of sulfhydryl groups and disulfide bridge and identification of C-termini of light and heavy chains. *Journal of protein chemistry*, 17(5), 417–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717738>
- Aoki, K. R., Smith, L. A., & Atassi, M. Z. (2010). Mode of action of botulinum neurotoxins: current vaccination strategies and molecular immune recognition. *Critical reviews in immunology*, 30(2), 167–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370628>
- Arnon, S. S. (2001). Botulinum Toxin as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285(8), 1059–1070. doi:10.1001/jama.285.8.1059
- Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., et al. (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 285(8), 1059–70. doi:10.1001/jama.285.8.1059
- Arnon, Stephen S, Schechter, R., Maslanka, S. E., Jewell, N. P., & Hatheway, C. L. (2006). Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism. *The New England journal of medicine*, 354(5), 462–71. doi:10.1056/NEJMoa051926
- Atlas, R., Campbell, P., Cozzarelli, N. R., Curfman, G., Enquist, L., Fink, G., Flanagan, A., et al. (2003). Statement on scientific publication and security. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5610), 1149. doi:10.1126/science.299.5610.1149
- Attrée, O., Guglielmo-Viret, V., Gros, V., & Thullier, P. (2007). Development and comparison of two immunoassay formats for rapid detection of botulinum neurotoxin type A. *Journal of immunological methods*, 325(1-2), 78–87. doi:10.1016/j.jim.2007.06.003
- Aujame, L., Geoffroy, F., & Sodoyer, R. (1997). High affinity human antibodies by phage display. *Human antibodies*, 8(4), 155–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395918>
- ## B
- Bade, S., Rummel, A., Reisinger, C., Karnath, T., Ahnert-Hilger, G., Bigalke, H., & Binz, T. (2004). Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *Journal of neurochemistry*, 91(6), 1461–72. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02844.x
- Baggett, H. C., Rhodes, J. C., Fridkin, S. K., Quinn, C. P., Hageman, J. C., Friedman, C. R., Dykewicz, C. A., et al. (2005). No evidence of a mild form of inhalational *Bacillus anthracis* infection during a bioterrorism-related inhalational anthrax outbreak in Washington, D.C., in 2001. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(7), 991–7. doi:10.1086/432937
- Baker, K., Qiao, S.-W., Kuo, T., Kobayashi, K., Yoshida, M., Lencer, W. I., & Blumberg, R. S. (2009). Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn. *Seminars in immunopathology*, 31(2), 223–36. doi:10.1007/s00281-009-0160-9
- Bakheit, A. M., Ward, C. D., & McLellan, D. L. (1997). Generalised botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: a report of two cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 62(2), 198. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=486736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Baldwin, M. R., Bradshaw, M., Johnson, E. A., & Barbieri, J. T. (2004). The C-terminus of botulinum neurotoxin type A light chain contributes to solubility, catalysis, and stability. *Protein expression and purification*, 37(1), 187–95. doi:10.1016/j.pep.2004.05.009

## Références

- Baldwin, M. R., Tepp, W. H., Pier, C. L., Bradshaw, M., Ho, M., Wilson, B. A., Fritz, R. B., *et al.* (2005). Characterization of the antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. *Infection and immunity*, 73(10), 6998–7005. doi:10.1128/IAI.73.10.6998-7005.2005
- Baldwin, M. R., Tepp, W. H., Przedpelski, A., Pier, C. L., Bradshaw, M., Johnson, E. A., & Barbieri, J. T. (2008). Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. *Infection and immunity*, 76(3), 1314–8. doi:10.1128/IAI.01025-07
- Ballard, T., Pate, J., Ackerman, G., McCauley, D., & Lawson, S. (2001). Chronology of Aum Shinrikyo 's CBW Activities.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brière, F., Galizzi, J. P., Van Kooten, C., Liu, Y. J., *et al.* (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology*, 12, 881–922. doi:10.1146/annurev.iv.12.040194.004313
- Barbas, C F, Bain, J. D., Hoekstra, D. M., & Lerner, R. A. (1992). Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4457–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49101&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Barbas, C F, Hu, D., Dunlop, N., Sawyer, L., Cababa, D., Hendry, R. M., Nara, P. L., *et al.* (1994). In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 3809–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43671&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Barbas, C F, Kang, A. S., Lerner, R. A., & Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7978–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Barbas, Carlos F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2001). *Phage Display: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed.) (pp. 10.12–10.15). New-York: CSHL Press.
- Barderas, R., Shochat, S., Martínez-Torrecuadrada, J., Altschuh, D., Meloen, R., & Ignacio Casal, J. (2006). A fast mutagenesis procedure to recover soluble and functional scFvs containing amber stop codons from synthetic and semisynthetic antibody libraries. *Journal of immunological methods*, 312(1-2), 182–9. doi:10.1016/j.jim.2006.03.005
- Barenblatt, D. (2004). *A Plague upon Humanity*. (Harper, Ed.) (First Edit., p. 288).
- Bartelds, G M, Wolbink, G. J., Stapel, S., Aarden, L., Lems, W. F., Dijkmans, B. A. C., & Nurmohamed, M. T. (2006). High levels of human anti-human antibodies to adalimumab in a patient not responding to adalimumab treatment. *Annals of the rheumatic diseases*, 65(9), 1249–50. doi:10.1136/ard.2005.049858
- Bartelds, Geertje M, De Groot, E., Nurmohamed, M. T., Hart, M. H. L., Van Eede, P. H., Wijbrandts, C. A., Crusius, J. B. A., *et al.* (2010). Surprising negative association between IgG1 allotype disparity and anti-adalimumab formation: a cohort study. *Arthritis research & therapy*, 12(6), R221. doi:10.1186/ar3208
- Bartelds, Geertje M, Krieckaert, C. L. M., Nurmohamed, M. T., Van Schouwenburg, P. A., Lems, W. F., Twisk, J. W. R., Dijkmans, B. A. C., *et al.* (2011). Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 305(14), 1460–8. doi:10.1001/jama.2011.406
- Beck, A., Haeuw, J.-F., Wurch, T., Goetsch, L., Bailly, C., & Corvaia, N. (2010). The next generation of antibody-drug conjugates comes of age. *Discovery medicine*, 10(53), 329–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034674>
- Beecher, D. J., & DasGupta, B. R. (1997). Botulinum neurotoxin type A: limited proteolysis by endoproteinase Glu-C and alpha-chymotrypsin enhanced following reduction; identification of the cleaved sites and fragments. *Journal of protein chemistry*, 16(7), 701–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330228>
- Beerli, R. R., Bauer, M., Buser, R. B., Gwerder, M., Muntwiler, S., Maurer, P., Saudan, P., *et al.* (2008). Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14336–41. doi:10.1073/pnas.0805942105
- Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2005). [Humanized antibodies as therapeutics]. *Médecine sciences : M/S*, 21(12), 1054–62. doi:10.1051/medsci/200521121054
- Bellet, D., Pecking, A., & Dangles-Marie, V. (2008). [XenoMouse: a feat for obtaining human antibodies in mice]. *Médecine sciences : M/S*, 24(11), 903–5. doi:10.1051/medsci/20082411903
- Benedict, C. L., Gilfillan, S., Thai, T. H., & Kearney, J. F. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunological reviews*, 175, 150–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933600>

## Références

- Berche, P. (2006). [Scientific progress and new biological weapons]. *Médecine sciences : M/S*, 22(2), 206–11. doi:10.1051/medsci/2006222206
- Berche, P. (2009). *L'histoire secrète des guerres biologiques: Mensonges et crimes d'Etat*. (Ro. Laffont, Ed.).
- Berek, C., & Milstein, C. (1987). Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunological reviews*, 96, 23–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3298007>
- Bernstein, B. J. (1985). Why We Didn't Use Poison Gas In World War II, 36(5), American heritage. Retrieved from <http://www.americanheritage.com/content/why-we-didn't-use-poison-gas-world-war-ii>
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., & Horwitz, A. H. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4855), 1041–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3285471>
- Betz, W. J., & Angleson, J. K. (1998). The synaptic vesicle cycle. *Annual review of physiology*, 60, 347–63. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.347
- Binz, T., Kurazono, H., Popoff, M. R., Eklund, M. W., Sakaguchi, G., Kozaki, S., Krieglstein, K., et al. (1990). Nucleotide sequence of the gene encoding Clostridium botulinum neurotoxin type D. *Nucleic acids research*, 18(18), 5556. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=332248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Binz, Thomas, & Rummel, A. (2009). Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *Journal of neurochemistry*, 109(6), 1584–95. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06093.x
- Biosingularity. (2013). Structure d'un anticorps. Retrieved March 12, 2013, from <http://biosingularity.com/2008/08/31/antibody-engineering-cuts-the-collateral-damage-of-cancer-drugs/>
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., et al. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4877), 423–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3140379>
- Bitz, S. (2010). The botulinum neurotoxin LD50 test - problems and solutions. *ALTEX*, 27(2), 114–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686744>
- Black, J. D., & Dolly, J. O. (1986). Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology*, 103(2), 535–44. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2113823&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Black, R. E., & Gunn, R. A. (1980). Hypersensitivity reactions associated with botulinum antitoxin. *The American journal of medicine*, 69(4), 567–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7191633>
- Blaise, L., Wehnert, A., Steukers, M. P. G., Van den Beucken, T., Hoogenboom, H. R., & Hufton, S. E. (2004). Construction and diversification of yeast cell surface displayed libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. *Gene*, 342(2), 211–8. doi:10.1016/j.gene.2004.08.014
- Blasi, J., Chapman, E. R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., & Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *The EMBO journal*, 12(12), 4821–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bloom, W., & Fawcett, D. W. (1975). *A Textbook of Histology* (10th editi.). Colorado Springs: A Trillion Books Inc.
- Boado, R. J., Zhang, Y., Zhang, Y., & Pardridge, W. M. (2007). Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnology and bioengineering*, 96(2), 381–91. doi:10.1002/bit.21120
- Boado, R. J., Zhou, Q.-H., Lu, J. Z., Hui, E. K.-W., & Pardridge, W. M. (2010). Pharmacokinetics and brain uptake of a genetically engineered bifunctional fusion antibody targeting the mouse transferrin receptor. *Molecular pharmaceutics*, 7(1), 237–44. doi:10.1021/mp900235k
- Boder, E. T., Midelfort, K. S., & Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 10701–5. doi:10.1073/pnas.170297297
- Boder, E. T., & Wittrup, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature biotechnology*, 15(6), 553–7. doi:10.1038/nbt0697-553

## Références

- Böhnel, H., Schwagerick, B., & Gessler, F. (2001). Visceral botulism--a new form of bovine Clostridium botulinum toxication. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 48(6), 373–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554495>
- Bonventre, P. F. (1979). Absorption of botulinum toxin from the gastrointestinal tract. *Reviews of infectious diseases*, 1(4), 663–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/399373>
- Bordet, J. (1899). Mécanisme de l'agglutination. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 13, 225–250. Retrieved from [http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k58359702/f33.image.r=annales de l'institut pasteur.langEN](http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k58359702/f33.image.r=annales%20de%20l'institut%20pasteur.langEN)
- Boulianne, G. L., Hozumi, N., & Shulman, M. J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, 312(5995), 643–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6095115>
- Bowmer, E. J. (1963). PREPARATION AND ASSAY OF THE INTERNATIONAL STANDARDS FOR CLOSTRIDIUM BOTULINUM TYPES A, B, C, D AND E ANTITOXINS. *Bulletin of the World Health Organization*, 29, 701–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2555097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Boyras, B., Sendur, M. A., Aksoy, S., Babacan, T., Roach, E. C., Kizilarslanoglu, M. C., Petekkaya, I., et al. (2013). Trastuzumab emtansine (T-DM1) for HER2-positive Breast Cancer. *Current medical research and opinion*. doi:10.1185/03007995.2013.775113
- Bradberry, S. M., Dickers, K. J., Rice, P., Griffiths, G. D., & Vale, J. A. (2003). Ricin poisoning. *Toxicological reviews*, 22(1), 65–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14579548>
- Brady, B. L., Steinel, N. C., & Bassing, C. H. (2010). Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(7), 3801–8. doi:10.4049/jimmunol.1001158
- Brambell, F. W., Hemmings, W. A., & Morris, I. G. (1964). A THEORETICAL MODEL OF GAMMA-GLOBULIN CATABOLISM. *Nature*, 203, 1352–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14207307>
- Brandau, D. T., Joshi, S. B., Smalter, A. M., Kim, S., Steadman, B., & Middaugh, C. R. (2007). Stability of the Clostridium botulinum type A neurotoxin complex: an empirical phase diagram based approach. *Molecular pharmaceutics*, 4(4), 571–82. doi:10.1021/mp0601244
- Brandtzaeg, P., & Prydz, H. (1984). Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature*, 311(5981), 71–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6433206>
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., & Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, 104(2), 147–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1916287>
- Brüggemann, M., Caskey, H. M., Teale, C., Waldmann, H., Williams, G. T., Surani, M. A., & Neuberger, M. S. (1989). A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17), 6709–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=297915&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Brunger, A. T., Breidenbach, M. A., Jin, R., Fischer, A., Santos, J. S., & Montal, M. (2007). Botulinum neurotoxin heavy chain belt as an intramolecular chaperone for the light chain. *PLoS pathogens*, 3(9), 1191–4. doi:10.1371/journal.ppat.0030113
- Bryceson, Y. T., Chiang, S. C. C., Darmanin, S., Fauriat, C., Schlums, H., Theorell, J., & Wood, S. M. (2011). Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *Journal of innate immunity*, 3(3), 216–26. doi:10.1159/000325265
- Bugli, F., Paroni Sterbini, F., Graffeo, R., Caridi, F., Iantomasi, R., Torelli, R., Masucci, L., et al. (2011). Effective use of nitrocellulose-blotted antigens for phage display monoclonal antibody selection. *The new microbiologica*, 34(3), 281–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811748>
- Buisson, Y., Cavallo, D. D., Kowalski, J. J., Renaudeau, C., & Tréguier, J. Y. (2004). *Les risques NRBC, savoir pour agir* (Xavier Mon., p. 300).
- Bureau des affaires du désarmement des Nations Unies. (1972). Convention sur les armes biologiques ou à toxines. Retrieved April 5, 2013, from <http://www.un.org/fr/disarmement/instruments/btwc.shtml>
- Burgen, A. S. V., Dickens, F., & Zatman, L. J. (1949). The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *The Journal of physiology*, 109(1-2), 10–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1392572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>



## Références

- Burnett, J. C., Schmidt, J. J., Stafford, R. G., Panchal, R. G., Nguyen, T. L., Hermone, A. R., Vennerstrom, J. L., *et al.* (2003). Novel small molecule inhibitors of botulinum neurotoxin A metalloprotease activity. *Biochemical and biophysical research communications*, *310*(1), 84–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511652>
- Burrows, W. D., & Renner, S. E. (1999). Biological warfare agents as threats to potable water. *Environmental health perspectives*, *107*(12), 975–84. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1566812&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Byrd, J. C., O'Brien, S., Flinn, I. W., Kipps, T. J., Weiss, M., Rai, K., Lin, T. S., *et al.* (2007). Phase 1 study of lumiliximab with detailed pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(15 Pt 1), 4448–55. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1463
- Byrne, M. P., Smith, T. J., Montgomery, V. A., & Smith, L. A. (1998). Purification, potency, and efficacy of the botulinum neurotoxin type A binding domain from *Pichia pastoris* as a recombinant vaccine candidate. *Infection and immunity*, *66*(10), 4817–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=108595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- ## C
- Cabilly, S. (1999). The basic structure of filamentous phage and its use in the display of combinatorial peptide libraries. *Molecular biotechnology*, *12*(2), 143–8. doi:10.1385/MB:12:2:143
- Cai, S., & Singh, B. R. (2001). Role of the disulfide cleavage induced molten globule state of type a botulinum neurotoxin in its endopeptidase activity. *Biochemistry*, *40*(50), 15327–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11735415>
- Caliceti, P., & Veronese, F. M. (2003). Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced drug delivery reviews*, *55*(10), 1261–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499706>
- Cambrosio, A., & Keating, P. (1992). Between fact and technique: the beginnings of hybridoma technology. *Journal of the history of biology*, *25*(2), 175–230. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11623041>
- Campbell, K., Collins, M. D., & East, A. K. (1993). Nucleotide sequence of the gene coding for *Clostridium botulinum* (*Clostridium argentinense*) type G neurotoxin: genealogical comparison with other clostridial neurotoxins. *Biochimica et biophysica acta*, *1216*(3), 487–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8268233>
- Cangene. (2013). FDA Advisory Committee Votes in Favour of Cangene's Botulism Antitoxin Product. Retrieved April 10, 2013, from <http://investor.cangene.com/Investor-Relations/News-Releases/News-Release-Details/2013/FDA-Advisory-Committee-Votes-in-Favour-of-Cangenes-Botulism-Antitoxin-Product1133548/default.aspx>
- Cao, T., & Heng, B. C. (2005). Intracellular antibodies (intrabodies) versus RNA interference for therapeutic applications. *Annals of clinical and laboratory science*, *35*(3), 227–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081577>
- Capron, M., & Capron, A. (1994). Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science (New York, N.Y.)*, *264*(5167), 1876–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8009216>
- Cardinale, S. C., Butler, M. M., Ruthel, G., Nuss, J. E., Wanner, L. M., Li, B., Pai, R., *et al.* (2011). Novel Benzimidazole Inhibitors of Botulinum Neurotoxin/A Display Enzyme and Cell-Based Potency. *The botulinum journal*, *2*(1), 16–29. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3509773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Carlson, J. (1988). A new means of inducibly inactivating a cellular protein. *Journal of molecular biology*, *8*(6), 2638–46.
- Carter, A. T., Paul, C. J., Mason, D. R., Twine, S. M., Alston, M. J., Logan, S. M., Austin, J. W., *et al.* (2009). Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*. *BMC genomics*, *10*, 115. doi:10.1186/1471-2164-10-115
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., *et al.* (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(10), 4285–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., & Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, *99*(3), 754–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806974>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. (2003). Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends in immunology*, *24*(9), 474–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967670>

## Références

- Castagnoli, L., Zucconi, A., Quondam, M., Rossi, M., Vaccaro, P., Panni, S., Paoluzi, S., *et al.* (2001). Alternative bacteriophage display systems. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 4(2), 121–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11281829>
- CDC. (2010). *Investigational Heptavalent Botulinum Antitoxin (HBAT) to Replace Licensed Botulinum Antitoxin AB and Investigational Botulinum Antitoxin E. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* (p. March 19, 2010 / 59(10);299). Retrieved from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5910a4.htm>
- Cello, J., Paul, A. V., & Wimmer, E. (2002). Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5583), 1016–8. doi:10.1126/science.1072266
- Centers for Diseases Control and Prevention. (2013). Classification des agents biologiques selon le CDC. Retrieved April 5, 2013, from <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
- Chahboun, S., Hust, M., Liu, Y., Pelat, T., Miethe, S., Helmsing, S., Jones, R. G., *et al.* (2011). Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin. *BMC biotechnology*, 11, 113. doi:10.1186/1472-6750-11-113
- Chai, Q., Arndt, J. W., Dong, M., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Chapman, E. R., & Stevens, R. C. (2006). Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature*, 444(7122), 1096–100. doi:10.1038/nature05411
- Chang, C., Takayanagi, A., Yoshida, T., & Shimizu, N. (2011). Screening of scFv-displaying phages recognizing distinct extracellular domains of EGF receptor by target-guided proximity labeling method. *Journal of immunological methods*, 372(1-2), 127–36. doi:10.1016/j.jim.2011.07.003
- Chapman, A. P. (2002). PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Advanced drug delivery reviews*, 54(4), 531–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052713>
- Chappel, J. A., He, M., & Kang, A. S. (1998). Modulation of antibody display on M13 filamentous phage. *Journal of immunological methods*, 221(1-2), 25–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894895>
- Chari, R. V. J. (2008). Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Accounts of chemical research*, 41(1), 98–107. doi:10.1021/ar700108g
- Chassagne, S., Laffly, E., Drouet, E., Hérodin, F., Lefranc, M.-P., & Thullier, P. (2004). A high-affinity macaque antibody Fab with human-like framework regions obtained from a small phage display immune library. *Molecular immunology*, 41(5), 539–46. doi:10.1016/j.molimm.2004.03.040
- Chasteen, L., Ayris, J., Pavlik, P., & Bradbury, A. R. M. (2006). Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic acids research*, 34(21), e145. doi:10.1093/nar/gkl772
- Check, E. (2005). Biologists asked to breed a culture of responsibility in face of terrorism. *Nature*, 435(7044), 860. doi:10.1038/435860a
- Chen, C., Wang, S., Wang, H., Mao, X., Zhang, T., Ji, G., Shi, X., *et al.* (2012). Potent neutralization of botulinum neurotoxin/B by synergistic action of antibodies recognizing protein and ganglioside receptor binding domain. *PLoS one*, 7(8), e43845. doi:10.1371/journal.pone.0043845
- Chen, F., Kuziemko, G. M., & Stevens, R. C. (1998). Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. *Infection and immunity*, 66(6), 2420–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=108219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chen, G., Hayhurst, A., Thomas, J. G., Harvey, B. R., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (2001). Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS). *Nature biotechnology*, 19(6), 537–42. doi:10.1038/89281
- Chen, S., & Barbieri, J. T. (2007). Multiple pocket recognition of SNAP25 by botulinum neurotoxin serotype E. *The Journal of biological chemistry*, 282(35), 25540–7. doi:10.1074/jbc.M701922200
- Chia, J. K., Clark, J. B., Ryan, C. A., & Pollack, M. (1986). Botulism in an adult associated with food-borne intestinal infection with *Clostridium botulinum*. *The New England journal of medicine*, 315(4), 239–41. doi:10.1056/NEJM198607243150407
- Chothia, C., & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *Journal of molecular biology*, 196(4), 901–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3681981>
- Christopher, G. W., Cieslak, T. J., Pavlin, J. A., & Eitzen, E. M. (1997). Biological warfare. A historical perspective. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 278(5), 412–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9244333>

## Références

- Cingoz, O. (2009). Motavizumab. *mAbs*, *1*(5), 439–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2759493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cirino, N. M., Sblattero, D., Allen, D., Peterson, S. R., Marks, J. D., Jackson, P. J., Bradbury, A., *et al.* (1999). Disruption of anthrax toxin binding with the use of human antibodies and competitive inhibitors. *Infection and immunity*, *67*(6), 2957–63. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96606&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cirino, P. C., Mayer, K. M., & Umeno, D. (2003). Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *231*, 3–9. doi:10.1385/1-59259-395-X:3
- Clayton, M. A., Clayton, J. M., Brown, D. R., & Middlebrook, J. L. (1995). Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. *Infection and immunity*, *63*(7), 2738–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173366&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Co, M. S., Baker, J., Bednarik, K., Janzek, E., Neruda, W., Mayer, P., Plot, R., *et al.* (1996). Humanized anti-Lewis Y antibodies: in vitro properties and pharmacokinetics in rhesus monkeys. *Cancer research*, *56*(5), 1118–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640770>
- Co, M. S., & Queen, C. (1991). Humanized antibodies for therapy. *Nature*, *351*(6326), 501–2. doi:10.1038/351501a0
- Colasante, C., Rossetto, O., Oirazzini, M., Molgo, J., & Montecucco, C. (2013). Botulinum neurotoxin type A is internalized and translocated from small synaptic vesicles at the neuromuscular junction. *Molecular neurobiology*, *48*(1), 120–127. doi:10.1007/s12035-013-8423-9
- Constantinou, A., Chen, C., & Deonarain, M. P. (2010). Modulating the pharmacokinetics of therapeutic antibodies. *Biotechnology letters*, *32*(5), 609–22. doi:10.1007/s10529-010-0214-z
- CORDIS. (1993). International Association for the promotion of cooperation with scientists from the independent states of the former Soviet Union (INTAS), 1993-. Retrieved April 5, 2013, from [http://cordis.europa.eu/search/index.cfm?fuseaction=prog.document&PG\\_RC�=841839](http://cordis.europa.eu/search/index.cfm?fuseaction=prog.document&PG_RC�=841839)
- Cotton, R. G., & Milstein, C. (1973). Letter: Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature*, *244*(5410), 42–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4582485>
- Couesnon, A., Molgó, J., Connan, C., & Popoff, M. R. (2012). Preferential entry of botulinum neurotoxin A Hc domain through intestinal crypt cells and targeting to cholinergic neurons of the mouse intestine. *PLoS pathogens*, *8*(3), e1002583. doi:10.1371/journal.ppat.1002583
- Couesnon, A., Pereira, Y., & Popoff, M. R. (2008). Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cellular microbiology*, *10*(2), 375–87. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01051.x
- Couesnon, A., Shimizu, T., & Popoff, M. R. (2009). Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells. *Cellular microbiology*, *11*(2), 289–308. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01253.x
- Covert, N. M. (2000). *Cutting Edge: A history of Fort Detrick, Maryland 1943-1993*. (M. Normand, Ed.) (4ème édit.). Maryland: Fort Detrick, MD: Headquarters, U.S. Army Garrison, Public Affairs Office.
- Croddy, E. A., & Wirtz, J. J. (2005). *Weapons of Mass Destruction: An Encyclopedia of Worldwide Policy, Technology, and History, Volume 2*. (E. A. Croddy & J. J. Wirtz, Eds.) (ABC-CLIO I., p. 1050). Santa Barbara.
- Cuesta, A. M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B., & Alvarez-Vallina, L. (2010). Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends in biotechnology*, *28*(7), 355–62. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.007
- Curran, J., & Mohler, P. J. (2011). Coordinating electrical activity of the heart: ankyrin polypeptides in human cardiac disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, *15*(7), 789–801. doi:10.1517/14728222.2011.575363
- Czuczman, M. S., Leonard, J. P., Jung, S., Johnson, J. L., Hsi, E. D., Byrd, J. C., & Cheson, B. D. (2012). Phase II trial of galiximab (anti-CD80 monoclonal antibody) plus rituximab (CALGB 50402): Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) score is predictive of upfront immunotherapy responsiveness. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, *23*(9), 2356–62. doi:10.1093/annonc/mdr620



## Références

- Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A., & Wu, H. (2006). Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *The Journal of biological chemistry*, 281(33), 23514–24. doi:10.1074/jbc.M604292200
- Dangl, J. L., Wensel, T. G., Morrison, S. L., Stryer, L., Herzenberg, L. A., & Oi, V. T. (1988). Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *The EMBO journal*, 7(7), 1989–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=454472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Danzig, R. (2012). A decade of countering bioterrorism: incremental progress, fundamental failings. *Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science*, 10(1), 49–54. doi:10.1089/bsp.2011.0104
- Daugherty, P. S., Chen, G., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (2000). Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2029–34. doi:10.1073/pnas.030527597
- Davidkova, G., Pettersson, S., Holmberg, D., & Lundkvist, I. (1997). Selective usage of VH genes in adult human B lymphocyte repertoires. *Scandinavian journal of immunology*, 45(1), 62–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010502>
- Davidson, R. L., O'Malley, K. A., & Wheeler, T. B. (1976). Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration. *Somatic cell genetics*, 2(3), 271–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1028174>
- Davies, D. R., & Cohen, G. H. (1996). Interactions of protein antigens with antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 7–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- De Groot, A. S., Goldberg, M., Moise, L., & Martin, W. (2006). Evolutionary deimmunization: an ancillary mechanism for self-tolerance? *Cellular immunology*, 244(2), 148–53. doi:10.1016/j.cellimm.2007.02.006
- De Kruif, J., & Logtenberg, T. (1996). Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library. *The Journal of biological chemistry*, 271(13), 7630–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631798>
- De Leij L, Molema, G., Helfrich, W., & Kroesen, B. (1998). Bispecific antibodies for treatment of cancer in experimental animal models and man. *Advanced drug delivery reviews*, 31(1-2), 105–129. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837620>
- Debré, R., Joannon, P., & Bernard, L. (1926). *La Rougeole. Epidémiologie, immunologie, prophylaxie. Préface du professeur Léon Bernard.* (p. 288). Paris.
- Delmas, G., Jourdan da Silva, N., Nathalie, P., Weil, F.-X., Vaillant, V., & De Valk, H. (2010). *Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008* (pp. 1–5).
- Denis, T. G. S., Dai, T., & Hamblin, M. R. (2013). Killing bacterial spores with blue light: when innate resistance meets the power of light. *Photochemistry and photobiology*, 89(1), 2–4. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01233.x
- Devlin, J. J., Panganiban, L. C., & Devlin, P. E. (1990). Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4967), 404–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2143033>
- Dezfulian, M., & Bartlett, J. G. (1985). Selective isolation and rapid identification of Clostridium botulinum types A and B by toxin detection. *Journal of clinical microbiology*, 21(2), 231–3. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=271619&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dezfulian, M., Hatheway, C. L., Yolken, R. H., & Bartlett, J. G. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum type A and type B toxins in stool samples of infants with botulism. *Journal of clinical microbiology*, 20(3), 379–83. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=271333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Di Noia, J. M., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual review of biochemistry*, 76, 1–22. doi:10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740
- DiMasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of health economics*, 22(2), 151–85. doi:10.1016/S0167-6296(02)00126-1
- Direction des Affaires Scientifiques. (2012). *Biomédicaments en France état des lieux 2011* (p. 17 avril 2012). Retrieved from [http://www.leem.org/sites/default/files/Biomédicaments en France 2011 version finale\\_0.pdf](http://www.leem.org/sites/default/files/Biomédicaments%20en%20France%202011%20version%20finale_0.pdf)
- Dixit, R., & Coats, S. (2009). Preclinical efficacy and safety models for mAbs: the challenge of developing effective model systems. *IDrugs : the investigational drugs journal*, 12(2), 103–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204884>

## Références

- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R., & Chapman, E. R. (2006). SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5773), 592–6. doi:10.1126/science.1123654
- Dooley, H., & Flajnik, M. F. (2006). Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Developmental and comparative immunology*, *30*(1-2), 43–56. doi:10.1016/j.dci.2005.06.022
- Dorrington, K. J., & Klein, M. (1981). Aspects of immunoglobulin G structure relevant to its interaction with Fc receptors. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, *29*(3), 275–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6794538>
- Dossiers thématiques en ligne de l'InVs. (2013). Retrieved from [www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Botulisme/Donnees-epidemiologiques/Caracteristiques-epidemiologiques-du-botulisme-humain-en-2010](http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Botulisme/Donnees-epidemiologiques/Caracteristiques-epidemiologiques-du-botulisme-humain-en-2010)
- Dotto, G. P., & Zinder, N. D. (1984). Increased intracellular concentration of an initiator protein markedly reduces the minimal sequence required for initiation of DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(5), 1336–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=344828&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Douglass, Joseph D Livingstone, N. C. (1987). *America the vulnerable: The threat of chemical and biological warfare*. (Free, Ed.) (The Free P., p. 256). Lexington Books (Lexington, Mass.).
- Dover, N., Barash, J. R., & Arnon, S. S. (2009). Novel Clostridium botulinum toxin gene arrangement with subtype A5 and partial subtype B3 botulinum neurotoxin genes. *Journal of clinical microbiology*, *47*(7), 2349–50. doi:10.1128/JCM.00799-09
- Drachman, D. B. (1964). ATROPHY OF SKELETAL MUSCLE IN CHICK EMBRYOS TREATED WITH BOTULINUM TOXIN. *Science (New York, N.Y.)*, *145*(3633), 719–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14163805>
- Drouet, J., Frit, P., Delteil, C., De Villartay, J.-P., Salles, B., & Calsou, P. (2006). Interplay between Ku, Artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *The Journal of biological chemistry*, *281*(38), 27784–93. doi:10.1074/jbc.M603047200
- Druar, C., Saini, S. S., Cossitt, M. A., Yu, F., Qiu, X., Geisbert, T. W., Jones, S., et al. (2005). Analysis of the expressed heavy chain variable-region genes of Macaca fascicularis and isolation of monoclonal antibodies specific for the Ebola virus' soluble glycoprotein. *Immunogenetics*, *57*(10), 730–8. doi:10.1007/s00251-005-0047-4
- Ducry, L., & Stump, B. (2010). Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjugate chemistry*, *21*(1), 5–13. doi:10.1021/bc9002019
- Durban, E., & Grecz, N. (1969). Resistance of spores of Clostridium botulinum 33A to combinations of ultraviolet and gamma rays. *Applied microbiology*, *18*(1), 44–50. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=377883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>


## E

- Edelman, R., Wasserman, S. S., Bodison, S. A., Perry, J. G., O'Donnoghue, M., & DeTolla, L. J. (2003). Phase II safety and immunogenicity study of type F botulinum toxoid in adult volunteers. *Vaccine*, *21*(27-30), 4335–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505916>
- Ehrenmann, F., & Lefranc, M.-P. (2012). IMGT/DomainGapAlign: the IMGT® tool for the analysis of IG, TR, MH, IgSF, and MhSF domain amino acid polymorphism. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *882*, 605–33. doi:10.1007/978-1-61779-842-9\_33
- Ehrlich, P. (1904). *Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung* (Hirschwald., p. 776). Berlin.
- Ekerljung, L., Lennartsson, J., & Gedda, L. (2012). The HER2-binding affibody molecule (Z(HER2:342))<sub>2</sub> increases radiosensitivity in SKBR-3 cells. *PloS one*, *7*(11), e49579. doi:10.1371/journal.pone.0049579
- Ekong, T. (2000). Immunological Detection of Botulinum Neurotoxins. *Anaerobe*, *6*(2), 125–127. doi:10.1006/anae.1999.0322
- Ellinger, I., & Fuchs, R. (2012). HFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport: protection of and threat to the human fetus and newborn. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, *162*(9-10), 207–13. doi:10.1007/s10354-012-0085-0
- Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L., & Muyldermans, S. (2001). Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *The Journal of biological chemistry*, *276*(10), 7346–50. doi:10.1074/jbc.M007734200

## Références

- Elston, J. S. (1985). The use of botulinum toxin A in the treatment of strabismus. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 104 ( Pt 2), 208–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3857781>
- Elvin, J. G., Couston, R. G., & Van der Walle, C. F. (2013). Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *International journal of pharmaceuticals*, 440(1), 83–98. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.039
- Emmons, C., & Hunsicker, L. G. (1987). Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa medicine : journal of the Iowa Medical Society*, 77(2), 78–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3557906>
- Encinar, J. A., Fernández, A., Ferragut, J. A., González-Ros, J. M., DasGupta, B. R., Montal, M., & Ferrer-Montiel, A. (1998). Structural stabilization of botulinum neurotoxins by tyrosine phosphorylation. *FEBS letters*, 429(1), 78–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657387>
- Erbguth, F. J. (2008). From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 115(4), 559–65. doi:10.1007/s00702-007-0728-2
- Eubank, S., Guclu, H., Kumar, V. S. A., Marathe, M. V., Srinivasan, A., Toroczkai, Z., & Wang, N. (2004). Modelling disease outbreaks in realistic urban social networks. *Nature*, 429(6988), 180–4. doi:10.1038/nature02541
- Eubanks, L. M., Hixon, M. S., Jin, W., Hong, S., Clancy, C. M., Tepp, W. H., Baldwin, M. R., et al. (2007). An in vitro and in vivo disconnect uncovered through high-throughput identification of botulinum neurotoxin A antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2602–7. doi:10.1073/pnas.0611213104
- ## F
- Fabbrini, E., Higgins, P. B., Magkos, F., Bastarrachea, R. A., Voruganti, V. S., Comuzzie, A. G., Shade, R. E., et al. (2012). Metabolic response to high-carbohydrate and low-carbohydrate meals in a non-human primate model. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. doi:10.1152/ajpendo.00347.2012
- FDA. (2010). Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin): Market Withdrawal. Retrieved April 16, 2013, from <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm216458.htm>
- Feigin, R. D., Cherry, J., Demmler, G., & Kaplan, S. (2004). *Textbook of pediatric infectious diseases*. (Kaplan, Ed.) (5th ed., pp. Infant botulism, p1758–1766). Philadelphia.
- Feldhaus, M. J., Siegel, R. W., Opresko, L. K., Coleman, J. R., Feldhaus, J. M. W., Yeung, Y. A., Cochran, J. R., et al. (2003). Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nature biotechnology*, 21(2), 163–70. doi:10.1038/nbt785
- Feldwisch, J. (2012). *Affibody Molecules - Next Generation Therapeutics & Diagnostics*. Karolinska Institutet. Retrieved from <http://www.affibody.com/>
- Feldwisch, J., & Tolmachev, V. (2012). Engineering of affibody molecules for therapy and diagnostics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 899, 103–26. doi:10.1007/978-1-61779-921-1\_7
- Fernández, R. A., Ciccarelli, A. S., Arenas, G. N., & Giménez, D. F. (1986). [First outbreak of botulism caused by *Clostridium botulinum* subtype Af]. *Revista Argentina de microbiología*, 18(1), 29–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3317514>
- Ferreira, J. L. (2001). Comparison of amplified ELISA and mouse bioassay procedures for determination of botulinum toxins A, B, E, and F. *Journal of AOAC International*, 84(1), 85–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234855>
- Ferreira, J. L., Eliasberg, S. J., Harrison, M. A., & Edmonds, P. (2001). Detection of preformed type A botulinum toxin in hash brown potatoes by using the mouse bioassay and a modified ELISA test. *Journal of AOAC International*, 84(5), 1460–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11601465>
- Fillo, S., Giordani, F., Anniballi, F., Gorgé, O., Ramière, V., Vergnaud, G., Riehm, J. M., et al. (2011). *Clostridium botulinum* group I strain genotyping by 15-locus multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4252–63. doi:10.1128/JCM.05396-11
- Finlay, W. J. J., Bloom, L., & Cunningham, O. (2011). Optimized generation of high-affinity, high-specificity single-chain Fv antibodies from multiantigen immunized chickens. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 681, 383–401. doi:10.1007/978-1-60761-913-0\_21

## Références

- Fiock, M. A., Cardella, M. A., & Gearinger, N. F. (1963). STUDIES ON IMMUNITY TO TOXINS OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM. IX. IMMUNOLOGIC RESPONSE OF MAN TO PURIFIED PENTAVALENT ABCDE BOTULINUM TOXIOD. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 90, 697–702. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14054890>
- Fischer, A., Garcia-Rodriguez, C., Geren, I., Lou, J., Marks, J. D., Nakagawa, T., & Montal, M. (2008). Molecular architecture of botulinum neurotoxin E revealed by single particle electron microscopy. *The Journal of biological chemistry*, 283(7), 3997–4003. doi:10.1074/jbc.M707917200
- Fischer, A., & Montal, M. (2007a). Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10447–52. doi:10.1073/pnas.0700046104
- Fischer, A., & Montal, M. (2007b). Crucial role of the disulfide bridge between botulinum neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes. *The Journal of biological chemistry*, 282(40), 29604–11. doi:10.1074/jbc.M703619200
- Fischer, A., Sambashivan, S., Brunger, A. T., & Montal, M. (2012). Beltless translocation domain of botulinum neurotoxin A embodies a minimum ion-conductive channel. *The Journal of biological chemistry*, 287(3), 1657–61. doi:10.1074/jbc.C111.319400
- Fisher, A., & Montal, M. (2006). Characterization of Clostridial botulinum neurotoxin channels in neuroblastoma cells. *Neurotoxicity research*, 9(2-3), 93–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785104>
- Fisk, B., Dague, B., Seifert, W., Kudelka, A., Wharton, J., Murray, J., & Ioannides, C. (1997). Mass-spectrometric analysis of naturally processed peptides recognized by ovarian tumor-associated CD8(+) CTL. *International journal of oncology*, 10(1), 159–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533359>
- Foote, J., & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *Journal of molecular biology*, 224(2), 487–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1560463>
- Fouchier, R. A. M., García-Sastre, A., & Kawaoka, Y. (2013). H5N1 virus: Transmission studies resume for avian flu. *Nature*, 493(7434), 609. doi:10.1038/nature11858
- Franciosa, G., Fenicia, L., Pourshaban, M., & Aureli, P. (1997). Recovery of a strain of Clostridium botulinum producing both neurotoxin A and neurotoxin B from canned macrobiotic food. *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 1148–50. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168405&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Franz, D. R., Pitt, L. M., Clayton, M. A., Hanes, M. A., & Rose, K. J. (1993). Efficacy of prophylactic and therapeutic administration of antitoxin for inhalation botulism. In Das Gupta (Ed.), *Botulinum and Tetanus Neurotoxins and Biomedical Aspects*. New-York.
- Friedrich, J. O., Wald, R., Bagshaw, S. M., Burns, K. E., & Adhikari, N. K. (2012). Hemofiltration compared to hemodialysis for acute kidney injury: systematic review and meta-analysis. *Critical care (London, England)*, 16(4), R146. doi:10.1186/cc11458
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J. C., Popoff, M. R., Kozaki, S., et al. (2000). Identification and characterization of functional subunits of Clostridium botulinum type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS letters*, 467(2-3), 179–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675534>
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E., & Oguma, K. (1997). The haemagglutinin of Clostridium botulinum type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology (Reading, England)*, 143 (Pt 1), 3841–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421908>
- Fujinaga, Yukako. (2006). Transport of bacterial toxins into target cells: pathways followed by cholera toxin and botulinum progenitor toxin. *Journal of biochemistry*, 140(2), 155–60. doi:10.1093/jb/mvj161
- 
- Gadjeva, M. G., Rouseva, M. M., Zlatarova, A. S., Reid, K. B. M., Kishore, U., & Kojouharova, M. S. (2008). Interaction of human C1q with IgG and IgM: revisited. *Biochemistry*, 47(49), 13093–102. doi:10.1021/bi801131h
- Gai, S. A., & Wittrup, K. D. (2007). Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Current opinion in structural biology*, 17(4), 467–73. doi:10.1016/j.sbi.2007.08.012
- Gaithersburg, M. (2000). *Official Methods of Analysis* (17th Ed., p. Methods 977.26 sec. 17.7.01). AOAC International.

## Références

- Gao, C., Mao, S., Kaufmann, G., Wirsching, P., Lerner, R. A., & Janda, K. D. (2002). A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 12612–6. doi:10.1073/pnas.192467999
- Garcia-Rodriguez, C., Geren, I. N., Lou, J., Conrad, F., Forsyth, C., Wen, W., Chakraborti, S., *et al.* (2011). Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, *24*(3), 321–31. doi:10.1093/protein/gzq111
- Garcia-Rodriguez, Consuelo, Levy, R., Arndt, J. W., Forsyth, C. M., Razai, A., Lou, J., Geren, I., *et al.* (2007). Molecular evolution of antibody cross-reactivity for two subtypes of type A botulinum neurotoxin. *Nature biotechnology*, *25*(1), 107–16. doi:10.1038/nbt1269
- Gasque, P. (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular immunology*, *41*(11), 1089–98. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.011
- Gefen, T., Vaya, J., Khatib, S., Harkevich, N., Artoul, F., Heller, E. D., Pitcovski, J., *et al.* (2013). The impact of PEGylation on protein immunogenicity. *International immunopharmacology*. doi:10.1016/j.intimp.2012.12.012
- Gellert, M. (1997). Recent advances in understanding V(D)J recombination. *Advances in immunology*, *64*, 39–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100979>
- Gelzleichter, T. R., Myers, M. A., Menton, R. G., Niemuth, N. A., Matthews, M. C., & Langford, M. J. (1999). Protection against botulinum toxins provided by passive immunization with botulinum human immune globulin: evaluation using an inhalation model. *Journal of applied toxicology : JAT, 19 Suppl 1*, S35–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594898>
- Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A., & Schmidt, R. E. (1998). The IgG Fc receptor family. *Annals of hematology*, *76*(6), 231–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692811>
- Getts, D. R., Getts, M. T., McCarthy, D. P., Chastain, E. M. L., & Miller, S. D. (2010). Have we overestimated the benefit of human(ized) antibodies? *mAbs*, *2*(6), 682–94. doi:10.4161/mabs.2.6.13601
- Geysen, H. M., Meloan, R. H., & Barteling, S. J. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(13), 3998–4002. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=345355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ghedini, E., Sengamalay, N. A., Shumway, M., Zaborsky, J., Feldblyum, T., Subbu, V., Spiro, D. J., *et al.* (2005). Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*, *437*(7062), 1162–6. doi:10.1038/nature04239
- Ghetie, V., & Ward, E. S. (2000). Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annual review of immunology*, *18*, 739–66. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.739
- Gill, D. M. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological reviews*, *46*(1), 86–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gilligan, P. H., Brown, L., & Berman, R. E. (1983). Differentiation of Clostridium difficile toxin from Clostridium botulinum toxin by the mouse lethality test. *Applied and environmental microbiology*, *45*(1), 347–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=242285&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Girdwood, R. H. (1985). Experimentation on prisoners by the Japanese during World War II. *British medical journal (Clinical research ed.)*, *291*(6494), 530–1. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1416543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Glanville, J., Zhai, W., Berka, J., Telman, D., Huerta, G., Mehta, G. R., Ni, I., *et al.* (2009). Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(48), 20216–21. doi:10.1073/pnas.0909775106
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., & Plückthun, A. (1990). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, *29*(6), 1362–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2110478>
- Gold, H. (1996). *Unit 731: Testimony*. (Tuttle, Ed.). Boston.
- Goldman, E. R., Anderson, G. P., Liu, J. L., Delehanty, J. B., Sherwood, L. J., Osborn, L. E., Cummins, L. B., *et al.* (2006). Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Analytical chemistry*, *78*(24), 8245–55. doi:10.1021/ac0610053



## Références

- Gonzales, N. R., Padlan, E. A., De Pascalis, R., Schuck, P., Schlom, J., & Kashmiri, S. V. S. (2004). SDR grafting of a murine antibody using multiple human germline templates to minimize its immunogenicity. *Molecular immunology*, *41*(9), 863–72. doi:10.1016/j.molimm.2004.03.041
- Gould, C., & Fold, P. I. (2003). *Project Coast : apartheid's chemical and biological warfare programme*. (Robert Ber.). Nations Unies.
- Govindan, S. V., & Goldenberg, D. M. (2012). Designing immunoconjugates for cancer therapy. *Expert opinion on biological therapy*, *12*(7), 873–90. doi:10.1517/14712598.2012.685153
- Grawunder, U., & Harfst, E. (2001). How to make ends meet in V(D)J recombination. *Current opinion in immunology*, *13*(2), 186–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11228412>
- Green, L. L. (1999). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*, *231*(1-2), 11–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648924>
- Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C., & Flajnik, M. F. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, *374*(6518), 168–73. doi:10.1038/374168a0
- Greenberg, S. (1999). Modular components of phagocytosis. *Journal of leukocyte biology*, *66*(5), 712–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577498>
- Greenfield, E. A., Nguyen, K. A., & Kuchroo, V. K. (1998). CD28/B7 costimulation: a review. *Critical reviews in immunology*, *18*(5), 389–418. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784967>
- Greenspan, N. S. (2001). Dimensions of antigen recognition and levels of immunological specificity. *Advances in cancer research*, *80*, 147–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034543>
- Greenspan, N. S., & Bona, C. A. (1993). Idiotypes: structure and immunogenicity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *7*(5), 437–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8462785>
- Greenspan, N. S., & Cooper, L. J. (1995). Complementarity, specificity and the nature of epitopes and paratopes in multivalent interactions. *Immunology today*, *16*(5), 226–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540013>
- Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., & Lifely, R. (1993). Polysialic acids: potential in drug delivery. *FEBS letters*, *315*(3), 271–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8422917>
- Griffin, P. M., Hatheway, C. L., Rosenbaum, R. B., & Sokolow, R. (1997). Endogenous antibody production to botulinum toxin in an adult with intestinal colonization botulism and underlying Crohn's disease. *The Journal of infectious diseases*, *175*(3), 633–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041335>
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., et al. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO journal*, *13*(14), 3245–60. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=395221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Group, O. W. (2012). Quarterly report, 1 January to 31 March 2012. *Communicable diseases intelligence*, *36*(4), E353–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330710>
- Gump, J. M., & Dowdy, S. F. (2007). TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends in molecular medicine*, *13*(10), 443–8. doi:10.1016/j.molmed.2007.08.002
- Gunneriusson, E., Nord, K., Uhlén, M., & Nygren, P. (1999). Affinity maturation of a Taq DNA polymerase specific affibody by helix shuffling. *Protein engineering*, *12*(10), 873–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556248>
- Gurbaxani, B. M., & Morrison, S. L. (2006). Development of new models for the analysis of Fc-FcRn interactions. *Molecular immunology*, *43*(9), 1379–89. doi:10.1016/j.molimm.2005.08.002
- Gurda, B. L., Raupp, C., Popa-Wagner, R., Naumer, M., Olson, N. H., Ng, R., McKenna, R., et al. (2012). Mapping a neutralizing epitope onto the capsid of adeno-associated virus serotype 8. *Journal of virology*, *86*(15), 7739–51. doi:10.1128/JVI.00218-12

## Références

- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, *400*(6743), 464–8. doi:10.1038/22780
- Haim M., S., & Lilly Jr, T. (2001). *Clostridium botulinum*. (U. F. and D. Administration, Ed.) (Bacteriolo.).
- Halloran, M. E., Longini, I. M., Nizam, A., & Yang, Y. (2002). Containing bioterrorist smallpox. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5597), 1428–32. doi:10.1126/science.1074674
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., *et al.* (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, *363*(6428), 446–8. doi:10.1038/363446a0
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R., & Plückthun, A. (1998). Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(24), 14130–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., & Plückthun, A. (2000). Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature biotechnology*, *18*(12), 1287–92. doi:10.1038/82407
- Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. (Harlow, Ed.) (p. 726). New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harmsen, M. M., & De Haard, H. J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied microbiology and biotechnology*, *77*(1), 13–22. doi:10.1007/s00253-007-1142-2
- Harper, C. B., Martin, S., Nguyen, T. H., Daniels, S. J., Lavidis, N. A., Popoff, M. R., Hadzic, G., *et al.* (2011). Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *The Journal of biological chemistry*, *286*(41), 35966–76. doi:10.1074/jbc.M111.283879
- Harris, R., & Paxman, J. (2002). *A Higher Form of Killing: The Secret History of Chemical and Biological Warfare* (pp. 90–96). New York: Random House Trade Paperbacks.
- Harvey, B. R., Georgiou, G., Hayhurst, A., Jeong, K. J., Iverson, B. L., & Rogers, G. K. (2004). Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(25), 9193–8. doi:10.1073/pnas.0400187101
- Hasegawa, K., Watanabe, T., Suzuki, T., Yamano, A., Oikawa, T., Sato, Y., Kouguchi, H., *et al.* (2007). A novel subunit structure of Clostridium botulinum serotype D toxin complex with three extended arms. *The Journal of biological chemistry*, *282*(34), 24777–83. doi:10.1074/jbc.M703446200
- Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clinical microbiology reviews*, *3*(1), 66–98. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hatheway, C. L. (1995). Botulism: the present status of the disease. *Current topics in microbiology and immunology*, *195*, 55–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8542759>
- Hauschild, A. H. W. (1989). *Clostridium botulinum*. (I. Marcel Dekker, Ed.) (Doyle (ed., p. 1989 pp. 111–189). New York.
- Hauser, D., Eklund, M. W., Kurazono, H., Binz, T., Niemann, H., Gill, D. M., Boquet, P., *et al.* (1990). Nucleotide sequence of Clostridium botulinum C1 neurotoxin. *Nucleic acids research*, *18*(16), 4924. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=331989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dübel, S., Breitling, F., & Little, M. (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *BioTechniques*, *17*(2), 310, 312, 314–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7980934>
- He, Y. Bin, Luo, H. Q., & Li, N. B. (2007). Thermodynamic and kinetic analysis of the interaction between hepatitis B surface antibody and antigen on a gold electrode modified with cysteamine and colloidal gold via electrochemistry. *Biosensors & bioelectronics*, *22*(12), 2952–7. doi:10.1016/j.bios.2006.11.031
- Hefferon, K. L. (2012). Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology*, *433*(1), 1–6. doi:10.1016/j.virol.2012.06.012
- Henderson, D. A. (1999). The looming threat of bioterrorism. *Science (New York, N.Y.)*, *283*(5406), 1279–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037590>



## Références

- Heng, B. C., & Cao, T. (2005). Making cell-permeable antibodies (Transbody) through fusion of protein transduction domains (PTD) with single chain variable fragment (scFv) antibodies: potential advantages over antibodies expressed within the intracellular environment (Intrabody). *Medical hypotheses*, 64(6), 1105–8. doi:10.1016/j.mehy.2005.01.011
- Héricourt, J., & Richet, C. (1888). De la transfusion péritonéale, et de l'immunité qu'elle confère. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences*, cvii, 748–750.
- Héricourt, J., & Richet, C. (1895). Traitement d'un cas de sarcome par la sérothérapie. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences*, cxx:948–950.
- Hérodin, F., Thullier, P., Garin, D., & Drouet, M. (2005). Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology. *European cytokine network*, 16(2), 104–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941681>
- Hibbs, R. G., Weber, J. T., Corwin, A., Allos, B. M., Abd el Rehim, M. S., Sharkawy, S. E., Sarn, J. E., et al. (1996). Experience with the use of an investigational F(ab')<sub>2</sub> heptavalent botulism immune globulin of equine origin during an outbreak of type E botulism in Egypt. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 23(2), 337–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842274>
- Hill, K. K., Smith, T. J., Helma, C. H., Ticknor, L. O., Foley, B. T., Svensson, R. T., Brown, J. L., et al. (2007). Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *Journal of bacteriology*, 189(3), 818–32. doi:10.1128/JB.01180-06
- Hinton, P. R., Johlfs, M. G., Xiong, J. M., Hanestad, K., Ong, K. C., Bullock, C., Keller, S., et al. (2004). Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *The Journal of biological chemistry*, 279(8), 6213–6. doi:10.1074/jbc.C300470200
- Hinton, P. R., Xiong, J. M., Johlfs, M. G., Tang, M. T., Keller, S., & Tsurushita, N. (2006). An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(1), 346–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365427>
- Ho, M., Nagata, S., & Pastan, I. (2006). Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9637–42. doi:10.1073/pnas.0603653103
- Ho, M., & Pastan, I. (2009a). Display and selection of scFv antibodies on HEK-293T cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 562, 99–113. doi:10.1007/978-1-60327-302-2\_8
- Ho, M., & Pastan, I. (2009b). Mammalian cell display for antibody engineering. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 525, 337–52, xiv. doi:10.1007/978-1-59745-554-1\_18
- Hoarau, G., Pelloux, I., Gayot, A., Wroblewski, I., Popoff, M.-R., Mazuet, C., Maurin, M., et al. (2012). Two cases of type A infant botulism in Grenoble, France: no honey for infants. *European journal of pediatrics*, 171(3), 589–91. doi:10.1007/s00431-011-1649-5
- Hoet, R. M., Cohen, E. H., Kent, R. B., Rookey, K., Schoonbroodt, S., Hogan, S., Rem, L., et al. (2005). Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nature biotechnology*, 23(3), 344–8. doi:10.1038/nbt1067
- Hof, D., Hoeke, M. O., & Raats, J. M. H. (2008). Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens. *Clinical and experimental immunology*, 151(2), 367–77. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03569.x
- Holliger, P., Prospero, T., & Winter, G. (1993). “Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), 6444–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46948&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Holliger, P., & Riechmann, L. (1997). A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd. *Structure (London, England : 1993)*, 5(2), 265–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032075>
- Holliger, Philipp, & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology*, 23(9), 1126–36. doi:10.1038/nbt1142
- Honarvar, H., Jokilaakso, N., Andersson, K., Malmberg, J., Rosik, D., Orlova, A., Karlström, A. E., et al. (2013). Evaluation of backbone-cyclized HER2-binding 2-helix Affibody molecule for In Vivo molecular imaging. *Nuclear medicine and biology*, 40(3), 378–86. doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.12.009
- Hoogenboom, H R, & Winter, G. (1992). By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *Journal of molecular biology*, 227(2), 381–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404359>

## Références

- Hoogenboom, Hennie R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature biotechnology*, 23(9), 1105–16. doi:10.1038/nbt1126
- Huang, C., Stewart, A. K., Schwartz, R. S., & Stollar, B. D. (1992). Immunoglobulin heavy chain gene expression in peripheral blood B lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*, 89(4), 1331–43. doi:10.1172/JCI115719
- Hudson, E. P., Uhlen, M., & Rockberg, J. (2012). Multiplex epitope mapping using bacterial surface display reveals both linear and conformational epitopes. *Scientific reports*, 2, 706. doi:10.1038/srep00706
- Hudson, P. J., & Kortt, A. A. (1999). High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of immunological methods*, 231(1-2), 177–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648937>
- Hughes, J. M., Blumenthal, J. R., Merson, M. H., Lombard, G. L., Dowell, V. R., & Gangarosa, E. J. (1981). Clinical features of types A and B food-borne botulism. *Annals of internal medicine*, 95(4), 442–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7283294>
- Huovinen, T., Sanmark, H., Ylä-Pelto, J., Vehniäinen, M., & Lamminmäki, U. (2010). Oligovalent Fab display on M13 phage improved by directed evolution. *Molecular biotechnology*, 44(3), 221–31. doi:10.1007/s12033-009-9231-3
- Huse, W. D., Sastry, L., Iverson, S. A., Kang, A. S., Alting-Mees, M., Burton, D. R., Benkovic, S. J., et al. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4935), 1275–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2531466>
- Huss, H. H. (1980). Distribution of Clostridium botulinum. *Applied and environmental microbiology*, 39(4), 764–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=291416&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M. I., et al. (2007). Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC biotechnology*, 7, 14. doi:10.1186/1472-6750-7-14
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J., & Reinard, T. (2002). The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *Journal of virological methods*, 106(2), 225–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393153>
- Hütter, M.-L., & Schlenk, R. F. (2011). Gemtuzumab ozogamicin in non-acute promyelocytic acute myeloid leukemia. *Expert opinion on biological therapy*, 11(10), 1369–80. doi:10.1517/14712598.2011.604630
- Hwang, W. Y. K., Almagro, J. C., Buss, T. N., Tan, P., & Foote, J. (2005). Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(1), 35–42. doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.004
- Hwang, W. Y. K., & Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(1), 3–10. doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.001
- ## I
- Idusogie, E. E., Presta, L. G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P. Y., Ultsch, M., Meng, Y. G., et al. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(8), 4178–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754313>
- Igawa, T., Ishii, S., Tachibana, T., Maeda, A., Higuchi, Y., Shimaoka, S., Moriyama, C., et al. (2010). Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nature biotechnology*, 28(11), 1203–7. doi:10.1038/nbt.1691
- Ilan, E., Eren, R., Lubin, I., Nussbaum, O., Zauberman, A., & Dagan, S. (2002). The Trimer mouse: a system for generating human monoclonal antibodies and modeling human diseases. *Current opinion in molecular therapeutics*, 4(2), 102–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044030>
- Iliades, P., Kortt, A. A., & Hudson, P. J. (1997). Triabodies: single chain Fv fragments without a linker form trivalent trimers. *FEBS letters*, 409(3), 437–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224705>
- Inbar, D., Hochman, J., & Givol, D. (1972). Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(9), 2659–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=427010&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## Références

- Indik, Z. K., Park, J. G., Hunter, S., & Schreiber, A. D. (1995). The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood*, *86*(12), 4389–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541526>
- Inglesby, T. V., O’Toole, T., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Friedlander, A. M., *et al.* (2002). Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, *287*(17), 2236–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980524>
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., *et al.* (1996). Molecular composition of Clostridium botulinum type A progenitor toxins. *Infection and immunity*, *64*(5), 1589–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, *431*(7011), 931–45. doi:10.1038/nature03001
- Ishida, I., Tomizuka, K., Yoshida, H., Tahara, T., Takahashi, N., Ohguma, A., Tanaka, S., *et al.* (2002). Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. *Cloning and stem cells*, *4*(1), 91–102. doi:10.1089/153623002753632084
- Israel, E. J., Taylor, S., Wu, Z., Mizoguchi, E., Blumberg, R. S., Bhan, A., & Simister, N. E. (1997). Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology*, *92*(1), 69–74. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1363983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- ISTC. (1992). International Science and Technology Center website. Retrieved April 5, 2013, from [http://www.istc.ru/istc/istc.nsf/va\\_WebPages/WhoweareEng](http://www.istc.ru/istc/istc.nsf/va_WebPages/WhoweareEng)

## J

- Jackman, J., Chen, Y., Huang, A., Moffat, B., Scheer, J. M., Leong, S. R., Lee, W. P., *et al.* (2010). Development of a two-part strategy to identify a therapeutic human bispecific antibody that inhibits IgE receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*, *285*(27), 20850–9. doi:10.1074/jbc.M110.113910
- Jacobson, M. J., Lin, G., Tepp, W., Dupuy, J., Stenmark, P., Stevens, R. C., & Johnson, E. A. (2011). Purification, modeling, and analysis of botulinum neurotoxin subtype A5 (BoNT/A5) from Clostridium botulinum strain A661222. *Applied and environmental microbiology*, *77*(12), 4217–22. doi:10.1128/AEM.00201-11
- Jakovovits, A., Amado, R. G., Yang, X., Roskos, L., & Schwab, G. (2007). From Xenomouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nature biotechnology*, *25*(10), 1134–43. doi:10.1038/nbt1337
- Janeway, C., Murphy, K. P., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Immunologie*. (D. Boeck, Ed.) (3ème édit., p. 889). Bruxelles.
- Jang, J. Y., Jeong, J. G., Jun, H. R., Lee, S. C., Kim, J. S., Kim, Y. S., & Kwon, M. H. (2009). A nucleic acid-hydrolyzing antibody penetrates into cells via caveolae-mediated endocytosis, localizes in the cytosol and exhibits cytotoxicity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *66*(11-12), 1985–97. doi:10.1007/s00018-009-9179-2
- Jathoul, A. P., Holley, J. L., & Garmory, H. S. (2004). Efficacy of DNA vaccines expressing the type F botulinum toxin Hc fragment using different promoters. *Vaccine*, *22*(29-30), 3942–6. doi:10.1016/j.vaccine.2004.04.006
- Jeong, K. J., Jang, S. H., & Velmurugan, N. (2011). Recombinant antibodies: engineering and production in yeast and bacterial hosts. *Biotechnology journal*, *6*(1), 16–27. doi:10.1002/biot.201000381
- Jerne, N. K. (1955). THE NATURAL-SELECTION THEORY OF ANTIBODY FORMATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *41*(11), 849–57. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=534292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jevševar, S., Kusterle, M., & Kenig, M. (2012). PEGylation of antibody fragments for half-life extension. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *901*, 233–46. doi:10.1007/978-1-61779-931-0\_15
- Jin, R., Rummel, A., Binz, T., & Brunger, A. T. (2006). Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature*, *444*(7122), 1092–5. doi:10.1038/nature05387
- Jin, Y., Takegahara, Y., Sugawara, Y., Matsumura, T., & Fujinaga, Y. (2009). Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins - differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C. *Microbiology (Reading, England)*, *155*(Pt 1), 35–45. doi:10.1099/mic.0.021246-0

## Références

- Johnson, G., & Wu, T. T. (2001). Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic acids research*, 29(1), 205–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=29771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Johnson, P. R., & Hirsch, V. M. (1991). Pathogenesis of AIDS: the non-human primate model. *AIDS (London, England)*, 5 Suppl 2, S43–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1845059>
- Joliot, A., & Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature cell biology*, 6(3), 189–96. doi:10.1038/ncb0304-189
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), 522–5. doi:10.1038/321522a0
- Jones, R. G. A., Ochiai, M., Liu, Y., Ekong, T., & Sesardic, D. (2008). Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *Journal of immunological methods*, 329(1-2), 92–101. doi:10.1016/j.jim.2007.09.014
- Junghans, R. P., & Anderson, C. L. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5512–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- ## K
- Kaetzel, C. S., Robinson, J. K., Chintalacharuvu, K. R., Vaerman, J. P., & Lamm, M. E. (1991). The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), 8796–800. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kalb, S. R., Lou, J., Garcia-Rodriguez, C., Geren, I. N., Smith, T. J., Moura, H., ... Barr, J. R. (2009). Extraction and inhibition of enzymatic activity of botulinum neurotoxins/A1, /A2, and /A3 by a panel of monoclonal anti-BoNT/A antibodies. *PLoS one*, 4(4), e5355. doi:10.1371/journal.pone.0005355
- Kalb, S. R., Baudys, J., Rees, J. C., Smith, T. J., Smith, L. A., Helma, C. H., Hill, K., et al. (2012). De novo subtype and strain identification of botulinum neurotoxin type B through toxin proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(1), 215–26. doi:10.1007/s00216-012-5767-3
- Kantha, S. S. (1991). A centennial review; the 1890 tetanus antitoxin paper of von Behring and Kitasato and the related developments. *The Keio journal of medicine*, 40(1), 35–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2046211>
- Kaplan, E. H., Craft, D. L., & Wein, L. M. (2002). Emergency response to a smallpox attack: the case for mass vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10935–40. doi:10.1073/pnas.162282799
- Kashmiri, S. V. S., De Pascalis, R., Gonzales, N. R., & Schlom, J. (2005). SDR grafting--a new approach to antibody humanization. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(1), 25–34. doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.003
- Kastelic, D., & He, M. (2012). Ribosome display and screening for protein therapeutics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 899, 61–72. doi:10.1007/978-1-61779-921-1\_4
- Kawanishi, H., & Joseph, K. (1991). IL4, IL5 and IL6-mediated regulation of immunoglobulin (Ig) heavy chain class switching and Ig production by gut-associated lymphoid tissue (GALT) B cells from athymic nude (nu/nu) mice. *Immunological investigations*, 20(7), 605–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757119>
- Kazdobina, I. S. (1995). Stability of botulin toxins in solutions and beverages. *Gigiena i sanitaria*, 1(1), 9–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744287>
- Keim, P., Smith, K. L., Keys, C., Takahashi, H., Kurata, T., & Kaufmann, A. (2001). Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *Journal of clinical microbiology*, 39(12), 4566–7. doi:10.1128/JCM.39.12.4566-4567.2001
- Keller, J E, Neale, E. A., Oyler, G., & Adler, M. (1999). Persistence of botulinum neurotoxin action in cultured spinal cord cells. *FEBS letters*, 456(1), 137–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10452545>
- Keller, James E. (2008). Characterization of new formalin-detoxified botulinum neurotoxin toxoids. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 15(9), 1374–9. doi:10.1128/CVI.00117-08

## Références

- Khalaf, W. F., Caldwell, M. E., & Reddy, N. (2013). Brentuximab in the Treatment of CD30-Positive Enteropathy-Associated T-Cell Lymphoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, *11*(2), 137–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411380>
- Kim, A., Shin, T.-H., Shin, S.-M., Pham, C. D., Choi, D.-K., Kwon, M.-H., & Kim, Y.-S. (2012). Cellular Internalization Mechanism and Intracellular Trafficking of Filamentous M13 Phages Displaying a Cell-Penetrating Transbody and TAT Peptide. *PLoS one*, *7*(12), e51813. doi:10.1371/journal.pone.0051813
- Kim, S., Davis, M., Sinn, E., Patten, P., & Hood, L. (1981). Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged VH genes. *Cell*, *27*(3 Pt 2), 573–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6101208>
- Kim, Y.-S. Y.-R., Kim, J.-S., Lee, S.-C. S.-H., Lee, W.-R., Sohn, J.-N., Chung, Y.-C., Shim, H.-K., *et al.* (2006). Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. *The Journal of biological chemistry*, *281*(22), 15287–95. doi:10.1074/jbc.M600937200
- Kindt, T., J. Goldsby, Richard A. Osborne, B. A., & Fridman, C. (2008). *Immunologie : Le cours de Janis Kuby*. (Dunod, Ed.) (6ème édit., p. 684). Sciences Sup.
- King, L.-A., Popoff, M.-R., Mazuet, C., Espié, E., Vaillant, V., & De Valk, H. (2010). [Infant botulism in France, 1991-2009]. *Archives de pédiatrie : organe officiel de la Société française de pédiatrie*, *17*(9), 1288–92. doi:10.1016/j.arcped.2010.06.010
- Kishore, U., Ghai, R., Greenhough, T. J., Shrive, A. K., Bonifati, D. M., Gadjeva, M. G., Waters, P., *et al.* (2004). Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunology letters*, *95*(2), 113–28. doi:10.1016/j.imlet.2004.06.015
- Kloetzel, P. M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPII. *Nature immunology*, *5*(7), 661–9. doi:10.1038/ni1090
- Knapp, B., Omasits, U., Bohle, B., Maillere, B., Ebner, C., Schreiner, W., & Jahn-Schmid, B. (2009). 3-Layer-based analysis of peptide-MHC interaction: in silico prediction, peptide binding affinity and T cell activation in a relevant allergen-specific model. *Molecular immunology*, *46*(8-9), 1839–44. doi:10.1016/j.molimm.2009.01.009
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., *et al.* (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of molecular biology*, *296*(1), 57–86. doi:10.1006/jmbi.1999.3444
- Kobasa, D., Takada, A., Shinya, K., Hatta, M., Halfmann, P., Theriault, S., Suzuki, H., *et al.* (2004). Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, *431*(7009), 703–7. doi:10.1038/nature02951
- Kobayashi, R., Kohda, T., Kataoka, K., Ihara, H., Kozaki, S., Pascual, D. W., Staats, H. F., *et al.* (2005). A novel neurotoxic vaccine prevents mucosal botulism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *174*(4), 2190–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699151>
- Koepke, R., Sobel, J., & Arnon, S. S. (2008). Global occurrence of infant botulism, 1976-2006. *Pediatrics*, *122*(1), e73–82. doi:10.1542/peds.2007-1827
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*(5517), 495–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1172191>
- Konagaya, Y., Urakami, H., Hoshino, J., Kobayashi, A., Sasagawa, A., Yamazaki, A., Kozaki, S., *et al.* (2009). Change of thermal inactivation of Clostridium botulinum spores during rice cooking. *Journal of food protection*, *72*(11), 2400–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903408>
- Kontermann, R. E. (2009). Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, *23*(2), 93–109. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19489651>
- Koriazova, L. K., & Montal, M. (2003). Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nature structural biology*, *10*(1), 13–8. doi:10.1038/nsb879
- Korn, H., Berche, P., & Binder, P. (2008). *Les menaces biologiques. Biosécurité et responsabilité des scientifiques*. (1ère ed., p. 172). Paris: Presse universitaire de France.
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., & Sondermann, P. (2003). Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *Journal of molecular biology*, *325*(5), 979–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527303>



## Références

- Kretzschmar, T., & Geiser, M. (1995). Evaluation of antibodies fused to minor coat protein III and major coat protein VIII of bacteriophage M13. *Gene*, 155(1), 61–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7698668>
- Kubota, T., Watanabe, T., Yokosawa, N., Tsuzuki, K., Indoh, T., Moriishi, K., Sanda, K., *et al.* (1997). Epitope regions in the heavy chain of Clostridium botulinum type E neurotoxin recognized by monoclonal antibodies. *Applied and environmental microbiology*, 63(4), 1214–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168414&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kudou, M., Ejima, D., Sato, H., Yumioka, R., Arakawa, T., & Tsumoto, K. (2011). Refolding single-chain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein expression and purification*, 77(1), 68–74. doi:10.1016/j.pep.2010.12.007
- Kukreja, R., & Singh, B. (2005). Biologically active novel conformational state of botulinum, the most poisonous poison. *The Journal of biological chemistry*, 280(47), 39346–52. doi:10.1074/jbc.M508463200
- Kukreja, R. V., Sharma, S. K., & Singh, B. R. (2010). Molecular basis of activation of endopeptidase activity of botulinum neurotoxin type E. *Biochemistry*, 49(11), 2510–9. doi:10.1021/bi902096r
- Kumar, G., Agarwal, R., & Swaminathan, S. (2012). Discovery of a fluorene class of compounds as inhibitors of botulinum neurotoxin serotype E by virtual screening. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 48(18), 2412–4. doi:10.1039/c2cc17158a
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Furey, W., Navaza, J., Sax, M., & Swaminathan, S. (2009). Domain organization in Clostridium botulinum neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation. *Journal of molecular biology*, 386(1), 233–45. doi:10.1016/j.jmb.2008.12.027
- Kummer, L., Parizek, P., Rube, P., Millgramm, B., Prinz, A., Mittl, P. R. E., Kaufholz, M., *et al.* (2012). Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), E2248–57. doi:10.1073/pnas.1205399109
- L**
- Lacy, D. B., & Stevens, R. C. (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *Journal of molecular biology*, 291(5), 1091–104. doi:10.1006/jmbi.1999.2945
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R., & Stevens, R. C. (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nature structural biology*, 5(10), 898–902. doi:10.1038/2338
- Ladner, R. C. (2007). Mapping the epitopes of antibodies. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 24, 1–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059626>
- Lafaille, J. J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., & Tonegawa, S. (1989). Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell*, 59(5), 859–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2590942>
- Laffly, E., Danjou, L., Condemine, F., Vidal, D., Drouet, E., Lefranc, M.-P., Bottex, C., *et al.* (2005). Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralize the protective antigen (PA) of Bacillus anthracis by binding to the segment of PA between residues 686 and 694. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3414–20. doi:10.1128/AAC.49.8.3414-3420.2005
- Lamanna, C., Eklund, H. W., & McElroy, O. E. (1946). Botulinum toxin (type A); including a study of shaking with chloroform as a step in the isolation procedure. *Journal of bacteriology*, 52, 1–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20994864>
- Lang, P. (2003). *Rapport d'information N°1097 de l'assemblée nationale sur le bioterrorisme* (p. 30 septembre 2003). Paris.
- Larrick, J. W., Danielsson, L., Brenner, C. A., Abrahamson, M., Fry, K. E., & Borrebaeck, C. A. (1989). Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction. *Biochemical and biophysical research communications*, 160(3), 1250–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499327>
- Lata, S., Bhasin, M., & Raghava, G. P. S. (2009). MHCBN 4.0: A database of MHC/TAP binding peptides and T-cell epitopes. *BMC research notes*, 2, 61. doi:10.1186/1756-0500-2-61
- Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., *et al.* (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4005–10. doi:10.1073/pnas.0508123103

## Références

- Lazar, G. A., Desjarlais, J. R., Jacinto, J., Karki, S., & Hammond, P. W. (2007). A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization. *Molecular immunology*, *44*(8), 1986–98. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.029
- Lebeda, F. J., & Olson, M. A. (1995). Structural predictions of the channel-forming region of botulinum neurotoxin heavy chain. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *33*(4), 559–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570641>
- Lebeda, Frank J., Cer, R. Z., Mudunuri, U., Stephens, R., Singh, B. R., & Adler, M. (2010). The zinc-dependent protease activity of the botulinum neurotoxins. *Toxins*, *2*(5), 978–97. doi:10.3390/toxins2050978
- Leclair, D., Farber, J. M., Doidge, B., Blanchfield, B., Suppa, S., Pagotto, F., & Austin, J. W. (2013). Distribution of Clostridium botulinum Type E Strains in Nunavik, Northern Quebec, Canada. *Applied and environmental microbiology*, *79*(2), 646–54. doi:10.1128/AEM.05999-11
- Lee, H.-W., Lee, S.-H., Park, K.-J., Kim, J.-S., Kwon, M.-H., & Kim, Y.-S. (2006). Construction and characterization of a pseudo-immune human antibody library using yeast surface display. *Biochemical and biophysical research communications*, *346*(3), 896–903. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.202
- Lefranc, M. P. (2001). Nomenclature of the human immunoglobulin genes. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, Appendix 1, Appendix 1P. doi:10.1002/0471142735.ima01ps40
- Lefranc, M.-P., Ehrenmann, F., Ginestoux, C., Giudicelli, V., & Duroux, P. (2012). Use of IMGT(®) databases and tools for antibody engineering and humanization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *907*, 3–37. doi:10.1007/978-1-61779-974-7\_1
- Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V., et al. (2003). IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Developmental and comparative immunology*, *27*(1), 55–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477501>
- Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J., & Wilcox, G. (1987). Characterization of the Erwinia carotovora pelB gene and its product pectate lyase. *Journal of bacteriology*, *169*(9), 4379–83. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=213756&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lentz, B. R. (2007). PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *European biophysics journal : EBJ*, *36*(4-5), 315–26. doi:10.1007/s00249-006-0097-z
- Levy, R., Forsyth, C. M., LaPorte, S. L., Geren, I. N., Smith, L. A., & Marks, J. D. (2007). Fine and domain-level epitope mapping of botulinum neurotoxin type A neutralizing antibodies by yeast surface display. *Journal of molecular biology*, *365*(1), 196–210. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.084
- Li, B., Cardinale, S. C., Butler, M. M., Pai, R., Nuss, J. E., Peet, N. P., Bavari, S., et al. (2011). Time-dependent botulinum neurotoxin serotype A metalloprotease inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *19*(24), 7338–48. doi:10.1016/j.bmc.2011.10.062
- Li, B., Peet, N. P., Butler, M. M., Burnett, J. C., Moir, D. T., & Bowlin, T. L. (2011). Small molecule inhibitors as countermeasures for botulinum neurotoxin intoxication. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *16*(1), 202–20. doi:10.3390/molecules16010202
- Li, D., Mattoo, P., & Keller, J. E. (2012). New equine antitoxins to botulinum neurotoxins serotypes A and B. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, *40*(4), 240–6. doi:10.1016/j.biologicals.2012.03.004
- Li, Y., Cockburn, W., Kilpatrick, J. B., & Whitelam, G. C. (2000). High affinity ScFvs from a single rabbit immunized with multiple haptens. *Biochemical and biophysical research communications*, *268*(2), 398–404. doi:10.1006/bbrc.2000.2129
- Li, Y., Li, H., Smith-Gill, S. J., & Mariuzza, R. A. (2000). Three-dimensional structures of the free and antigen-bound Fab from monoclonal antilysozyme antibody HyHEL-63(.). *Biochemistry*, *39*(21), 6296–309. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828942>
- Liao, W. W. P., & Arthur, J. W. (2011). Predicting peptide binding to Major Histocompatibility Complex molecules. *Autoimmunity reviews*, *10*(8), 469–73. doi:10.1016/j.autrev.2011.02.003
- Lin, G., Tepp, W. H., Pier, C. L., Jacobson, M. J., & Johnson, E. A. (2010). Expression of the Clostridium botulinum A2 neurotoxin gene cluster proteins and characterization of the A2 complex. *Applied and environmental microbiology*, *76*(1), 40–7. doi:10.1128/AEM.01882-09
- Lin, Y., Tsumuraya, T., Wakabayashi, T., Shiraga, S., Fujii, I., Kondo, A., & Ueda, M. (2003). Display of a functional hetero-oligomeric catalytic antibody on the yeast cell surface. *Applied microbiology and biotechnology*, *62*(2-3), 226–32. doi:10.1007/s00253-003-1283-x



## Références

- Lindgren, J., Segerfeldt, P., Sholts, S. B., Gräslund, A., Karlström, A. E., & Wärmländer, S. K. T. S. (2013). Engineered non-fluorescent Affibody molecules facilitate studies of the amyloid-beta (A $\beta$ ) peptide in monomeric form: low pH was found to reduce A $\beta$ /Cu(II) binding affinity. *Journal of inorganic biochemistry*, *120*, 18–23. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.11.005
- Lindhofer, H., Mocikat, R., Steipe, B., & Thierfelder, S. (1995). Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *155*(1), 219–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7602098>
- Lindström, M., & Korkeala, H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical microbiology reviews*, *19*(2), 298–314. doi:10.1128/CMR.19.2.298-314.2006
- Linke, R., Klein, A., & Seimetz, D. (2010). Catumaxomab: clinical development and future directions. *mAbs*, *2*(2), 129–36. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2840231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lipovsek, D., & Plückthun, A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *Journal of immunological methods*, *290*(1-2), 51–67. doi:10.1016/j.jim.2004.04.008
- Lippow, S. M., & Tidor, B. (2007). Progress in computational protein design. *Current opinion in biotechnology*, *18*(4), 305–11. doi:10.1016/j.copbio.2007.04.009
- Lippow, S. M., Wittrup, K. D., & Tidor, B. (2007). Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation. *Nature biotechnology*, *25*(10), 1171–6. doi:10.1038/nbt1336
- Little, S. F., Leppä, S. H., & Friedlander, A. M. (1990). Production and characterization of monoclonal antibodies against the lethal factor component of Bacillus anthracis lethal toxin. *Infection and immunity*, *58*(6), 1606–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=258686&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lobato, M. N., & Rabbitts, T. H. (2004). Intracellular antibodies as specific reagents for functional ablation: future therapeutic molecules. *Current molecular medicine*, *4*(5), 519–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15267223>
- Löfblom, J., Sandberg, J., Wernérus, H., & Ståhl, S. (2007). Evaluation of staphylococcal cell surface display and flow cytometry for postselectional characterization of affinity proteins in combinatorial protein engineering applications. *Applied and environmental microbiology*, *73*(21), 6714–21. doi:10.1128/AEM.01432-07
- Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nature biotechnology*, *23*(9), 1117–25. doi:10.1038/nbt1135
- LOPH. (2011). *Botulism* (Vol. Infectious, p. 11). Retrieved from <http://new.dhh.louisiana.gov/assets/oph/Center-PHCH/Center-CH/infectious-epi/EpiManual/BotulismManual.pdf>
- Lou, J., Geren, I., Garcia-Rodriguez, C., Forsyth, C. M., Wen, W., Knopp, K., Brown, J., et al. (2010). Affinity maturation of human botulinum neurotoxin antibodies by light chain shuffling via yeast mating. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, *23*(4), 311–9. doi:10.1093/protein/gzq001
- Louis, J. M., Bewley, C. A., Gustchina, E., Aniana, A., & Clore, G. M. (2005). Characterization and HIV-1 fusion inhibitory properties of monoclonal Fabs obtained from a human non-immune phage library selected against diverse epitopes of the ectodomain of HIV-1 gp41. *Journal of molecular biology*, *353*(5), 945–51. doi:10.1016/j.jmb.2005.09.044
- Low, N. M., Holliger, P. H., & Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *Journal of molecular biology*, *260*(3), 359–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757799>

## M

- MacDonald, K. L., Rutherford, G. W., Friedman, S. M., Dietz, J. R., Kaye, B. R., McKinley, G. F., Tenney, J. H., et al. (1985). Botulism and botulism-like illness in chronic drug abusers. *Annals of internal medicine*, *102*(5), 616–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3985512>
- MacLennan, I. C. (1994a). Somatic mutation. From the dark zone to the light. *Current biology : CB*, *4*(1), 70–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922318>
- MacLennan, I. C. (1994b). Germinal centers. *Annual review of immunology*, *12*, 117–39. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001001

## Références

- Madej, T., Address, K. J., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Lanczycki, C. J., Liu, C., *et al.* (2012). MMDDB: 3D structures and macromolecular interactions. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D461–4. doi:10.1093/nar/gkr1162
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., & Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS letters*, 580(8), 2011–4. doi:10.1016/j.febslet.2006.02.074
- Maksymowych, A B, Reinhard, M., Malizio, C. J., Goodnough, M. C., Johnson, E. A., & Simpson, L. L. (1999). Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infection and immunity*, 67(9), 4708–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96798&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Maksymowych, A B, & Simpson, L. L. (1998). Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), 21950–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9705335>
- Maksymowych, Andrew B, & Simpson, L. L. (2004). Structural features of the botulinum neurotoxin molecule that govern binding and transcytosis across polarized human intestinal epithelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310(2), 633–41. doi:10.1124/jpet.104.066845
- Malito, E., Faleri, A., Lo Surdo, P., Veggi, D., Maruggi, G., Grassi, E., Cartocci, E., *et al.* (2013). Defining a protective epitope on factor H binding protein, a key meningococcal virulence factor and vaccine antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3304–9. doi:10.1073/pnas.1222845110
- Manchee, R. J., Broster, M. G., Stagg, A. J., & Hibbs, S. E. (1994). Formaldehyde Solution Effectively Inactivates Spores of *Bacillus anthracis* on the Scottish Island of Gruinard. *Applied and environmental microbiology*, 60(11), 4167–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mandecki, W., & Goldam, E. (2009). *Phage display and selection of protein ligands*. (G. Emanuel & G. Lorrence H, Eds.) (Practical., pp. 101–116). CRC Press. doi:10.1201/9781420009330.ch9
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., & Winter, G. (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *The Journal of biological chemistry*, 267(23), 16007–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644788>
- Martin, W. L., & Bjorkman, P. J. (1999). Characterization of the 2:1 complex between the class I MHC-related Fc receptor and its Fc ligand in solution. *Biochemistry*, 38(39), 12639–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504233>
- Marvin, D. A. (1998). Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current opinion in structural biology*, 8(2), 150–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631287>
- Massung, R. F., Liu, L. I., Qi, J., Knight, J. C., Yuran, T. E., Kerlavage, A. R., Parsons, J. M., *et al.* (1994). Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. *Virology*, 201(2), 215–40. doi:10.1006/viro.1994.1288
- Mates, M. (1999). *Rapport pour la commission des sciences et des technologies de l'Assemblée parlementaire de l'OTAN*.
- Matsumura, T., Jin, Y., Kabumoto, Y., Takegahara, Y., Oguma, K., Lencer, W. I., & Fujinaga, Y. (2008). The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cellular microbiology*, 10(2), 355–64. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01048.x
- May, C., Sapra, P., & Gerber, H.-P. (2012). Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer. *Biochemical pharmacology*, 84(9), 1105–12. doi:10.1016/j.bcp.2012.07.011
- Mayer, M., & Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society*, 123(25), 6108–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11414845>
- Mazor, Y., Van Blarcom, T., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (2009). Isolation of full-length IgG antibodies from combinatorial libraries expressed in *Escherichia coli*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 525, 217–39, xiv. doi:10.1007/978-1-59745-554-1\_11
- Mazor, Y., Van Blarcom, T., Mabry, R., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (2007). Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 25(5), 563–5. doi:10.1038/nbt1296
- Mazuet, C., Dano, J., Popoff, M. R., Créminon, C., & Volland, H. (2010). Characterization of botulinum neurotoxin type A neutralizing monoclonal antibodies and influence of their half-lives on therapeutic activity. *PloS one*, 5(8), e12416. doi:10.1371/journal.pone.0012416
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552–4. doi:10.1038/348552a0


## Références

- McCarthy, M. (2001). Anthrax attack in the USA. *The Lancet infectious diseases*, 1(5), 288–9. doi:10.1016/S1473-3099(01)00129-3
- Medesan, C., Matesoi, D., Radu, C., Ghetie, V., & Ward, E. S. (1997). Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(5), 2211–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036967>
- Meek, K. D., Hasemann, C. A., & Capra, J. D. (1989). Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. Inversions and fusions add to IgH somatic diversity. *The Journal of experimental medicine*, 170(1), 39–57. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2189376&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Meffre, E., Chiorazzi, M., & Nussenzweig, M. C. (2001). Circulating human B cells that express surrogate light chains display a unique antibody repertoire. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(4), 2151–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489999>
- Mellor, J. D., Brown, M. P., Irving, H. R., Zalcberg, J. R., & Dobrovic, A. (2013). A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *Journal of hematology & oncology*, 6, 1. doi:10.1186/1756-8722-6-1
- Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Jia, X. C., Maynard-Currie, C. E., Yang, X. D., Gallo, M. L., et al. (1997). Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature genetics*, 15(2), 146–56. doi:10.1038/ng0297-146
- Ménétreay, J., Gillet, D., & Ménez, A. (2005). Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 45(2), 129–37. doi:10.1016/j.toxicon.2004.09.004
- Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., & Carter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. *Nature biotechnology*, 16(7), 677–81. doi:10.1038/nbt0798-677
- Merens, A., Cavallo, J. D., Thibault, F., Salicis, F., Munoz, J. F., Courcol, R., & Binder, P. (2012). Assessment of the bio-preparedness and of the training of the French hospital laboratories in the event of biological threat. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 17(45). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153476>
- Merson, M. H., & Dowell, V. R. (1973). Epidemiologic, clinical and laboratory aspects of wound botulism. *The New England journal of medicine*, 289(19), 1005–10. doi:10.1056/NEJM197311082891904
- Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., & Yampolskaya, O. (1994). The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5188), 1202–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7973702>
- Metz, S., Haas, A. K., Daub, K., Croasdale, R., Stracke, J., Lau, W., Georges, G., et al. (2011). Bispecific digoxigenin-binding antibodies for targeted payload delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8194–9. doi:10.1073/pnas.1018565108
- Meyer, C. (2013). Graines de ricine. *Dictionnaire des sciences animales*. Retrieved April 17, 2013, from <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/liste-mots.php?fiche=24081&def=ricin+commun>
- Meyer, K F, & Eddie, B. (1951). Perspectives concerning botulism. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten; medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Virologie*, 133(4), 255–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14932143>
- Meyer, K. F., & Bubovsky, B. J. (1922). The distribution of the spores of B. botulinus in the United States. *The Journal of infectious diseases*, 31:559–594.
- Middlebrook, J. . L., & Franz, D. R. (1997). Botulinum toxins. In Brigadier General Russ Zajtchuk MC U.S.Army Borden Institute (Ed.), *Medical aspects of chemical and biological warfare* (p. Chapter 33: 643–654). Washington DC: Office of The Surgeon General Department of the Army, United States of America.
- Midura, T. F., & Arnon, S. S. (1976). Infant botulism. Identification of Clostridium botulinum and its toxins in faeces. *Lancet*, 2(7992), 934–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/62164>
- Miethe, S., Meyer, T., Wöhl-Bruhn, S., Frenzel, A., Schirrmann, T., Dübel, S., & Hust, M. (2012). Production of single chain fragment variable (scFv) antibodies in Escherichia coli using the LEX™ bioreactor. *Journal of biotechnology*. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.07.011
- MIIS. (2001). *Chronology of Aum Shinrikyo's CBW Activities* (p. 17). Retrieved from [http://cns.miiis.edu/reports/pdfs/aum\\_chrn.pdf](http://cns.miiis.edu/reports/pdfs/aum_chrn.pdf)

## Références

- Miller, G. (1982). Immortalization of human lymphocytes by Epstein-Barr virus. *The Yale journal of biology and medicine*, 55(3-4), 305–10. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2596471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Miller, J., Engelberg, S., & Broad, W. (2001). *Germs: Biological Weapons and America's Secret War* (p. 382). New York: Simon & Schuster.
- Mirick, G. R., Bradt, B. M., Denardo, S. J., & Denardo, G. L. (2004). A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of Radiopharmaceutica*, 48(4), 251–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640788>
- Mitscherlich, E., & Marth, E. H. (1984). *Microbial Survival in the Environment — Bacteria and Rickettsiae Important in Human and Animal Health*. (Springer-Verlag, Ed.). Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo.
- Mizanur, R. M., Gorbet, J., Swaminathan, S., & Ahmed, S. A. (2012). Inhibition of catalytic activities of botulinum neurotoxin light chains of serotypes A, B and E by acetate, sulfate and calcium. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 3(3), 313–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3476790&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mobley, J. A. (1995). Biological warfare in the twentieth century: lessons from the past, challenges for the future. *Military medicine*, 160(11), 547–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8538887>
- Moghaddam, A., Borgen, T., Stacy, J., Kausmally, L., Simonsen, B., Marvik, O. J., Brekke, O. H., *et al.* (2003). Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *Journal of immunological methods*, 280(1-2), 139–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972195>
- Montal, M. (2009). Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease by the heavy chain protein-conducting channel. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 54(5), 565–9. doi:10.1016/j.toxicon.2008.11.018
- Montecucco, C., & Schiavo, G. (1995). Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Quarterly reviews of biophysics*, 28(4), 423–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8771234>
- Moore, G. L., Chen, H., Karki, S., & Lazar, G. A. (2010). Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs*, 2(2), 181–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2840237&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., & Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), 6851–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=392030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mortensen, H. D., Dupont, K., Jespersen, L., Willats, W. G. T., & Arneborg, N. (2007). Identification of amino acids involved in the Flo11p-mediated adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to a polystyrene surface using phage display with competitive elution. *Journal of applied microbiology*, 103(4), 1041–7. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03325.x
- Morton, H. E. (1961). *The Toxicity of Clostridium Botulinum Type: A Toxin for Various Species of Animals, Including Man*. Philadelphia: institute of cooperative research, university of pennsylvania.
- Moutel, S., Nizak, C., & Perez, F. (2012). Selection and use of intracellular antibodies (intrabodies). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 907, 667–79. doi:10.1007/978-1-61779-974-7\_37
- Mukovozov, I., Sabljic, T., Hortelano, G., & Ofosu, F. A. (2008). Factors that contribute to the immunogenicity of therapeutic recombinant human proteins. *Thrombosis and haemostasis*, 99(5), 874–82. doi:10.1160/TH07-11-0654
- Mullaney, B. P., Pallavicini, M. G., & Marks, J. D. (2001). Epitope mapping of neutralizing botulinum neurotoxin A antibodies by phage display. *Infection and immunity*, 69(10), 6511–4. doi:10.1128/IAI.69.10.6511-6514.2001
- Mulleague, L., Bonner, S. M., Samuel, A., Nichols, P., Khan, M., Shaw, S., & Grüning, T. (2001). Wound botulism in drug addicts in the United Kingdom. *Anaesthesia*, 56(2), 120–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167471>
- Muller, P. Y., & Brennan, F. R. (2009). Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 85(3), 247–58. doi:10.1038/clpt.2008.273
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5), 553–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007474>

## Références

- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., & Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(26), 18470–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10373455>
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., *et al.* (2008). Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(11), 1789–96. doi:10.1200/JCO.2007.14.8957
- Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *Journal of biotechnology*, 74(4), 277–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526908>
- 
- Nadel, B., & Feeney, A. J. (1997). Nucleotide deletion and P addition in V(D)J recombination: a determinant role of the coding-end sequence. *Molecular and cellular biology*, 17(7), 3768–78. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232228&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nakamura, T., Tonozuka, T., Ito, S., Takeda, Y., Sato, R., Matsuo, I., Ito, Y., *et al.* (2011). Molecular diversity of the two sugar-binding sites of the  $\beta$ -trefoil lectin HA33/C (HA1) from Clostridium botulinum type C neurotoxin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 512(1), 69–77. doi:10.1016/j.abb.2011.05.012
- Nakayama, S., Takahashi, H., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Current opinion in immunology*, 24(3), 297–302. doi:10.1016/j.coi.2012.01.014
- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., *et al.* (2008). Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer research*, 68(10), 3863–72. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6297
- Nester, W. R. (2000). *Haughty Conquerors: Amherst and the Great Indian Uprising of 1763*. (Praeger, Ed.). Westport.
- Neuberger, M. S., Harris, R. S., Di Noia, J., & Petersen-Mahrt, S. K. (2003). Immunity through DNA deamination. *Trends in biochemical sciences*, 28(6), 305–12. doi:10.1016/S0968-0004(03)00111-7
- Neylon, C. (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic acids research*, 32(4), 1448–59. doi:10.1093/nar/gkh315
- Nielsen, M., Lundegaard, C., Blicher, T., Peters, B., Sette, A., Justesen, S., Buus, S., *et al.* (2008). Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS computational biology*, 4(7), e1000107. doi:10.1371/journal.pcbi.1000107
- Nielsen, M., Lundegaard, C., & Lund, O. (2007). Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC bioinformatics*, 8, 238. doi:10.1186/1471-2105-8-238
- Nilsson, K., Klein, G., Henle, W., & Henle, G. (1971). The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 8(3), 443–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4332899>
- Nishikawa, A., Uotsu, N., Arimitsu, H., Lee, J.-C., Miura, Y., Fujinaga, Y., Nakada, H., *et al.* (2004). The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(2), 327–33. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.183
- Norman, D. J., Chatenoud, L., Cohen, D., Goldman, M., & Shield, C. F. (1993). Consensus statement regarding OKT3-induced cytokine-release syndrome and human antimouse antibodies. *Transplantation proceedings*, 25(2 Suppl 1), 89–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8465436>
- Novotný, J., Handschumacher, M., Haber, E., Bruccoleri, R. E., Carlson, W. B., Fanning, D. W., Smith, J. A., *et al.* (1986). Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes (antibody domains). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(2), 226–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=322830&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>



## Références

- Nowakowski, A., Wang, C., Powers, D. B., Amersdorfer, P., Smith, T. J., Montgomery, V. A., Sheridan, R., *et al.* (2002). Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(17), 11346–50. doi:10.1073/pnas.172229899
- Nygren, P.-A. (2008). Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *The FEBS journal*, *275*(11), 2668–76. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06438.x
- Nyindo, M., & Farah, I. O. (1999). The baboon as a non-human primate model of human schistosome infection. *Parasitology today (Personal ed.)*, *15*(12), 478–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10557147>
- ## O
- O'Connell, D., Becerril, B., Roy-Burman, A., Daws, M., & Marks, J. D. (2002). Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. *Journal of molecular biology*, *321*(1), 49–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139932>
- Ober, R. J., Radu, C. G., Ghetie, V., & Ward, E. S. (2001). Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *International immunology*, *13*(12), 1551–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717196>
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., & Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science (New York, N.Y.)*, *248*(4962), 1517–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2360047>
- Offerman, S. R., Schaefer, M., Thundiyl, J. G., Cook, M. D., & Holmes, J. F. (2009). Wound botulism in injection drug users: time to antitoxin correlates with intensive care unit length of stay. *The western journal of emergency medicine*, *10*(4), 251–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2791728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Oguma, K., Agui, T., Syuto, B., Kimura, K., Iida, H., & Kubo, S. (1982). Four different monoclonal antibodies against type C1 toxin of *Clostridium botulinum*. *Infection and immunity*, *38*(1), 14–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=347689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ohishi, I., Sugii, S., & Sakaguchi, G. (1977). Oral toxicities of *Clostridium botulinum* toxins in response to molecular size. *Infection and immunity*, *16*(1), 107–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=421495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ohlin, M., Owman, H., Mach, M., & Borrebaeck, C. A. (1996). Light chain shuffling of a high affinity antibody results in a drift in epitope recognition. *Molecular immunology*, *33*(1), 47–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604223>
- Olafsen, T., Sirk, S. J., Olma, S., Shen, C. K.-F., & Wu, A. M. (2012). ImmunoPET using engineered antibody fragments: fluorine-18 labeled diabodies for same-day imaging. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *33*(3), 669–77. doi:10.1007/s13277-012-0365-8
- Opinel, A. (2007). The Pasteur Hospital as an element of Emile Roux's anti-diphtheria apparatus (1890-1914). *Dynamis (Granada, Spain)*, *27*, 83–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18351160>
- Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on honey and microbiological hazards.* (2002). Bruxelles.
- Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. (2002). *Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, statistiques sur les maladies d'origine alimentaire en Europe, risques microbiologiques et chimiques.* Budapest.
- Organisation Mondiale de la Santé. (1980). *L'éradication mondiale de la variole, rapport final de la commission mondiale pour la certification de l'éradication de la variole* (Histoire d., p. 135). Genève: Organisation Mondiale De La Santé -- Commission mondiale pour la certification de l'éradication de la variole. Retrieved from [http://whqlibdoc.who.int/publications/a41464\\_fre.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/a41464_fre.pdf)
- Orii, H., Yamaguchi, T., & Watanabe, K. (2013). Single-step cloning of a hybridoma producing a monoclonal antibody against a target protein. *Analytical biochemistry*, *434*(1), 52–3. doi:10.1016/j.ab.2012.10.042
- Orlandi, R., Güssow, D. H., Jones, P. T., & Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(10), 3833–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=287235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## Références

Orlova, A., Hofström, C., Strand, J., Varasteh, Z., Sandstrom, M., Andersson, K., Tolmachev, V., *et al.* (2013). [99mTc(CO)<sub>3</sub>]+-(HE)<sub>3</sub>-ZIGF1R:4551, a new Affibody conjugate for visualization of insulin-like growth factor-1 receptor expression in malignant tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 40(3), 439–49. doi:10.1007/s00259-012-2284-8

Ostberg, L., & Queen, C. (1995). Human and humanized monoclonal antibodies: preclinical studies and clinical experience. *Biochemical Society transactions*, 23(4), 1038–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654677>

## P

Padlan, E. A., Abergel, C., & Tipper, J. P. (1995). Identification of specificity-determining residues in antibodies. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(1), 133–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821752>

Padlan, E. A., Silverton, E. W., Sheriff, S., Cohen, G. H., Smith-Gill, S. J., & Davies, D. R. (1989). Structure of an antibody-antigen complex: crystal structure of the HyHEL-10 Fab-lysozyme complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), 5938–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=297746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Pandit, D., Tuske, S. J., Coales, S. J., E, S. Y., Liu, A., Lee, J. E., Morrow, J. A., *et al.* (2012). Mapping of discontinuous conformational epitopes by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and computational docking. *Journal of molecular recognition : JMR*, 25(3), 114–24. doi:10.1002/jmr.1169

Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., & Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC biotechnology*, 9, 6. doi:10.1186/1472-6750-9-6

Papaloucas, M., Papaloucas, C., & Stergioulas, A. (2008). Ricin and the assassination of Georgi Markov. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 11(19), 2370–1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137875>

Pardridge, W. M. (2010). Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *Journal of drug targeting*, 18(3), 157–67. doi:10.3109/10611860903548354

Parham, P. (2005). *The immun system* (2nd ed., p. 456). New-York: Garland Science.

Park, J.-B., & Simpson, L. L. (2003). Inhalational poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component. *Infection and immunity*, 71(3), 1147–54. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Pascual, M., & Schifferli, J. A. (1995). Another function of erythrocytes: transport of circulating immune complexes. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*, 22(5), 310–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8924746>

Paul, C. J., Twine, S. M., Tam, K. J., Mullen, J. A., Kelly, J. F., Austin, J. W., & Logan, S. M. (2007). Flagellin diversity in Clostridium botulinum groups I and II: a new strategy for strain identification. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 2963–75. doi:10.1128/AEM.02623-06

Pavoni, E., Monteriù, G., Cianfriglia, M., & Minenkova, O. (2007). New display vector reduces biological bias for expression of antibodies in E. coli. *Gene*, 391(1-2), 120–9. doi:10.1016/j.gene.2006.12.009

Peck, M. W. (2009). Biology and genomic analysis of Clostridium botulinum. *Advances in microbial physiology*, 55, 183–265, 320. doi:10.1016/S0065-2911(09)05503-9

Pedersen, J. T., Henry, A. H., Searle, S. J., Guild, B. C., Roguska, M., & Rees, A. R. (1994). Comparison of surface accessible residues in human and murine immunoglobulin Fv domains. Implication for humanization of murine antibodies. *Journal of molecular biology*, 235(3), 959–73. doi:10.1006/jmbi.1994.1050

Pedroso, I., Irún, M. P., Machicado, C., & Sancho, J. (2002). Four-state equilibrium unfolding of an scFv antibody fragment. *Biochemistry*, 41(31), 9873–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146953>

Peipp, M., Simon, N., Loichinger, A., Baum, W., Mahr, K., Zunino, S. J., & Fey, G. H. (2001). An improved procedure for the generation of recombinant single-chain Fv antibody fragments reacting with human CD13 on intact cells. *Journal of immunological methods*, 251(1-2), 161–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292491>



## Références

- Pekrun, K., Shibata, R., Igarashi, T., Reed, M., Sheppard, L., Patten, P. A., Stemmer, W. P. C., *et al.* (2002). Evolution of a human immunodeficiency virus type 1 variant with enhanced replication in pig-tailed macaque cells by DNA shuffling. *Journal of virology*, 76(6), 2924–35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135969&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pelat, T., Bedouelle, H., Rees, A. R., Crennell, S. J., Lefranc, M.-P., & Thullier, P. (2008). Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by in vitro and in silico engineering. *Journal of molecular biology*, 384(5), 1400–7. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.033
- Pelat, T., Hust, M., Hale, M., Lefranc, M.-P., Dübel, S., & Thullier, P. (2009). Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC biotechnology*, 9, 60. doi:10.1186/1472-6750-9-60
- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M.-P., *et al.* (2007). High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(8), 2758–64. doi:10.1128/AAC.01528-06
- Pendley, C., Schantz, A., & Wagner, C. (2003). Immunogenicity of therapeutic monoclonal antibodies. *Current opinion in molecular therapeutics*, 5(2), 172–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12772508>
- Peng, L., Berntsson, R. P.-A., Tepp, W. H., Pitkin, R. M., Johnson, E. A., Stenmark, P., & Dong, M. (2012). Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I and II as receptors, and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C and G toxins. *Journal of cell science*, 125(Pt 13), 3233–42. doi:10.1242/jcs.103564
- Peng, L., Tepp, W. H., Johnson, E. A., & Dong, M. (2011). Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS pathogens*, 7(3), e1002008. doi:10.1371/journal.ppat.1002008
- Pérez-Durán, P., Belver, L., De Yébenes, V. G., Delgado, P., Pisano, D. G., & Ramiro, A. R. (2012). UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *The Journal of experimental medicine*, 209(7), 1379–89. doi:10.1084/jem.20112253
- Pickett, J., Berg, B., Chaplin, E., & Brunstetter-Shafer, M. A. (1976). Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study. *The New England journal of medicine*, 295(14), 770–2. doi:10.1056/NEJM197609302951407
- Pier, C. L., Tepp, W. H., Bradshaw, M., Johnson, E. A., Barbieri, J. T., & Baldwin, M. R. (2008). Recombinant holotoxoid vaccine against botulism. *Infection and immunity*, 76(1), 437–42. doi:10.1128/IAI.00843-07
- Pina, M., Severino, L. S., Beltrão, N., Villeneuve, P., & Lago, R. (2005). De nouvelles voies de valorisation pour redynamiser la filière ricin au Brésil. *Cahiers Agriculture*, 14(1), 169–171.
- Pingeon, J. M., Vanbockstael, C., Popoff, M. R., King, L. A., Deschamps, B., Pradel, G., Dupont, H., *et al.* (2011). Two outbreaks of botulism associated with consumption of green olive paste, France, September 2011. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 16(49), 20035. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22172329>
- Piro, A., Tagarelli, A., Tagarelli, G., Lagonia, P., & Quattrone, A. (2008). Paul Ehrlich: the Nobel Prize in physiology or medicine 1908. *International reviews of immunology*, 27(1-2), 1–17. doi:10.1080/08830180701848995
- Ploss, M., & Kuhn, A. (2011). Membrane insertion and assembly of epitope-tagged gp9 at the tip of the M13 phage. *BMC microbiology*, 11, 211. doi:10.1186/1471-2180-11-211
- Podack, E. R., Esser, A. F., Biesecker, G., & Müller-Eberhard, H. J. (1980). Membrane attack complex of complement: a structural analysis of its assembly. *The Journal of experimental medicine*, 151(2), 301–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2185789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P., & Saul, F. (1973). Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3305–10. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=427225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Poltoratsky, V., Goodman, M. F., & Scharff, M. D. (2000). Error-prone candidates vie for somatic mutation. *The Journal of experimental medicine*, 192(10), F27–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Poole, J. A., Meng, J., Reff, M., Spellman, M. C., & Rosenwasser, L. J. (2005). Anti-CD23 monoclonal antibody, lumiliximab, inhibited allergen-induced responses in antigen-presenting cells and T cells from atopic subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(4), 780–8. doi:10.1016/j.jaci.2005.07.007

## Références

- Popoff, M., & Marvaud, J.-C. (1999). *Structural and genomic features of clostridial neurotoxins*. (A. Press, Ed.) (The compre., pp. 174–201). London.
- Porter, R. R. (1958). Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature*, *182*(4636), 670–1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13590068>
- Potter, K. J., Zhang, W., Smith, L. A., & Meagher, M. M. (2000). Production and purification of the heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, *19*(3), 393–402. doi:10.1006/prep.2000.1256
- Poul, M. A., Becerril, B., Nielsen, U. B., Morisson, P., & Marks, J. D. (2000). Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *Journal of molecular biology*, *301*(5), 1149–61. doi:10.1006/jmbi.2000.4026
- Poul, M.-A. (2009). Selection of antibodies able to rapidly enter mammalian cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *562*, 155–63. doi:10.1007/978-1-60327-302-2\_12
- Poulain, B., Rossetto, O., Deloye, F., Schiavo, G., Tauc, L., & Montecucco, C. (1993). Antibodies against rat brain vesicle-associated membrane protein (synaptobrevin) prevent inhibition of acetylcholine release by tetanus toxin or botulinum neurotoxin type B. *Journal of neurochemistry*, *61*(3), 1175–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395562>
- Poungpair, O. O., Pootong, A., Maneewatch, S., Srimanote, P., Tongtawe, P., Songserm, T., Tapchaisri, P., *et al.* (2010). A human single chain transbody specific to matrix protein (M1) interferes with the replication of influenza A virus. *Bioconjugate chemistry*, *21*(7), 1134–1141. doi:10.1021/bc900251u
- Powell, S. K., Kaloss, M. A., Pinkstaff, A., McKee, R., Burimski, I., Pensiero, M., Otto, E., *et al.* (2000). Breeding of retroviruses by DNA shuffling for improved stability and processing yields. *Nature biotechnology*, *18*(12), 1279–82. doi:10.1038/82391
- Preud'homme, J. L., Petit, I., Barra, A., Morel, F., Lecron, J. C., & Lelièvre, E. (2000). Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Molecular immunology*, *37*(15), 871–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282392>
- Prevention, C. for D. C. and. (1998). *Botulism in the United States, 1899-1996*. (C. for D. C. and Prevention, Ed.) (Handbook f.). Atlanta.
- ## Q
- Qi, H., Lu, H., Qiu, H.-J., Petrenko, V., & Liu, A. (2012). Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *Journal of molecular biology*, *417*(3), 129–43. doi:10.1016/j.jmb.2012.01.038
- Quartier, P., Bustamante, J., Sanal, O., Plebani, A., Debré, M., Deville, A., Litzman, J., *et al.* (2004). Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, *110*(1), 22–9. doi:10.1016/j.clim.2003.10.007
- Queen, C., Schneider, W. P., Selick, H. E., Payne, P. W., Landolfi, N. F., Duncan, J. F., Avdalovic, N. M., *et al.* (1989). A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(24), 10029–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=298637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Quintero-Hernández, V., Juárez-González, V. R., Ortiz-León, M., Sánchez, R., Possani, L. D., & Becerril, B. (2007). The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. *Molecular immunology*, *44*(6), 1307–15. doi:10.1016/j.molimm.2006.05.009
- ## R
- Raghavan, M., & Bjorkman, P. J. (1996). Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annual review of cell and developmental biology*, *12*, 181–220. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.181
- Raju, T. N. (1999). The Nobel chronicles. 1972: Gerald M Edelman (b 1929) and Rodney R Porter (1917-85). *Lancet*, *354*(9183), 1040. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501404>
- Ramirez-Benitez, M. C., & Almagro, J. C. (2001). Analysis of antibodies of known structure suggests a lack of correspondence between the residues in contact with the antigen and those modified by somatic hypermutation. *Proteins*, *45*(3), 199–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599023>

## Références

- Raphael, B. H., Choudoir, M. J., Lúquez, C., Fernández, R., & Maslanka, S. E. (2010). Sequence diversity of genes encoding botulinum neurotoxin type F. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4805–12. doi:10.1128/AEM.03109-09
- Rasetti-Escargueil, C., Liu, Y., Rigsby, P., Jones, R. G. A., & Sesardic, D. (2011). Phrenic nerve-hemidiaphragm as a highly sensitive replacement assay for determination of functional botulinum toxin antibodies. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxicology*, 57(7-8), 1008–16. doi:10.1016/j.toxicon.2011.04.003
- Rauber, A., & Heard, J. (1985). Castor bean toxicity re-examined: a new perspective. *Veterinary and human toxicology*, 27(6), 498–502. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4082461>
- Ravichandran, E., Al-Saleem, F. H., Ancharski, D. M., Elias, M. D., Singh, A. K., Shamim, M., Gong, Y., et al. (2007). Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route. *Infection and immunity*, 75(6), 3043–54. doi:10.1128/IAI.01893-06
- Raynaud, L. (1896). *Essais de sérothérapie contre le typhus exanthématique: (sérum de convalescents)* (Charles Za., p. 16).
- Reiber, H., & Felgenhauer, K. (1987). Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 163(3), 319–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3581475>
- Reichert, J. M. (2013). Which are the antibodies to watch in 2013? *mAbs*, 5(1), 1–4. doi:10.4161/mabs.22976
- Reid, K. (2005). Using the flea as weapon. *Army Chemical Review*.
- Reisner, Y., & Dagan, S. (1998). The Trimer mouse: generating human monoclonal antibodies and an animal model for human diseases. *Trends in biotechnology*, 16(6), 242–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652134>
- République française. (2004). Arrêté du 15 janvier 2004 relatif à la mise en oeuvre, l'importation, l'exportation, la détention, la cession à titre gratuit ou onéreux, l'acquisition et le transport de certains agents responsables de maladies infectieuses, micro-organismes pathogènes e. *JORF N°17 du 21 janvier 2004 page 1567 texte n° 34*. Retrieved April 5, 2013, from <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000415652&dateTexte=&categorieLien=id>
- République française. (2007). Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en oeuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établis. *Code de santé publique, texte 22 du 16 juillet 2007 NOR : MTST07564294*. Retrieved April 5, 2013, from <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000465273&dateTexte=&categorieLien=id>
- République française. (2008). Légifrance.fr. *Article R4421-2, du Code du travail, créé par le décret n°2008-244 du 7 mars 2008 - art. V*. Retrieved April 5, 2013, from <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000018530510&cidTexte=LEGITEXT000006072050&dateTexte=20100316&oldAction=rechCodeArticle>
- Rich, V. (1995). Japanese war-time experiments come to light. *Lancet*, 346(8974), 566. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11644727>
- Ricklin, D., Hajjishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, 11(9), 785–97. doi:10.1038/ni.1923
- Ridgway, J. B., Presta, L. G., & Carter, P. (1996). “Knobs-into-holes” engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein engineering*, 9(7), 617–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8844834>
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., & Winter, G. (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 332(6162), 323–7. doi:10.1038/332323a0
- Rinaldi, A.-S., Freund, G., Desplancq, D., Sibling, A.-P., Baltzinger, M., Rochel, N., Mély, Y., et al. (2013). The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cancer cells. *Experimental cell research*. doi:10.1016/j.yexcr.2013.01.011
- Risks and benefits of dual-use research. (2005). *Nature*, 435(7044), 855. doi:10.1038/435855a
- Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced drug delivery reviews*, 54(4), 459–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052709>
- Robinson, N. A., Matson, C. F., & Pace, J. G. (1991). Association of microcystin-LR and its biotransformation product with a hepatic-cytosolic protein. *Journal of biochemical toxicology*, 6(3), 171–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1770501>

## Références

- Roblot, F., Popoff, M., Carlier, J. P., Godet, C., Abbadie, P., Matthis, S., Eisendorn, A., *et al.* (2006). Botulism in patients who inhale cocaine: the first cases in France. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(5), e51–2. doi:10.1086/506567
- Rock, K. L., York, I. A., & Goldberg, A. L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nature immunology*, 5(7), 670–7. doi:10.1038/ni1089
- Rodi, D. J., Soares, A. S., & Makowski, L. (2002). Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries. *Journal of molecular biology*, 322(5), 1039–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367527>
- Rodon, J., Garrison, M., Hammond, L. A., De Bono, J., Smith, L., Forero, L., Hao, D., *et al.* (2008). Cantuzumab mertansine in a three-times a week schedule: a phase I and pharmacokinetic study. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 62(5), 911–9. doi:10.1007/s00280-007-0672-8
- Roguska, M. A., Pedersen, J. T., Keddy, C. A., Henry, A. H., Searle, S. J., Lambert, J. M., Goldmacher, V. S., *et al.* (1994). Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3), 969–73. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rojas, G., Talavera, A., Munoz, Y., Rengifo, E., Kregel, U., Angström, J., Gavilondo, J., *et al.* (2004). Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to N-glycolyl GM3 ganglioside. *Journal of immunological methods*, 293(1-2), 71–83. doi:10.1016/j.jim.2004.07.002
- Ronzitti, N. (1989). Le désarmement chimique et le Protocole de Genève de 1925. *Annuaire français de droit international*, 35(35), 149–157.
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature reviews. Immunology*, 7(9), 715–25. doi:10.1038/nri2155
- Rosen, O., & Anglister, J. (2009). Epitope mapping of antibody-antigen complexes by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 524, 37–57. doi:10.1007/978-1-59745-450-6\_3
- Rossetto, O., & Montecucco, C. (2008). Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. *Handbook of experimental pharmacology*, (184), 129–70. doi:10.1007/978-3-540-74805-2\_6
- Rothe, C., Urlinger, S., Löhning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jäger, U., Hubner, B., *et al.* (2008). The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *Journal of molecular biology*, 376(4), 1182–200. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018
- Roux, K. H. (1999). Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy. *International archives of allergy and immunology*, 120(2), 85–99. doi:24226
- Roux, K. H., Strelets, L., & Michaelsen, T. E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(7), 3372–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317136>
- Rudnick, S. I., Lou, J., Shaller, C. C., Tang, Y., Klein-Szanto, A. J. P., Weiner, L. M., Marks, J. D., *et al.* (2011). Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer research*, 71(6), 2250–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2277
- Rusnak, J. M., & Smith, L. A. (2009). Botulinum neurotoxin vaccines: Past history and recent developments. *Human vaccines*, 5(12), 794–805. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684478>
- Rycyzyn, M. A., Staquet, K., Fisher, J., Bannish, G., Bassiri, A., Duchala, C., & Giles-Komar, J. (2008). The use of an anti-CD40 agonist monoclonal antibody during immunizations enhances hybridoma generation. *Hybridoma (2005)*, 27(1), 25–30. doi:10.1089/hyb.2007.0537

## S

- Sagane, Y., Watanabe, T., Kouguchi, H., Sunagawa, H., Inoue, K., Fujinaga, Y., Oguma, K., *et al.* (1999). Dichain structure of botulinum neurotoxin: identification of cleavage sites in types C, D, and F neurotoxin molecules. *Journal of protein chemistry*, 18(8), 885–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839626>

## Références

- Sagane, Yoshimasa, Inui, K., Miyashita, S.-I., Niwa, K., Watnabe, To., & Suzuki, T. (2012). Botulinum toxin complex: a delivery vehicle of botulinum neurotoxin traveling digestive tract. In Ayman Amer Eissa (Ed.), *Structure and Function of Food Engineering* (p. 404). InTech. doi:10.5772/46023
- Saldanha, J. (2013). Humanization by design. Retrieved March 15, 2013, from <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>
- Salzameda, N. T., Eubanks, L. M., Zakhari, J. S., Tsuchikama, K., DeNunzio, N. J., Allen, K. N., Hixon, M. S., *et al.* (2011). A cross-over inhibitor of the botulinum neurotoxin light chain B: a natural product implicating an exosite mechanism of action. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(6), 1713–5. doi:10.1039/c0cc04078a
- Sanofi/Regeneron. (2011). *Sanofi et Regeneron annoncent t des résultats positifs de Phase 2b pour sarilumab dans la polyarthrite rhumatoïde*. Communiqué de presse du 12 juillet 2011, Paris, New-York.
- Sblattero, D., & Bradbury, A. (2000). Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature biotechnology*, 18(1), 75–80. doi:10.1038/71958
- Scallan, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N., & Raju, T. S. (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular immunology*, 44(7), 1524–34. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.005
- Schaaper, R. M., & Radman, M. (1989). The extreme mutator effect of *Escherichia coli* mutD5 results from saturation of mismatch repair by excessive DNA replication errors. *The EMBO journal*, 8(11), 3511–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=401508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schanzer, J., Jekle, A., Nezu, J., Lochner, A., Croasdale, R., Dioszegi, M., Zhang, J., *et al.* (2011). Development of tetravalent, bispecific CCR5 antibodies with antiviral activity against CCR5 monoclonal antibody-resistant HIV-1 strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(5), 2369–78. doi:10.1128/AAC.00215-10
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., & Schlissel, M. S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annual review of immunology*, 10, 359–83. doi:10.1146/annurev.iy.10.040192.002043
- Schellenberger, V., Wang, C.-W., Geething, N. C., Spink, B. J., Campbell, A., To, W., Scholle, M. D., *et al.* (2009). A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nature biotechnology*, 27(12), 1186–90. doi:10.1038/nbt.1588
- Schep, L. J., Temple, W. A., Butt, G. A., & Beasley, M. D. (2009). Ricin as a weapon of mass terror--separating fact from fiction. *Environment international*, 35(8), 1267–71. doi:10.1016/j.envint.2009.08.004
- SCHER. (2009). *The need for non-human primat es in biomedical research, production and testing of products and devices*.
- Scheuermann, R. H., & Echols, H. (1984). A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), 7747–51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=392229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R., & Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 359(6398), 832–5. doi:10.1038/359832a0
- Schiavo, G., Santucci, A., Dasgupta, B. R., Mehta, P. P., Jontes, J., Benfenati, F., Wilson, M. C., *et al.* (1993). Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS letters*, 335(1), 99–103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243676>
- Schlebusch, H., Reinartz, S., Kaiser, R., Grün, U., & Wagner, U. (1997). Production of a single-chain fragment of the murine anti-idiotypic antibody ACA125 as phage-displayed and soluble antibody by recombinant phage antibody technique. *Hybridoma*, 16(1), 47–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9085128>
- Schlissel, M. S. (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nature reviews. Immunology*, 3(11), 890–9. doi:10.1038/nri1225
- Schmalstieg, F. C., & Goldman, A. S. (2009). Jules Bordet (1870-1961): a bridge between early and modern immunology. *Journal of medical biography*, 17(4), 217–24. doi:10.1258/jmb.2009.009061
- Schmid, G., & Kaufmann, A. (2002). Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(8), 479–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197870>
- Schmid, M. F., Robinson, J. P., & DasGupta, B. R. (1993). Direct visualization of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles. *Nature*, 364(6440), 827–30. doi:10.1038/364827a08395659



## Références

- Schmidt, E., Hennig, K., Mengede, C., Zillikens, D., & Kromminga, A. (2009). Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, *132*(3), 334–41. doi:10.1016/j.clim.2009.05.007
- Schmidt, J. J., & Stafford, R. G. (2002). A high-affinity competitive inhibitor of type A botulinum neurotoxin protease activity. *FEBS letters*, *532*(3), 423–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482605>
- Schmidt, M. M., & Wittrup, K. D. (2009). A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting. *Molecular cancer therapeutics*, *8*(10), 2861–71. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0195
- Schneider, S., & Zacharias, M. (2012). Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component. *Molecular immunology*, *51*(1), 66–72. doi:10.1016/j.molimm.2012.02.111
- Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J. J., Berger, S., Rossen, K., Van Berkel, P. H. C., Derer, S., Beyer, T., *et al.* (2010). Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(1), 512–20. doi:10.4049/jimmunol.0900847
- Schwaber, J., & Cohen, E. P. (1973). Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature*, *244*(5416), 444–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4200460>
- Schwaber, J., & Cohen, E. P. (1974). Pattern of immunoglobulin synthesis and assembly in a human-mouse somatic cell hybrid clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(6), 2203–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=388419&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schwemmlin, M., Peipp, M., Barbin, K., Saul, D., Stockmeyer, B., Repp, R., Birkmann, J., *et al.* (2006). A CD33-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of cultured human myeloid leukaemia cells. *British journal of haematology*, *133*(2), 141–51. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05869.x
- Scott, A. B. (1981). Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, *79*, 734–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1312202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Scott, A. B., Rosenbaum, A., & Collins, C. C. (1973). Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Investigative ophthalmology*, *12*(12), 924–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4203467>
- Scott, A. B., & Suzuki, D. (1988). Systemic toxicity of botulinum toxin by intramuscular injection in the monkey. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, *3*(4), 333–5. doi:10.1002/mds.870030409
- Scott, C. T. (2007). Mice with a human touch. *Nature biotechnology*, *25*(10), 1075–7. doi:10.1038/nbt1007-1075
- Scott, J. K., & Smith, G. P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science (New York, N.Y.)*, *249*(4967), 386–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696028>
- SCRS. (1995). *La menace de Terrorisme Biologique ou Chimique Selon les sources publiées. Service canadien du renseignement de sécurité*. Retrieved from <http://www.csis-scrc.gc.ca/pblctns/thr/cbtrrrsm02-fra.asp>
- Seidl, T., Whittall, T., Babaahmady, K., & Lehner, T. (2012). B-cell agonists up-regulate AID and APOBEC3G deaminases, which induce IgA and IgG class antibodies and anti-viral function. *Immunology*, *135*(3), 207–15. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03524.x
- Sekiguchi, J. M., & Ferguson, D. O. (2006). DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell*, *124*(2), 260–2. doi:10.1016/j.cell.2006.01.010
- Sensel, M. G., Kane, L. M., & Morrison, S. L. (1997). Amino acid differences in the N-terminus of C(H)2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement. *Molecular immunology*, *34*(14), 1019–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488053>
- Shapiro, R. L., Hatheway, C., & Swerdlow, D. L. (1998). Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. *Annals of internal medicine*, *129*(3), 221–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696731>
- Shearer, J. D., Vassar, M. L., Swiderski, W., Metcalfe, K., Niemuth, N., & Henderson, I. (2010). Botulinum neurotoxin neutralizing activity of immune globulin (IG) purified from clinical volunteers vaccinated with recombinant botulinum vaccine (rBV A/B). *Vaccine*, *28*(45), 7313–8. doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.076
- Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., *et al.* (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens.

## Références

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6157–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shen, Y., Yang, X., Dong, N., Xie, X., Bai, X., & Shi, Y. (2007). Generation and selection of immunized Fab phage display library against human B cell lymphoma. *Cell research*, 17(7), 650–60. doi:10.1038/cr.2007.57
- Sheng, Z.-M., Chertow, D. S., Ambroggio, X., McCall, S., Przygodzki, R. M., Cunningham, R. E., Maximova, O. A., *et al.* (2011). Autopsy series of 68 cases dying before and during the 1918 influenza pandemic peak. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(39), 16416–21. doi:10.1073/pnas.1111179108
- Shi, G. P., Bryant, R. A., Riese, R., Verhelst, S., Driessen, C., Li, Z., Bromme, D., *et al.* (2000). Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 191(7), 1177–86. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shields, R L, Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., *et al.* (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *The Journal of biological chemistry*, 276(9), 6591–604. doi:10.1074/jbc.M009483200
- Shields, Robert L, Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. A., *et al.* (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 277(30), 26733–40. doi:10.1074/jbc.M202069200
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., *et al.* (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 278(5), 3466–73. doi:10.1074/jbc.M210665200
- Shusta, E. V., Kieke, M. C., Parke, E., Kranz, D. M., & Wittrup, K. D. (1999). Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *Journal of molecular biology*, 292(5), 949–56. doi:10.1006/jmbi.1999.3130
- Shyu, R. H., Shaio, M. F., Tang, S. S., Shyu, H. F., Lee, C. F., Tsai, M. H., Smith, J. E., *et al.* (2000). DNA vaccination using the fragment C of botulinum neurotoxin type A provided protective immunity in mice. *Journal of biomedical science*, 7(1), 51–7. doi:25429
- Sibérl, S., De Romeuf, C., Bihoreau, N., Fernandez, N., Meterreau, J.-L., Regenman, A., Nony, E., *et al.* (2006). Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc gamma R functions. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 118(2-3), 170–9. doi:10.1016/j.clim.2005.10.008
- Sibérl, S., Dutertre, C.-A., Fridman, W.-H., & Teillaud, J.-L. (2007). Fc gamma R: The key to optimize therapeutic antibodies? *Critical reviews in oncology/hematology*, 62(1), 26–33. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.12.003
- Sidhu, S. (Ed.). (2005). *Phage Display In Biotechnology and Drug Discovery* (Vol. 3). CRC Press. doi:10.1201/9780849359125
- Siegel, L. S. (1988). Human immune response to botulinum pentavalent (ABCDE) toxoid determined by a neutralization test and by an enzyme-linked immunosorbent assay. *The journal of clinical microbiology*, 26, 2361–2366.
- Simister, N. E., & Mostov, K. E. (1989). An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*, 337(6203), 184–7. doi:10.1038/337184a0
- Simon, J. (2007). Emil Behring's medical culture: from disinfection to serotherapy. *Medical history*, 51(2), 201–18. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1871706&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Simpson, L L. (1982). The interaction between aminoquinolines and presynaptically acting neurotoxins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 222(1), 43–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6283072>
- Simpson, L L. (1983). Ammonium chloride and methylamine hydrochloride antagonize clostridial neurotoxins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 225(3), 546–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6864519>
- Simpson, L L, Coffield, J. A., & Bakry, N. (1994). Inhibition of vacuolar adenosine triphosphatase antagonizes the effects of clostridial neurotoxins but not phospholipase A2 neurotoxins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 269(1), 256–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8169833>
- Simpson, Lance L. (2004). Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 44, 167–93. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121554



## Références

- Skerra, A., & Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4855), 1038–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3285470>
- Skrlj, N., Vranac, T., Popović, M., Curin Šerbec, V., & Dolinar, M. (2011). Specific binding of the pathogenic prion isoform: development and characterization of a humanized single-chain variable antibody fragment. *PloS one*, 6(1), e15783. doi:10.1371/journal.pone.0015783
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4001944>
- Smith, H. O., Hutchison, C. A., Pfannkoch, C., & Venter, J. C. (2003). Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15440–5. doi:10.1073/pnas.2237126100
- Smith, J. K., Burns, S., Cunningham, S., Freeman, J., McLellan, A., & McWilliam, K. (2010). The hazards of honey: infantile botulism. *BMJ case reports*, 2010. doi:10.1136/bcr.05.2010.3038
- Smith, T. J., Lou, J., Geren, I. N., Forsyth, C. M., Tsai, R., Laporte, S. L., Tepp, W. H., et al. (2005). Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infection and immunity*, 73(9), 5450–7. doi:10.1128/IAI.73.9.5450-5457.2005
- Snyder, D. (2003, May 6). The Front Lines of Biowarfare. *Washington post*.
- Sobel, J. (2005). Botulism. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(8), 1167–73. doi:10.1086/444507
- Somerfield, J., Hill-Cawthorne, G. A., Lin, A., Zandi, M. S., McCarthy, C., Jones, J. L., Willcox, M., et al. (2010). A novel strategy to reduce the immunogenicity of biological therapies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(1), 763–8. doi:10.4049/jimmunol.1000422
- Sonnabend, O., Sonnabend, W., Heinzle, R., Sigrist, T., Dirnhofer, R., & Krech, U. (1981). Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G botulinum toxin in humans: report of five sudden unexpected deaths. *The Journal of infectious diseases*, 143(1), 22–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7012244>
- Soong, N. W., Nomura, L., Pekrun, K., Reed, M., Sheppard, L., Dawes, G., & Stemmer, W. P. (2000). Molecular breeding of viruses. *Nature genetics*, 25(4), 436–9. doi:10.1038/78132
- Sourya, A., Samarth, S., SN, M., & SK, D. (2011). The charisma of “Magic Bullets”– Monoclonal antibodies (mAB/moAB) in clinical medicine. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, 12(4), 283–9. Retrieved from <http://medind.nic.in/jac/t11/i4/jact11i4p283.pdf>
- Spencer, B. J., & Verma, I. M. (2007). Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7594–9. doi:10.1073/pnas.0702170104
- Staquet, K., Fisher, J., Lamb, R., Bannish, G., Duchala, C., Mbow, M. L., Ryczyn, M. A., et al. (2006). A rapid and efficient method for generating anti-variable region monoclonal antibodies using type-1 interferons as immune modulators. *Human antibodies*, 15(3), 61–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065737>
- Stavnezer, J. (1996). Antibody class switching. *Advances in immunology*, 61, 79–146. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8834495>
- Stavnezer, Janet, Guikema, J. E. J., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology*, 26, 261–92. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248
- Stavnezer, Janet, & Kang, J. (2009). The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(1), 5–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109126>
- Stefan, D. (2007). *Handbook of Therapeutic Antibodies*. (D. S.-C. E. Stefan, Ed.) (p. 1228). Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Steinitz, M. (2009). Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments. *Human antibodies*, 18(1-2), 1–10. doi:10.3233/HAB-2009-0196
- Stemmer, W. P. (1994a). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10747–51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=45099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## Références

- Stemmer, W. P. (1994b). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370(6488), 389–91. doi:10.1038/370389a0
- Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M., & Heyneker, H. L. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164(1), 49–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7590320>
- Stengele, I., Bross, P., Garcés, X., Giray, J., & Rasched, I. (1990). Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites. *Journal of molecular biology*, 212(1), 143–9. doi:10.1016/0022-2836(90)90311-9
- Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E. R., & Stevens, R. C. (2010). Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding. *Journal of molecular biology*, 397(5), 1287–97. doi:10.1016/j.jmb.2010.02.041
- Stenmark, P., Dupuy, J., Imamura, A., Kiso, M., & Stevens, R. C. (2008). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS pathogens*, 4(8), e1000129. doi:10.1371/journal.ppat.1000129
- Story, C. M., Mikulska, J. E., & Simister, N. E. (1994). A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *The Journal of experimental medicine*, 180(6), 2377–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stowe, G. N., Silhár, P., Hixon, M. S., Silvaggi, N. R., Allen, K. N., Moe, S. T., Jacobson, A. R., et al. (2010). Chirality holds the key for potent inhibition of the botulinum neurotoxin serotype A protease. *Organic letters*, 12(4), 756–9. doi:10.1021/ol902820z
- Straughan, D. (2006). Progress in applying the Three Rs to the potency testing of Botulinum toxin type A. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 34(3), 305–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831062>
- Streltsov, V. A., Carmichael, J. A., & Nuttall, S. D. (2005). Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 14(11), 2901–9. doi:10.1110/ps.051709505
- Strohl, W. R., & Strohl, L. M. (2012). *Therapeutic antibody engineering. Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry.* (p. 650). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Strotmeier, J., Willjes, G., Binz, T., & Rummel, A. (2012). Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: increased therapeutic dosage and immunogenicity. *FEBS letters*, 586(4), 310–3. doi:10.1016/j.febslet.2011.12.037
- Stumpp, M. T., & Amstutz, P. (2007). DARPin: a true alternative to antibodies. *Current opinion in drug discovery & development*, 10(2), 153–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17436550>
- Stumpp, M. T., Binz, H. K., & Amstutz, P. (2008). DARPin: a new generation of protein therapeutics. *Drug discovery today*, 13(15-16), 695–701. doi:10.1016/j.drudis.2008.04.013
- Su, C. G., & Lichtenstein, G. R. (2003). Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 125(5), 1544–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14598275>
- Suckau, D., Köhl, J., Karwath, G., Schneider, K., Casaretto, M., Bitter-Suermann, D., & Przybylski, M. (1990). Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9848–52. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sugawara, Y., Matsumura, T., Takegahara, Y., Jin, Y., Tsukasaki, Y., Takeichi, M., & Fujinaga, Y. (2010). Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *The Journal of cell biology*, 189(4), 691–700. doi:10.1083/jcb.200910119
- Sukonpan, C., Oost, T., Goodnough, M., Tepp, W., Johnson, E. A., & Rich, D. H. (2004). Synthesis of substrates and inhibitors of botulinum neurotoxin type A metalloprotease. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, 63(2), 181–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009541>
- Sun, W., Xie, J., Lin, H., Mi, S., Li, Z., Hua, F., & Hu, Z. (2012). A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies. *Protein expression and purification*, 83(1), 21–9. doi:10.1016/j.pep.2012.02.006
- Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., & Yamaguchi, T. (2010). Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(4), 1968–76. doi:10.4049/jimmunol.0903296

## Références

- Swenson, J. M., Thornsberry, C., McCroskey, L. M., Hatheway, C. L., & Dowell, V. R. (1980). Susceptibility of *Clostridium botulinum* to thirteen antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 18(1), 13–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=283932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- # T
- Takahashi, H., Keim, P., Kaufmann, A. F., Keys, C., Smith, K. L., Taniguchi, K., Inouye, S., *et al.* (2004). Bacillus anthracis incident, Kameido, Tokyo, 1993. *Emerging infectious diseases*, 10(1), 117–20. doi:10.3201/eid1001.030238
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M., & Plückthun, A. (2012). Designed ankyrin repeat proteins (DARPs) from research to therapy. *Methods in enzymology*, 503, 101–34. doi:10.1016/B978-0-12-396962-0.00005-7
- Tan, P., Mitchell, D. A., Buss, T. N., Holmes, M. A., Anasetti, C., & Foote, J. (2002). “Superhumanized” antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(2), 1119–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097421>
- Tao, M. H., & Morrison, S. L. (1989). Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(8), 2595–601. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2507634>
- Taubenberger, J. K., Baltimore, D., Doherty, P. C., Markel, H., Morens, D. M., Webster, R. G., & Wilson, I. A. (2012). Reconstruction of the 1918 influenza virus: unexpected rewards from the past. *mBio*, 3(5). doi:10.1128/mBio.00201-12
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., Wang, R., Jin, G., & Fanning, T. G. (2005). Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 437(7060), 889–93. doi:10.1038/nature04230
- Tavallaie, M., Chenal, A., Gillet, D., Pereira, Y., Manich, M., Gibert, M., Raffestin, S., *et al.* (2004). Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. *FEBS letters*, 572(1-3), 299–306. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.094
- Taysse, L., Daulon, S., Calvet, J., Delamanche, S., Hilaire, D., Bellier, B., & Breton, P. (2005). Induction of acute lung injury after intranasal administration of toxin botulinum a complex. *Toxicologic pathology*, 33(3), 336–42. doi:10.1080/01926230590922884
- Teicher, B. A. (2009). Antibody-drug conjugate targets. *Current cancer drug targets*, 9(8), 982–1004. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20025606>
- Tessmer Snipe, P., & Sommer, H. (1928). Studies on botulinus toxin. *The Journal of Infectious Diseases*, 43(N°2).
- The EPIC Investigators. (1994). Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. The EPIC Investigation. *The New England journal of medicine*, 330(14), 956–61. doi:10.1056/NEJM199404073301402
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D. H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology*, 23, 307–36. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843
- Thom, G., & Groves, M. (2012). Ribosome display. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 901, 101–16. doi:10.1007/978-1-61779-931-0\_6
- Thompson, D. E., Brehm, J. K., Oultram, J. D., Swinfield, T. J., Shone, C. C., Atkinson, T., Melling, J., *et al.* (1990). The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. *European journal of biochemistry / FEBS*, 189(1), 73–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185020>
- Thullier, P., Lafaye, P., Mégret, F., Deubel, V., Jouan, A., & Mazié, J. C. (1999). A recombinant Fab neutralizes dengue virus in vitro. *Journal of biotechnology*, 69(2-3), 183–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361725>
- Thullier, Philippe, Avril, A., Mathieu, J., Behrens, C. K., Pellequer, J.-L., & Pelat, T. (2013). Mapping the epitopes of a neutralizing antibody fragment directed against the lethal factor of bacillus anthracis and cross-reacting with the homologous edema factor. *Plos One*, *In press*.
- Thullier, Philippe, Chahboun, S., & Pelat, T. (2010). A comparison of human and macaque (*Macaca mulatta*) immunoglobulin germline V regions and its implications for antibody engineering. *mAbs*, 2(5), 528–38. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2958574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## Références

- Thullier, Philippe, Huish, O., Pelat, T., & Martin, A. C. R. (2010). The humanness of macaque antibody sequences. *Journal of molecular biology*, 396(5), 1439–50. doi:10.1016/j.jmb.2009.12.041
- Thurber, G. M., & Wittrup, K. D. (2008). Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids. *Cancer research*, 68(9), 3334–41. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3018
- Tikunova, N., Dubrovskaya, V., Morozova, V., Yun, T., Khlusevich, Y., Bormotov, N., Laman, A., *et al.* (2012). The neutralizing human recombinant antibodies to pathogenic Orthopoxviruses derived from a phage display immune library. *Virus research*, 163(1), 141–50. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.008
- Ting, P. T., & Freiman, A. (2004). The story of Clostridium botulinum: from food poisoning to Botox. *Clinical medicine (London, England)*, 4(3), 258–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15244362>
- Tiwari, A., Khanna, N., Acharya, S. K., & Sinha, S. (2009). Humanization of high affinity anti-HBs antibody by using human consensus sequence and modification of selected minimal positional template and packing residues. *Vaccine*, 27(17), 2356–66. doi:10.1016/j.vaccine.2009.02.019
- Tkaczyk, C., Hua, L., Varkey, R., Shi, Y., Dettinger, L., Woods, R., Barnes, A., *et al.* (2012). Identification of anti-alpha toxin monoclonal antibodies that reduce the severity of Staphylococcus aureus dermonecrosis and exhibit a correlation between affinity and potency. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 19(3), 377–85. doi:10.1128/CI.05589-11
- Todorovska, A., Roovers, R. C., Dolezal, O., Kortt, A. A., Hoogenboom, H. R., & Hudson, P. J. (2001). Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *Journal of immunological methods*, 248(1-2), 47–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223068>
- Tolcher, A. W., Ochoa, L., Hammond, L. A., Patnaik, A., Edwards, T., Takimoto, C., Smith, L., *et al.* (2003). Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(2), 211–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525512>
- Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., *et al.* (2000). Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 722–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tomlinson, I. M., Walter, G., Jones, P. T., Dear, P. H., Sonnhammer, E. L., & Winter, G. (1996). The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *Journal of molecular biology*, 256(5), 813–17. doi:10.1006/jmbi.1996.0127
- Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B., & Winter, G. (1992). The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *Journal of molecular biology*, 227(3), 776–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404388>
- Tonegawa, S. (1976). Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: further evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(1), 203–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=335869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909), 575–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6300689>
- Tonello, F., Morante, S., Rossetto, O., Schiavo, G., & Montecucco, C. (1996). Tetanus and botulism neurotoxins: a novel group of zinc-endopeptidases. *Advances in experimental medicine and biology*, 389, 251–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861019>
- Torii, Y., Tokumaru, Y., Kawaguchi, S., Izumi, N., Maruyama, S., Mukamoto, M., Kozaki, S., *et al.* (2002). Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid. *Vaccine*, 20(19-20), 2556–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057613>
- Tornetta, M., Baker, S., Whitaker, B., Lu, J., Chen, Q., Pisors, E., Shi, L., *et al.* (2010). Antibody Fab display and selection through fusion to the pIX coat protein of filamentous phage. *Journal of immunological methods*, 360(1-2), 39–46. doi:10.1016/j.jim.2010.06.001
- Torrens, J. K. (1998). Clostridium botulinum was named because of association with "sausage poisoning. *BMJ (Clinical research ed.)*, 316(7125), 151. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2665396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Treva, T. (2004). Où sont les armes chimiques et biologiques irakiennes ? *Politique étrangère*, 69, 25–37.

## Références

- Trevisanato, S. I. (2007). The “Hittite plague”, an epidemic of tularemia and the first record of biological warfare. *Medical hypotheses*, 69(6), 1371–4. doi:10.1016/j.mehy.2007.03.012
- Tsai, Y. C., Maditz, R., Kuo, C., Fishman, P. S., Shoemaker, C. B., Oyler, G. A., & Weissman, A. M. (2010). Targeting botulinum neurotoxin persistence by the ubiquitin-proteasome system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38), 16554–9. doi:10.1073/pnas.1008302107
- Tsurui, H., & Takahashi, T. (2007). Prediction of T-cell epitope. *Journal of pharmacological sciences*, 105(4), 299–316. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094522>
- Tsuzuki, K., Yokosawa, N., Syuto, B., Ohishi, I., Fujii, N., Kimura, K., & Oguma, K. (1988). Establishment of a monoclonal antibody recognizing an antigenic site common to Clostridium botulinum type B, C1, D, and E toxins and tetanus toxin. *Infection and immunity*, 56(4), 898–902. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=259387&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tumpey, T. M., Basler, C. F., Aguilar, P. V, Zeng, H., Solórzano, A., Swayne, D. E., Cox, N. J., et al. (2005). Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5745), 77–80. doi:10.1126/science.1119392
- Turton, K., Chaddock, J. A., & Acharya, K. R. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends in biochemical sciences*, 27(11), 552–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417130>
- Tzaban, S., Massol, R. H., Yen, E., Hamman, W., Frank, S. R., Lapierre, L. A., Hansen, S. H., et al. (2009). The recycling and transcytotic pathways for IgG transport by FcRn are distinct and display an inherent polarity. *The Journal of cell biology*, 185(4), 673–84. doi:10.1083/jcb.200809122

## U

- Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., & Kozaki, S. (2009). Genetic characterization of Clostridium botulinum associated with type B infant botulism in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 47(9), 2720–8. doi:10.1128/JCM.00077-09
- UNODA. (1987). *Status of multilateral arms regulation and disarmament agreements* (pp. 9–11). New-York: United Nations Department for Disarmament.
- UNSCOM. (1991). UNSCOM : rapport suite à la résolution 687 du conseil de sécurité des nations unis du 3 avril 1991. Retrieved from <http://www.un.org/french/Depts/unscom/unscom.htm>

## V

- Vaccaro, C., Zhou, J., Ober, R. J., & Ward, E. S. (2005). Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nature biotechnology*, 23(10), 1283–8. doi:10.1038/nbt1143
- Vaidyanathan, G., & Zalutsky, M. R. (2006). Synthesis of N-succinimidyl 4-[18F]fluorobenzoate, an agent for labeling proteins and peptides with 18F. *Nature protocols*, 1(4), 1655–61. doi:10.1038/nprot.2006.264
- Van den Beucken, T., Pieters, H., Steukers, M., Van der Vaart, M., Ladner, R. C., Hoogenboom, H. R., & Hufton, S. E. (2003). Affinity maturation of Fab antibody fragments by fluorescent-activated cell sorting of yeast-displayed libraries. *FEBS letters*, 546(2-3), 288–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832056>
- Van Kooten, C., & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology*, 67(1), 2–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647992>
- Van Regenmortel, M. H. (1989). The concept and operational definition of protein epitopes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 323(1217), 451–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2474169>
- Van Schouwenburg, P. A., Krieckaert, C. L., Rispens, T., Aarden, L., Wolbink, G. J., & Wouters, D. (2013). Long-term measurement of anti-adalimumab using pH-shift-anti-idiotypic antigen binding test shows predictive value and transient antibody formation. *Annals of the rheumatic diseases*. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202407
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., et al. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature biotechnology*, 14(3), 309–14. doi:10.1038/nbt0396-309



## Références

- Vaughn, D. E., & Bjorkman, P. J. (1998). Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure (London, England : 1993)*, 6(1), 63–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9493268>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304–51. doi:10.1126/science.1058040
- Vidal, D., Thibault, F., Valade, E., Leveque, F., Ramisse, F., Gauthier, Y., Paucod, J.-C., *et al.* (2003). Analyse de colis suspects de contamination par le bacille du charbon. Les leçons de la crise bioterroriste de l'automne 2001. *Médecine et armées*, 31 N°3, 227–231.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H., & Cattaneo, A. (1999). Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 11723–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wagner, C. L., Schantz, A., Barnathan, E., Olson, A., Mascelli, M. A., Ford, J., Damaraju, L., *et al.* (2003). Consequences of immunogenicity to the therapeutic monoclonal antibodies ReoPro and Remicade. *Developments in biologicals*, 112, 37–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12762503>
- Wang, G., Liu, Y.-F., Li, C.-Y., Lu, N., Gao, T.-W., Hua, B., & Wang, Y. (2004). Cloning and characterization of antikeratin human antibodies using a semisynthetic phage antibody library. *Archives of dermatological research*, 296(6), 270–7. doi:10.1007/s00403-004-0504-1
- Wang, Z., & Laursen, R. A. (1992). Multiple peptide synthesis on polypropylene membranes for rapid screening of bioactive peptides. *Peptide research*, 5(5), 275–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1280493>
- Wang, Z., Mathias, A., Stavrou, S., & Neville, D. M. (2005). A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 18(7), 337–43. doi:10.1093/protein/gzi036
- Wannemacher, R. W., Dinterman, R. E., Thompson, W. L., & Schmidt, M. O. (1993). *Treatment for removal of biotoxins from drinking water. Technical report 9120*. Fort Detrick, Frederick, Md.
- Weaver-Feldhaus, J. M., Lou, J., Coleman, J. R., Siegel, R. W., Marks, J. D., & Feldhaus, M. J. (2004). Yeast mating for combinatorial Fab library generation and surface display. *FEBS letters*, 564(1-2), 24–34. doi:10.1016/S0014-5793(04)00309-6
- Webb, R. P., Smith, T. J., Wright, P., Brown, J., & Smith, L. A. (2009). Production of catalytically inactive BoNT/A1 holoprotein and comparison with BoNT/A1 subunit vaccines against toxin subtypes A1, A2, and A3. *Vaccine*, 27(33), 4490–7. doi:10.1016/j.vaccine.2009.05.030
- Wein, L. M., & Liu, Y. (2005). Analyzing a bioterror attack on the food supply: the case of botulinum toxin in milk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9984–9. doi:10.1073/pnas.0408526102
- Weingart, O. G., Schreiber, T., Mascher, C., Pauly, D., Dorner, M. B., Berger, T. F. H., Egger, C., *et al.* (2010). The case of botulinum toxin in milk: experimental data. *Applied and environmental microbiology*, 76(10), 3293–300. doi:10.1128/AEM.02937-09
- Wells, C. L., & Wilkins, T. D. (1996). *Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli*. (4th editio., p. Chapter 18). Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Wenham, T., & Cohen, A. (2008). Botulism. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 8(1), 21–25. doi:10.1093/bjaceaccp/mkm051
- Wheelis, M. (2002). Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 971–5. doi:10.3201/eid0809.010536
- Wictome, M., Newton, K., Jameson, K., Hallis, B., Dunnigan, P., Mackay, E., Clarke, S., *et al.* (1999). Development of an in vitro bioassay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), 3787–92. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99701&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Williams, P., & Wallace, D. (1990). *La Guerre bactériologique. Les secrets des expériences japonaises*. (A. Michel, Ed.) (p. 372). Paris.

## Références

- Williamson, L. C., & Neale, E. A. (1998). Syntaxin and 25-kDa synaptosomal-associated protein: differential effects of botulinum neurotoxins C1 and A on neuronal survival. *Journal of neuroscience research*, 52(5), 569–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632313>
- Wilson, N. S., & Villadangos, J. A. (2005). Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Advances in immunology*, 86, 241–305. doi:10.1016/S0065-2776(04)86007-3
- Wirtz, P., & Steipe, B. (1999). Intrabody construction and expression III: engineering hyperstable V(H) domains. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(11), 2245–50. doi:10.1110/ps.8.11.2245
- Wofsy, L., Metzger, H., & Singer, S. J. (1962). Affinity labeling—a general method for labeling the active sites of antibody and enzyme molecules. *Biochemistry*, 1, 1031–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14001461>
- Woodruff, B. A., Griffin, P. M., McCroskey, L. M., Smart, J. F., Wainwright, R. B., Bryant, R. G., Hutwagner, L. C., et al. (1992). Clinical and laboratory comparison of botulism from toxin types A, B, and E in the United States, 1975–1988. *The Journal of infectious diseases*, 166(6), 1281–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1431246>
- Wörn, A., & Plückthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of molecular biology*, 305(5), 989–1010. doi:10.1006/jmbi.2000.4265
- Wu, A. M., & Senter, P. D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature biotechnology*, 23(9), 1137–46. doi:10.1038/nbt1141

## Y

- Yamasaki, S., Baumeister, A., Binz, T., Blasi, J., Link, E., Cornille, F., Roques, B., et al. (1994). Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin. *The Journal of biological chemistry*, 269(17), 12764–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175689>
- Yamashita, S., Yoshida, H., Uchiyama, N., Nakakita, Y., Nakakita, S., Tonozuka, T., Oguma, K., et al. (2012). Carbohydrate recognition mechanism of HA70 from *Clostridium botulinum* deduced from X-ray structures in complexes with sialylated oligosaccharides. *FEBS letters*, 586(16), 2404–10. doi:10.1016/j.febslet.2012.05.055
- Yancopoulos, G. D., & Alt, F. W. (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annual review of immunology*, 4, 339–68. doi:10.1146/annurev.iy.04.040186.002011
- Yang, C., Lu, D., & Liu, Z. (2011). How PEGylation enhances the stability and potency of insulin: a molecular dynamics simulation. *Biochemistry*, 50(13), 2585–93. doi:10.1021/bi101926u
- Yang, H. Y., Kang, K. J., Chung, J. E., & Shim, H. (2009). Construction of a large synthetic human scFv library with six diversified CDRs and high functional diversity. *Molecules and cells*, 27(2), 225–35. doi:10.1007/s10059-009-0028-9
- Yermakova, A., Vance, D. J., & Mantis, N. J. (2012). Sub-domains of ricin's B subunit as targets of toxin neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies. *PLoS one*, 7(9), e44317. doi:10.1371/journal.pone.0044317
- Yokoyama, W. M. (2001). Monoclonal antibody supernatant and ascites fluid production. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 2, Unit 2.6. doi:10.1002/0471142735.im0206s40
- Yong, E. (2012). Mutant-flu paper published. *Nature*, 485(7396), 13–4. doi:10.1038/485013a
- Yu, Y. J., Zhang, Y., Kenrick, M., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Atwal, J., et al. (2011). Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Science translational medicine*, 3(84), 84ra44. doi:10.1126/scitranslmed.3002230

## Z

- Zaccolo, M., Williams, D. M., Brown, D. M., & Gherardi, E. (1996). An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *Journal of molecular biology*, 255(4), 589–603. doi:10.1006/jmbi.1996.0049



## Références

- Zahnd, C., Pecorari, F., Straumann, N., Wyler, E., & Plückthun, A. (2006). Selection and characterization of Her2 binding-designed ankyrin repeat proteins. *The Journal of biological chemistry*, 281(46), 35167–75. doi:10.1074/jbc.M602547200
- Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbühl, B., Amstutz, P., Cambillau, C., & Plückthun, A. (2004). Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. *The Journal of biological chemistry*, 279(18), 18870–7. doi:10.1074/jbc.M309169200
- Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J. M., Steiner, D., Lawrence, M. C., McKern, N. M., Pecorari, F., et al. (2007). A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2. *Journal of molecular biology*, 369(4), 1015–28. doi:10.1016/j.jmb.2007.03.028
- Zeng, M., Xu, Q., Elias, M., Pichichero, M. E., Simpson, L. L., & Smith, L. A. (2007). Protective immunity against botulism provided by a single dose vaccination with an adenovirus-vectored vaccine. *Vaccine*, 25(43), 7540–8. doi:10.1016/j.vaccine.2007.08.035
- Zhang, C., Helmsing, S., Zagrebelsky, M., Schirrmann, T., Marschall, A. L. J., Schüngel, M., Korte, M., et al. (2012). Suppression of p75 neurotrophin receptor surface expression with intrabodies influences Bcl-xL mRNA expression and neurite outgrowth in PC12 cells. *PLoS one*, 7(1), e30684. doi:10.1371/journal.pone.0030684
- Zhang, J.-C., Sun, L., & Nie, Q.-H. (2010). Botulism, where are we now? *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 48(9), 867–79. doi:10.3109/15563650.2010.535003
- Zhang, Q., Willison, L. N., Tripathi, P., Sathe, S. K., Roux, K. H., Emmett, M. R., Blakney, G. T., et al. (2011). Epitope mapping of a 95 kDa antigen in complex with antibody by solution-phase amide backbone hydrogen/deuterium exchange monitored by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 83(18), 7129–36. doi:10.1021/ac201501z
- Zhao, J.-X., Yang, L., Gu, Z.-N., Chen, H.-Q., Tian, F.-W., Chen, Y.-Q., Zhang, H., et al. (2010). Stabilization of the single-chain fragment variable by an interdomain disulfide bond and its effect on antibody affinity. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 1–11. doi:10.3390/ijms12010001
- Zhao, Y., Muir, T. W., Kent, S. B., Tischer, E., Scardina, J. M., & Chait, B. T. (1996). Mapping protein-protein interactions by affinity-directed mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4020–4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zhou, Chen, Jacobsen, F. W., Cai, L., Chen, Q., & Shen, W. D. (2010). Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform. *mAbs*, 2(5), 508–18. doi:10.4161/mabs.2.5.12970
- Zhou, Chun, & Przedborski, S. (2009). Intrabody and Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(7), 634–42. doi:10.1016/j.bbadis.2008.09.001
- Zhou, H., Zhou, B., Pellett, S., Johnson, E. A., & Janda, K. D. (2009). Selection and characterization of a human monoclonal neutralizing antibody for Clostridium Botulinum neurotoxin serotype B. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(3), 662–4. doi:10.1016/j.bmcl.2008.12.055
- Zhou, M., Meyer, T., Koch, S., Koch, J., Von Briesen, H., Benito, J. M., Soriano, V., et al. (2013). Identification of a new epitope for HIV-neutralizing antibodies in the gp41 membrane proximal external region by an Env-tailored phage display library. *European journal of immunology*, 43(2), 499–509. doi:10.1002/eji.201242974
- Zhou, Y., Foss, S., Lindo, P., Sarkar, H., & Singh, B. R. (2005). Hemagglutinin-33 of type A botulinum neurotoxin complex binds with synaptotagmin II. *The FEBS journal*, 272(11), 2717–26. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04688.x
- Zilinskas, R. A. (1997). Iraq's biological weapons. The past as future? *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 278(5), 418–424. doi:10.1001/jama.1997.03550050080037
- Zlatarova, A. S., Rouseva, M., Roumenina, L. T., Gadjeva, M., Kolev, M., Dobrev, I., Olova, N., et al. (2006). Existence of different but overlapping IgG- and IgM-binding sites on the globular domain of human C1q. *Biochemistry*, 45(33), 9979–88. doi:10.1021/bi060539v





# *Résumé*

**Résumé :**

Les anticorps recombinants représentent une approche prometteuse pour améliorer le traitement et la prophylaxie des maladies causées par les armes biologiques. De tels anticorps peuvent être isolés à partir de primates non humains, dont l'immunisation est plus facile à concevoir et à réaliser que l'immunisation d'humains. Des chimpanzés (*Pan troglodytes*) et des macaques (*Macaca mulatta* et *M. fascicularis*) ont été utilisés pour de tels travaux, et notre analyse de séquences a démontré que l'utilisation de chimpanzés n'apporte pas d'avantage significatif malgré leur plus grande proximité phylogénétique avec l'Homme. La suite de ce travail a donc utilisé des macaques, plus facilement accessibles en France que les chimpanzés. Dans le cadre du projet européen AntiBotABE, des banques immunes exposées à la surface de phages ont été construites à partir de macaques (*M. fascicularis*) immunisés puis criblées, et des scFv neutralisant simultanément les toxines botuliques (BoNT) A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> en ciblant leurs chaînes lourdes, et BoNT/E<sub>3</sub> en ciblant sa chaîne légère ont été isolés. D'autre part, un anticorps neutralisant de façon croisée la toxine létale et la toxine œdémateuse de *Bacillus anthracis* avait été précédemment isolé. Ses épitopes ont été localisés au cours de la présente thèse par une méthode tirant partie de cette réactivité croisée. Ils correspondent à la région [229-230]-[234-236] de la sous-unité LF (*Lethal Factor*) et à la région [229-230]-[234-236] de la sous-unité EF (*Edema Factor*). Le principe de cette localisation d'épitope pourrait être ré-employé pour localiser les épitopes des scFv neutralisant les BoNT.

**Mots clés :** toxine botulique, armes biologiques, anticorps recombinants, scFv, humanisation, primates non humains, neutralisation, épitope, macaques, chimpanzés.

**Abstract :**

Recombinant antibodies represent a promising approach to improve the treatment and prophylaxis of diseases caused by bioweapons. Such antibodies may be isolated from non-human primates, whose immunization is much easier to conceive and realized than immunization of humans. Chimpanzees (*Pan troglodytes*) and macaques (*Macaca mulatta* and *M. fascicularis*, particularly) have been utilized for such purposes, and our sequence analysis has demonstrated that using chimpanzees does not bring a significant advantage despite their closer phylogenetic proximity with humans. The rest of this thesis has thus utilized macaques, easier to access in France than chimpanzees. In the context of the European AntiBotABE project, phage-displayed immune libraries have been constructed from immunized macaques (*M. fascicularis*) then screened, and scFv simultaneously neutralizing botulinum toxins (BoNT) A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> by targeting their heavy chains, and BoNT/E<sub>3</sub> by targeting its light chain were isolated. On the other side, an antibody cross-neutralizing the *lethal toxin* and the *edema toxin* of *Bacillus anthracis* had been formerly isolated. Its epitopes have been mapped in the course of the present thesis by a method taking advantage of its cross-reactivity. They correspond to the [229-230]-[234-236] region of LF (Lethal Factor) subunit and to the [229-230]-[234-236] region of EF (Edema Factor) subunit. The principle of this epitope mapping could be re-employed to map the epitopes of BoNT-neutralizing scFv.

**Keywords :** botulinum toxin, bioweapons, recombinant antibodies, scFv, humanization, non-human primates, neutralization, epitope, macaques, chimpanzees.