



HAL
open science

Etude de la réponse des lymphocytes T spécifiques de l'hormone humaine H2-relaxine et de modifications non-naturelles : perspectives pour la réduction de l'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques

Aurélien Azam

► **To cite this version:**

Aurélien Azam. Etude de la réponse des lymphocytes T spécifiques de l'hormone humaine H2-relaxine et de modifications non-naturelles : perspectives pour la réduction de l'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS140 . tel-02426003

HAL Id: tel-02426003

<https://theses.hal.science/tel-02426003>

Submitted on 1 Jan 2020

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.



Etude de la réponse des lymphocytes T spécifiques de l'hormone humaine H₂-relaxine et de modifications non-naturelles : perspectives pour la réduction de l'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569
Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (IFTA)
Spécialité de doctorat: Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Gif Sur Yvette, le 14 Juin 2018, par

Aurélien Azam

Composition du Jury :

Marc Pallardy Pr. des Universités, Université Paris-Sud (INSERM-UMR 996)	Président
Sylvie Fournel Pr. des Universités, Université de Strasbourg (CNRS-UMR 7199)	Rapporteur
Sébastien Lacroix-Desmazes DR, Centre de Recherche des Cordeliers (INSERM-UMRS 1138)	Rapporteur
Corinne Tanchot CR, Université Paris-Descartes (UMR 970)	Examinatrice
Catherine Prades Responsable en Bio-Informatique, Sanofi R&D Vitry-Alfortville	Examinatrice
Bernard Maillère DR, CEA de Saclay (DRF Joliot SIMOPRO)	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie donc Sylvie Fournel et Sébastien Lacroix-Desmazes pour le temps qu'ils ont consacré à mon mémoire en tant que rapporteurs. Je tiens à remercier également Corinne Tanchot pour sa participation à mon comité de mi-thèse, ainsi que Marc Pallardy pour leur présence à ma soutenance en tant qu'examineurs.

Ma gratitude va à mes encadrants de thèse Catherine Prades et Bernard Maillère. Catherine, je vous remercie de m'avoir aidé à intégrer Sanofi (bien que je n'y ai pas souvent mis les pieds ^^), à gérer les conférences et coordonner les échanges entre le CEA et Sanofi. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et votre aide. Bernard, je doute pouvoir un jour vous renvoyer la pareille tellement vous en avez fait pour moi. Votre soutien, votre patience (et il en faut avec moi...), vos conseils, et j'en passe. Depuis mon stage en M2 vous m'avez aidé à progresser, je suis honoré d'avoir travaillé à vos côtés, nos discussions scientifiques et moins scientifiques m'ont beaucoup apporté.

Je remercie tout particulièrement l'équipe du Sous-sol du SIMOPRO, locataires du BauF et voisins de couloir confondus. Merci à Marie et Fabinou, on sera bien amusés à terroriser mon voisin de bureau (qui a dit paradoxe ?), toujours dans un esprit de finesse, légèreté et rigueur scientifique. On n'était pas payés à coller des timbres, mais des étiquettes, qu'est-ce qu'on a pu en coller aux gens ! De supers moments ont été partagés, ce qui se passe au BauF reste au BauF. A « mon cœur », ma petite plante tropicale, mon oiseau du Paradis, dont la sensibilité musicale n'a d'égal qu'une adolescente en fleur à son premier amour... Ta mère rebelle qui dépassait tout juste du moniteur était le seul brin de poésie que mon poste de travail m'offrait à contempler. Merci à toutes celles et ceux qui ont été/sont des Maillère, Moman (merci pour les petits pains et la vinaigrette), Tibi (TIBIII !!!), Zylvain (t'as retrouvé tes stylos sous ta hotte ?), Yann (t'es propriétaire ?), Catherine (elle est où Laurèène ?!!!), Mousse (Houpa !!!), Elodie (merci de ta bonne humeur), Raphaël (Harry), Coline (Hermione), Hervé (Rogue), Buitoni, Amélie, Pierre, Ouiche, Jérôme, Claire et Abasse. J'ai adoré travailler à vos côtés et échanger avec vous, que cela soit sur le plan scientifique ou non. Merci à tous les Gillet, aux irréductibles Sylvain (RIP à ton verre) et Julien (RIP à tes filles), Livia (tu dois toujours m'expliquer comment fonctionne la cristallographie), Clémence, Bastien, Robine et Yu. Merci à tout le SIMOPRO, ceux qui voient le jour depuis leur bureau, que j'ai croisé durant le travail ou à tous ces pots et moments d'échanges, Pascal pour les nombreux covoiturages, Fabrice, Steven, Bob, Laurent, Daniel, Alain, Loïc, Olivier, Carole, les thésards Cécile, Laura, Tania, Monika et Nicolas. Merci de votre soutien et enthousiasme.

Je remercie également les équipes de Sanofi, qui m'ont longuement accompagné et soutenu dans ce projet, Sergio, Stéphane, Olivier et Géraldine. Merci à l'équipe de Catherine, de votre accueil et gentillesse.

Je tiens à remercier chaleureusement ma famille pour leur soutien inconditionnel. A mes parents, à qui je dois tout. A mon frère, à qui je dois un malus sur mon assurance voiture. A Jade, à qui je dois un choix. A mes quatre grands-parents, à qui je dédie cette thèse, votre

présence et votre amour m'ont porté bien au-delà de mes capacités à travailler. A mes tantes et oncles, cousines et cousins, petites cousines et cousins, merci de faire partie de ma famille et de ne me le faire regretter que dans de rares occasions. Je vous aime. Merci à ma belle-famille, votre soutien me va droit au cœur et j'espère un jour être digne de faire partie de votre famille.

Je remercie tous mes amis et copains, à commencer par les BFF, aux côtés de qui j'ai étudié et ri, vous me manquez tous et je regrette que l'on ait qu'une Saint-Sylvestre par an. Malgré mon futur grade de docteur, je promets de ne pas vous regarder de haut (sauf Sonia, t'es petite et t'es passée chez l'ennemi ^^). Enfin, pas plus que d'habitude. A Martin et David, *D48 forever*, et leur famille/copine formidables. Je mets une option sur vos gosses pour les futurs miens. A PPDm et son mari PCDS. A la Magouille (et au DAB©), votre finesse d'esprit et renouvellement de blagues me surprendront toujours. Au Ptit, je suis toujours grand et pense petit, mais j'y travaille. Aux geeks, j'adore faire partie de votre groupe sans en faire partie. A Miss Cucu, Marion, Lucie et Coco, nos soirées filles me manquent tout le temps. A la promo 186 de l'Agro, vous êtes pour la plupart des gens formidables. La plupart. A la promo 187, qui m'a accueillie tel un oiseau tombé du nid, ou un attardé qui veut par grandir, question de point de vue. Aux promos 185, 187,5, 188 et j'en passe, y'a sûrement des gens que j'apprécie et dont je ne connais pas le nom. A Julie, on devrait se voir plus souvent maintenant que t'es en France.

Un grand merci à ma moitié qui m'a accompagné, supporté et soigné durant ces longs mois de rédaction, et même avant. Sans ton amour inconditionnel, je n'aurais pu accomplir ce travail. Tu m'as assisté, câliné, diverti, inspiré, conseillé et fait rire durant toutes ces heures. Merci de ton amour et ta douceur, même si tu laisses des poils partout où tu passes et sens la croquette le matin. A ma vraie moitié, pour laquelle les quatre phrases précédentes sont quasiment aussi valables.

Je remercie l'école doctorale, pour toutes les formations auxquelles il m'a été permis de participer. Merci à toutes celles et ceux que j'ai croisé et avec qui j'ai travaillé et appris durant ces formations, thésards, chercheurs et formateurs.

Je remercie les industries du divertissement et du transport parisien, sans lesquelles j'ai pu gagner et perdre tellement de temps à la fois. Merci à l'internet, à tous les sites de procrastination, au cinéma, à ma tablette et aux retards de trains (#jesuischeminot). Merci à PubMed et Mendeley, ma bibliographie n'a de raison que grâce à vous.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	14
CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	17
CHAPITRE I. IMMUNOGENICITE DES PROTEINES THERAPEUTIQUES.....	17
I.1. Les protéines et peptides thérapeutiques.....	17
I.1.1. Anticorps thérapeutiques.....	19
I.1.2. Protéines de remplacement.....	21
I.1.3. Cytokines et hormones.....	22
I.1.4. Enzymes.....	23
I.1.5. Toxines.....	23
I.1.6. Peptides thérapeutiques.....	24
I.2. Conséquences de l'immunogénicité.....	26
I.2.1 Problèmes et limites rencontrées pour les protéines thérapeutiques.....	26
I.2.1.A. Définition des ADA.....	26
I.2.1.B. Historique des cas d'immunogénicité des PT.....	27
I.2.2. Risques pour le produit.....	30
I.2.2.A. Les ADA n'ont aucun effet.....	30
I.2.2.B. Effet sur la pharmacocinétique.....	30
I.2.2.C. Neutralisation et résistance au traitement.....	30
I.2.3. Risques pour le patient.....	31
I.2.3.A. Allergies.....	31
I.2.3.B. Anticorps préexistants.....	34
I.2.3.C. Auto-immunité.....	34
I.3. Mécanismes cellulaires de l'immunogénicité.....	35
I.3.1. Les Lymphocytes B et les anticorps.....	36
I.3.1.A. Les anticorps.....	36
- Structure générale.....	36
- Classes ou isotypes.....	37
- Fixation à l'antigène.....	39
- Région charnière.....	39
- Isotype, allotype et idiotype.....	40
- Structure génétique.....	40
- Recombinaisons, épissage et traduction.....	42
- Sélection de classe.....	43
I.3.1.B. Les Lymphocytes B.....	44
- Ontogénie des Lymphocytes B.....	44
- Maturation et différenciation des LB.....	47
I.3.2. Les DC et les molécules HLA de classe II.....	47
I.3.2.A. Les cellules dendritiques.....	47
- Différenciation et localisation.....	47
- Fonctions biologiques dans l'immunité.....	49
- Activation des DC par les PRR.....	50
I.3.2.B. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.....	51
- Distribution histologique et cellulaire des molécules HLA.....	51
- Caractéristiques des molécules HLA de classe II.....	52
- Capture, clivage et apprêtement des antigènes par les DC.....	56
- Interactions molécules HLA de classe II / peptide.....	57
I.3.3. Le TCR et les lymphocytes T.....	60

I.3.3.A. Le TCR	60
- Structure	60
- Complexe TCR-CD3.....	60
- Organisation génétique et réarrangement	61
I.3.3.B. Les Lymphocytes T CD4	63
- Ontogénie des Lymphocytes T	63
- Répertoire T	66
- Sélection thymique	66
- Tolérance centrale	68
- Différenciation des Lymphocytes T	69
- Sous-populations lymphocytaires T CD4.....	70
I.3.3.C. Activation du lymphocyte T	74
- Interaction TCR / peptide-HLA et co-récepteur CD4	74
- Molécules de costimulation et d'adhésion	75
- Activation des lymphocytes T CD4	77
- Réponse humorale initiée par les lymphocytes T CD4 ⁺	78
I.4. Facteurs de l'immunogénicité.....	80
I.4.1. Facteurs liés au produit	80
I.4.2. Facteurs liés au traitement.....	81
I.4.3. Facteurs liés au patient	81
I.5. Evaluation de l'immunogénicité.....	82
I.5.1. Prédiction de l'immunogénicité	82
I.5.1.A. Modèles de prédiction <i>in vivo</i>	86
I.5.1.B. Modèles de prédiction <i>in silico</i>	87
I.5.1.C. Modèles <i>in vitro</i> de liaison aux molécules HLA de classe II	88
I.5.1.D. Modèles de prédiction <i>in vitro</i> de culture de cellules T humaines.....	89
I.5.2. Evaluation clinique.....	91
I.5.2.A. Stratégies	91
I.5.2.B. Méthodes d'évaluation.....	91
CHAPITRE II. LA RELAXINE-2 HUMAINE.....	95
II.1. Historique et classification	95
II.1.1. Historique	95
II.1.2. La famille de peptides Relaxine.....	95
II.1.3. La superfamille d'hormones Insuline	96
II.2. Génétique	96
II.2.1. Organisation génique	96
II.2.2. Expression et régulation.....	97
II.3. Structure	99
II.3.1. Structure générale	99
II.3.2. Les récepteurs RXFP	100
II.4. Fonctions biologiques.....	104
II.4.1. Fonctions des peptides de la famille Relaxine	104
II.4.2. Rôles dans le système reproducteur	105
II.4.3. Rôles dans le système cardiovasculaire	105
II.4.4. Rôles dans des systèmes annexes	105
II.4.5. Rôle dans le système immunitaire	106
II.5. Applications thérapeutiques.....	106

II.5.1. Essais cliniques contre la sclérodémie systémique	107
II.5.2. Essais cliniques sur l'amélioration des conditions d'accouchement	107
II.5.3. Essais cliniques contre l'insuffisance cardiaque	107
II.5.4. Champs thérapeutiques potentiels.....	111
II.5.5. Réponses immunitaires en essais cliniques	112
CHAPITRE III. IMMUNOGENICITE DES MODIFICATIONS CHIMIQUES.....	115
III.1. Modifications des protéines thérapeutiques.....	115
III.1.1. Modifications post-traductionnelles	115
III.1.1.A. Modifications post-traductionnelles des protéines	115
- Phosphorylation.....	115
- Glycosylation	116
III.1.2. Modifications non-naturelles	117
III.1.2.A. PEGylation	118
III.1.2.B. Oxydation	119
III.1.2.C. Agrégation.....	120
III.1.2.D. Acides aminés non naturels.....	121
- Acides aminés D	122
- Peptides rétro-inverso.....	124
- Acides iso-butyriques	126
- Acétylation	127
- Méthylation	128
- Réduction	129
- Peptoïdes	130
OBJECTIFS.....	133
RESULTATS	137
Article 1: Healthy donors exhibit a CD4 T cell repertoire specific to the immunogenic hormone H2-relaxin before any injection.	137
Abstract	141
Introduction	142
Material and methods	144
Results	147
Discussion	149
Acknowledgements	152
Abbreviations	152
Author contributions.....	152
References	153
Figure and table legends.....	156
Article 2 (en cours d'écriture) : Effets d'acides aminés non-naturels sur la reconnaissance par des TCR et l'induction de lignées spécifiques d'un épitope de lymphocyte T CD4 immunoprévalent.	164
Introduction	166
Matériel et méthodes	168
Résultats	171
Discussion	180
Conclusion.....	184
Tableaux supplémentaires	185
Références	190

Résultats complémentaires (résultats non publiés) : Etude du potentiel immunogénique des analogues de la Rln2.	197
Introduction	197
Matériel et méthodes	197
Résultats et discussion.....	200
<i>DISCUSSION GENERALE</i>	205
Immunogénicité de la Relaxine-2	205
Rôles des lymphocytes T CD4 dans l'induction d'ADA contre la Relaxine-2.....	205
Rôle immunologique de la Relaxine-2	206
Risques liés aux ADA anti-Relaxine-2.....	206
Comparaison avec l'EPO et l'insuline.....	207
Avantages et limites du modèle de prédiction utilisé	208
Dé-immunisation de la Relaxine-2	209
Rôle des modifications chimiques sur l'immunogénicité	210
Choix de la méthodologie.....	210
Effets différents d'une modification à une autre	210
Positions non-permissives et permissives.....	211
Utilité pour la prédiction de l'immunogénicité	212
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	215
<i>LISTE DES ABBREVIATIONS</i>	217
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	227

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale d'un anticorps humain de type IgG.....	36
Figure 2 : Organisation génétique et synthèse des anticorps chez l'Homme.	41
Figure 3 : Ontogénie des lymphocytes B humains.	46
Figure 4 : Organisation génétique du complexe HLA.....	53
Figure 5 : Structure générale d'une molécule HLA de classe II.	55
Figure 6 A : Arbre des 9 supertypes de molécules HLA de classe II. 6B : Profil général de liaison au peptide des molécules HLA de classe II.....	58
Figure 7 : Organisation membranaire du complexe TCR chez l'Homme.	61
Figure 8 : Organisation génétique et synthèse du récepteur T humain.	62
Figure 9 : Développement lymphocytaire T au sein d'un lobule thymique	64
Figure 10 : Différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺ en sous-populations.	71
Figure 11 : Molécules impliquées dans l'activation d'un lymphocyte T CD4 ⁺ par une cellule dendritique mature.	75
Figure 12 : Coopération cellulaire dans la réponse en anticorps contre une protéine thérapeutique.	79
Figure 13 : Représentation schématique de la transcription du gène humain de la Relaxine-2.	97
Figure 14 : Comparaison des séquences des peptides de la famille Relaxine.	100
Figure 15 : Organisation générale des récepteurs RXFP humains à travers la membrane plasmique.....	102
Figure 16 : Mécanismes cellulaires de la Rln2 sur les cellules immunitaires.	106
Figure 17 : Mécanismes cellulaires et voies de signalisation de la Serelaxin dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.	108

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des 10 médicaments les plus vendus au monde en 2016.	18
Tableau 2 : Meilleures ventes d'anticorps monoclonaux ou protéines de fusion en 2016.	20
Tableau 3 : Liste des 10 protéines thérapeutiques de remplacement les plus vendues en 2016.	22
Tableau 4 : Liste des 10 protéines thérapeutiques les plus vendues en 2016.	24
Tableau 5 : Rapport de détection d'ADA sur 26 protéines thérapeutiques anti-cancéreuses.	29
Tableau 6 : Principaux types de réactions allergiques à un médicament.	32
Tableau 7 : Précurseurs, localisation et activités des sous-populations de cellules dendritiques humaines.	48
Tableau 8 : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires connus chez l'Homme, localisation et ligands.	50
Tableau 9 : Principaux modèles de prédiction d'immunogénicité des protéines thérapeutiques.	85
Tableau 10 : Ligands, voies de signalisation et localisation des RXFP chez l'Homme.	103
Tableau 11 : Liste non exhaustive des études cliniques complètes en Phase I-II ou III sur l'administration de Serelaxin chez l'Homme dans divers domaines thérapeutiques.	109
Tableau 12 : Liste non exhaustive des études cliniques complètes en Phase II-III sur l'administration de Serelaxin chez l'Homme dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique (CHF) et aiguë (AHF).	110

INTRODUCTION GENERALE

L'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques constitue un enjeu sanitaire majeur pour leur développement et utilisation. En effet, elle se définit comme la capacité d'une molécule, le plus souvent une protéine, à induire une réaction immunitaire. Appliqué à des séquences peptidiques médicamenteuses, ce principe peut avoir de nombreuses conséquences sur la santé des patients. Ces conséquences vont de l'absence de symptômes, une chute de l'efficacité thérapeutique, chocs anaphylactiques et symptômes autoimmuns. Depuis le développement des protéines thérapeutiques dans les années 1980, de nombreux cas d'immunogénicité ont été reportés, plaçant cette problématique au centre de la stratégie de gestion des risques pour les laboratoires pharmaceutiques.

Lors de l'injection d'une protéine thérapeutique chez un patient, la protéine peut être captée par des cellules présentatrices d'antigènes qui ont la capacité de les découper en peptides. Parmi ces peptides, certains peuvent avoir une forte affinité pour des molécules HLA de classe II et s'y lier afin de former un complexe de présentation. Ce dernier est alors exposé en surface et peut activer spécifiquement un lymphocyte T CD4 au niveau d'un ganglion lymphatique, lieu de rencontre entre les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules effectrices. Le lymphocyte T CD4 se multiplie alors et peut à son tour activer des lymphocytes B qui proliféreront afin de produire des anticorps spécifiques des séquences immunogènes de la protéine thérapeutique. Du fait du rôle clé des lymphocytes T dans l'initiation de la réponse en anticorps, les expériences menées durant cette thèse sont principalement axées autour de leurs molécules et mécanismes d'activation.

Mes travaux de thèse avaient pour objectif initial d'accompagner le développement préclinique de l'hormone humaine Relaxine-2 au sein de Sanofi R&D et comportaient deux projets différents : comprendre l'immunogénicité clinique de la Relaxine-2 et étudier l'impact des modifications non-naturelles sur l'immunogénicité des peptides.

La Relaxine-2 constitue un candidat prometteur pour le traitement de l'insuffisance cardiaque, mais elle a révélé une immunogénicité clinique lors d'injections répétées pour différents traitements. Afin de minimiser les risques d'anticorps contre leur produit final, les équipes de Sanofi R&D souhaitaient comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires. J'ai quantifié le nombre de cellules T CD4 spécifiques de la Relaxine-2 dans un large panel de donneurs sains afin d'évaluer le répertoire naïf de cellules T de la Relaxine-2. La fréquence de cellules naïves spécifiques de la Relaxine-2 a permis de rendre compte de l'immunogénicité de la Relaxine-2. J'ai ensuite effectué une cartographie des épitopes T de la Relaxine-2 afin d'identifier les zones présentant un risque d'immunogénicité et que les équipes de Sanofi puissent développer un candidat moins immunogène.

La Relaxine-2 présente une demi-vie dans l'organisme très faible ainsi qu'une affinité élevée pour son récepteur mais qui pourrait être augmentée. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la Relaxine-2 en modulant ces deux aspects, les équipes de Sanofi R&D souhaitaient y intégrer des modifications chimiques sans en augmenter l'immunogénicité. Les modifications chimiques couramment utilisées pour augmenter la demi-vie ou l'activité biologique ont des impacts encore largement méconnus sur le système immunitaire humain. J'ai donc étudié l'effet de l'introduction de modifications chimiques dans un peptide modèle sur ses

propriétés immunogènes. Six modifications chimiques ont été étudiées. Introduites individuellement à la plupart des positions du peptide modèle, leur impact sur la reconnaissance par des cellules T spécifiques du peptide natif, leur liaison aux molécules HLA et la capacité à induire des lymphocytes T CD4 a été étudié.

Les objectifs de ma thèse ont été de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'immunogénicité de la Relaxine-2 ainsi que les impacts d'acides aminés non-naturels sur les propriétés immunogéniques d'un peptide. Dans la première partie de ma thèse, j'ai évalué le répertoire naïf de cellules T de la Relaxine-2 dans un large panel de donneurs sains, identifié les épitopes T au sein de la séquence et mesuré leur affinité pour des molécules de présentation. En parallèle de ces travaux, j'ai aussi évalué le potentiel d'immunogénicité d'analogues de la Relaxine-2 développés par les équipes de Sanofi R&D. Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai étudié l'effet d'un unique acide aminé non-naturel dans un peptide sur la reconnaissance par des TCR spécifiques du peptide natif, sur l'affinité de liaison pour des molécules HLA-DR. Pour deux types d'acides aminés non-naturels, j'ai évalué leur capacité à générer des lignées de lymphocytes T spécifiques.

L'ensemble de ces travaux a donné lieu aux publications suivantes :

1. "Healthy donors exhibit a CD4 T-cell repertoire specific to the immunogenic human hormone H2-relaxin before injection"

Aurélien Azam, Sergio Mallart, Stéphane Illiano, Olivier Duclos, Catherine Prades et Bernard Maillère.

En cours de soumission à *Frontiers in Immunology*.

2. "Effects of non-natural amino acid on TCR recognition and induction of specific CD4 T-cell lines of an immunoprevalent T-cell epitope"

Aurélien Azam, Sergio Mallart, Stéphane Illiano, Olivier Duclos, Catherine Prades et Bernard Maillère.

En cours d'écriture.

Dans le contexte scientifique, nous aborderons l'immunogénicité des protéines thérapeutiques. Nous développerons ensuite les mécanismes cellulaires de l'immunogénicité à travers trois groupes cellulaires majeurs (lymphocytes B et anticorps, cellules dendritiques et molécules HLA de classe II, lymphocytes T et TCR). Nous parlerons également des facteurs et méthodes d'évaluation de l'immunogénicité. Nous introduirons ensuite la Relaxine-2 et enfin, nous évoquerons par l'immunogénicité des modifications chimiques.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

CHAPITRE I. IMMUNOGENICITE DES PROTEINES THERAPEUTIQUES

I.1. Les protéines et peptides thérapeutiques

Un médicament est défini comme une substance ou une composition ayant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies. Le marché mondial du médicament représentait 941 Mds € en 2016, dont 47,3% aux Etats-Unis et sa croissance mondiale était de 3% par rapport à 2015 (LEEM 2017). Les médicaments comptent des centaines de molécules actives, dont un grand nombre d'origine synthétique. En effet, avec l'avènement de la chimie au début du 20^{ème} siècle, des centaines de molécules de synthèse ont été développées à des fins curatives ou préventives. Le nombre de molécules, d'applications et leur utilisation de plus en plus courante ont participé à l'augmentation de l'espérance de vie d'une vingtaine d'années en 60 ans à peine en France par exemple.

Depuis le développement du génie génétique dans les années 1970, une catégorie de médicaments issus des biotechnologies s'est considérablement développée : les biomédicaments. Ces derniers incluent les protéines et peptides thérapeutiques dérivés des biotechnologies, certains produits dérivés du plasma (remplaçant des facteurs de coagulation, *etc.*) et les protéines naturellement dérivées (hormones, enzymes, toxines, *etc.*). En sont exclus les oligonucléotides, les produits cellulaires et les vaccins (Shankar *et al.* 2014). Les biotechnologies connaissent depuis une expansion et une diversification d'applications grandissantes : leur taux annuel de croissance est de 10%. En effet, si les composés organiques de synthèse (COS) ont occupé une place majeure dans le paysage des médicaments, leur toxicité et effets secondaires sont intimement liés à leur nature, contrairement aux protéines thérapeutiques (PT) dont la toxicité est très faible. Ainsi, le développement des biotechnologies a largement profité à l'émergence des biomédicaments dont la production était le facteur limitant principal et dont la spécificité d'action et la faible toxicité pour l'organisme sont des atouts majeurs. Elles constituent dorénavant un acteur majeur des industries pharmaceutiques et sont à l'origine de nouvelles approches de production et de conception des médicaments à partir de processus biologiques contrôlés et modifiés. Parmi ces processus, la production de protéines à applications thérapeutiques est elle aussi en plein développement depuis les années 1970. On peut notamment citer les travaux de Köhler et Milstein (Köhler & Milstein 1975). Le prix Nobel de Médecine de 1975 leur a été décerné pour l'obtention de cellules sécrétrices d'anticorps (Ac) spécifiques d'un antigène (Ag), issues de la fusion entre un myélome et un lymphocyte B (LB). Le génie génétique et les biotechnologies ont ainsi permis de produire en conditions contrôlées et sûres des protéines thérapeutiques (PT) qui étaient initialement obtenues par extraction. Depuis cette époque pionnière, l'exploitation de la recombinaison génétique a permis la mise sur le marché de protéines très variées et appliquées de nombreuses pathologies.

Le **Tableau 1** présente les 10 médicaments les plus vendus au monde en 2016. Il a été obtenu à partir des données publiées sur le site internet du LEEM (LEEM 2017). On y constate que les plus grands groupes pharmaceutiques proviennent des Etats-Unis et d'Europe et que les biomédicaments représentent la moitié des dix produits les plus vendus dans le monde. Les

biomédicaments nécessitent des procédés de production et de contrôle bien plus complexes et onéreux que les composés obtenus par synthèse chimique puisqu'ils sont produits par des systèmes vivants. C'est pourquoi les biomédicaments les plus vendus sont généralement développés par les plus grands groupes pharmaceutiques, le développement et l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un biomédicament coûtent très cher. Aussi, si les biomédicaments ont permis d'améliorer considérablement les traitements de nombreuses pathologies et la qualité de vie des patients, ils ont parfois augmenté le prix des traitements. Par exemple, le prix quotidien d'un traitement avec un biomédicament coûtait en moyenne 45 \$ contre 2 \$ avec un COS en 2014. Malgré un coût important, les laboratoires pharmaceutiques ont su implanter les biomédicaments puisque, la même année, on comptait 247 biomédicaments ayant obtenu une AMM, toutes classes confondues (Walsh 2014).

Produit (AMM)	Laboratoire (Pays – Rang - PdM)	Classe thérapeutique	Type	Cible	PdM
Humira (2003)	Abbvie (EU - 9 - 3,2%)	Antirhumatismes	mAb	TNF α	2,0%
Harvoni (2014)	Gilead Sciences (EU - 5 - 4,4%)	Antiviraux	COS	NS5	1,8%
Lantus (2000)	Sanofi (France - 3 - 4,8%)	Antidiabétiques	Hormone protéique	Remplace l'insuline	1,4%
Remicade (1999)	Merck & Co (EU - 6 - 4,2%)	Antirhumatismes	mAb	TNF α	0,9%
Avastin (2011)	Roche (Suisse - 7 - 4,1%)	Antinéoplasiques	mAb	VEGF	0,8%
Herceptin (2000)	Roche (Suisse - 7 - 4,1%)	Antinéoplasiques	mAb	HER2	0,8%
Enbrel (2000)	Pfizer (EU - 2 - 5,3%)	Antirhumatismes	mAb	TNF α	0,8%
Seretide (2000)	GlaxoSmithKline (RU - 8 - 3,8%)	Antiasthmatiques	Glucocorticoïde COS	GR ADRB2	0,8%
Xarelto (2011)	Bayer (Allemagne - 14 - 2%)	Antithrombotiques	COS	Facteur X	0,8%
Mabthera (1998)	Roche (Suisse - 7 - 4,1%)	Antinéoplasiques	mAb	CD20	0,7%
Total	5 Pays - 8 lab. - 32%	7 Classes	4 Types	9 Cibles	10,8%

Tableau 1 : Liste des 10 médicaments les plus vendus au monde en 2016.

Première colonne : la date sous le nom commercial correspond à celle de la première obtention d'autorisation de mise sur le marché en Europe. **Deuxième colonne** : le rang correspond au rang mondial du laboratoire pharmaceutique et le pourcentage à sa part de marché en 2016. **ADRB2**, Récepteur β_2 adrénergique, **AMM**, Autorisation de mise sur le marché, **CD20**, Marqueur spécifique des lymphocytes B, **COS**, Composé Organique de synthèse, **EU**, Etats-Unis, **GR**, Récepteur aux glucocorticoïdes, **HER2**, Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains, **lab.**, Laboratoires pharmaceutiques, **mAb**, Anticorps monoclonal, **NS5**, Protéine non structurale 5, **PdM**, Part de marché mondiale, **RU**, Royaume-Uni, **TNF**, Facteur de nécrose tumoral, **VEGF**, Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

On dénombre plus d'une centaine de PT commercialisées de nos jours, dans les domaines de la cancérologie, maladies autoimmunes et génétiques, *etc.* Depuis leurs premières utilisations au début du 20^{ème} siècle avec du sérum ou des extraits d'organes ([Banting et al. 1922](#)), nombre d'entre elles ont sauvé des milliers de vies, ou du moins nettement amélioré la qualité de vie de malades, et engendré d'importants bénéfices aux entreprises pharmaceutiques. Par exemple, l'insuline recombinante a généré 8 Mds \$ de chiffre d'affaire à elle seule. Le marché des PT est en pleine croissance, il représente actuellement 20% des médicaments (30% des nouveaux médicaments en Europe sont des PT). Ce marché est par conséquent à l'origine de nombreux brevets et travaux de recherche, dans une dynamique de compétition rude. En effet, une fois que les brevets déposés pour les premières PT sont tombés dans le domaine public, des biosimilaires peuvent être développés, ce sont les équivalents des médicaments génériques pour les biomédicaments. Ces molécules doivent passer par les mêmes étapes de validation et détenir les mêmes propriétés physico-chimiques et biologiques ainsi que la même efficacité que la PT de référence. Contrairement aux médicaments et leurs génériques, le processus de production des PT ne peut pas tomber dans le domaine public, des différences issues de la variabilité biologique du système de production sont donc observées entre un biosimilaire et sa référence. Ces différences justifient que la bioéquivalence des médicaments de synthèse ne puisse s'appliquer aux PT et aux biosimilaires, et doivent être évaluées et validées par les autorités compétentes. On compte une vingtaine de biosimilaires ayant obtenu une AMM, ce sont principalement des protéines de remplacement dont la production est moins complexe que pour les mAbs, notamment pour celles possédant une structure simple ([Walsh 2014](#)). On peut diviser les PT en cinq classes selon leur nature et rôle thérapeutique : (1) les anticorps monoclonaux (mAbs, ou autres molécules associées à la structure et fonctionnalité des Ac) se liant à une cible antigénique, (2) les protéines de remplacement palliant au déficit de l'expression ou activité d'une protéine endogène, (3) les hormones, facteurs de croissance et cytokines modulant l'activité de certaines cellules, (4) les enzymes favorisant une voie métabolique, (5) les toxines dont l'activité toxique a été maîtrisée.

I.1.1. Anticorps thérapeutiques

Les mAbs représentent la classe de PT la plus représentée dans le paysage pharmaceutique (48% des ventes de PT en 2012) avec plus de 300 mAbs actuellement en développement dans une trentaine de domaines thérapeutiques. Leur faible toxicité, leur très haute spécificité d'action et leur stabilité métabolique en font des protéines de choix pour se lier à une molécule cible extramembranaire et inhiber son activité à des fins thérapeutiques. Les Ac ont deux mécanismes d'action principaux pour inhiber ou activer leur cible antigénique une fois liés à celle-ci : neutralisation d'un Ag soluble par des cellules phagocytaires (favorisent le phénomène d'opsonisation des plus grosses particules) ou activation la cytotoxicité de cellules T, NK (*natural killer*) ou granulocytes envers un Ag membranaire ou circulant. De plus, les possibilités de cibler une molécule en particulier sont quasiment infinies tant que l'Ag est accessible, puisque les anticorps peuvent pénétrer les cellules ([Weisbart et al. 2012](#)). Le **Tableau 2** liste les 10 mAbs les plus vendus en 2016, il a été établi à partir des données du site internet PharmaCompass ([PharmaCompass 2017](#)). On remarque que les mAbs humains et humanisés représentent plus de la moitié des mAbs de la liste, leur succès étant en partie dû à

une meilleure acceptation par le système immunitaire que les mAb d'origine murine en général. De plus, les anti-TNF représentent aussi une marge importante du marché, leur utilisation étant applicable à de nombreuses pathologies graves et touchant un grand nombre de personnes. Les mAbs sont des Ac obtenus à partir d'une unique lignée cellulaire clonée à des millions d'exemplaires contenant un matériel génétique identique, d'où le terme monoclonal, opposé aux Ac polyclonaux. Ces derniers proviennent de cellules différentes et présentent des différences d'affinité pour une ou plusieurs cibles. Les mAbs sont aujourd'hui essentiellement produits par des lignées cellulaires CHO (*chinese hamster ovary*), même si des systèmes eucaryotes alternatifs présentent des atouts intéressants : champignons filamenteux, levures, microalgues et protozoaires (Matthews *et al.* 2017).

Produit (AMM)	Laboratoire (Pays)	Utilisations thérapeutiques	Nom du mAb	Type de mAb	Cible	Vente en 2016
Humira (2003)	Abbvie (EU)	MIA	Adalimumab	Humain	TNF α	16,1 Mds \$
Remicade (1999)	Merck & Co (EU)	MIA	Infliximab	Chimérique	TNF α	7,0 Mds \$
Avastin (2011)	Roche (Suisse)	Cancer	Bevacizumab	Humanisé	VEGF	6,7 Mds \$
Herceptin (2000)	Roche (Suisse)	Cancer	Trastuzumab	Humanisé	HER2	6,7 Mds \$
Enbrel (2000)	Pfizer (EU)	MIA	Etanercept	Pdf au Fc	TNF α	6,0 Mds \$
Mabthera (1998)	Roche (Suisse)	MIA et cancer	Rituximab	Chimérique	CD20	5,8 Mds \$
Opdivo (2015)	BMS (EU)	Cancer	Nivolumab	Humain	PD-1	3,8 Mds \$
Eylea (2013)	Regeneron (EU)	Cancer	Aflibercept	Pdf au Fc	VEGF	3,3 Mds \$
Stelara (2009)	Janssen-Cilag (EU)	MIA	Ustekinumab	Humain	IL-12 IL-23	3,2 Mds \$
Soliris (2007)	Alexion (EU)	DS	Eculizumab	Humanisé	C5	2,8 Mds \$

Tableau 2 : Meilleures ventes d'anticorps monoclonaux ou protéines de fusion en 2016.

Première colonne : la date sous le nom commercial est celle de la 1^{ère} obtention d'AMM en Europe. **AMM**, Autorisation de mise sur le marché, **C5**, Facteur 5 du complément, **CD20**, Marqueur spécifique des lymphocytes B, **DS**, Dérèglements sanguins, **Fc**, Fragment cristallisable d'un anticorps, **HER2**, Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains, **IL**, Interleukine, **Mds**, Milliards, **MIA**, Maladies inflammatoires et autoimmunes, **PD-1**, Récepteur de mort cellulaire programmée 1, **Pdf**, Protéine de fusion, **TNF**, Facteur de nécrose tumoral, **VEGF**, Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Les mAbs ont connu plusieurs générations avec chacune un degré d'humanisation depuis leur développement en santé, et le suffixe de leur nom définissait ce degré. En effet, les mAbs murins se sont développés dès 1975 (-mumab, (Cosimi 1987)), puis chimériques à partir de 1984 (-ximab), humanisés dès 1988 à (-zumab) et enfin entièrement humains à partir de 1994

(Den Broeder *et al.* 2002). Le risque de déclencher une réponse immunitaire chez l'Homme diminue généralement avec le degré d'humanisation. Les mAbs sont aujourd'hui tous de la classe IgG (Immunoglobuline G), plus précisément de la sous-classe IgG1, notamment pour leur demi-vie plus longue, leur rôle dans la réponse immunitaire secondaire, leurs fonctions effectrices portées par le fragment Fc et parce qu'ils constituent la sous-classe d'IgG la plus répandue et la mieux étudiée.

Enfin, de nouvelles générations de mAbs apparaissent, basées sur les domaines fonctionnels, une double spécificité ou une réduction de la taille en ne conservant que les domaines variables responsables de la liaison à l'Ag. Ce sont respectivement les protéines de fusion au Fc, les mAbs bispécifiques (Topp *et al.* 2014) et les *nanobodies* (Nb). Pour ces dernières, le poids moléculaire passe alors de 150 kDa à 15 kDa, les Nb présentent une meilleure solubilité, stabilité et pénétration tissulaire *in vivo* que les mAbs. Les Nb sont aussi plus faciles à produire en levures, ce qui diminue drastiquement les coûts de production. Cette nouvelle génération s'inspire des Ac produits naturellement par les camélidés et constitués de deux chaînes lourdes dont le domaine de reconnaissance de l'Ag est composé d'un seul domaine variable (Bannas, Hambach, & Koch-Nolte 2017). Différentes formes sont actuellement en développement, présentant divers degrés de "camélidation", cette nouvelle génération d'Ac est destinée aux traitements de maladies cardiaques, du système nerveux et du cancer.

I.1.2. Protéines de remplacement

Cette classe de PT couvre plusieurs types de protéines (hormones, enzymes, *etc.*) et se caractérise par son rôle thérapeutique : remplacer une protéine endogène dont l'expression ou l'activité est anormalement basse voire nulle. Ce manque est à l'origine d'une pathologie qui peut être atténuée voire guérie en administrant une PT de remplacement aux patients atteints. Cette classe représente le premier type de PT développées avec l'utilisation de protéines animales homologues puis humaines recombinantes (Weinges, Ehrhardt, & Enzmann 1981). Le **Tableau 3** regroupe les 10 PT de remplacement les plus vendues en 2016. Il a été établi d'après les données du site internet PharmaCompass (PharmaCompass 2017).

Afin de donner plus de visibilité aux différentes PT, seules les 3 insulines les plus vendues apparaissent, les 4 suivantes occupaient chacune les places 4, 6, 7 et 9 du classement. On peut expliquer le nombre élevé d'insulines développées par deux facteurs majeurs : (1) L'épidémiologie du diabète de type 2 qui touche quasiment un demi-milliard de personnes dans le monde, surtout dans les pays industrialisés et donc principalement des sujets capables d'assumer financièrement une thérapie sur de nombreuses années. (2) L'insuline est largement décrite dans la littérature et sa production est plus aisée que celle d'un mAb par exemple. Ainsi, l'insuline thérapeutique illustre les différents facteurs pris en compte par les laboratoires pour développer une PT plutôt qu'une autre : pathologie (incidence et gravité, connaissances scientifiques, *etc.*), population de patients (répartition, niveau de vie, *etc.*) et le médicament en lui-même (coût et conditions de production, *etc.*).

Produit (AMM)	Laboratoire (Pays)	Utilisations thérapeutiques	Nom de la protéine	Remplace	Vente en 2016
Lantus (2000)	Sanofi (France)	Diabètes	Insuline glargine	Insuline	6,1 Mds \$
NovoRapid (1999)	Novo Nordisk (Danemark)	Diabètes	Insuline asparte	Insuline	2,8 Mds \$
Humalog (1997)	Eli Lilly (EU)	Diabètes	Insuline lispro	Insuline	2,8 Mds \$
Aranesp (2001)	Amgen (EU)	DS	Darbepoétine α	EPO	2,1 Mds \$
NovoSeven (1996)	Novo Nordisk (Danemark)	DS	rFVII α de coagulation	Facteur VII	1,5 Mds \$
Epogen (1989*)	Amgen (EU)	DS	Epoétine α	EPO	1,3 Mds \$
Kogenate (2004)	Bayer (Allemagne)	DS	rFVIII anti-hémophilie	Facteur VIII	1,2 Mds \$
Acthar (2010*)	Mallinckrodt (RU)	Maladies autoimmunes	Corticotropine	ACTH	1,2 Mds \$
Eprex (1994)	Johnson & Johnson (EU)	TS	Epoétine α	EPO	1,1 Mds \$
Myozyme (2006)	Sanofi (France)	Maladie de Pompe	Alglucosidase α	Glucosidase α	0,77 Mds \$

Tableau 3 : Liste des 10 protéines thérapeutiques de remplacement les plus vendues en 2016.

Première colonne : la date sous le nom commercial correspond à celle de la première obtention d'autorisation de mise sur le marché en Europe ou aux Etats-Unis*. **ACTH**, Hormone adrénocorticotrope, **AMM**, Autorisation de mise sur le marché, **DS**, Dérèglements sanguins, **EPO**, Erythropoïétine, **EU**, Etats-Unis, **FVII-FVIII**, Facteurs 7 et 8, **Mds**, Milliards, **rFVII-rFVIII**, Facteurs 7 et 8 recombinants, **RU**, Royaume-Uni.

I.1.3. Cytokines et hormones

Cette catégorie contient les PT dont l'activité biologique régule une activité cellulaire précise (stimulation de la division cellulaire, différenciation, sécrétion, *etc.*). Le vivant étant très difficile à classer dans son intégralité et sa complexité, certaines protéines peuvent appartenir à plusieurs classes de cette catégorie. Par exemple, l'érythropoïétine (EPO) est à la fois une hormone, une cytokine et un facteur de croissance, mais est administrée en guise de remplacement aux patients atteints d'anémie.

On peut classer ces PT en deux classes principales selon leur nature :

(1) Les cytokines, ce sont des protéines de 15 à 20 kDa jouant le rôle de médiateurs cellulaires au sein du système immunitaire. Sont comprises parmi les cytokines les :

- interleukines, ce sont des cytokines jouant un rôle majeur et varié dans le système immunitaire, comme l'IL-2 pour le traitement du carcinome métastatique colorectal ([Heys *et al.* 1995](#)),

- chimiokines, ce sont des cytokines chimio-attractives, comme la CXCL1 pour le traitement de l'inflammation cardiaque auto-immune ([Bachmaier, Toya, & Malik 2014](#)),

- interférons, ce sont des cytokines jouant un rôle dans la réponse antivirale et possédant des activités immuno-modulatrices, comme l'IFN β dans le traitement de la sclérose en plaques (SEP) (**Jacobs et al. 1982**),

- certains facteurs de croissance, ce sont des cytokines à activité mitotique, comme le G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) dans le traitement de la neutropénie (**Lieschke & Burgess 1992**).

(2) Les hormones protéiques, que l'on différencie des cytokines par leur expression et leur activité qui sont davantage tissulaires voire organe-spécifiques comme l'hormone folliculostimulante (ou FSH) utilisée pour assister la fécondation *in vitro* humaine (**Out et al. 1997**).

I.1.4. Enzymes

Les enzymes ont un rôle régulateur dans le métabolisme et dans les voies de signalisation. Elles sont caractérisées par une activité catalytique envers une réaction chimique avec un substrat aboutissant à la formation d'un produit. Parmi les enzymes thérapeutiques, on peut citer l'Alteplase qui favorise la fibrinolyse en se liant à la fibrine et en convertissant le plasminogène en plasmine. Elle est utilisée pour traiter les lésions du système cardiovasculaire (**Goldhaber et al. 1993**).

I.1.5. Toxines

Les toxines sont par définition des molécules ayant une activité toxique pour un ou plusieurs organismes. Elles peuvent être produites par des microorganismes, des plantes, champignons et animaux (insectes, serpents, *etc.*) constituant un atout de protection ou de prédation. Dans le cas des bactéries, les toxines peuvent servir à affaiblir l'hôte ou neutraliser son système immunitaire.

Les toxines développées comme PT sont d'origine non humaine et peuvent être utilisées pour d'autres applications que soigner des pathologies. La toxine botulinique est par exemple connue pour son utilisation en chirurgie plastique mais aussi pour traiter plusieurs types de dystonie (**Jankovic & Brin 1991**). Le **Tableau 4** liste les 10 protéines thérapeutiques hors mAb ni de remplacement les plus vendues en 2016. Il a été établi d'après les données du site internet (**PharmaCompass 2017**).

Produit (AMM)	Laboratoire (Pays)	Utilisations thérapeutiques	Nom de la protéine	Classe de protéine	Vente en 2016
Neulasta (2002)	Amgen (EU)	DS	Pegfilgrastim	Cytokine	4,6 Mds \$
Botox (2011)	Allergan (Irlande)	Insuffisance rénale	Onabotulinumtoxina	Toxine	2,8 Mds \$
Avonex (1997)	Biogen (EU)	MNM	IFN β -1A	Interféron	2,3 Mds \$
Sandostatine (1995)	Novartis (Suisse)	Cancer	Octreotide	Hormone mimétique	1,6 Mds \$
Forsteo (2003)	Eli Lilly (EU)	Maladies osseuses	Teriparatide	Hormone	1,5 Mds \$
Norditropin (2000)	Novo Nordisk (Danemark)	Maladies hormonales	Somatropine	Hormone	1,2 Mds \$
Activase (1991)	Roche (Suisse)	Maladies cardiovasculaires	Alteplase	Enzyme	1.1 Mds \$
Betaféron (1995)	Bayer (Allemagne)	MNM	IFN β -1B	Interféron	0,78 Mds \$
Neupogen (1995)	Amgen (EU)	DS	Filgrastim	Cytokine	0,77 Mds \$
Pulmozyme (1994)	Roche (Suisse)	Mucoviscidose	Dornase- α	Enzyme	0.69 Mds \$

Tableau 4 : Liste des 10 protéines thérapeutiques les plus vendues en 2016.

Première colonne : la date sous le nom commercial correspond à celle de la première obtention d'autorisation de mise sur le marché en Europe. **AMM**, Autorisation de mise sur le marché, **DS**, Dérèglements sanguins, **EU**, Etats-Unis, **IFN**, Interféron, **Mds**, Milliards, **MIA**, Maladies inflammatoires et autoimmunes, **MNM**, Maladies neurologiques et mentales.

I.1.6. Peptides thérapeutiques

En 2010, les 50 peptides thérapeutiques (pT) ayant obtenu une AMM dépassaient le symbolique Md \$ sur le marché du médicament ([Goodwin, Simerska, and Toth 2012](#)). Aujourd'hui, ils représentent environ 20% des biomédicaments. On les différencie des PT principalement par leur taille ou leur poids moléculaire qui ne dépassent pas 50 résidus ou 5kDa. Les pT ont l'avantage d'une taille réduite, ce qui les rend biologiquement plus mobiles que les PT, tout en ayant une grande spécificité et une faible toxicité par rapport aux COS. Cependant, ces avantages sur les PT n'ont pas suffi à compenser les inconvénients qu'ils ont par rapport aux PT. En effet, ils ont une capacité d'absorption réduite à travers les muqueuses, et sont surtout plus sensibles à la filtration rénale et aux protéases, leur demi-vie dans l'organisme oscille de quelques minutes à quelques heures. Leur développement a donc été relativement plus lent à cause de leur clairance plus grande et leur activité biologique restreinte par rapport aux mAbs.

Les pT peuvent être produits selon trois méthodes : (1) synthèse biologique naturelle, ce sont les peptides bioactifs issus de l'environnement, (2) synthèse biologique recombinante (comme les PT), (3) synthèse chimique. La plupart des pT sont des dérivés de peptides bioactifs

ayant subi des optimisations (taille, spécificité, *etc.*) (Sato *et al.* 2006). Les pT comportent trois classes majoritaires selon leur fonction :

- (1) Les peptides analogues d'hormones et enzymes : ils sont généralement issus de séquences humaines et ciblent des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPCR). Ils comprennent les dérivés d'insuline, la GnRH, la calcitonine, les glucagons, les encéphalines, *etc.* On peut par exemple citer l'ocytocine, une neuro-hormone composée de 9 acides aminés. Elle est administrée par voie intranasale afin de passer la barrière hémato-encéphalique dans des traitements de troubles mentaux ou comme analgésique (antidouleur) (Ota *et al.* 2018).

- (2) Les peptides antimicrobiens (*antimicrobial peptides* ou AMPs) : ce sont des peptides composés d'une dizaine à moins de 100 résidus et constituent un maillon important du système immunitaire inné dans la plupart des êtres vivants. Comme leur nom l'indique, ils sont synthétisés afin de lutter contre les microorganismes. Chez l'Homme, ils sont principalement synthétisés par les cellules de l'immunité innée. Les recherches sur leur développement en santé ont été menées suite à l'apparition de souche bactériennes résistantes aux antibiotiques (Mok & Li 2014). En effet, ils présentent un large spectre d'activité antibactérienne et induisent moins de souches résistantes que les antibiotiques, ils constituent donc une alternative intéressante à ces derniers. On en dénombre plus de 2900 différents dans tout le vivant et d'origine synthétique, ils représentaient autour de 10% des médicaments protéiques en 2012. Les AMPs présentent un grand nombre d'activités biologiques différentes : antimicrobienne, antiparasite, insecticide, antitumorale, chémoattractive, et même immunomodulatrice (http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic_function.php). Toutes ces activités sont autant d'applications thérapeutiques potentielles en dehors des traitements d'infections, certains AMPs sont en phases II/III de développement clinique et une dizaine ont reçu une AMM depuis 2012 (Kovalainen *et al.* 2015). Leur activité cytotoxique pose néanmoins problème et constitue un enjeu de développement clinique majeur, pour leur utilisation dans le traitement de la fibrose pulmonaire kystique par exemple (Forde *et al.* 2016). Par exemple, la gramicidine est un AMPs obtenu à partir d'une bactérie du sol et dont l'activité hémolytique empêche son utilisation d'antibiotique par injection. Elle est donc restreinte à une application cutanée pour traiter les GRAM positifs (Burkhart *et al.* 1999). Certains AMPs sont utilisés pour faciliter l'entrée de molécules médicinales dans les cellules, appartenant aussi à la seconde catégorie de pT.

- (3) Les peptides pénétrant les cellules (*cell-penetrating peptides*, ou CPPs) sont composés de 5 à une trentaine de résidus et sont capables de pénétrer les cellulaires plasmiques sans passer par un récepteur spécifique. Ils peuvent ainsi permettre à une molécule médicamenteuse non liposoluble ou de petite à taille moyenne (jusqu'à une centaine de kDa) d'atteindre une cible intracellulaire. Les CPPs présentent une grande diversité d'origines (virus, bactéries, *etc.*) et de séquences, une fois liés covalentement ou non à une molécule cargo (la molécule thérapeutique : protéine, ADN, ARN ou COS), ils entrent dans la cellule par deux voies principales :

- la voie énergie-indépendante, dite voie directe, qui comprend l'entrée par la formation de pores membranaires, d'une micelle inversée ou par interactions entre les résidus positivement chargés du CPP et les chaînes lipidiques négativement chargés de la membrane plasmique,

- la voie énergie-dépendante, dite voie d'endocytose, qui comprend aussi la

macropinocytose. Actuellement, aucun CPP n'a obtenu d'AMM car leur utilisation en modèle animal est encore récente, une dizaine de CPPs sont en développement clinique avancé et représentent une avancée intéressante pour que des PT par exemple puisse plus facilement accéder à une cible intracellulaire (**Guidotti, Brambilla, & Rossi 2017**).

Des pT peuvent ne pas appartenir aux trois classes, et leur diversité de fonction et d'origine ne permet pas de les rassembler en une même classe. Ils peuvent être synthétisés chimiquement ou par recombinaison génétique, et ont des applications thérapeutiques aussi variées que leurs activités biologiques. Par exemples, l'éptifibatide est un hexapeptide cyclique issu d'un venin de serpent, il est utilisé comme anti-thrombotique dans les traitements de maladies cardiovasculaires (**Lorenz, Macdonald & Kitt 1999**). L'enfuvirtide est un peptide linéaire de 36 résidus synthétisé par voie chimique. Sa séquence reproduit une partie de celle de la glycoprotéine gp41 du VIH, et il est utilisé comme antirétroviral contre le VIH-1 chez des patients résistants à d'autres traitements (**Lalezari et al. 2003**). Il fut le premier peptide thérapeutique à être produit chimiquement en masse.

I.2. Conséquences de l'immunogénicité

L'immunogénicité est la capacité d'une molécule à induire une réaction immunitaire. Malgré les efforts des industriels pour humaniser les séquences des PT, en particulier celles des mAbs, le risque d'immunogénicité des protéines produites demeure dans leur nature protéique. En effet, toute protéine présente un risque potentiel d'immunogénicité. Ce risque peut mener à une réponse immunitaire humorale, incluant l'apparition d'Ac spécifiques chez des patients ayant reçu une PT. Ainsi, l'évaluation de l'immunogénicité d'une PT est cliniquement basée sur la détection d'ADA (*antidrug antibodies*) 15 jours après le premier traitement. Le risque qu'un patient développe des ADA augmente avec des facteurs de risque tels que le nombre d'injections, ce phénomène se rencontre donc majoritairement au cours de traitements de maladies chroniques.

I.2.1 Problèmes et limites rencontrés pour les protéines thérapeutiques

I.2.1.A. Définition des ADA

Les ADA sont définis comme des Ac biologiquement réactifs à un médicament, y compris les Ac préexistants qui réagissent de manière croisée avec le médicament biologique administré (**Shankar et al. 2014**). Ils sont le résultat d'une réponse du système immunitaire adaptatif lors de l'introduction d'une molécule thérapeutique dans l'organisme, de nature protéique le plus souvent. Les protéines ont une grande capacité de liaison et d'interaction spécifiques à d'autres molécules, une capacité de changement de conformation et d'activité selon les conditions physicochimiques et enfin une immense variété de séquences et de structures, toutes ces caractéristiques en font les molécules organiques les plus actives du vivant. C'est pourquoi le système immunitaire, adaptatif principalement, s'est spécialisé dans la capture, la reconnaissance et le contrôle des protéines au sein de l'organisme au détriment des autres molécules organiques moins réactives que sont les acides nucléiques, les carbohydrates et les lipides. Les réponses spécifiques du système immunitaire aux molécules organiques, même de synthèse, sont donc anecdotiques dans le cadre d'un traitement préventif

ou thérapeutique comparé à celles enregistrées contre des protéines. Si le développement des PT dans les années 1980 a permis d'obtenir une grande spécificité d'activité biologique et une faible toxicité par rapport aux COS, cela a aussi occasionné l'émergence de réponses immunitaires. L'utilisation de PT d'origine animale a été cessée à cause de leur grande immunogénicité dont la cause xénogénique a rapidement été identifiée, et l'humanisation n'a constitué qu'une solution partielle au problème, puisque toute protéine détient un potentiel immunogénique (Maillère, Delluc, & Ravot 2012). Ainsi, une PT peut être reconnue, captée, clivée en peptides et présentée par des cellules de l'immunité innée spécialisées dans la présentation d'Ag. Des lymphocytes peuvent ensuite recevoir un signal de danger et reconnaître spécifiquement certaines séquences peptidiques, appelées épitopes, et initier une réponse immunitaire en activant des cellules productrices d'Ac spécifiques des épitopes présents dans la PT, ce sont les ADA. Ces derniers peuvent avoir divers effets sur le traitement et le patient, allant de l'absence significative d'effet à une inefficacité du traitement et la mise en danger de la santé du patient.

I.2.1.B. Historique des cas d'immunogénicité des PT

Le nombre d'études décrivant des problèmes d'immunogénicité de PT via la présence d'ADA chez des patients est important et ne cesse de croître avec le développement des biomédicaments, même si les précautions prises par les laboratoires pharmaceutiques sont de plus en plus efficaces. Cette sous-partie relate quelques faits marquants de l'immunogénicité des PT et ses nombreuses conséquences sur la santé des patients.

En 1983, l'un des premiers mAbs murins, un anti-Leu1 (antigène des cellules T tumorales) nommé T101, est utilisé comme thérapie contre un lymphome des cellules T. Chez 4 des 7 patients traités, les injections répétées induisent l'apparition d'ADA de classe IgG et dirigés à 95% contre les parties murines du T101. Les ADA provoquent un échappement tumoral au traitement chez trois d'entre eux, ce fut l'une des premières preuves de l'immunogénicité d'un mAb d'origine non humaine (Miller *et al.* 1983).

En 1988, un patient présentant des troubles hormonaux devient résistant au traitement à la gonadotropine chorionique humaine, commencé 10 puis 17 ans auparavant par phases de 6 mois. Des ADA spécifiques de l'hormone sont détectés dans le sérum du patient, neutralisent l'activité thérapeutique et obligent le corps médical à changer d'hormone sexuelle. Cet événement constitue la première preuve d'immunogénicité d'une hormone humaine de remplacement (Thau *et al.* 1988).

En 1986, le premier mAb murin à avoir été développé, un anti-CD3 de classe IgG2a nommé OKT3, est utilisé en prévention du rejet de greffe rénale, parfois en association avec des immunosuppresseurs. Des Ac neutralisants et augmentant la clairance spécifiques de l'OKT3 ont été détectés chez tous les patients traités avec l'OKT3 seul. Les immunosuppresseurs réduisent nettement l'apparition et l'intensité de la réponse immunitaire puisque les ADA détectés sont alors ni neutralisants, ni clairants. Deux ans plus tard, l'OKT3 est toujours utilisé en prévention du rejet de greffe de reins chez l'Homme. Chez 3 patients puis chez 9 patients deux ans tard, la première injection provoque en l'espace de quelques heures une fièvre, des frissons, maux de tête et diarrhées suite à un syndrome de libération de cytokines (*Cytokine Release Syndrome* ou CRS). Les cytokines impliquées sont le TNF α , l'IL-2 et l'IFN γ ,

et sont sécrétées spécifiquement par certains LT dont l'activation par l'OKT3 murin a provoqué un CRS grave. Ce fut l'une des premières preuves d'immunogénicité et d'immunotoxicité d'un mAb d'origine non humaine ([Chatenoud et al. 1986, 1988](#)).

En 1993, 262 patients atteints de la maladie de Gaucher de type 1, provoquée par une mutation autosomique d'une enzyme lysosomale, sont traités avec une enzyme thérapeutique remplaçant la glucosylcéramidase mutée. En moins d'un an de traitement, 34 patients (soient 13%) développent des ADA, de classe IgG1 et ne montrant aucun effet sur l'efficacité du traitement. Aussi, 14 patients présentent une hypersensibilité immédiate de type II (pseudo-allergie indépendante des IgE) suite aux injections, dont 5 patients ne présentent pas d'ADA contre l'enzyme de remplacement. Cet épisode constitue le premier relevé clinique d'ADA contre une enzyme thérapeutique, et souligne la complexité des liens entre la présence d'ADA, leur capacité de neutralisation de la PT et réaction allergique ([Richards, Olson & McPherson 1993](#)).

En 1999, le mAb murin anti-CD52 CAMPATH-1 est utilisé afin de prévenir le rejet de greffe. Chez 15 patients sur 17, des ADA contre le mAb murin sont détectés et menacent le prolongement du traitement alors qu'aucun ADA n'est détecté contre sa version humanisée chez les 12 patients testés. Cette expérience est l'une des premières à démontrer que l'humanisation des séquences constitue une solution à l'immunogénicité des PT, surtout des mAbs, mais des études montrent par la suite que cela n'est pas toujours suffisant ([Rebello et al. 1999](#)).

De 1999 à 2002, l'injection répétée d'EPO, une hormone précurseur des hématies, chez des patients atteints d'aplasie suite à une insuffisance rénale a induit chez 13 d'entre eux la production d'ADA neutralisant les PT et la protéine endogène. Les ADA bloquaient alors la formation d'hématies et ont déclenché un stade aggravé d'érythroblastopénie. Chez 12 d'entre eux, les ADA reconnaissent des épitopes conformationnels de la protéine, chez le patient restant, les ADA reconnaissent des épitopes conformationnels et séquentiels de l'EPO. Ces deux épisodes ont marqué le risque d'autoimmunité par la présence d'un homologue endogène aux PT, l'injection pouvant perturber une tolérance envers la protéine endogène ([Casadevall et al. 2002](#)).

Ces nombreux événements montrent les conséquences de l'immunogénicité des PT qui peuvent avoir des conséquences graves. Ils ont obligé les institutions de contrôle à réagir et imposer davantage de contrôles sur les PT avant que les tests sur l'Homme soient effectués ([Wadman 2006](#)).

Heureusement, l'immunogénicité des PT peut avoir des effets moins dangereux pour la santé des patients. On dénombre aujourd'hui un grand nombre d'articles révélant la production d'ADA contre des PT et ce, à différents niveaux : champs thérapeutiques, taille des cohortes de patients, type de PT, etc. La sensibilité et l'exhaustivité des données sur les ADA récoltées durant des phases cliniques sont souvent différentes d'une étude à une autre. En effet, même si les instances de contrôle des médicaments ont établi des réglementations strictes et placé l'immunogénicité au centre des stratégies de gestion des risques, les techniques utilisées demeurent au choix du laboratoire menant l'étude, et les problématiques et les tests qui en découlent peuvent différer.

Afin d'appuyer ces propos, nous avons comparé deux revues récentes résumant des

données sur les ADA contre des PT (Cf. **Tableau 5**). L'une étudie les ADA détectés contre 26 PT utilisées en oncologie ([van Brummelen et al. 2016](#)), l'autre contre 121 PT tous champs thérapeutiques confondus ([Wang et al. 2016](#)). La première revue déplore que les données sur les ADA en cancérologie soient moins renseignées que dans d'autres pathologies. En effet, sur 81 études cliniques recensées contre le cancer pour lesquelles la recherche d'ADA a été effectuée, 63% détectent des ADA et moins de la moitié d'entre elles ont recherché leurs effets sur la santé du patient, l'efficacité du traitement ou la pharmacocinétique (PK) de la PT. Enfin, les auteurs soulignent entre autre la nécessité de standardiser les tests de détection et analyse d'ADA, plus spécialement en oncologie. La seconde revue rapporte des résultats statistiques bien différents et relève des disparités de sensibilité entre les différents paramètres des effets des ADA. D'après les auteurs, l'étude de la PK de la PT et des ADA semble la méthode la plus sensible, notamment pour l'anticipation de l'effet des ADA sur l'efficacité du traitement. Ainsi, les deux revues soulignent-elles la difficulté à collecter des données standardisées, équivalentes ou complètes sur la détection et surtout l'étude des effets des ADA tant les techniques et données collectées peuvent varier. Le **Tableau 5** résume les données générales sur les ADA récoltées dans chacune des revues. Les PT n'étant pas listées dans la seconde revue, il est probable que certaines PT soient communes aux deux.

Nombre total de PT	ADA détectés	Répartition des PT	Effet sur			
			Activité	Santé	Traitement	PK
81	51 (63%)	mAbs : 19 PPT : 5 ND : 27	ND	3 / 17 (18%) (ND : 34)	0 / 16 0% (ND : 35)	2 / 12 17% (ND : 39)
121	108 (89%)	mAbs : 43 Ctk : 11 Enz : 26 GF / H : 12 PPT : 29	73/108 (60%)	73/108 (60%)	59/108 (49%)	31/108 (26%)

Tableau 5 : Rapport de détection d'ADA sur 26 protéines thérapeutiques anti-cancéreuses.

ND, Absence de données, **ADA**, Anticorps anti-drogue, **Ctk**, Cytokines, **Enz**, Enzymes, **GF / H**, Facteurs de croissance et hormones, **mAbs**, Anticorps monoclonaux, **PK**, Pharmacocinétique, **PPT**, Protéines, peptide et toxines thérapeutiques.

On constate que les effets des ADA sont totalement différents, ce que l'on peut en partie expliquer par le nombre de PT pris en compte dans chaque revue. Dans la première, le faible nombre de données collectées semble donner des résultats moins représentatifs de la réalité que la seconde dont l'échantillon est jusqu'à 9 fois plus grand pour l'effet sur la PK par exemple. De plus, les patients atteints de cancer ont en général un système immunitaire moins réactif que dans d'autres pathologies, les ADA sont donc moins fréquents dans la première revue que dans la seconde qui traite de diverses pathologies. Parmi les mAbs de la première revue, les fréquences moyennes sont de 6% pour les 5 mAbs humains, 5% pour les 7 mAbs humanisés, 6% pour les 4 mAbs chimériques, 45% pour les 3 mAbs murins, et enfin 30% pour les 5 toxines

et autres PT. Ces chiffres montrent que le degré d'humanisation diminue le risque d'apparition d'ADA, mais pas totalement.

I.2.2. Risques pour le produit

Les réponses immunitaires contre les PT peuvent avoir des conséquences sur la protéine (disponibilité, efficacité, *etc.*), ce sont les risques pour le produit.

I.2.2.A. Les ADA n'ont aucun effet

Il se peut que des patients développent des ADA, mais que ces derniers n'aient aucun effet. Les patients ADA positifs présentent alors la même réponse au traitement que les ADA négatifs, les ADA semblent ne modifier aucun paramètre de la PT, que ce soit la PK ou bien son efficacité thérapeutique.

I.2.2.B. Effet sur la pharmacocinétique

La demi-vie de la PT dans l'organisme peut être perturbée par les ADA qui accélèrent ou limitent la dégradation de la PT, on parle alors de *clearing anti-drug antibodies* (CADA) ou de *sustaining anti-drug antibodies* (SADA). En mesurant la concentration de la PT et en ADA dans le sang après administration, on peut déterminer la demi-vie de la PT ainsi que sa clairance en présence ou absence d'ADA. Les SADA diminuent la clairance de la PT par rapport à la PT sous sa forme libre, c'est-à-dire que le complexe immunitaire PT-ADA est moins vite épuré par les reins que la PT seule. Par exemple, l'insuline aspartate (un acide aspartique remplace la proline en position 28 de la chaîne β) a induit des ADA après de multiples injections chez 33 patients diabétiques, les ADA augmentant significativement la durée de la présence d'insuline dans le sang ([Chen et al. 2005](#)). Au contraire, les CADA augmentent la clairance et facilitent sa filtration. De tels ADA ont été observés durant un essai clinique de l'Infliximab (mAb chimérique anti-TNF α). Sur 27 patients, 5 étaient exposés à des doses sous-thérapeutiques d'Infliximab en moins d'une heure à cause d'ADA déjà présents avant l'injection ([van den Bemt et al. 2011](#)). Généralement, les ADA formant des complexes immunitaires de grosse taille augmentent la clairance de la PT tandis que ceux formant de plus petits complexes immunitaires la diminuent. Dans les deux cas, la dose administrée doit être ajustée et un suivi de la concentration sérique plus régulier doit être mis en place. Enfin, l'activité neutralisante ou non-neutralisante des ADA est dissociée à leur effet sur la PK.

I.2.2.C. Neutralisation et résistance au traitement

Les ADA peuvent reconnaître comme épitope le site d'activité biologique de la PT et s'y fixer ou gêner sa disponibilité par encombrement stérique ou changement de conformation. La protéine liée voit alors son activité neutralisée par des ADA dits neutralisants (NADA) et le traitement a de moins en moins d'effets thérapeutiques. Le caractère neutralisant des ADA peut être confirmé par des tests cellulaires *in vitro* ou biochimiques, les deux évaluant la capacité des ADA à interférer l'activité biologique de la PT en présence de sa cible. L'un des exemples les plus marquants est celui des NADA développés contre l'EPO thérapeutique réagissant de manière croisée avec l'EPO endogène, ce qui aggrave fortement les symptômes pour lesquels

les patients étaient traités (Casadevall *et al.* 2002). Des NADA ont aussi été détectés contre l'IFN β dans le traitement contre la SEP et l'Infliximab et l'Adalimumab dans le traitement contre l'AR par exemples, diminuant l'effet thérapeutique des traitements (Kim *et al.* 2007, van Schouwenburg *et al.* 2013). Plus précisément, les NADA induits contre l'IFN β neutralisaient les deux types d'IFN thérapeutiques : β 1a et β 2a (Khan & Dhib-Jalbut 1998). Plus tard, des NADA de sous-types IgG1 et IgG4 détectés chez des patients traités à l'IFN β ont en partie neutralisé l'IFN β endogène, les effets cliniques de cette neutralisation restent cependant inconnus. Aussi, les NADA induits contre les mAbs anti-TNF α étaient de classe IgE et IgG, ils ont nettement diminué l'efficacité du traitement, nécessitant d'augmenter les doses administrées et augmentant ainsi le risque d'immunogénicité et d'effets secondaires (Murdaca *et al.* 2016).

Dans le cas d'ADA comportant une activité neutralisante et une concentration importante dans le sang, ils peuvent induire une résistance au traitement. Les patients présentant ces critères deviennent résistants à un traitement, c'est ainsi que des patients sont devenus résistants au traitement à l'IFN β contre la SEP dans les années 2000 (Scagnolari *et al.* 2002). Dans ce cas, il faut augmenter la dose administrée dans les limites de la dose thérapeutique, tout en surveillant le dosage d'ADA. Cela implique cependant une augmentation du risque d'immunogénicité ainsi qu'une augmentation du coût du traitement. Lorsque cette option n'est pas efficace, ce qui arrive généralement si la durée du traitement perdure, il faut passer à un traitement alternatif et changer de molécule thérapeutique. Par exemple, le changement d'hormone sexuelle fut une solution pour le patient devenu résistant à son traitement à la gonadotropine chorionique (Thau *et al.* 1988). Aussi, changer de mAb anti-TNF α chez des patients traités pour l'AR a permis de restaurer efficacement une sensibilité au traitement chez des patients devenus résistants à un premier anti-TNF α (Atzeni *et al.* 2013).

I.2.3. Risques pour le patient

Les conséquences pour la santé du patient peuvent varier entre l'absence de symptômes, une inflammation localisée autour de la piqûre ou plus gravement, un choc anaphylactique en cas d'allergie à la protéine, et enfin une réponse auto-immune contre la protéine endogène. La réponse humorale peut induire la présence d'ADA avec une tendance le plus souvent accrue pour une protéine non humaine. Cependant, il existe des protéines thérapeutiques entièrement humaines qui ont provoqué une réponse humorale (Maillère *et al.* 2012). En effet, l'humanisation des séquences a été un système efficace pour baisser l'immunogénicité des PT, mais sans l'annuler totalement.

I.2.3.A. Allergies

L'allergie se caractérise par une réponse immunitaire disproportionnée face à une substance ne nécessitant normalement pas une réponse immunitaire forte voire pas de réponse du tout. L'allergie se manifeste le plus souvent par une inflammation en présence de ladite substance, la sensibilité et l'intensité de la réponse peuvent varier d'une inflammation localisée à une altération de plusieurs organes. Si le traitement n'a plus d'effet thérapeutique, il doit être arrêté avant que les réactions immunitaires ne deviennent néfastes voire dangereuses pour la santé du patient. Dans le cadre d'une allergie IgE-dépendante à un médicament, l'allergie se

développe en trois temps : (1) Première rencontre de cellules immunitaires avec la molécule médicamenteuse, en conditions inflammatoires suite à une injection par exemple, le système immunitaire du patient se sensibilise à la molécule. (2) Mise en place et en mémoire de cellules immunitaires spécifiques de la molécule avec production d'ADA, cette phase de latence dure une dizaine de jours. (3) Réponse immunitaire exacerbée dès l'administration de la molécule au patient. Cette dernière phase peut faire intervenir différentes cellules et messagers immunitaires et peut être divisée en 5 types de réactions majeures, présentés dans le **Tableau 6**. Ce tableau est adapté des données de l'article de Descotes et présente les principales réponses allergiques à un médicament, toutes classes moléculaires confondues (**Descotes & Choquet-Kastylevsky 2001**). Les types de réaction peuvent s'entrecroiser, un choc anaphylactique peut par exemple être causé de manière dépendante ou indépendante des IgE. La plupart des réactions allergiques aux COS dépendent des IgE. Compte tenu de la nature des PT comparée à celle des COS, des réactions allergiques à une PT peuvent emprunter d'autres voies non-présentées ci-dessous.

Réaction	Acteurs	Mécanismes	Symptômes	Délai
Hypersensibilité immédiate / Anaphylaxie (Type I)	IgE Mastocytes Basophiles	Sécrétion de molécules vaso-actives (histamine, thromboxanes, <i>etc.</i>)	Inflammations Choc anaphylactique	Minutes à heures
Pseudo-allergie (Type II)	IgG Complément NK	Activation non spécifique des NK et du complément	Inflammations Choc anaphylactique	Minutes à heures
Cytotoxicité médiée par anticorps (Type III)	IgM et IgG Neutrophiles	Lyse cellulaire Activation du complément	Fièvre et infections Hémorragies dermiques	Heures à jours
Médiation par complexe immun	IgM Complexes immuns	Accumulation tissulaire de cellules immunitaires	Inflammation locale Lésions tissulaires	9 à 11 jours
Hypersensibilité retardée (Type IV)	LT CPA	Sécrétion cytokinique	Dermatite	2 à 14 jours

Tableau 6 : Principaux types de réactions allergiques à un médicament.

CPA, Cellules présentatrices d'antigènes, **Ig**, Immunoglobulines, **LT**, Lymphocytes T, **NK**, Cellules tueuses naturelles.

L'allergie à une PT implique généralement des Ac de classe IgE (*Cf. Tableau 6*, Hypersensibilité immédiate/Anaphylaxie). Ces IgE sont formés à partir de LB activés par des lymphocytes CD4⁺ Th2, ce sont les cytokines que ces derniers sécrètent qui orientent la commutation de classe IgM à IgE dans une cellule sécrétrice d'Ac. Ainsi, lorsqu'une IgE rencontre une PT pour laquelle elle présente une bonne affinité, elle active les récepteurs de forte affinité pour sa partie effectrice présents en surface de cellules mastocytes ou basophiles, en latence dans les tissus. Ces derniers génèrent alors une réponse immunitaire disproportionnée, appelée réaction à l'injection, qui se déroule en 3 phases : (1) Réaction aigüe, la sécrétion de molécules vasoactives (histamine, prostaglandines, leucotriènes, *etc.*) dilate les artérioles, augmente la perméabilité veineuse et cause des rougeurs cutanées. Ces molécules

sont relâchées dans le sang périphérique et ont un effet global, c'est le choc anaphylactique. Ces symptômes peuvent s'arrêter à une inflammation locale, ou mener à des dommages importants dans des organes voire la mort du patient. (2) Réaction tardive, survient 10 à 12 heures après le choc anaphylactique par le recrutement de lymphocytes CD4⁺ Th2. Ils sécrètent des cytokines proinflammatoires qui provoquent entre autres des rougeurs et gonflements au niveau local. (3) Inflammation chronique, caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires proinflammatoires dans les tissus touchés pouvant être activées rapidement à chaque nouvelle rencontre avec l'Ag (Bochner & Lichtenstein 1991).

En 2011, un patient atteint de diabète de type II (résistance à l'insuline) fait un choc anaphylactique suite à l'injection d'insuline recombinante, moins d'un an après le début de l'insulinothérapie. Des IgE spécifiques de l'insuline recombinante sont détectées dans le sérum du patient. Un protocole de désensibilisation des basophiles à l'insuline a rétabli une tolérance envers d'autres insulines de remplacement (Luyasu *et al.* 2011). En 2012, un grand nombre de patients traités à l'Infliximab, un mAb chimérique anti-TNF α , développent des ADA. Certains d'entre eux présentent en plus une réaction d'hypersensibilité (ou réaction à l'injection) dès la première injection, des IgE spécifiques sont identifiés comme responsables dans 30% des cas (Matucci *et al.* 2013). Dans les deux études, la positivité de tests cutanés est corrélée à l'implication d'IgE spécifiques des PT. Ces données apportent ainsi un test prédictif et inoffensif sur la réactivité dépendante des IgE des patients aux PT, évitant ainsi de sévères complications pour la santé du patient.

Aussi, des réactions à l'injection peuvent avoir lieu dès la première administration de la PT et ne pas être de nature allergique, elles sont dites IgE-indépendantes ou réactions pseudo-anaphylactiques. Elles présentent les mêmes premiers symptômes que les réactions d'hypersensibilité allergique et leurs conséquences peuvent aussi varier d'une inflammation locale sans dommages à la mise en danger de la vie du patient. Causées spécifiquement par les mAbs, et plus particulièrement par ceux réagissant avec les cellules du sang périphérique, ces réactions se manifestent généralement par un CRS. Le CRS est en effet initié par la cytotoxicité des cellules T, NK et granulocytes ou l'activation du système du complément par la partie effectrice des mAbs (domaine Fc). Plus précisément, lorsqu'un mAb se fixe à son Ag exprimé par une cellule immunitaire circulant dans le sang, des chimiokines attirant d'autres cellules immunitaires effectrices et des molécules du complément sont sécrétées. Les cellules recrutées possédant une activité cytotoxique tuent la cellule cible qui relâche des cytokines proinflammatoires dans la circulation sanguine, les cellules recrutées relâchent à leur tour ce type de cytokines. Cette réaction peut s'amplifier, allant d'un relargage cytokinique contenu à un CRS généralisé. Ce sont ces réactions qui ont été observées lors des essais cliniques du mAb murin anti-CD3 OKT3 et du mAb humanisé anti-CD28 TGN1412, et dont les conséquences ont été très graves (Chatenoud *et al.* 1986, 1988; Suntharalingam *et al.* 2006). En oncologie, ces réactions sont particulièrement courantes lors de l'utilisation de mAbs dirigées contre des cellules tumorales circulant dans le sang. En effet, les mAbs chimériques tels que le Rituximab et le Cetuximab provoquent des réactions IgE-indépendantes dans 14 à 77% et 15 à 20% des cas, respectivement. Ces réactions sont liées à l'immunotoxicité des Ac et ne dépendent directement pas du taux d'humanisation des Ac. En effet, elles concernent aussi des mAbs humanisés et humains tels que le Trastuzumab et l'Ofatumumab dans 40% des cas. Fort

heureusement, la grande majorité de ces réactions n'ont pas de conséquences graves pour la santé des patients. On constate que le taux d'incidence varie selon la pathologie et même selon le type de cancer pour un même mAb. Enfin, ces réactions peuvent être contrôlées par l'administration d'anti-fièvre, de bloqueurs histaminiques, et l'arrêt temporaire avec une reprise plus douce et espacée du traitement (Vogel 2010).

I.2.3.B. Anticorps préexistants

Les ADA préexistants sont définis comme des Ac endogènes spécifiques d'une séquence couvrant un épitope présent sur un biomédicament, ils sont présents chez des sujets avant le début d'un traitement. Ils peuvent faire partie du pool naturel d'Ac présents chez un sujet, ou avoir été induit en réponse à un Ag environnemental ou même à une molécule thérapeutique préalablement administrée et présentant certaines homologues avec le biomédicament. Les causes de la présence d'ADA préexistants sont nombreuses, les principales étant l'exposition à des Ag présentant des homologues de séquence ou de conformation avec une PT. Comme les autres ADA, les Ac préexistants constituent un risque potentiel pour le traitement et la santé du patient puisqu'ils peuvent reconnaître une PT dès la première administration et déclencher une réponse immunitaire contre celle-ci, leur existence justifie donc le dosage d'ADA avant le début d'un traitement avec une PT. Aussi, ils peuvent n'induire aucun symptôme, ou bien influencer la PK, être neutralisants, et sont le plus souvent des Ac de classes communes aux ADA : IgG et IgE (Gorovits *et al.* 2016). De tels ADA ont déclenché une réaction d'hypersensibilité chez des patients traités pour la première fois avec un mAb chimérique anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), le Cetuximab. Ce mAb chimérique utilisé dans le traitement de certains cancers comporte un oligosaccharide sur sa partie hypervariable murine, dont le motif Galactose- α -1,3-Galactose est commun aux protéines de mammifères non primates. Ce motif est reconnu par des Ac de classe G chez l'humain et ne causent généralement pas de réactions graves contre le Cetuximab, mais une réaction croisée médiée par des Ac de classe IgE a induit un choc anaphylactique chez de nombreux patients traités dès la première injection dans une région restreinte des Etats-Unis. De tels Ac sont rarement observés dans le reste du monde, leur forte présence dans le sang a été expliquée par des Ag environnementaux (pathogènes et parasites endémiques de cette région) auxquels étaient exposés les patients (Chung *et al.* 2008). Cet épisode et les ADA préexistants observés contre d'autres biomédicaments (protéines de fusion, de remplacement, thérapie génique, *etc.*) démontrent donc la nécessité de doser les Ac réactifs à une PT avant le début du traitement, d'autant plus lorsque cette dernière contient des séquences non humaines ou est synthétisé par des cellules non humaines.

I.2.3.C. Auto-immunité

Enfin, l'immunogénicité d'une PT peut induire des symptômes autoimmuns lorsque les ADA reconnaissent une protéine endogène. L'événement le plus marquant d'auto-immunité déclenchée par une PT est l'EPO thérapeutique administrée à des patients atteints d'anémie comme précédemment relaté (*Cf. I.2.1.B. Historique des cas d'immunogénicité des PT*) (Casadevall *et al.* 2002). On peut citer deux autres exemples d'auto-immunité induite par des PT : (1) Trois patients traités avec des facteurs de croissance recombinants humains pour une

thrombopénie ont développé une thrombopénie sévère, caractérisée par une réduction importante de plaquettes. Cette auto-immunité était médiée par des Ac de type G neutralisant l'activité thérapeutique des facteurs recombinants et reconnaissant la thrombopoïétine (TPO) endogène, les patients présentaient alors une diminution du nombre de mégacaryocytes (cellules produisant les plaquettes) dans la moelle osseuse. Pour deux des 3 patients, la TPO circulante était inactive et principalement sous forme de complexes immuns (Li *et al.* 2001).

(2) Dans le cadre de traitement de maladies inflammatoires telles que l'AR, la maladie de Crohn ou du psoriasis, l'administration de certains mAbs anti-TNF α (Infliximab, Etanercept et Adalimumab) induisait une baisse considérable de facteurs autoimmuns (cytokines proinflammatoires, *etc.*), ce qui avait un effet positif sur la santé des patients. Cependant, le traitement induisait aussi des Ac reconnaissant des molécules du soi telles que l'ADN double brin, les phospholipides ou des constituants du noyau cellulaire, touchant de 5 à 91% des patients selon le mAb utilisé et la pathologie. Fort heureusement, ces réactions autoimmunes pouvaient être résolues par un traitement additionnel de glucocorticoïdes et immunosuppresseurs. Ces traitements sont depuis souvent utilisés en parallèle dans traitements anti-TNF α afin de prévenir ces réactions autoimmunes (Atzeni *et al.* 2005, Pirowska *et al.* 2015).

Ainsi, les conséquences de l'immunogénicité touchant plusieurs biomédicaments ont failli mettre en péril l'avenir des PT, tant les répercussions sur la santé des patients peuvent être lourdes et les exemples nombreux. En effet, les modèles animaux auparavant utilisés en phases précliniques pour les molécules peu immunogènes comme les acides nucléiques par exemple étaient efficaces et permettaient de prédire l'immunogénicité de ces molécules. Mais avec le développement des PT et leur humanisation, ces modèles sont devenus incomplets voire inefficaces puisqu'aucun animal non modifié ne permet de mimer parfaitement la réaction immunitaire adaptative humaine face à une protéine, aussi humaine soit-elle.

I.3. Mécanismes cellulaires de l'immunogénicité

Lors d'une réponse immunitaire qui induit une production d'Ac contre un antigène T-dépendant, trois types cellulaires sont impliqués, il s'agit des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), des lymphocytes T CD4⁺ (LTh) et des LB. Les DC sont les CPA les plus courantes et sont dites professionnelles, car elles peuvent présenter à la fois des Ag endogènes aux lymphocytes T CD8⁺ (LTc), des Ag exogènes aux LTh et exprimer des molécules de costimulation qui permettent l'amplification de la réponse des cellules T. Les LB sont les cellules productrices d'Ac, chaque LB exprime à sa surface et/ou sécrète une seule sorte d'Ac qui leur permet de fixer de manière sélective un Ag. La séquence de l'Ac résulte de la recombinaison de ses propres gènes au stade précurseur de LB (Brack *et al.* 1978, Weigert *et al.* 1978). La grande variété des séquences d'Ac est donc due au nombre important de gènes codant pour les Ac ainsi que de leurs réarrangements et mutations. Cette variabilité a pour effet de couvrir un vaste répertoire d'Ag pouvant être reconnus par le système immunitaire. Enfin, les LTh sont les cellules qui initient majoritairement la production d'Ac. Chaque LTh peut reconnaître des séquences antigéniques, nommées épitopes T, qui peuvent être présentes sur plusieurs Ag et inversement, un Ag peut présenter plusieurs fois le même épitope. En effet, pour initier la réponse humorale, le récepteur T des LTh doit reconnaître spécifiquement des

peptides présentés par les molécules HLA de classe II et recevoir un signal de costimulation pour être activé. C'est donc le réarrangement des gènes de récepteur des cellules T (TCR) qui donne un TCR bien particulier et propre à chaque LTh. Une fois activés, les LTh sécrètent des cytokines ainsi que des molécules de costimulation, ce qui enclenche la sécrétion d'Ac spécifiques de l'Ag par les LB.

I.3.1. Les Lymphocytes B et les anticorps

I.3.1.A. Les anticorps

- Structure générale

Les Ac, ou immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines (4 à 18% de polyoses) d'environ 150 kDa de poids moléculaire et ont pour rôle principal de se lier et neutraliser de manière spécifique un Ag libre ou exprimé par une cellule. Les Ac sont des protéines sériques, font partie de la superfamille des immunoglobulines et partagent avec d'autres molécules leur structure et leur capacité de reconnaissance ou d'activation, comme le TCR, les molécules HLA de classe I-II, le CD4 et le CD8 (Larhammar *et al.* 1982). Ils peuvent être exprimés à la surface membranaire des LB, formant le récepteur des cellules B (BCR) avec le co-récepteur CD79 α - β , ou bien être sécrétés par des LB matures hautement différenciés appelés plasmocytes. Sous leur forme membranaire, ils permettent aux LB leur survie et leur sélection, un LB va cependant exprimer ou sécréter un unique Ac, selon la théorie de sélection clonale de Sir MacFarlane (Nature 1958). Sous leur forme soluble, ils sont le support de l'immunité à médiation humorale, qui vient compléter l'immunité cellulaire médiée par des cellules lymphocytaires. Plus généralement, le rôle des Ac tient une place très importante dans la réponse adaptative, de par sa spécificité, son amplitude et son territoire d'action qui couvre l'ensemble de l'organisme via les réseaux lymphatique et sanguin.

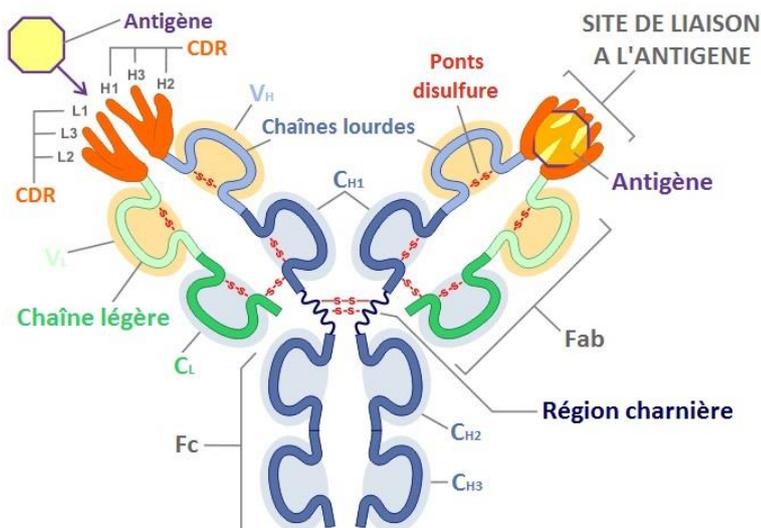


Figure 1 : Structure générale d'un anticorps humain de type IgG.

CDR, Région hypervariable, **CH**, Domaine constant de la chaîne lourde, **CL**, Domaine constant de la chaîne légère, **Fab**, Fragment de reconnaissance de l'antigène, **Fc**, Fragment cristallisable, **VH**, Domaine variable de la chaîne lourde, **VL**, Domaine variable de la chaîne légère.

La structure symétrique générale des Ac est complexe. La détermination de leur structure chimique a valu le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine de 1972 aux deux chercheurs Edelman et Porter (Edelman 1970, Porter 1973). L'Ac comporte une partie variable composée de deux "branches" symétriques et une partie constante. La partie variable

est propre à chaque Ac et tient une fonction de reconnaissance/liaison à un antigène soluble. La partie invariable est commune à chaque classe d'Ac et a quatre fonctions : (1) activation du complément, (2) liaison aux récepteurs du Fc pour faciliter la phagocytose ou la lyse cellulaire par des cellules immunitaires, (3) catabolisme des Ac, (4) passage placentaire (pour les Ig de classe G uniquement). Le Fc permet donc d'induire une réponse adaptée à la fois à l'Ag et à la classe d'Ac, ainsi que de réguler ou transmettre l'immunité humorale. La **Figure 1** ci-dessous représente la structure générale d'un anticorps, elle est traduite depuis celle du livre de Murphy (**Murphy et al. 2014**).

La symétrie des Ac est axée selon 2 paires de chaînes polypeptidiques : une paire de chaînes lourdes identiques *Heavy Chain* (HC) de 50 kDa chacune (soit 450 résidus) et une paire de chaînes légères identiques *Light Chain* (LC) de 25 kDa (soit 210 résidus) (**Edelman 1962, Porter & Press 1962**).

- Classes ou isotypes

Les Ac sont rangés en 5 classes (ou isotypes) chez la plupart des mammifères selon le type de chaînes lourdes qu'ils détiennent : IgA (chaînes lourdes α), IgD (chaînes lourdes δ), IgE (chaînes lourdes ϵ), IgG (chaînes lourdes γ) et IgM (chaînes lourdes μ). Chaque classe comporte une composition, c'est-à-dire une séquence en acides aminés et en polyoses, longueur et masse, et une activité de reconnaissance et effectrice propres (**Spiegelberg 1989**). Chez l'Homme, il existe des sous-classes IgA1-2 et IgG1-2-3-4 (**Schur 1987**).

Les IgM peuvent être sécrétées sous forme libre à 80% dans la circulation sanguine, liées covalentement cinq par cinq par une pièce *Joining* (J) insérée entre chaque Fc, ou bien exprimées en surface des LB. On retrouve les IgM dans les systèmes sanguin et lymphatique, elles ne représentent que 5 à 10% des Ac sériques. Elles ont un rôle important dans la réponse primaire puisque les LB activés vont produire des IgM en premier lieu, ces cellules et leurs précurseurs ne deviennent cependant pas des cellules mémoires, de sorte à ce que les rencontres suivantes avec l'Ag induisent des Ac plus affins que les IgM, comme les IgG par exemple. Les IgM ont en effet une affinité faible mais une avidité forte : elles se lient peu spécifiquement mais à beaucoup d'Ag, elles peuvent agglutiner des bactéries pour faciliter leur lyse. A titre de comparaison, les IgM ont un pouvoir agglutinant et une activité bactéricide 20 et 1000 fois supérieure aux IgG, respectivement. De plus, elles peuvent activer le complément bien plus facilement que les IgG. La durée de la réponse des IgM étant très courte, un taux élevé d'IgM spécifiques dans le sang peut révéler une infection en cours (**Gould & Ramadani 2015**). De plus, ce sont les premières Ig produites par le fœtus et les seules à être produites plus tard en réponse à des Ag sans la coopération des LTh, appelés Ag thymo-indépendants (ATI).

Les IgG ont une très faible proportion de chaînes oligosaccharidiques, elles représentent 75% des Ac sériques et on les retrouve uniformément dans l'organisme, dont la moitié dans la circulation sanguine. La sous-classe détermine en particulier le type de danger contre lequel elles induisent une réponse. Par exemple, les IgG1 sont les premiers synthétisés contre les antigènes protéiques et lors de la réponse secondaire plus généralement, les IgG2 agissent contre les polysaccharides capsulaires bactériens, les IgG3 ont plutôt un rôle proinflammatoire et enfin les IgG4 contre les virus en bloquant leur fixation aux cellules ou en désorganisant la structure de la particule virale (**Vidarsson, Dekkers & Rispen 2014**). Les sous-classes sont

distribuées selon les proportions suivantes : 66% d'IgG1, 23% d'IgG2, 7% d'IgG3 et 4% d'IgG4. Les IgG tiennent aussi un rôle très important dans l'immunité du nouveau-né puisque ce sont les seules Ig à pouvoir traverser la barrière placentaire. Les IgG maternelles sont activement sélectionnées au niveau du placenta par les récepteurs néonataux du Fc, ce transfert permet au nourrisson de naître avec le même répertoire d'IgG que sa mère. Les IgG1-3-2 sont parmi les seules Ig, dans l'ordre de capacité décroissante, à pouvoir activer la voie classique du complément après liaison à un Ag, cette activation est menée par le C_{H2}. Aussi, les granulocytes neutrophiles et les macrophages peuvent fixer et phagocyter les microorganismes recouverts d'IgG, leurs récepteurs du Fc, nommés FcγRI (ou CD64), FcγRII (ou CD32) et FcγRIII (ou CD16), se liant aux C_{H2-3} des IgG, et des cellules NK peuvent tuer des cellules recouvertes d'IgG sans les phagocyter par le biais du mécanisme *Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity* (ADCC) (Isturiz, Maria & Manni 1975).

Les IgA peuvent être sécrétées dans le sérum et mais le sont principalement dans les sécrétions des muqueuses (intestin, yeux, colostrum, voies respiratoires et urogénitales), majoritairement liées deux par deux par la pièce J. On retrouve principalement les IgA1 dans le sérum, représentant 15% des Ac sériques, tandis que l'on retrouve surtout les IgA2 dans les sécrétions. D'ailleurs, les IgA représentent plus de la moitié de la synthèse quotidienne totale des Ig chez l'Homme, mais elles sont sécrétées à près de 60%. Les IgA2 sont synthétisées par des plasmocytes présents dans les muqueuses, elles sont internalisées dans les cellules épithéliales par transcytose, dans lesquelles elles sont entourées par la pièce sécrétoire, une chaîne polypeptidique produite par les cellules épithéliales et qui les protège de la protéolyse et leur permet d'être excrétées dans les sécrétions à la surface des muqueuses. Les IgA2 ne représentent que 10% des IgA mais représentent la majorité des Ac présents dans ces sécrétions et assurent ainsi l'immunité des muqueuses en se liant directement aux microorganismes et en les empêchant de se fixer aux muqueuses. De plus, les IgA2 sont plus résistantes aux protéases que les IgA1 notamment grâce à la présence d'une région charnière. En formant un complexe immun Ig-Ag ou en s'agrégeant à plusieurs autour d'un Ag, les IgA peuvent activer la voie alterne du complément mais pas la voie classique, ce qui facilite l'opsonisation des bactéries et ainsi leur phagocytose (Seah *et al.* 1973). Le complément est une chaîne réactionnelle pouvant être activé par plusieurs voies et qui implique une trentaine de protéines sériques. Le complément mène à une réponse innée aux infections en initiant un contexte inflammatoire, l'élimination des complexes immuns ou une lyse cellulaire. Il suffit de 4 à 6 Ig sur une cellule pour que le complément réagisse. Les IgA peuvent aussi activer des cellules telles que les neutrophiles, monocytes, macrophages, et les éosinophiles via, entre autres, le récepteur du Fc présent sur ces dernières, nommé FcαRI (ou CD89) (Monteiro & van de Winkel 2003).

Les IgD sont sécrétées et représentées en très faible proportion dans le sérum, même si elles sont en plus grande proportion dans le sang du cordon ombilical (Cederqvist, Ewool, & Litwin 1977). Les IgD solubles se retrouvent principalement dans les voies aériennes, leur fonction est très mal connue mais semble agir dans l'homéostasie et contre la colonisation de pathogènes en activant des basophiles et mastocytes. La plupart des LB expriment cependant en leur surface des IgD et des IgM. Une récente étude a montré que les IgD étaient plus largement exprimées dans les sinus, et encore plus chez des patients atteints de rhinosinusite chronique, leur activité étant davantage ciblée sur les tissus que sur les sécrétions (Sokoya *et*

al. 2017).

Les IgE représentent la plus faible proportion de classe d'Ac sériques, à hauteur de 0,004% et sont les derniers isotypes d'Ac à avoir été découverts (Ishizaka & Ishizaka 1966) et jouent un rôle dans la réponse contre les parasites. Les IgE sont principalement sécrétées par des plasmocytes localisés dans les amygdales, les ganglions lymphatiques et les muqueuses des tracts respiratoires et gastro-intestinaux. Les IgE sont engagées principalement dans les allergies, elles étaient d'ailleurs autrefois appelées Réagine de par leur capacité à souvent induire une réponse immunitaire disproportionnée. Les IgE spécifiques d'allergènes sont d'ailleurs en taux plus élevés chez des sujets allergiques, elles se fixent aux allergènes et activent les récepteurs du Fc, nommés respectivement FcεRI (présent sur les basophiles et les mastocytes) et FcεRII (ou CD23), pour que les cellules porteuses du récepteur libèrent, entre autres, de l'histamine, un médiateur immunitaire important dans les réponses inflammatoires (Ishizaka & Ishizaka 1971). Cependant, leur rôle premier réside dans la lutte contre les parasites, la réaction allergique n'étant pas une fin en soi vis-à-vis de l'évolution. Il existe en effet une relation entre le taux d'IgE sérique chez l'Homme et la quantité de parasites dans son environnement, les IgE induisant une réponse immunitaire très forte permettraient une lutte plus efficace (Houba & Rowe 1973). Les IgE peuvent aussi parfois se lier aux récepteurs spécifiques de leur Fc en surface des LB, LT, macrophages et éosinophiles.

- Fixation à l'antigène

Chaque chaîne est composée de plusieurs domaines de 110 résidus et de forte homologie, le tout formant un hétérodimère assemblé par des ponts disulfures. Chacun de ces domaines détient un rôle précis et est constitué de 2 feuillets β-plissés composés eux-mêmes de 7 à 9 brins β antiparallèles reliés par des boucles d'acides aminés. Il y a 3 à 4 domaines constants pour les chaînes lourdes (C_{H1-2-3} pour les IgA-D-G et jusqu'à C_{H4} pour les IgM-E), un domaine constant C_L pour les chaînes légères, et un domaine variable V_H ou V_L par chaîne. Chaque V_H ou V_L contient 3 régions hypervariables *Complementary Determinant Region* (CDR) de 5 à 10 résidus, contenus au niveau des boucles d'acides aminés et entourés de régions *Framework Regions* (FR1-2-3-4) relativement constantes, dites charpentes. D'ailleurs, le site de fixation de l'Ag, appelé paratope, est constitué du repliement et de l'association des 6 CDR d'un V_L et d'un V_H adjacents situés aux extrémités N-terminales de la partie variable (Harpaz & Chothia 1994, Kabat & Wu 1991). Il y a donc 2 paratopes identiques sur chaque Ac, et l'extrémité C-terminale de la partie constante est portée par 2 domaines C_H appariés, à savoir un par chaîne lourde. Chaque paratope est spécifique d'un déterminant antigénique précis appelé épitope B. L'interaction entre eux est due à des liaisons faibles : hydrogène, électrostatiques, de Van der Waals et hydrophobes. Ces liaisons ne sont pas covalentes mais leur grand nombre suffit à exercer une grande force attractive appelée affinité de l'Ac. Les domaines C_{H1} et C_{H2} sont séparés par une région charnière contenant des cystéines et liant par des ponts disulfure les 2 chaînes lourdes.

- Région charnière

La région charnière a pour rôle de donner à l'Ac une flexibilité de 60° à 180° en fonction de sa longueur afin de faciliter la liaison à l'Ag, les IgG1-3 ont par exemple une région charnière

de 60 résidus et sont plus flexibles que les autres Ig dont elle est composée de 15 résidus en moyenne. Aussi, les IgM, les IgE et les IgA2 n'ont pas de région charnière, la liaison des deux chaînes lourdes étant assurée par le C_{H2} (Paul *et al.* 1971). Ce dernier porte aussi les chaînes polyoses tout isotype confondu, ces glycosylations peuvent être portées ailleurs mais uniquement par les domaines constants de la chaîne lourde (Arnold *et al.* 2007) et jouent un rôle dans la fixation sur les cellules et l'assemblage et la stabilité des Ac. Le C_{H2} est aussi responsable de la régulation du catabolisme des Ac.

Les séquences en acides aminés des C_H sont propres à chaque espèce et isotype, c'est ce qui fait qu'un Ac humain ne pourra interagir qu'avec des cellules humaines alors qu'ils pourront être reconnus par des cellules animales comme des Ag et déclencher une réponse immunitaire. Les Ac induits chez l'animal contre une Ig humaine seront d'ailleurs appelés des anti-isotypes puisqu'ils reconnaîtront le plus souvent les parties constantes de la chaîne lourde. Les chaînes légères sont divisées en 2 types (κ ou λ), elles peuvent s'assembler avec n'importe quelle classe de chaîne lourde et leur ratio kappa/lambda au sein des Ac sécrétés varie selon l'espèce de sorte à augmenter les combinaisons et ainsi la diversité des Ig (Woloschak & Krco 1987). Pour l'Homme, il est par exemple de 2/1, et la chaîne légère λ contient 4 sous-classes. Si l'on découpe un Ac avec une protéase comme la papaïne, on obtient 2 types de fragments : 2 Fab correspondants aux bras du Y, composés des V_H-C_{H1} associés aux V_L-C_L et un Fc correspondant au pied du Y, composé des C_{H2-3} voire C_{H4-5} des 2 chaînes lourdes. Cette appellation date de la découverte de leur structure : le Fc se cristallise (*crystallizable fragment*, devenu fragment constant) tandis que le Fab garde les propriétés de reconnaissance de l'Ac (*antigen-binding fragment*).

- Isotype, allotype et idiotype

On peut caractériser les Ac selon 3 niveaux : isotypique, allotypique et idiotypique. L'isotype dépend, comme nous l'avons vu précédemment, du type de chaîne lourde dont dispose l'Ac, mais il s'applique aussi aux chaînes légères. Il y a donc un isotype pour la chaîne κ et un pour la chaîne λ , et un Ac donné possède une certaine combinaison de déterminants isotypiques. L'allotype correspond aux produits alléliques formés lors de la synthèse d'un Ac, il y en a par exemple une vingtaine rien que pour la classe des IgG. En effet, il peut exister de petites différences de séquences entre les chaînes lourdes et légères au sein d'un même profil isotypique en passant d'un individu à un autre. Ces différences peuvent être portées par un seul résidu jusqu'à quelques-uns pour un isotype de chaîne pourtant identique, un Ac donné possède donc un allotype unique, spécifique à chaque individu. Puis, l'idiotype correspond à la région hypervariable qui se lie à l'Ag, il y a donc autant d'idiotypes qu'il y a de plasmocytes différents au sein d'un même individu (Menegozzo, Ruffilli & Sansone 1973, Ruffilli & Menegozzo 1975). Ces 3 déterminants représentent donc 3 échelles différentes pour caractériser précisément un Ac : espèce, individu, cellule.

- Structure génétique

L'étude des anticorps et leur rôle chez l'Homme remonte au début du 20^{ème} siècle, et les connaissances précises sur leur génétique date des années 1970. Avant cette période, on pensait que l'humain possédait un gène pour chaque Ac, mais il en est tout autre (Hood, Campbell &

Elgin 1975). En effet, les chaînes lourdes et légères sont synthétisées à partir de familles de gènes indépendants répartis en segments pouvant être recombinaisonés et dont les produits subissent des transformations (**Tonegawa 1983**). Chez l'Homme, la famille de gènes codant pour les chaînes lourdes se situe sur le chromosome 14 (position 14q32.33), celle des gènes codant pour la chaîne légère κ sur le chromosome 2 (position 2p11) et celle des gènes codant pour la chaîne légère λ sur le chromosome 22 (position 22q11) (**Nishana & Raghavan 2012**). Bien que la moitié des séquences en acides aminés des chaînes légères et les trois quarts des chaînes lourdes soient des régions constantes, l'immense diversité des Ac obtenus reflète la complexité de l'organisation génétique qui en est à l'origine. En effet, face à une diversité quasi-infinie d'Ag présents dans l'environnement, le système immunitaire a su s'adapter et former une réponse spécifique et rapide à chaque Ag à travers la synthèse des Ac. La **Figure 2** ci-dessous résume les grandes étapes de l'expression génétique menant à la synthèse des Ac, elle est adaptée du livre de Murphy (**Murphy et al. 2014**).

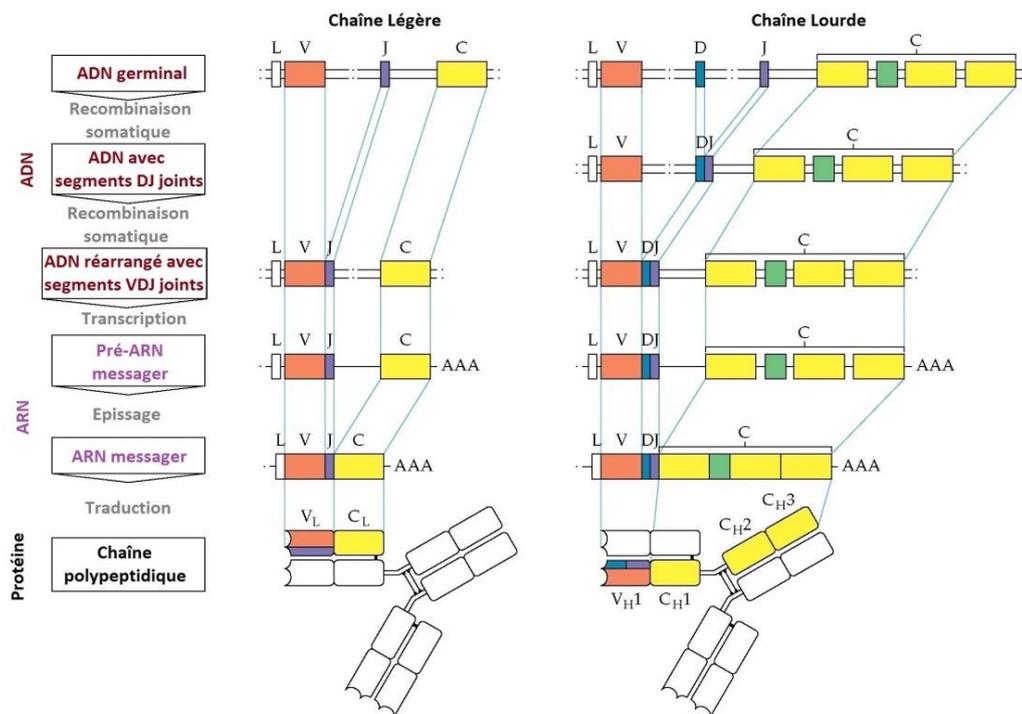


Figure 2 : Organisation génétique et synthèse des anticorps chez l'Homme.

AAA, Queue poly-Adénosine, ADN, Acide désoxyribonucléique, ARN, Acide ribonucléique, C, Segment de gène codant pour le(s) domaine(s) constant(s), C_H, Domaine constant de la chaîne lourde, C_L, Domaine constant de la chaîne légère, D, Segment de gène codant pour la séquence de diversité,

DJ, Assemblage des segments de gènes codant pour les séquences de diversité et de jonction, J, Segment de gène codant pour la séquence de jonction, L, Segment de gène codant pour la séquence de peptide guide, V, Segment de gène codant pour la séquence de variabilité, V_H, Domaine variable de la chaîne lourde, V_L, Domaine variable de la chaîne légère.

Le nombre de gènes au sein d'un même locus et d'un même type de gène (V, D, J ou C) peut varier en fonction de l'haplotype, et les gènes non fonctionnels représentent une part non négligeable des gènes comptés. Les familles de gènes des Ig contiennent de nombreux segments de gènes codant pour les régions variables et autant segments de gènes pour les régions

constantes qu'il y a d'isotypes et sous-isotypes d'Ac (**Tonegawa 1983**). Le nombre de gènes au sein d'une même famille permet déjà une certaine diversité :

- 76 V, 5 J et 1 C pour la chaîne légère κ ,
- 73-74 V, 7-11 J et 7-11 C pour la chaîne légère λ ,
- 123-129 V, 27 D, 9 J et 11 C pour les chaînes lourdes (**Nishana & Raghavan 2012**).

- Recombinaisons, épissage et traduction

Pour que le gène codant pour la région variable de la chaîne légère soit complet, une première étape va consister à rapprocher physiquement certains segments de gènes V et J en supprimant les séquences intermédiaires (**Brack et al. 1978, Sakano et al. 1979, Weigert et al. 1978**). Les segments de gènes V les plus proches des segments de gènes J ont tendance à être davantage sélectionnés que ceux plus éloignés, mais ces derniers peuvent toutefois être sélectionnés, laissant un grand nombre de combinaison V et J possibles (**VanDyk et al. 1996**). Pour les chaînes lourdes, une première recombinaison somatique a lieu pour rapprocher certains segments de gènes D et certains segments de gènes J, puis une seconde pour rapprocher la combinaison DJ et certains segments de gènes V (**Sakano et al. 1980**). La transcription des gènes réarrangés est largement favorisée car chaque segment de gène V contient un promoteur qui est rapproché d'une séquence amplificatrice située dans les introns entre les segments de gènes D et J pour les chaînes légères et J et C pour les chaînes lourdes. Le gène V sélectionné va coder la séquence correspondant aux 3 régions *framework* et 2 régions CDR, tandis que les gènes D et J codent pour la dernière région *framework* et la troisième région CDR.

Ces recombinaisons utilisent la capacité de l'ADN à être réparé pour joindre des extrémités non homologues, et ainsi créer une grande variété de gènes codant pour les régions variables selon les segments sélectionnés. Plus précisément, ces recombinaisons sont catalysées par les protéines *Recombination Activating Gene* (RAG-1-2) et rendues possibles par la présence de séquences uniques appelées séquences de signal de recombinaison (RSS) de part et d'autre de chaque segment V, D ou J (**Oettinger et al. n.d., Schatz, Oettinger, & Baltimore 1989**). Ces RSS sont constituées de deux séquences conservées de 7 et 9 paires de bases chacune, espacées l'une de l'autre par une 12 ou 23 paires de bases, ces dernières pouvant respectivement former un ou deux tours d'hélice d'ADN. Une recombinaison ne peut avoir lieu qu'entre une RSS présente sur un tour d'hélice et une RSS présente sur deux tours d'hélice. La répartition des espaceurs d'un ou deux tours de part et d'autres des segments de gènes varie selon la chaîne mais reste telle que la recombinaison ne peut rapprocher que des segments V, D ou J un à un, réduisant la possibilité d'avoir un type de segment double ou manquant. Cependant, il peut arriver qu'une erreur de recombinaison survienne et produise un gène variable anormal. Ce type d'erreur n'affecte pas la fonction effectrice de l'Ac formé mais directement sa spécificité, ce qui accroît les possibilités de séquences de la région variable. De plus, l'action de l'enzyme *Terminal deoxyribonucleotidyl Transferase* (TdT) peut introduire spontanément des nucléotides dans l'ADN aux extrémités 3' des jonctions des segments de gènes V, D et J, ce qui augmente encore la diversité de séquences de la région variable (**Desiderio et al. 1984**). De plus, chaque segment de gènes D contient 2 à 3 cadres ouverts de lecture, ce qui peut donner plusieurs versions par segment de gène D sélectionné.

Une fois ces recombinaisons somatiques effectuées, l'ADN ainsi réarrangé est transcrit en pré-ARN messager qui subit un épissage alternatif, toujours dans le noyau, afin de supprimer les introns. Mais pour les chaînes lourdes comme pour les légères, cet épissage alternatif permet surtout de combiner une unique région variable réarrangée à une région constante sélectionnée, ce qui augmente encore le nombre de combinaisons possibles. La sélection de la nature de la chaîne lourde entre une chaîne membranaire ou sécrétée intervient aussi durant l'épissage alternatif, puisque la région transmembranaire des chaînes lourdes est conservée dans le premier cas et excisée dans le second (**Danner & Leder 1985**). On peut noter que la région charnière est codée par un gène situé entre ceux codant pour les domaines C_{H2-3} au sein de la famille de gènes des chaînes lourdes, et l'on compte aussi un segment de gène C par domaine C_H selon l'isotype (**Sakano, Rogers et al. 1979**).

Puis, la traduction au niveau du cytoplasme forme une chaîne polypeptidique pourvue d'un peptide *leader* (L) en extrémité N-terminale. Le peptide L est excisé lors de l'élongation dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), il tient une fonction de guide pour la chaîne polypeptidique vers la voie normale de sécrétion de la cellule. Toujours dans le RE, les chaînes lourdes et légères sont appariées par des ponts disulfures, étape nécessitant certaines conditions de contrôle. En effet, chaque chaîne lourde doit être complète et être dimérisée avec une chaîne légère pour que leur repliement permette l'assemblage entre les deux chaînes lourdes (**Kaloff & Haas 1995**). Ces conditions sont, entre autres, régulées par la protéine *Immunoglobulin Binding Protein* (BiP) et suffisent à limiter les Ac malformés, ne pouvant se lier à un Ag ou n'ayant pas de fonction effectrice (**Reddy & Corley 1998**). Enfin, des modifications post-traductionnelles apportent les chaînes polyoses au niveau des domaines constants des chaînes lourdes (**Scharff & Laskov 1970**).

- Sélection de classe

Les réarrangements génétiques en faveur de l'expression d'une classe de chaîne lourde et d'un type de chaîne légère précises sont effectués durant la différenciation et la maturation du LB, et donnent lieu à un nombre de combinaisons possibles allant jusqu'à 10^{12} . Cependant, chaque LB contient un chromosome maternel et paternel portant chacun une version de chacune des familles de gènes des Ig, l'équilibre entre l'expression des gènes de l'un ou de l'autre est régi par un phénomène de sélection simple agissant sur les chromosomes porteurs des gènes codant pour les chaînes lourdes. Si les premiers réarrangements d'ADN sur un des deux chromosomes donnent une chaîne lourde correcte, le LB ne produira plus que ce type précis de chaînes lourdes. S'ils échouent, le chromosome provenant de l'autre parent est réarrangé et donne soit une chaîne lourde correcte, définissant les chaînes lourdes produites par la suite, soit une chaîne lourde invalide, menant à l'apoptose du LB. Le même processus de sélection est observé par la suite pour la synthèse des chaînes légères, d'abord sur les chromosomes portant les gènes codant pour la chaîne κ , puis ceux de la chaîne λ (**Marsh & Kendall 1996**). Cet ordre précis explique le fait que deux tiers des chaînes légères soient des chaînes κ chez les LB humains. Plus largement, ces processus de réarrangement et de sélection expliquent qu'un LB ne soit capable de produire qu'un Ac composé d'un seul isotype, d'un seul type de chaîne légère et une ayant une spécificité propre, et que l'ensemble des LB d'un individu puisse exprimer une diversité si grande d'Ac.

I.3.1.B. Les Lymphocytes B

- Ontogénie des Lymphocytes B

Les LB sont les cellules responsables de l'immunité humorale dont les effecteurs principaux sont les Ac sécrétés par les plasmocytes, les LB représentent jusqu'à 15% des lymphocytes de la circulation sanguine. Ils sont issus de cellules souches hématopoïétiques (CSH), au même titre que les autres cellules du sang, qui ont toutes en commun le récepteur CD45R. Plus précisément, le développement des LB se fait au niveau du parenchyme de la moelle osseuse et ils partagent un progéniteur commun avec les LT et les lymphocytes *natural killer* (NK), appelé progéniteur lymphocyte commun (CLP). Les CSH se différencient en CLP en perdant leurs propriétés de cellules souches au contact des cellules stromales de la moelle osseuse, sécrétrices de l'interleukine IL-3.

Une fraction des CLP migre ensuite vers le thymus pour donner des LT après différenciation tandis que le reste continue à se différencier en LB dans la moelle osseuse par l'acquisition du BCR. Le BCR est la caractéristique même des LB car il permet la reconnaissance et la réponse B à l'Ag. Le BCR permet aux cellules précoces B, une fois exprimé en surface sous sa forme complète, de quitter la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires via la circulation sanguine. Ces cellules précoces vont passer par plusieurs stades avant d'être considérées comme des LB matures, ces stades se déroulent dans la moelle osseuse, indépendamment de l'Ag et constituent la première phase du développement des LB appelée la lymphopoïèse. Ainsi, la moelle osseuse regorge de potentielles cellules B de tous stades (Osmond 1986) et durant cette phase, 75% des cellules B meurent par apoptose. C'est le cas pour celles qui subissent un réarrangement non productif des gènes d'Ig, ainsi que celles présentant une Ig reconnaissant un Ag du soi, c'est-à-dire des cellules autoréactives. Ces sélections, respectivement positive et négative, sont régulées par les cellules stromales qui conditionnent l'environnement cytokinique, et la présentation des Ag du soi est effectuée par des cellules dendritiques. La **Figure 3** résume les différentes étapes de l'ontogénèse des LB, elle est adaptée de celle du livre de Murphy (Murphy *et al.* 2014).

Après avoir reçu les signaux de différenciation par les cellules stromales, dont les interleukines IL-3-7, les CLP vont subir des mutations somatiques aléatoires au niveau des gènes codant pour les Ig afin de synthétiser puis exprimer une IgM membranaire, puis un BCR complet. L'isotype M est favorisé par rapport aux autres car le segment de gène C correspondant à une chaîne lourde μ est le plus proche des segments V, D et J. Le premier stade de cellule pro-B est atteint dès l'apparition des marqueurs de surface des cellules B, mais les réarrangements des gènes de leurs chaînes lourdes ne sont pas complets. A ce stade, elles présentent aussi le CD10, marqueur des cellules B immatures. Lorsque le réarrangement des gènes de chaînes lourdes est complet mais pas celui des gènes de chaînes légères, les cellules atteignent le stade de pré-B. Le réarrangement des gènes V des chaînes lourdes et légères permet de produire puis exprimer en surface une IgM complète qui va s'associer au CD79 α - β pour former le BCR, les cellules sont alors au stade de cellules B immatures, mais elles ne peuvent pas encore exprimer d'IgD à leur surface. Le BCR est, comme nous l'avons cité précédemment, un complexe membranaire qui permet de lier spécifiquement un Ag. Il est constitué non covalent d'une Ig monomérique ancrée dans la membrane et d'un co-récepteur protéique sous forme

d'hétérodimère appelé Ig α -Ig β (ou CD79 α - β). En effet, l'Ig exprimée en surface, d'isotype M ou D, n'a pas de région intracellulaire et ne peut donc pas transmettre de signal en cas de liaison à un Ag ([Hombach et al. 1990](#)). Le CD79 α - β est assemblé par des ponts disulfures entre ses deux monomères invariants, eux-mêmes composés d'une région transmembranaire et une région intracellulaire, cette dernière permet la transmission du signal d'activation de l'Ig membranaire ainsi qu'une stabilisation du complexe BCR à la membrane.

Ainsi, l'expression d'un BCR complet entraîne les cellules B immatures dans la circulation sanguine pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, principalement la rate. Cette étape place les cellules au stade de LB transitionnels (n'apparaît pas dans la **Figure 3**), et leur permet ensuite d'acquérir un phénotype de LB mature naïf, à savoir ne plus exprimer, entre autres, le marqueur CD10 ni d'IgM au profit du récepteur au facteur activant des cellules B (BAFF-R) par exemple, qui joue un rôle important dans leur survie et développement ([Schiemann 2001](#)). Cette étape marque aussi le début de la seconde phase du développement des LB, cette fois-ci dépendante de l'Ag et appelée immunopoïèse, puisqu'elle met en place la maturation de l'affinité et la différenciation terminale des LB. A ce stade, les cellules sont toujours sujettes à la sélection négative afin de supprimer les cellules autoréactives ([Carsetti, Köhler, & Lamers 1995](#)), et leur entrée dans la rate va les diviser en 2 catégories distinctes selon la suite du développement, dans la zone marginale d'une part, et en follicules d'autre part. Ces catégories sont rassemblées dans la **Figure 3** au stade de cellule B mature naïve. Outre leur localisation dans la rate, on distingue les LB de la zone marginale des LB folliculaires par leurs expressions distinctes d'Ig membranaires, les premiers expriment majoritairement des IgM et quelques IgD tandis que les seconds expriment majoritairement des IgD ([Pieper, Grimbacher, & Eibel 2013](#)).

La zone marginale constitue la frontière entre les pulpes rouge et blanche de la rate. La pulpe rouge forme un tissu lâche richement vascularisé dans laquelle les hématies âgés sont éliminés, elle est en périphérie de la blanche, cette dernière est organisée en amas de lymphocytes dispersés et centrés autour d'une artériole. La zone marginale est ainsi à la fois hautement vascularisée et riche en CPA, ce qui permet aux cellules B de la zone marginale de capter les Ag circulants.

L'activation des LB par un tel Ag induit leur différenciation en plasmocyte de courte durée afin de produire des Ac spécifiques, cependant, la plupart des LB matures suivent un développement folliculaire. Les follicules lymphocytaires sont situés à la frontière entre la région occupée par les cellules T et dendritiques, vers l'intérieur de la zone corticale de la rate, et la région occupée par les cellules B, vers l'extérieur de la zone corticale. Ainsi, les cellules T et dendritiques à proximité peuvent présenter des Ag et interagir avec les LB matures naïfs, l'activation de ces derniers les orientera vers la zone d'entrée et de prolifération des CG dite zone sombre afin d'accroître leur affinité pour l'Ag. Dans la **Figure 3**, les cellules des CG sont associées au stade lymphoblaste. Les CG constituent des sites d'intense prolifération, de sélection, de maturation et de mort des LB dans les organes lymphoïdes secondaires ([Cottier et al. 1964](#)).

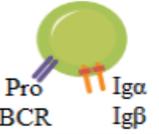
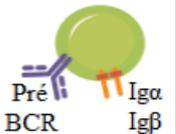
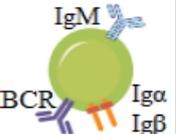
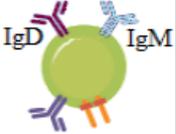
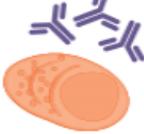
	Cellules B	Gènes de chaînes lourdes	Gènes de chaînes légères	Marqueurs de surface		
Lymphopoïèse, phase indépendante de l'antigène	Cellules souche		Lignée germinale	Lignée germinale	CD34	Moelle osseuse
	Signaux de différenciation en progéniteurs B (IL-3 et IL-7)					
	Cellule pro-B		Réarrangement V-DJ	Lignée germinale	IL-3R et IL-7R CD10 CD19 et CD20 CD79	
	Prolifération et différenciation, réarrangement des gènes des chaînes lourdes μ et légères					
Immunopoïèse, phase dépendante de l'antigène	Cellule pré-B		VDJ réarrangé	Réarrangement VJ	IL-3R, IL-7R et IL-4R CD10 CD19, CD20 et CD40 CD79	Organes lymphoïdes secondaires
	Sélection et expression d'un BCR complet					
	Cellule B immature		VDJ réarrangé chaîne μ membranaire	VJ réarrangé	IL-4R CD10 CD19, CD20 et CD40 CD79 IgM	
	Epissage alternatif produisant de l'ARNm $\mu+\delta$					
	Cellule B mature naïve		VDJ réarrangé chaîne μ membranaire	VJ réarrangé	CD19, CD20 et CD40 CD21 CD79 IgM et IgD	
	Présentation de l'Antigène et activation					
Lymphoblaste		L'épissage alternatif produit des chaînes μ sécrétées	Ig	CD19, CD20 et CD40 CD21 et CD23 IgM	Circulation sanguine	
Prolifération, hypermutation somatique, sélection et commutation de classe						
Cellule B mémoire		Hypermutation somatique		CD19 et CD20 CD21 CD27 CD138 IgG, IgA ou IgE		
Différenciation terminale	Plasmocyte		L'épissage alternatif fournit des Ig membranaires et sécrétées	Ig	CD38 CD138 Ig tout isotype	Moelle osseuse

Figure 3 : Ontogénie des lymphocytes B humains.

BCR, Récepteur des cellules B, **CD10**, Marqueur des cellules B immatures, **CD19-20-40**, Marqueurs des cellules B, **CD21-23**, Marqueur des cellules B matures, **CD27**, Marqueur des cellules B mémoires, **CD34**, Marqueur des précurseurs hématopoïétiques, **CD38**, Marqueur des plasmocytes, **CD79**, corécepteur des cellules B, **CD138**, Marqueur de cellules B longue durée, **D**, Segment de gène de diversité, **Ig α** , Chaîne invariante α du corécepteur des cellules B, **Ig β** , Chaîne invariante β du corécepteur des cellules B, **Ig**, Immunoglobulines, **IL-R**, Récepteurs aux interleukines, **J**, Segment de gène de jonction, **V**, Segment de gène de variabilité.

- Maturation et différenciation des LB

Une fois dans la zone sombre, les LB activés prolifèrent rapidement et subissent une hypermutation somatique des gènes de chaînes lourdes et légères afin de modifier l'affinité du BCR pour l'Ag. Puis elles sont dirigées vers la zone de sélection du centre germinatif (CG) dite zone claire. Les cellules ayant la meilleure spécificité pour l'Ag peuvent s'y fixer par compétition et recevoir les signaux de survie tandis que les autres, moins affins pour l'Ag, meurent par apoptose. Les cellules sélectionnées poursuivent leur différenciation ou retournent en zone sombre afin de proliférer et d'augmenter encore l'affinité pour l'Ag. Cette sélection est organisée par les DC folliculaires qui jouent le rôle de CPA et les LTh folliculaires qui jouent un rôle partenaire dans l'activation des LB les plus affins. Cette activation aboutit à une commutation de classe des Ig, qui se différencient en plasmocytes à longue durée de vie, ou en cellules mémoires. Dans le premier cas, les cellules sont rapatriées dans la moelle osseuse pour y résider, dans le second, elles sont relâchées dans la circulation sanguine où elles représentent un tiers des LB. Les plasmocytes tout comme les cellules mémoires ont des durées de vie extrêmement longues comparées aux autres cellules du sang. Les plasmocytes peuvent dériver de 4 types cellulaires : (1) Plasmablastes issus de sites extrafolliculaires de la rate, (2) Cellules B matures issues de CG, (3) LB naïfs activés par un Ag, (4) LB mémoires ([Sze et al. 2000](#)). On peut notamment différencier les plasmocytes des plasmablastes, ces derniers ont une durée de vie et un délai de production d'Ac en réponse à un Ag bien plus courts.

Ainsi, les LB permettent, par leur développement jusqu'à leur différenciation terminale, de sécréter des Ac à très haute affinité ainsi que de garantir une mémoire immunitaire B, et ce, jusqu'à plusieurs années. Les LB ont d'autres rôles majeurs, dont celui de CPA. Bien qu'ils représentent de moins bons présentateurs d'Ag que les DC, ils ont l'avantage de pouvoir capter des Ag solubles spécifiques tandis que ces dernières ne reconnaissent que des Ag communs à de nombreux pathogènes.

I.3.2. Les DC et les molécules HLA de classe II

I.3.2.A. Les cellules dendritiques

- Différenciation et localisation

Les DC jouent le rôle de sentinelles du système immunitaire, et font partie intégrante de l'immunité innée, elles participent aussi grandement à l'initiation de la réponse adaptative et ne représentent pourtant que 0,3% des leucocytes circulants. En effet, elles constituent des CPA dites professionnelles, car hautement spécialisées dans la phagocytose de pathogènes, l'internalisation, le traitement et la présentation des Ag aux LT, elles sont d'ailleurs les principales cellules à pouvoir activer des LT naïfs.

Les DC peuvent en effet exprimer 10 à 100 fois plus d'Ag que les autres CPA. Elles peuvent présenter à la fois des Ag endogènes aux LTc, des Ag exogènes aux LTh, et exprimer des molécules de costimulation qui permettent l'amplification de la réponse des cellules T. Elles peuvent aussi intervenir dans la tolérance immunitaire afin de limiter les réactions auto-immunes de la part des cellules T. Pour cela, elles ont la capacité de bloquer des thymocytes autoréactifs potentiels et d'induire l'anergie de cellules T matures ([Banchereau & Steinman](#)

1998). Elles présentent comme particularité morphologique de nombreuses extensions cytoplasmiques appelées dendrites, à l'origine de leur nom, et ont été identifiées dans un tissu lymphoïde murin pour la première fois en 1973 (Steinman & Cohn 1973). Comme les autres cellules sanguines, elles sont issues des CSH, différenciées en progéniteur myéloïde commun (CMP) ou en CLP dotés d'une grande plasticité de différenciation (Ardavin *et al.* 1993). Le CMP est à l'origine de toutes les cellules de la lignée myéloïde : leucocytes polynucléaires, plaquettes et érythrocytes. En fonction du microenvironnement de la cellule précurseur dans la moelle osseuse, elle peut suivre de multiples voies de différenciations aboutissant à une certaine diversité de sous-populations de DC.

Le **Tableau 7** résume la différenciation des sous-populations de DC, leurs rôles et localisations dans l'organisme, il est adapté des revues de Jacobs, Satpathy et Wu (Jacobs *et al.* 2008, Satpathy *et al.* 2012, Wu & Liu 2007). Leur grande diversité fonctionnelle leur permet, en plus de leur capacité migratoire, d'être impliquées dans des réponses immunitaires non spécifiques et adaptatives sur l'ensemble du corps.

Catégorie	Plasmacytoïdes	Conventionnelles	
Précurseurs (Cytokines)	CMP (Flt3L) CLP (Flt3L)	Monocyte (GM-CSF et IL-4) CLP (Flt3L)	
Sous-populations	Plasmacytoïdes	Interstitielles	Langherans
Marqueurs de surface	CD11c- / CD123+ CD45RA	CD11c+ / CD123+ CD209	CD11c+ / CD123+ CD207
Localisation	Organes lymphoïdes Sang	Organes lymphoïdes Foie, poumons et derme	Peau Epithéliums muqueux
Sécrétions	IFN- α - β	IL-4 et IL-12 Molécules de costimulation Fas-L	Molécules de costimulation IL-10
Rôles	Réponse antivirale	Réponse des cellules T Tolérance des cellules T	Réponse des cellules T Tolérance cutanée

Tableau 7 : Précurseurs, localisation et activités des sous-populations de cellules dendritiques humaines.

CD11, Marqueur des cellules myéloïdes, **CD45RA**, Marqueur de sous-populations T et monocytes, **CD123**, Marqueur de cellules souches de moelle osseuse, **CD207**, Marqueur de cellules de Langerhans, **CD209**, Marqueur de cellules dendritiques interstitielles, **CLP**, Progéniteur lymphoïde commun, **CMP**, Progéniteur myéloïde commun, **Fas-L**, Ligand transmembranaire menant à l'apoptose, **Flt3L**, Cytokine d'activation des progéniteurs hématopoïétiques, **GM-CSF**, Facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages, **IFN**, Interférons, **IL**, Interleukines.

- Fonctions biologiques dans l'immunité

Les DC sont présentes dans l'organisme sous deux formes, matures et immatures, avec des rôles et des propriétés fonctionnelles bien distinctes : (1) les DC immatures (DCi), circulent dans les tissus périphériques et peuvent facilement internaliser des Ag. (2) les DC matures (DCm) se situent dans les organes lymphoïdes secondaires et ont une excellente capacité à présenter les Ag aux cellules T mais ne peuvent plus les internaliser (**Romani et al. 1989**). Les DCi sont dotées d'une grande capacité migratoire qui leur permet de capter des Ag à des endroits stratégiques, comme une plaie par exemple, puis d'aller les présenter aux LT dans des lieux d'interactions cellulaires, tels que les ganglions lymphatiques. En effet, les DCi sont attirées en nombre dans les foyers d'inflammation via leurs récepteurs membranaires tels que CCR1-2-5 (CD191-192-195), par des chimiokines, cytokines à activité chémo-attractante (**Sozzani et al. 1997**). Ces dernières sont sécrétées par des cellules lésées ou des cellules effectrices de l'immunité innée au niveau des sites inflammatoires. Les DCi peuvent aussi être attirées par des signaux de danger autres que des cytokines dans les tissus lors d'une inflammation ou d'un nombre de morts cellulaires important localement. Selon le microenvironnement cytokinique où se situe la DC, cette dernière peut réagir afin de stimuler une réponse non-spécifique ou une réponse adaptative. Le captage puis l'internalisation d'une protéine par la DCi l'active et fait évoluer ses récepteurs membranaires vers un phénotype de DCm qui lui permet alors de rejoindre les sites de présentation d'Ag et de sécréter des cytokines inflammatoires. La maturation se déroule durant la migration de la DCi activée et s'achève lorsqu'elles entrent dans les ganglions lymphatiques. Elle intervient sur leur morphologie en allongeant leurs dendrites pour augmenter la surface de contact, mais aussi leurs fonctions, afin de présenter au mieux les Ag. Dans le cadre de la réponse T chez l'Homme, ce sont donc les DCi qui captent les Ag et les DCm qui les présentent Ag aux LT grâce à leurs molécules *Human Leucocyte Antigen* (HLA) : les molécules HLA de classe I présentent principalement les Ag cytoplasmiques de la cellule aux LTc et les molécules HLA de classe II principalement des Ag extracellulaires à la cellule aux LTh (**Melief, 1989**). En effet, les DCi expriment les molécules HLA de classe II dans le cytoplasme et faiblement en surface des molécules de costimulation et d'adhérence tandis que les DCm expriment fortement toutes ces molécules en surface de leur membrane. De plus, les DCm perdent l'expression membranaire de récepteurs aux chimiokines des sites inflammatoires au profit de récepteur aux chimiokines sécrétées dans les ganglions lymphatiques tels que CCR7 (CD197). Ce dernier reconnaît CCL19 et CCL21 qui sont sécrétées dans les zones riches en LT. Ainsi, les DC participent à l'immunité innée aux travers de leur capacité à reconnaître des motifs communs à de nombreux pathogènes, mais aussi à l'immunité adaptative en activant les LT spécifiques des Ag qu'elles présentent.

Les DC peuvent aussi participer à la tolérance centrale et périphérique. En effet, en présentant des Ag issus du soi aux LTh durant leur éducation dans le thymus, elles permettent l'élimination des LTh autoréactifs (**Vandekerckhove et al. 1992**). Dans les tissus périphériques, elles peuvent induire le développement de LTc au phénotype régulateur, c'est-à-dire capables de bloquer l'activation de LT naïfs, mais elles peuvent aussi induire directement l'anergie de certains LTh (**Gilliet & Liu 2002**).

- Activation des DC par les PRR

Classe	Nom	Localisation	Ligand	Origines du ligand
TLR	TLR1	Membrane plasmique	Triacyl lipoprotéine	Bactéries
	TLR2		Lipoprotéines	Bactéries, virus, parasites, lésions cellulaires
	TLR3	Endolysosome	ARN double brin	Virus
	TLR4	Membrane plasmique	LPS	Bactéries, virus, lésions cellulaires
	TLR5		Flagelline	Bactéries
	TLR6		Diacyl lipoprotéines	Bactéries, virus
	TLR8		ARN simple brin	Bactéries, virus, lésions cellulaires
	TLR9	Endolysosome	Dinucléotide CpG	Bactéries, virus, protozoaires, lésions cellulaires
	TLR11		Molécules pseudo-Profiline	Protozoaires
RLR	RIG-I	Membrane pl.	ARN double brin court	Virus
	MDA5	Cytoplasme	ARN double brin long	
	RLR3		ARN double brin termini	
NLR	NOD1	Cytoplasme	iE-DAP	Bactéries
	NOD2		MDP	
CLR	Dectine-1	Membrane plasmique	β -glucane	Champignons
	Dectine-2		β -glucane	
	MINCLE		SAP130	Champignons, lésions cellulaires

Tableau 8 : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires connus chez l'Homme, localisation et ligands.

ADN, Acide désoxyribonucléique, **ARN**, Acide ribonucléique, **CpG**, Cytosine-phosphate-Guanine, **CLR**, Récepteurs à lectine de type C, **iE-DAP**, Acide g-D-glutamyl-mésodiaminopimélique, **LPS**, Lipopolysaccharides, **MDA5**, Gène 5 associé à la différenciation de mélanome, **MDP**, Dipeptide muramyl, **MINCLE**, Lectine de macrophage de type C, **NLR**, Récepteurs de type NOD, **NOD**, Protéine contenant un domaine de liaison aux oligomères de nucléotides, **RIG-I**, Gène I inductible à l'acide rétinoïque, **RLR**, Récepteurs pseudo-RIG-I, **SAP130**, Sous-unité du complexe histone déacétylase, **TLR**, Récepteurs Toll-like.

Les DC, de par leur fonction de sentinelles du système immunitaire et leur rôle médian entre l'immunité innée et adaptative, sont dotées de récepteurs qui leur permettent de reconnaître une grande diversité de molécules. Elles sont aussi capables de différencier les molécules signalant un environnement à risque des molécules signalant un environnement sain. Cette idée est portée par la théorie du danger, énoncée en 1994, qui stipule que les cellules immunitaires doivent pouvoir distinguer un signal inoffensif d'un signal de danger et réagir en conséquences (**Matzinger 1994**). Cette théorie est étayée par la présence de récepteurs à l'origine de cette distinction en surface de nombreuses cellules de l'immunité, notamment en surface des DC, ce sont les *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Les PRR ont pour rôle de reconnaître de manière innée les motifs moléculaires conservés auprès de microorganismes pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou PAMP), mais aussi les molécules propres à l'organisme présentant une situation dangereuse (*Danger-Associated Molecular*

Patterns ou DAMP). Les PRR peuvent être exprimés en surface ou dans le cytosol afin de couvrir au maximum l'organisme d'une surveillance innée. Ils comportent 4 classes selon les motifs qu'ils reconnaissent et les voies d'activation qu'ils induisent. Le **Tableau 8** présente les différents PRR connus chez l'Homme, leur localisation et le type de ligands. Il est adapté de celui de la revue de Takeuchi et Akira (**Takeuchi & Akira 2010**). Chaque PRR détient un ou plusieurs ligands dont la liaison correspond à une situation de danger. Par exemple, l'expression d'ARN double brin est spécifique d'une infection de certains virus et peut être détectée par les PRR de classe RLR, *etc.*

L'interaction des PRR avec leur ligand a trois types de conséquences : activation de la cascade du complément, phagocytose de la cellule ou particule porteuse du ligand, et activation de la cellule. L'activation d'une DC par les PRR induit l'activation de facteurs de transcription responsables de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par la cellule activée, établissant alors un contexte inflammatoire propice à l'activation et le recrutement d'autres cellules immunitaires. Selon le type de pathogène auquel est confrontée la DC, différents PRR peuvent s'y lier et, par une voie de signalisation plus ou moins spécifique à chacun, la DC peut être activée lors de l'internalisation de l'Ag. Dans le cadre d'une injection de PT par exemple, les cellules lésées par l'injection sécrètent des DAMP que les DC peuvent reconnaître, ils provoquent ainsi la maturation de la DC en parallèle de l'internalisation de la PT. La reconnaissance de cytokines proinflammatoires par la DC peut aussi mener à son activation. L'activation de la DC mène à sa maturation, pendant laquelle des changements morphologiques et fonctionnels importants ont lieu : des extensions membranaires en dendrites se forment, baisse de l'activité phagocytaire et augmentation de l'activité de présentation d'Ag.

I.3.2.B. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

- Distribution histologique et cellulaire des molécules HLA

Les molécules HLA, *Human Leucocyte Antigen*, sont des molécules de présentation d'antigène aux lymphocytes, aussi appelées molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de manière plus générale. Le système HLA est un complexe génique comportant plus de 200 gènes codant pour un grand nombre de glycoprotéines transmembranaires ayant une même structure mais des différences de séquences à l'origine de différences allogéniques importantes entre individus d'une même espèce. Ces produits sont aussi à l'origine de phénomènes tels que le rejet de greffe entre sujets incompatibles, c'est d'ailleurs ce phénomène qui a permis sa découverte (**Dausset & Brex 1957**). De plus, le terme majeur fait opposition à des systèmes moins impliqués en transplantation, la réponse anti-HLA étant plus intense et responsable de la moitié des rejets de greffe. Les protéines du HLA jouent un rôle crucial dans la présentation des peptides issus du soi ou du non-soi aux LT puisque ces derniers ne reconnaissent que les peptides présentés par ces molécules, on dit qu'ils sont restreints aux molécules HLA de classe I et II (**Zinkernagel & Doherty 1975**). Il existe 3 classes différentes de molécules du HLA. Les molécules de classe I présentent les peptides cytoplasmiques aux LTc afin d'induire une réponse cellulaire, et les molécules de classe II présentent les peptides extracellulaires aux LTh afin d'induire une réponse humorale. Les molécules de classe III sont des molécules très différentes, codées par une trentaine de gènes

fonctionnels et n'ont pas de rôle de présentation mais un rôle immunitaire important, par exemples des protéines du complément et les facteurs TNF (**Carroll et al. 1984, de Grouchy & Turleau 1984**). Les molécules HLA de classe I sont exprimées par toutes les cellules nucléées de l'organisme et permettent donc une surveillance des événements intracellulaire en présentant les Ag endogènes. La densité en surface des molécules HLA de classe I est forte pour les cellules immunitaires, intermédiaire pour les cellules épithéliales et endothéliales et faible voire nulle pour les cellules pancréatiques et hépatiques, des glandes salivaires et les hématies. Les molécules de HLA de classe II ne sont exprimées que par les CPA et permettent une surveillance du milieu extracellulaire en présentant les Ag extracellulaires. Seuls les monocytes/macrophages, LB et DC présentent constitutivement des molécules HLA de classe II en surface. Cependant, un contexte inflammatoire (présence des cytokines IFN- γ et TNF- α) ou une activation de ces cellules augmente l'expression des gènes et la densité de surface de ces molécules, comme pour les cellules épithéliales, endothéliales et les LT activés qui peuvent les exprimer en surface dans ces cas précis (**Londei et al. 1984**). Ainsi, le rôle des molécules du HLA est fortement lié à leur structure, leur mode de synthèse et leur polymorphisme.

- Caractéristiques des molécules HLA de classe II

Génétique des molécules HLA de classe II

Les gènes des molécules HLA sont et localisés sur le chromosome 6 (**Lamm et al. 1974**) et sont répartis en 3 classes selon leurs propriétés biochimiques, fonctions et expression. Ces gènes partagent de nombreuses similarités de séquence, ce qui est le fruit d'une haute conservation durant l'évolution et a permis l'identification du complexe tout entier. Il y a 3 gènes "classiques" de classe I hautement exprimés et polymorphiques, HLA-A-B-C qui codent pour la chaîne lourde principale des molécules HLA de classe I et trois gènes "non classiques" HLA-E-F-G, fonctionnels mais bien moins variables et exprimés. Une seconde chaîne, légère et monomorphe, nommée β -2m et codée par un gène localisé sur le chromosome 15, s'ajoute à la chaîne lourde pour former une molécule HLA de classe I. On estime un gène polymorphe lorsqu'il comporte plusieurs allèles chacun représenté par au moins 1% dans la population étudiée.

Il existe une vingtaine de gènes dans la région HLA de classe II mais seulement 3 paires codent pour les molécules HLA de classe II présentant des peptides, à savoir HLA-DR, DQ et DP (**Trowsdale, Ragoussis & Campbell 1991**). Il s'agit des gènes DRA et DRB pour la molécule HLA-DR dont le second est le gène le plus polymorphe, DQA1 ou DQB1 pour HLA-DQ et DPA1 ou DPB1 pour HLA-DP, ils sont aussi polymorphiques mais à un niveau moyen. Pour les 3 paires, le premier gène code pour la chaîne α et est le moins polymorphe, particulièrement pour DRA qui est monomorphe. Aussi, il y a deux gènes DRB par haplotype, donnant une à deux molécules DRB. Le gène DRB1 code pour la première molécule DR et les gènes DRB3-4-5 codent pour la deuxième molécule DR qui n'est pas exprimée par tout le monde. Une molécule DP ou DQ peut s'apparier à une molécule homologue provenant de l'autre chromosome 6, ce qui double le nombre de molécules HLA-DP-DQ. Un individu peut donc exprimer entre 3 et 6 molécules HLA de classe I et entre 3 et 12 molécules HLA de classe II. Ces molécules présentent un fort polymorphisme et reconnaissent un répertoire de peptides qui leur est propre. En effet, il existe plusieurs gènes aux mêmes fonctions et exprimés

système immunitaire (**Snell 1968**). En effet, le nombre de gènes étant limité dans le génome et l'évolution des pathogènes étant bien plus rapide que celle des hôtes, une grande variabilité dans la séquence en acides aminés et la liaison aux Ag limite les infections par les pathogènes ciblant les molécules HLA. La réponse aux pathogène varie donc entre individus d'une même espèce et permet la survie d'un certain nombre d'entre eux.

Nomenclature

Depuis la découverte du système HLA en 1957 (**Dausset & Brex 1957**), les méthodes de détection et de nomenclature ont considérablement évolué. La sérologie constituait l'unique outil d'analyse et de description du système, des numéros étaient alors assignés à des allèles selon la spécificité antigénique et leur découverte chronologique. Des sous-types ont ensuite été créés pour détailler au mieux le polymorphisme observé. Les produits des gènes HLA de classe II sont à l'époque précédés du code Dw, faisant référence au polymorphisme d'un potentiel locus D, responsable des réactions lymphocytaires observées entre cellules de sujets ayant la même sérologie HLA de classe I (loci A, B et C) (**Anon 1976**). Puis les techniques de séparation cellulaire permettent d'isoler les cellules exprimant les molécules HLA de classe II. Le code DR (*locus D related*) désigne alors les produits issus du premier locus HLA de classe II identifié. Moins exprimés et polymorphes, les loci DP et DQ seront par la suite identifiés. C'est avec le séquençage du système HLA que le degré de polymorphisme vient supplanter la spécificité antigénique pour définir les nombreux haplotypes et allèles découverts. Chaque gène est alors défini par deux à trois lettres et un chiffre décrivant précisément la région génique (A, B, C ou D), le locus (R, P ou Q uniquement pour les classes II), la chaîne exprimée (A pour la chaîne α et B pour la chaîne β) et le numéro de gène. Par exemple, DRB1 désigne le gène n°1 du locus R codant pour la chaîne β dans la région génique des molécules de classe II. Puis, deux couples de chiffres définissent l'allèle correspondant, le premier désigne le groupe d'allèle (correspondant au numéro de l'antigène) et le second désigne l'ordre de découverte de l'allèle (**Dupont 1989**). En 2010, des colonnes symbolisées par des " : " viennent séparer les couples de numéros afin d'augmenter le nombre de possibilités (prise en compte des mutations) et que le nombre d'allèles par groupe d'allèle puisse dépasser la centaine, chose courante, notamment au niveau du locus DR. Ainsi, une molécule HLA de classe II peut être désignée de la sorte : région-locus* groupe : allèle : numéro de mutation. Exemple : HLA-DRB1*13:01:01 (**Tait 2011; McCluskey, Kanaan & Diviney 2017**).

Déséquilibre de liaison

On observe une codominance de certains gènes de par l'expression des deux allèles parentaux de chaque gène du HLA et un déséquilibre de liaison (**Degos & Dausset 1974**). Ce dernier est dû à la proximité de certains allèles qui sont plus transmis "en bloc" et facilement exprimés simultanément. L'augmentation de la fréquence observée d'un haplotype par rapport à sa fréquence théorique est permise par ce déséquilibre qui, *in fine*, augmente les chances de trouver des individus compatibles pour une transplantation par exemple. De rares événements de recombinaison entre les loci HLA-A et B et HLA-B et DR peuvent aussi survenir chez 1% des individus en moyenne, et ainsi rompre cette codominance. Chaque haplotype HLA présente trois à quatre molécules HLA de classe II différentes : une molécule DP, une DQ et une à deux

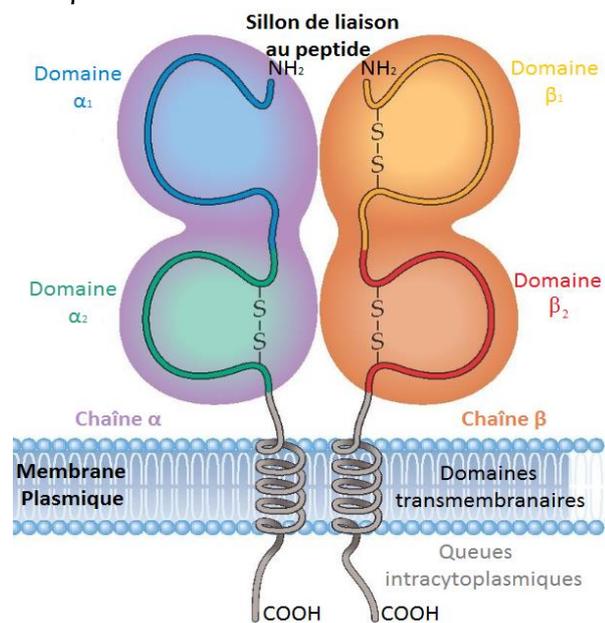
DR. Ce dernier type contient d'ailleurs la molécule la plus répandue dans la population mondiale, dont le gène correspondant est DRB1. Ce dernier présente plus de 200 allèles répartis mondialement de manière non uniforme et offre donc une grande diversité de peptides pouvant s'y lier. La chaîne DR α est cependant invariable. En raison de similarités de motifs de liaison au peptide chez HLA-DR, plusieurs peptides peuvent se lier à plusieurs HLA-DR. Inversement, des molécules HLA de classe II différentes peuvent lier un même peptide avec une affinité similaire.

Structure

La molécule HLA de classe II est composée de 2 chaînes α et β de 26 à 28 kDa et 33 à 35 kDa respectivement, chacune d'elle est ancrée dans la membrane plasmique par un des 2 domaines la composant (Brown *et al.* 1993). Ces domaines sont liés entre eux par un pont disulfure, comme les domaines constants des Ig. Chacune des 2 chaînes comporte une à deux glycosylations, elles sont synthétisées et assemblées dans le RE comme les autres protéines sécrétées ou membranaires. L'assemblage des deux chaînes est assuré par une protéine chaperonne du RE, la calnexine, au même moment que les chaînes glycosylées sont ajoutées, elles le seront jusqu'à la sortie de la molécule HLA de classe II du Golgi. L'assemblage du domaine N-terminal des deux chaînes forme le site de liaison au peptide composé de 2 hélices α surmontant un plancher composé de 8 feuilletts β .

Figure 5 : Structure générale d'une molécule HLA de classe II.

COOH, Terminaison carboxyle de la chaîne, NH₂, Terminaison amine de la chaîne, S-S, Pont disulfure.



La **Figure 5** représente la structure générale des molécules HLA de classe II et leur organisation membranaire, elle est adaptée de l'ouvrage de Murphy (Murphy *et al.* 2014). Une fois la molécule HLA formée, la chaîne invariante li s'enroule autour d'elle tel un caducée pour former un complexe HLA-Li non covalent. Li est une glycoprotéine qui permet d'une part qu'aucun peptide endogène du RE n'occupe le sillon de liaison, d'autre part la sortie du complexe du RE et son transport vers le Golgi.

- Capture, clivage et apprêtement des antigènes par les DC

Les DCi sont, de par leur localisation périphérique et leurs nombreux récepteurs membranaires, capables d'appréhender un grand nombre de particules antigéniques. Ces dernières peuvent être de nature et d'origines multiples : cellules infectées, microorganismes, cellules cancéreuses ou mourantes, *etc.* Les DCi peuvent internaliser les Ag de 3 façons grâce à de nombreux récepteurs : (1) L'endocytose médiée par un récepteur, les récepteurs aux lectines de type C (CD205-6-7) reconnaissent des motifs communs à de nombreux pathogènes comme des glycoprotéines, les récepteurs au Fc d'IgG ou IgE (CD23-32-64) reconnaissent des complexes immuns, il existe aussi des récepteurs pour les corps apoptotiques et les protéines du complément. (2) La phagocytose permet d'ingérer de plus grosses particules telles que des bactéries, virus ou fragments apoptotiques via le récepteur au mannose (CD206), elle est aussi médiée par des récepteurs d'endocytose. Cette internalisation de l'Ag constitue la plus courante chez les DC. Les récepteurs impliqués autour de la particule permettent une ouverture de la membrane pour former un phagosome qui sera internalisé avec la particule (**Lanzavecchia 1996**). (3) La pinocytose permet d'internaliser des Ag solubles dans les fluides extracellulaires via les aquaporines (AQP3-7) et la formation de replis membranaires qui créent alors des vésicules à l'intérieur du cytoplasme (**de Baey & Lanzavecchia 2000**). On distingue la macropinocytose de la micropinocytose, la première concernant une grande quantité de molécules solubles, la seconde une faible quantité. La macropinocytose, au même titre que la phagocytose, fait intervenir de grands changements structurels au niveau cellulaire, et est dépendante de la mobilisation de l'actine du cytosquelette.

Une fois que la DC a internalisé des protéines dans des vésicules, ces dernières vont fusionner entre elles pour former un endosome précoce et se diriger vers le centre de la cellule. Au fur et à mesure de l'avancée de l'endosome dans la cellule, il fusionne avec des vésicules pré-lysosomales issues du réseau trans-Golgi et fournissant des pompes à protons, ces dernières font baisser le pH de l'endosome. L'acidification de l'intérieur de l'endosome a pour conséquences de dégrader chimiquement les protéines internalisées, mais aussi d'activer les enzymes protéolytiques qu'il contient (hydrolases acides et cathepsines), jusqu'à obtenir un endosome tardif. Puis, la fusion de ce dernier avec un lysosome donne un endolysosome. L'endolysosome fournit la cellule en peptides de longueurs différentes et issus de protéines internalisées, ces peptides peuvent alors être chargés par les molécules HLA au niveau du compartiment de chargement du peptide (CCP) puis présentés en surface. Les peptides peuvent provenir d'un autre complexe, lui aussi clos et composé de nombreux compartiments : le protéasome.

Les complexes chaînes HLA α - β -li se regroupent en nonamères (3 de chaque) et sont adressés depuis le RE, en passant par le Golgi jusqu'au CCP grâce à la chaîne li et les queues cytoplasmiques des chaînes HLA (**Cresswell 1994**). Le passage des complexes par le Golgi permettent d'affiner la maturation des chaînes des molécules HLA. Dans le CCP, la chaîne li est découpée par des exoprotéases acides, les cathepsines. Ne reste de la chaîne li que le peptide *Class II-associated Invariant chain Peptide* (CLIP) occupant le sillon de liaison et évitant qu'un peptide endogène ne se lie aux molécules HLA de classe II. C'est dans le CCP, compartiment endosomique acidifié, que les peptides extracellulaires rencontrent les molécules HLA de classe II, et ceux répondant aux critères de liaison (longueur et séquence) prennent la

place du peptide CLIP (Sette *et al.* 1987). Le chargement d'un peptide est assisté par la molécule HLA-DM qui, suite à l'acidification de la vésicule, interagit directement avec les molécules HLA de classe II en délogeant le peptide CLIP du sillon pour y placer un peptide de plus haute affinité (Schmid & Jackson 1994). Aussi, la molécule HLA-DM occupe un rôle de contrôle puisqu'elle peut déloger les peptides dont la liaison avec la molécule HLA de classe II est instable. Ce processus est appelé révision peptidique et permet de ne pas présenter en surface de l'APC des peptides qui pourraient être délogés du sillon avant qu'un TCR ne s'engage. La molécule HLA-DO semble, elle, n'être présente qu'au sein des LB présentateurs d'Ag et des cellules endothéliales thymiques, et tient un rôle régulateur négatif sur l'activité chaperonne de HLA-DM. La sécrétion de cytokines proinflammatoires (IFN γ , TGF β , *etc.*) par les cellules T et NK constitue un contexte inflammatoire auquel les CPA sont sensibles. Elles peuvent réagir en augmentant l'expression de la molécule HLA-DM mais celle de HLA-DO reste inchangée, permettant ainsi de lever l'activité inhibitrice de cette dernière et de présenter davantage de peptides afin d'augmenter la réponse adaptative (Walter, Loos & Maeurer 1999).

- Interactions molécules HLA de classe II / peptide

Les molécules HLA de classe II forment une cavité occupée par li jusqu'à qu'un peptide plus affin n'y prenne place et stabilise ainsi la molécule. Les molécules HLA de classe II s'associent à des peptides de longueur variant de 12 à 25 acides aminés, la cavité ne contenant pas les extrémités du peptide. C'est par cette ouverture de la cavité et la présence de deux domaines transmembranaires que les molécules HLA de classe II se différencient structurellement des molécules de classe I, ces dernières possédant une cavité fermée accueillant des peptides de huit à dix peptides et un seul domaine transmembranaire. Pour les deux classes, la liaison au peptide se fait par des liaisons hydrogène entre les acides aminés du peptide et les acides aminés polaires de la cavité. Cependant, ces derniers peuvent interagir avec la chaîne principale des acides aminés ainsi que la chaîne latérale, ce qui implique des interactions indépendantes et dépendantes de la séquence du peptide. Les liaisons aux chaînes latérales sont distribuées sur des poches correspondant aux acides aminés numérotés du peptide. Ces poches ont des propriétés physico-chimiques différentes d'une molécule HLA à une autre qui déterminent le type de peptide qui peut s'y fixer, pour les molécules de classe II, il s'agit des poches P1, P4, P6, P7 et P9 (Stern *et al.* 1994). La variabilité entre deux allèles s'étale de 1 à 30 résidus et se concentre principalement sur le domaine β 1 pour les molécules HLA de classe II alors qu'elle concerne les domaines α 1 et β 1 pour les classes I. En effet, les régions fonctionnelles en contact avec le TCR ou le peptide portent le plus de variabilité pour les deux classes. Ainsi, la constitution des poches de liaison jouent un rôle important sur la composition du répertoire de peptides qui peuvent s'y lier : c'est pourquoi les épitopes T CD4 varient d'un individu à l'autre en fonction de l'haplotype HLA de classe II. Les classes I sont cependant bien plus sélectives que les classes II, la prédiction d'épitopes T par l'étude de la liaison d'un peptide aux molécules HLA de classe I est donc plus efficace (Sturniolo *et al.* 1999).

La **Figure 6A** représente l'arbre des 9 supertypes de molécules HLA de classe II établis dans l'article de Lund (Lund *et al.* 2004) et la **Figure 6B** schématise la répartition des poches contenant les résidus d'ancrage aux molécules HLA de classe II (Zhang *et al.* 2012).

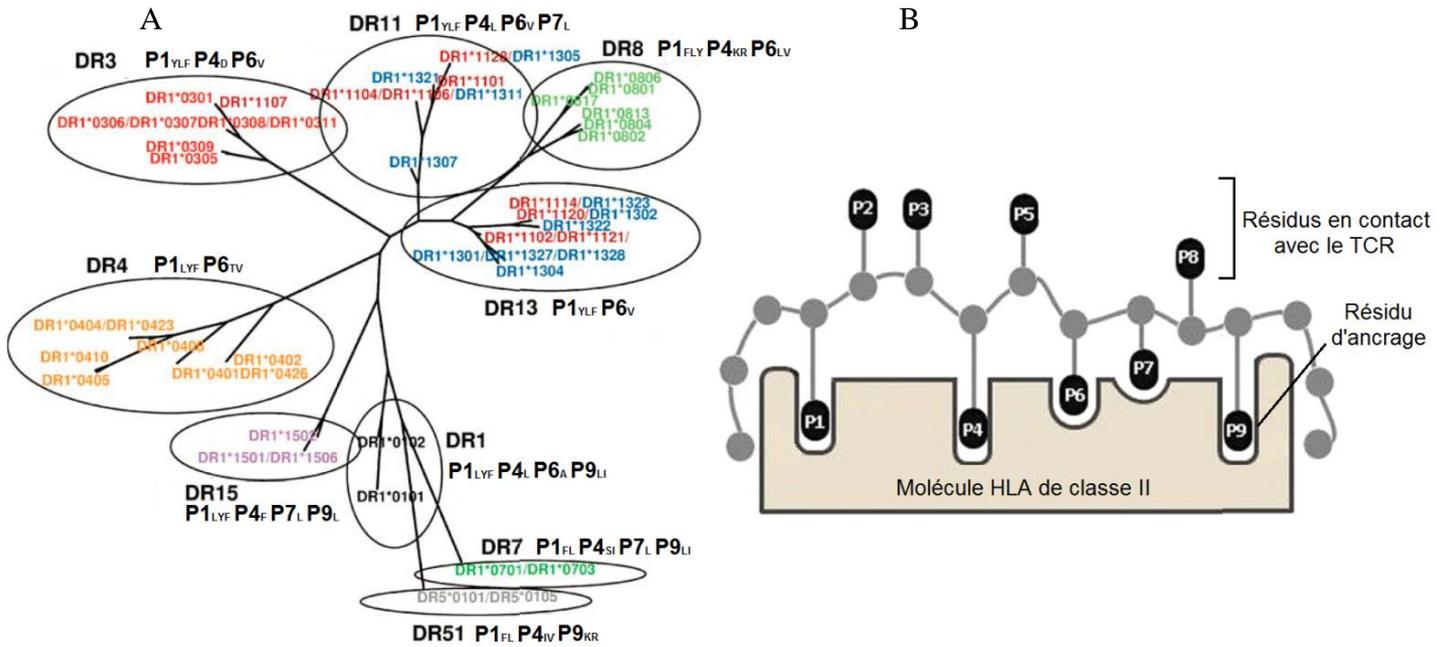


Figure 6 A : Arbre des 9 supertypes de molécules HLA de classe II.
6B : Profil général de liaison au peptide des molécules HLA de classe II.

A : Les supertypes sont entourés en noir et les noms de molécules HLA de classe II sont colorés par locus. **A**, Alanine, **D**, Acide Aspartique, **H**, Histidine, **I**, Isoleucine, **K**, Lysine, **L**, Leucine, **P**, Phénylalanine, **R**, Asparagine, **S**, Sérine, **V**, Valine, **Y**, Tyrosine. **DRX**, Supertypes de molécules HLA de classe II, **DRX*XXXX**, Locus et allèle de la molécule HLA de classe II, **P1_x P4_x P6_x P7_x P9_x**, Résidu X communs les plus fréquents pour chaque poche au sein d'un supertype de molécules HLA de classe II.

B : **HLA**, Complexe majeur d'histocompatibilité humain, **P1-4-6-7-9**, Poche de liaison aux chaînes latérales des résidus d'ancrage à la molécule HLA de classe II, **P2-3-5-8**, Positions des chaînes latérales des résidus en contact avec le récepteur des cellules T, **TCR**, Récepteur des cellules T.

Les supertypes ont été élaborés selon les spécificités de liaison au peptide communes parmi 50 différentes molécules HLA de classe II les plus répandues. Les distances de l'arbre reflètent l'éloignement ou le rapprochement entre les spécificités de liaison des molécules pour chaque supertype. Par exemple, on peut supposer que les molécules du supertype DR8 lient davantage de peptides communs avec celles du supertype DR11 que celles du supertype DR51. Les codes associés à chacun des supertypes permettent de caractériser leur profil de liaison commun selon les poches en nommant les résidus communs les plus fréquemment liés pour chaque poche.

On remarque évidemment que plus un supertype regroupe de molécules, plus il est difficile de trouver des caractéristiques communes au sein du supertype. Toutes les molécules des 9 supertypes lient majoritairement les résidus phénylalanine, leucine ou tyrosine au niveau de leur P1, celles des supertypes DR3-4-8-11-13 lient une valine en P6 et celles des supertypes DR1-7-15 lient une lysine en P9.

On estime que plus de 2000 peptides différents peuvent être présentés par une même molécule HLA de classe II, ce qui reflète la grande plasticité du complexe HLA en considérant

le nombre de molécules différentes pouvant être exprimées en surface d'une CPA. Un LB peut par exemple exprimer simultanément jusqu'à 80 000 molécules HLA de classe II, dont plus de 90% des molécules DR.

- La voie de présentation classique des antigènes par les molécules HLA de classe II

La voie classique de présentation d'un Ag protéique extracellulaire par les molécules HLA de classe II commence par l'internalisation de la molécule portant l'Ag, comme détaillé précédemment avec les DC. L'internalisation de l'Ag dépend de la nature de l'Ag, mais aussi de la sous-population de DC, puisque chacune d'elle détient des propriétés fonctionnelles propres. Plus précisément, si l'Ag est de nature protéique, alors la séquence est découpée en plusieurs peptides de sorte à présenter chacun d'eux au LT ([Townsend et al. 1986](#)). Cette présentation a lieu une fois qu'un peptide s'est lié à une molécule HLA, présente en grand nombre dans les CPA, et que le complexe p-HLA est exprimé en surface. Si l'Ag est de nature autre que protéique, à savoir lipidique, lipido-protéique ou glycolipidique, alors il est associé aux 4 molécules CD1a-b-c-d pour être présenté aux LT par des CPA ([Porcelli, Morita, & Brenner 1992](#)). Le processus de présentation est similaire mais indépendant de la voie de présentation des Ag protéiques.

Le complexe p-HLA est ensuite dirigé vers la membrane pour être exprimé en surface. Les molécules HLA de classe II n'ayant pu se lier à un peptide sont en général dégradées dans le protéasome, il peut arriver qu'elles soient exprimées en surface sans peptide à présenter. Il s'écoule généralement 3 heures entre la synthèse d'une molécule HLA de classe II et l'expression en surface d'un complexe HLA-peptide, de dernier peut être exprimé jusqu'à 36 heures. Ce processus est 3 fois plus lent que pour les molécules HLA de classe I mais l'expression dure 3 fois plus longtemps. Il a été montré qu'il suffit de moins de dix complexes HLA-peptide pour un même peptide pour activer certains LTh, ce qui souligne l'importance du système HLA et son efficacité dans l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique. Les molécules HLA de classe II exprimées en surface avec un peptide peuvent aussi parfois être endocytées pour être recyclées et présenter un nouveau peptide.

Des peptides provenant de protéines cytosoliques peuvent aussi être chargés aux molécules HLA de classe II lorsque les endosomes les adressent au CCP. Cette présentation est alors appelée présentation croisée car elle permet la reconnaissance d'Ag destinés aux LTc par des LTh. Le phénomène inverse de présentation d'un peptide extracellulaire à un LTc est possible et constitue une autre part de la présentation croisée ([Shen et al. 2014](#)).

I.3.3. Le TCR et les lymphocytes T

I.3.3.A. Le TCR

- Structure

Le TCR est un hétérodimère polypeptidique membranaire caractéristique des LT et impliqué dans la reconnaissance de complexes p-HLA. Selon l'appariement de deux chaînes qui le composent, le TCR peut être de type $\alpha:\beta$ et avoir une grande variabilité, ou bien $\gamma:\delta$ et être plus restreint. Sa polymorphie lui confère une immense variabilité de séquence pour une structure globale constante, notamment au niveau des parties se liant aux complexes p-HLA qui, comme pour les fragments Fab des Ig, contiennent 3 régions CDR (**Davis & Bjorkman 1988**). En effet, comme les Ig, les chaînes du TCR comportent un domaine variable et un domaine constant. Les CDR1 et CDR2 sont variables et reconnaissent les molécules HLA de classe II tandis que le CDR3 est hypervariable et reconnaît le peptide présenté. De plus, le CDR3, plus flexible que les autres CDR, peut adopter différentes conformations afin d'augmenter la liaison au peptide, le reste du TCR ne modifiant pas sa conformation en présence d'un complexe p-HLA (**Rudolph & Wilson 2002**). Ainsi, l'affinité pour un peptide peut être augmentée indépendamment des molécules HLA, ce qui augmente le panel de peptides présentés. Les chaînes du TCR ont aussi une partie transmembranaire d'une vingtaine de résidus hydrophobes et d'une partie intracellulaire de 6 à 12 résidus, bien trop courte pour transmettre un signal. Les chaînes sont reliées l'une à l'autre par des ponts disulfure au niveau de la partie constante, des ponts disulfure intra-caténaux forment des repliements, comme sur les Ig. A la différence des Ig, le TCR d'une cellule T reste le même quelle que soit son activation, et il présente une affinité de 1 à 100 μM pour les complexes p-HLA alors que les Ig peuvent avoir une affinité de l'ordre du nM. Le TCR contient un domaine intracellulaire très court (extrémité Cter), ce qui rend la transduction du signal de liaison à un complexe p-HLA impossible seul, il est donc associé à une autre molécule membranaire pour former un complexe TCR fonctionnel.

- Complexe TCR-CD3

Le complexe TCR est constitué du TCR et du CD3 associés non covalentement. Le rôle principal du complexe TCR est d'identifier un complexe Ag-HLA afin d'activer la cellule T et induire une réponse spécifique de l'Ag. Les LT expriment jusqu'à 20 000 TCR identiques à leur surface. Le CD3 transmet le signal d'activation à l'intérieur de la cellule car il contient une extrémité Cter suffisamment longue. Le CD3 est non polymorphe, composé de 6 chaînes glycopeptidiques assemblées en 2 hétérodimères et un homodimère par un pont disulfure : $\gamma\varepsilon$, $\delta\varepsilon$ et $\zeta\zeta$. Chacune de ces sous-unités est invariante, ne possède aucun site de liaison à un ligand ni fonction enzymatique mais contient un à 3 motifs ITAM (*Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif*) côté intracellulaire, ces derniers transmettent le signal d'activation du TCR. En effet, la phosphorylation par des kinases des tyrosines contenues dans les ITAM permet le recrutement de protéines de signalisation qui induiront l'activation de la cellule (**Samelson, Harford, & Klausner 1985**). Les deux hétérodimères ont eux aussi une structure ressemblant à celle des Ig, l'homodimère $\zeta\zeta$ a une longue queue intracellulaire qui comprend 3 ITAM par chaîne. La **Figure 7** représente l'organisation membranaire du complexe TCR. Elle est adaptée

expriment un récepteur $\alpha:\beta$ très varié, ils constituent les précurseurs des LT matures.

La **Figure 8** schématise les réarrangements génétiques donnant un TCR $\alpha:\beta$. Elle est adaptée de celles de l'article d'Attaf et du livre de Murphy ([Attaf, Huseby & Sewell 2015](#); [Murphy et al. 2014](#)).

Lors des réarrangements des segments de gènes $V\alpha$ et $J\alpha$, le locus de la chaîne δ qui est situé entre les deux est excisé et libéré sous forme circulaire dans le cytoplasme. Ce mécanisme permet à la cellule de n'exprimer qu'un type de TCR et la quantification des morceaux d'ADN excisés appelés TREC (*T-cell Receptor Excision Circle*) spécifiques des jeunes LT naïfs exprimant un TCR $\alpha:\beta$ et circulants constitue un marqueur de l'activité thymique ([Kong, Chen, & Cooper 1998](#)). En effet, les TREC sont stables, ne sont pas dupliqués pendant la mitose et sont donc dilués à chaque fois que la cellule se divise, et la proportion de ces cellules sur la totalité des LT sortant du thymus est constante. On observe nettement une plus grande diversité au sein des TCR $\alpha:\beta$ que des TCR $\delta:\gamma$:

- 42 V, 50 J et 1 C pour la chaîne α ,
- 48 V, 2 D, 12 J et 2 C pour la chaîne β ,
- ~50 V, 2 D, 2 J et 1 C pour la chaîne δ ,
- 5 V, 2 J et 2 C pour la chaîne γ .

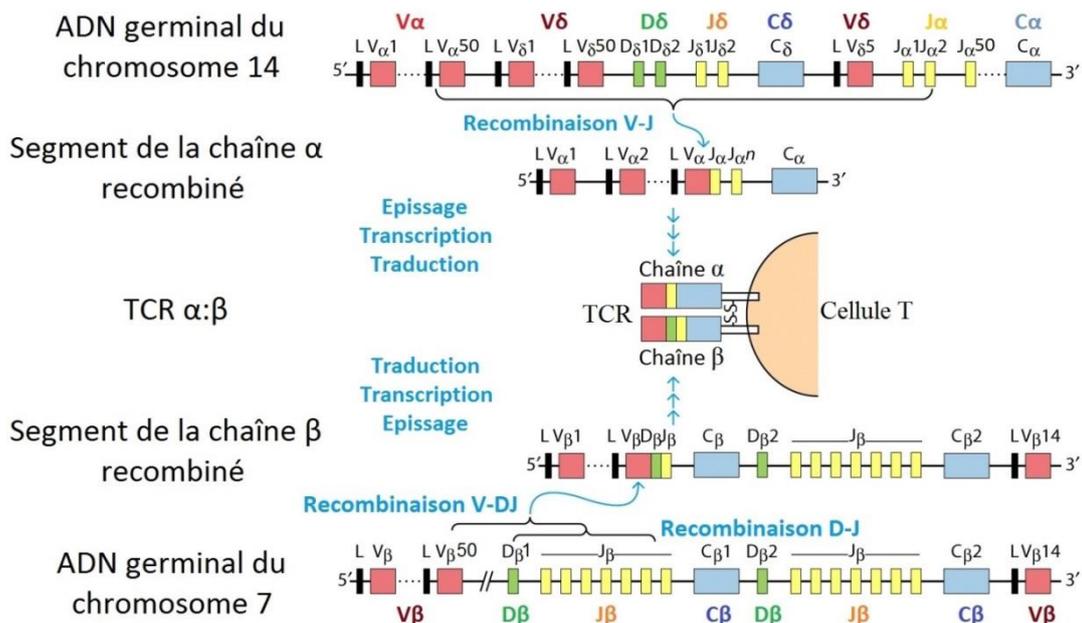


Figure 8 : Organisation génétique et synthèse du récepteur T humain.

ADN, Acide désoxyribonucléique, **C α - β - δ** , Segments de gène codant pour les domaines constants des chaînes α - β - δ , **D β - δ** , Segments de gène codant pour les séquences de diversité des chaînes β - δ , **DJ**, Assemblage des segments de gènes codant pour les séquences de diversité et de jonction, **J α - β - δ** , Segments de gène codant pour les séquences de jonction des chaînes α - β - δ , **L**, Segments de gène codant pour les séquences du peptide guide, **TCR**, Récepteur des cellules T, **S-S**, Pont disulfure, **V α - β - δ** , Segments de gène codant pour les séquences de variabilité des chaînes α - β - δ , **V-DJ**, Assemblage des segments de gènes codant pour les séquences de variabilité, de diversité et de jonction, **V-J**, Assemblage des segments de gènes codant pour les séquences de variabilité et de jonction.

Lorsque l'on ne tient compte que de cette diversité germinale, on obtient une diversité combinatoire approximative de 2100 chaînes α et 2304 chaînes β , soit $4 \cdot 10^6$ TCR $\alpha:\beta$ différents, et de 200 chaînes δ et 20 chaînes γ , soit $4 \cdot 10^3$ TCR $\gamma:\delta$ différents. Or, ces chiffres ne tiennent pas compte de la diversité jonctionnelle (additions et délétions potentielles de nucléotides au moment des recombinaisons), ni les effets de l'épissage alternatif, ce qui donne un nombre potentiel de TCR différents d'environ 10^{20} alors que l'on en compte 10^{12} au sein de l'organisme pour un répertoire de cellules T présentant des TCR différents inférieur à 10^8 (Legoux *et al.* 2010). En effet, les CDR1 et CDR2 sont codés par les domaines V des deux chaînes tandis que le CDR3 hypervariable est déterminé suite à l'épissage par l'assemblage des segments de gènes VJ pour la chaîne α ou VDJ pour la chaîne β . Le CDR3 peut contenir des insertions ou délétions nucléotidiques aléatoires, ce qui le rend plus hypervariable et permet une grande diversité de reconnaissance des Ag au sein du répertoire de cellules T. Le CDR3 porte en effet la majorité de la diversité idiotypique des TCR. Des facteurs réduisent néanmoins la diversité du répertoire T, la proximité des segments pouvant augmenter la fréquence de certaines recombinaisons, la redondance des séquences protéiques obtenues à partir de recombinaisons ou de séquences d'ADN différentes, mais aussi et surtout la sélection thymique qui réduit le nombre de TCR non fonctionnels ou potentiellement autoréactifs.

I.3.3.B. Les Lymphocytes T CD4

- Ontogénie des Lymphocytes T

Si les LB se développent et sont sélectionnés dans la moelle osseuse, les LT, eux, naissent dans la moelle osseuse, se développent, sont sélectionnés et deviennent matures dans l'autre organe lymphoïde primaire qu'est le thymus. Ce dernier est un organe impair médian situé dans la cage thoracique, plus précisément dans le médiastin antérieur, entre le sternum et les grands vaisseaux sanguins. Il est formé de deux lobes inégaux entourés d'une capsule et constitue le seul organe à involuer après l'âge de dix ans, une fois le système immunitaire est arrivé à maturité. En effet, le développement des LT est maximal entre le développement fœtal et avant la puberté, il met en place le répertoire T de l'individu puis il diminue, à 50 ans, 80% de l'espace thymique est occupé par du tissu adipeux et conjonctif. Les activités de développement, sélection et maturation des LT du thymus persistent toutefois puisqu'il produit quotidiennement $3 \cdot 10^9$ LT pour que les $3 \cdot 10^{11}$ de LT présents dans l'organisme soient maintenus (Goronzy & Weyand 2005). Néanmoins, si l'ablation du thymus ne compromet pas la réponse des cellules T, il est reconnu que son involution est un facteur influençant le déclin du système immunitaire chez l'adulte. Le thymus est structurellement organisé selon ces fonctions : chacun des deux lobes qui le composent est divisé en lobules, eux-mêmes composés d'un cortex périphérique contenant des amas denses de lymphocytes et d'une médulla centrale contenant les corpuscules thymiques.

Les LT se développent en migrant du cortex vers la médulla pour acquérir un phénotype mature et fonctionnel. Ce processus se décompose en plusieurs phases indépendantes de l'Ag, régies par des microenvironnements cytokiniques et aboutissent à l'obtention d'un TCR complet ainsi que d'autres récepteurs fonctionnels au bout de 3 semaines. Leur profil phénotypique permet d'ailleurs d'identifier leur stade de développement, puisqu'il témoigne du

changement d'activité et du réarrangement de gènes codant l'expression des marqueurs de surface et pour le récepteur T, respectivement. La **Figure 9** illustre le développement et la différenciation des LT au sein du thymus. Elle est adaptée de celles des revues de Blackburn et de Fu ([Blackburn & Manley 2004](#), [Fu & Chen 2004](#)).

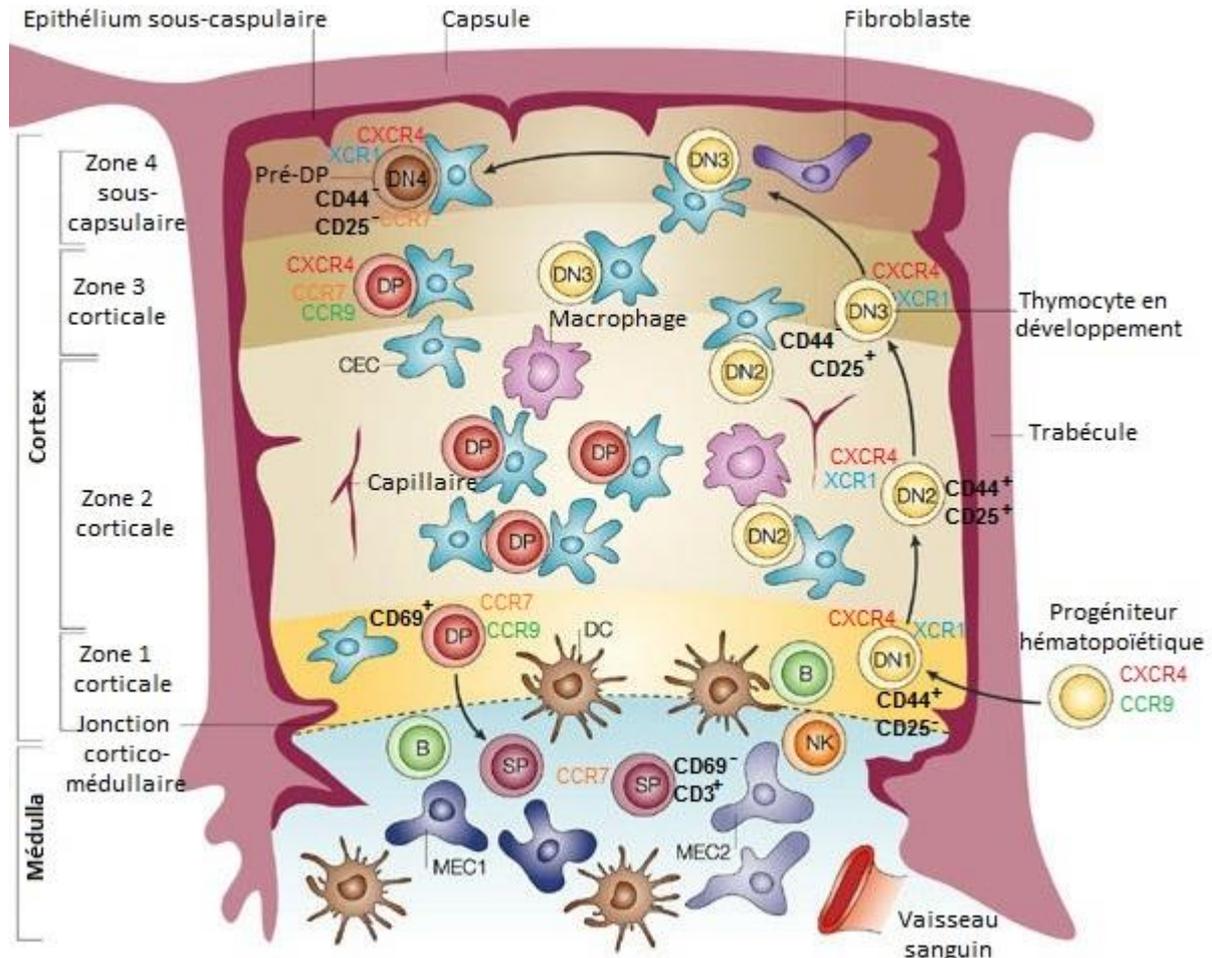


Figure 9 : Développement lymphocytaire T au sein d'un lobule thymique

+, Expression, -, Non expression, **B**, Lymphocyte B, **CCR**, Récepteurs aux chimiokines C-C, **CD**, Clusters de différenciation, **CEC**, Cellule épithéliale corticale, **CXCR**, Récepteur aux chimiokines CXC, **DC**, Cellule dendritique, **DN**, Thymocytes doubles positifs, **DP**, Thymocyte double positif, **MEC1-2**, Cellules épithéliales médullaires 1-2, **NK**, Lymphocyte *Natural Killer*, **Pré-DP**, Thymocyte au stade pré-double positif CD4⁺ CD8⁺, **SP**, Thymocyte simple positif CD4⁺ ou CD8⁺, **XCR1**, Récepteur aux lymphotactines.

Le précurseur T pénètre à l'intérieur du thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire afin d'acquies un récepteur T complet et fonctionnel, ce processus dure environ 3 semaines. Comme les LB, les LT dérivent de progéniteurs lymphoïdes issus de cellules souches hématopoïétiques qui n'expriment pas encore de marqueurs spécifiques de cellules T. Les progéniteurs lymphoïdes entrent dans le thymus par des veinules proches de la jonction entre le cortex et la médulla. Suivant la période de vie, différentes cytokines sont exprimées par les cellules épithéliales thymiques pour attirer les progéniteurs dans le thymus. Avant la naissance,

CXCL12 et CCL25 sont les ligands des récepteurs CXCR4 et CCR9, et après la naissance, PSGL-1 est le ligand de la P-sélectine. Lorsqu'ils commencent à exprimer la molécule d'adhésion CD44, on parle de cellules précurseurs des LT, les thymocytes. Cependant, ils n'expriment pas encore les corécepteurs CD4 ni CD8, on parle de thymocytes doubles négatifs (DN) et les gènes de leur récepteur T ne sont pas encore réarrangés. En effet, comme les LB, c'est le réarrangement du locus du TCR qui leur permet d'exprimer un récepteur complet et fonctionnel. Les corécepteurs CD4-8 interagissent avec une partie faiblement polymorphe des molécules HLA de classe I et II, respectivement, ils stabilisent l'interaction de p-HLA avec TCR et participent à la transduction intracellulaire du signal de reconnaissance (Hamad *et al.* 1998).

Les thymocytes DN interagissent avec les cellules épithéliales corticales (CEC), ou cellules stromales corticales, ce qui déclenche, notamment par leur récepteur Notch, une phase de différenciation de la lignée T puis une phase de prolifération cellulaire, cette dernière peut durer jusqu'à une semaine et est sous l'action de l'IL-7. Les thymocytes participeront à la maturation des cellules stromales en interagissant avec elles tout au long de leur développement. Parallèlement à leur développement phénotypique, les thymocytes fabriquent par réarrangement les gènes codant pour les chaînes du TCR. Ces réarrangements donnent naissance à 2 lignées distinctes en fonction de l'ordre dans lequel les segments de gènes sont réarrangés : les thymocytes exprimant un TCR $\gamma:\delta$ et ceux exprimant un récepteur $\alpha:\beta$. Ces derniers constituent les précurseurs des LT matures, nous nous pencherons sur l'étude de cette dernière population. Suivant l'expression de certains marqueurs de surface et de la localisation des DN dans le thymus, on peut diviser le passage de thymocytes DN à thymocytes doubles positifs (DP) en 4 étapes. Jusqu'à présent, les cellules sont donc à l'étape DN1.

L'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (IL-2R ou CD25) amène les DN1 à passer en DN2 et à migrer vers la zone 2 du cortex. Ces cellules réarrangent les gènes de la chaîne β du TCR en joignant les segments D-J puis V-DJ. Le rendement de ce réarrangement pour donner une chaîne β fonctionnelle est amélioré par la présence de 2 groupes de gènes DJC de la chaîne β , si le réarrangement de l'un échoue, l'autre est réarrangé à son tour. Les expressions membranaires des récepteurs CXCR4 et d'une chaîne β fonctionnelle font migrer les DN2 dans la zone 3 corticale pour devenir des DN3. Comme lors du développement des LB, les recombinaisons RAG-1-2 sont exprimées entre les stades DN2-3 afin de permettre la recombinaison des segments de gènes.

Les DN3 expriment le CD3, indispensable à la future expression du TCR, ainsi que la chaîne α substitutive, nommée pT α , au détriment du CD44. A la différence d'une chaîne α classique, pT α ne comporte pas de partie variable et est donc identique à tous les DN3. L'appariement de la chaîne β à la chaîne pT α constitue le pré-TCR, accompagné du CD3. Ce dernier transmet un signal de survie suite à l'expression d'une chaîne β fonctionnelle, on parle alors de β -sélection, 90% des thymocytes meurent durant cette étape. Puis, un signal passant par le pré-TCR cause l'arrêt du réarrangement des gènes de la chaîne β et l'expression de CCR7 fait migrer les DN3 dans la zone 4 corticale sous-capsulaire pour devenir des DN4. Ils expriment alors le marqueur CD2, spécifique des cellules T. Les DN4 entrent dans une seconde phase de prolifération sous l'action de l'IL-7 à la fin de laquelle les gènes codant pour la chaîne α se réarrangent, la chaîne α est exprimée en surface, s'associe à la chaîne β , formant ainsi un

TCR complet associé au CD3. La plupart des signaux impliqués dans leur maturation avant sortie du thymus passe désormais par le TCR ainsi que les corécepteurs CD4 et CD8. Les DN4 expriment les corécepteurs CD4-8 au détriment du CD25 ainsi que le récepteur CCR9, ils deviennent des thymocytes DP et subissent alors la sélection thymique. Si les DP représentent 80% des cellules que l'on retrouve dans le thymus, une immense majorité d'entre eux ne sortiront jamais de celui-ci.

- Répertoire T

Le répertoire T constitue l'ensemble des LT capables de reconnaître un Ag présenté par une molécule HLA autologue, ils sont donc caractérisés par leur TCR. Il est composé des LT naïfs sortant du thymus, si une rencontre avec un complexe Ag-HLA peut induire une expansion clonale, les LT conservent cependant leur TCR contrairement aux LB qui peuvent modifier leur récepteur après maturation. Autre différence avec les LB, le TCR ne peut être que membranaire. La diversité des TCR a permis de reconnaître le plus d'Ag possibles avec une affinité suffisante et une restriction aux molécules HLA. Les mécanismes de sélection thymique permettent de contrôler ces deux derniers critères, mais ce sont des recombinaisons somatiques et l'épissage qui assurent la diversité des TCR. En effet, l'organisation génétique et l'expression des chaînes du TCR sont semblables à celle du BCR et des Ig. Ces recombinaisons aléatoires entre plusieurs allèles permettent de développer une grande diversité de chaînes peptidiques V(D)J avec un matériel génétique restreint. Cette diversité est exprimée principalement par les domaines variables V et s'observe au sein des millions de LT d'un individu et d'une espèce. Le répertoire de cellules T est limité afin de reconnaître un large panel de complexes p-HLA et de couvrir un maximum d'Ag étrangers. Ainsi, plusieurs TCR peuvent reconnaître un même Ag et inversement, un TCR peut reconnaître plusieurs Ag. Enfin, un mécanisme essentiel au bon fonctionnement des LT et au maintien de leur rôle protecteur diminue drastiquement la diversité du répertoire T : la sélection thymique. Pour la suite, nous nous intéresserons au type de TCR le plus répandu et varié, le TCR $\alpha:\beta$, le TCR de type $\gamma:\delta$ étant moins représentatif du rôle des LT dans l'immunité.

- Sélection thymique

La maturation des thymocytes DP passe par l'éducation thymique qui comporte une sélection positive et négative afin d'empêcher que des LT non fonctionnels ou potentiellement autoréactifs ne quittent le thymus et circulent dans l'organisme (**Takaba & Takayanagi 2017; Zinkernagel 1978**). La plupart des cellules ne parviennent pas à passer les étapes requises pour devenir une cellule T mature naïve et meurent par apoptose durant les phases de sélection. Les signaux émis via le TCR jouent un rôle important au cours de cette différenciation puisqu'ils permettent aux cellules d'être sélectionnées.

La première sélection est dite positive car elle permet seulement aux cellules capables de reconnaître un complexe p-HLA de survivre, on estime le taux de mortalité de cette étape à 98-99% (**Bouneaud, Kourilsky & Bouso 2000**). La présentation des Ag est assurée par les molécules HLA de classe I et II des CEC et les DP traversent le cortex dans le sens inverse, en direction de la médulla. Un signal de survie, médié par l'IL-7, est envoyé aux DP interagissant avec suffisamment d'affinité avec un complexe p-HLA, s'ils n'y arrivent pas au bout de 3 à 4

jours, ils meurent par apoptose. On appelle cela la *death-by-neglect* (mort par négligence). Les CEC peuvent interagir avec jusqu'à 20 DN et DP à la fois grâce à leur organisation en réseau dans le cortex (Klein *et al.* 2014). La sélection positive permet de sélection des TCR restreints aux molécules HLA et a été mise en évidence en pratiquant le remplacement total des cellules de la moelle osseuse de souris par celles provenant de souris génétiquement identiques sauf pour les molécules du CMH. Les lymphocytes et les CPA de la souris receveuse expriment les molécules du CMH du donneur alors que les autres cellules de l'organisme, y compris les cellules stromales du thymus, expriment les molécules du CMH du receveur, seuls les thymocytes capables de reconnaître des complexes peptides-HLA propres au receveur sont sélectionnés (Fink & Bevan 1978). La sélection positive est aussi l'étape qui détermine le lignage des futurs LT : ceux qui reconnaissent un complexe p-HLA de classe I pourront devenir des cellules T CD8⁺ tandis que ceux qui reconnaissent un complexe p-HLA de classe II pourront devenir des cellules T CD4⁺. La présence de ces deux corécepteurs est importante dans la sélection positive, puisque le déficit de l'expression de l'un ou de l'autre entraîne un déficit en LT du lignage correspondant. Afin de pouvoir exprimer une chaîne α fonctionnelle, les thymocytes DP expriment à nouveau les recombinaisons RAG-1-2 pour recombiner les gènes de la chaîne α . Cette recombinaison a lieu sur les deux chromosomes simultanément et ce jusqu'à la fin de la sélection thymique. Les thymocytes expriment donc 2 chaînes α , potentiellement différentes selon les allèles hérités des parents, ce qui double leurs chances d'avoir un TCR capable de reconnaître un complexe p-HLA et d'être sélectionnés. Il est estimé qu'autour d'un tiers des LT expriment plus d'un TCR à leur surface, ce qui augmente leur capacité à réagir face à un Ag, même si la probabilité pour qu'un LT présente deux TCR différents et fonctionnels reste faible tant la sélection positive est forte. De plus, il existe certains segments de gène V codant pour la synthèse de la partie variable du TCR, responsable de la liaison au complexe p-HLA, soit exprimé de telle sorte que la partie variable puisse se lier à plusieurs molécules HLA, augmentant ainsi davantage les chances de passer la sélection positive (Oettinger 2004). Cependant, les CEC présentent des Ag provenant du soi, ce qui implique qu'une seconde sélection ait lieu afin de supprimer les DP autoréactifs potentiels.

Après avoir été sélectionnés positivement, les cellules DP expriment les récepteurs CCR7 et CCR4 et sont attirées vers la médulla, où les ligands du CCL19 et CCL21 sont hautement exprimés par les cellules endothéliales médullaires (CEM) et où elles resteront 10 à 15 jours (Hu *et al.* 2015). Les DP sont alors sélectionnés sur la capacité de leur TCR à ne pas reconnaître d'Ag du soi, c'est la sélection négative. Cette fois-ci, la présentation des Ag est assurée par les CEM ainsi que des macrophages et des DC organisées en grappes comparativement aux réseaux de CEC dans le cortex, les CPA peuvent provenir de la périphérie et ainsi participer à la sélection thymique. Les DP reconnaissant avec une affinité suffisante pour un complexe p-HLA meurent par un phénomène appelé délétion clonale car il supprime chez la cellule visée toute possibilité de se diviser et de survivre. Cependant, un DP présentant une forte affinité pour un Ag du soi peut échapper à la mort cellulaire soit en se différenciant en cellule régulatrice (Cf. **Tolérance centrale**), soit en réarrangeant une deuxième fois le locus du TCR pour en changer la spécificité. Ce phénomène peu connu car peu fréquent est appelé édition du récepteur et permet l'expression d'une nouvelle chaîne α (Wang, Huang & Kanagawa 1998). L'édition du récepteur est rendue possible grâce au fait que le locus de la

chaîne α n'est pas soumis à l'exclusion allélique qui ne permet l'expression que d'un seul type de chaîne et qui contrôle le locus de la chaîne β . On notera que les CPA contenues dans le thymus et en l'absence de pathogènes présentent uniquement des auto-antigènes et élaborent ainsi la tolérance centrale. La découverte de cette seconde sélection chez la souris a permis d'expliquer l'origine des réponses allogéniques ainsi que de démontrer la similarité des recombinaisons entre les segments de gènes codant pour les parties variables des BCR et TCR (**Dröge 1979**). En plus du sens sélectif, positif puis négatif, les deux sélections se différencient par l'affinité des TCR aux complexes p-HLA qu'elles contrôlent chez l'Homme. Il a été montré chez la souris que pour un même complexe p-HLA, le signal de survie de la sélection positive est envoyé dès qu'un nombre restreint de TCR sont engagés alors que le signal de mort de la sélection négative n'est envoyé que pour un nombre plus grand (**Ashton-Rickardt et al. 1994**). Ainsi, la première sélection vise à supprimer une trop faible affinité pour les complexes p-HLA tandis que la seconde vise à supprimer une trop forte affinité. Les thymocytes SP contrôlés comme fonctionnels et non-autoréactifs sont dits matures ou naïfs. Ils expriment Mst1 qui les pousse à sortir du thymus par les vaisseaux de la jonction cortico-médullaire pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires et la circulation générale afin d'effectuer leur tâche de reconnaissance des Ag (**Ueda et al. 2012**).

- Tolérance centrale

Les CPA présentes dans la médulla ne peuvent pas présenter l'intégralité des peptides du soi, l'apprentissage d'une certaine tolérance est donc régi par plusieurs mécanismes. D'une part, deux facteurs de transcription exprimés exclusivement par les CEM et indépendamment l'un de l'autre permettent d'établir la tolérance centrale sur différents organes, ils permettent de refléter le soi périphérique au sein du thymus. (1) Le facteur *AutoImmune REgulator* (AIRE) permet aux CEM d'exprimer des Ag tissu-spécifiques par des mécanismes épigénétiques en outrepassant les mécanismes de régulation génétique (**Derbinski et al. 2001**). AIRE active l'expression des gènes normalement réservés à certains types cellulaires en accédant à l'ADN condensé afin d'exprimer un maximum d'Ag du soi. On estime qu'un même Ag tissu-spécifique est à tout moment exprimé par 1 à 3% des CEM. Ces Ag sont ensuite captés par les DC médullaires qui les présentent aux DP (**Liston et al. 2003**). Des peptides issus de l'insuline sécrétée uniquement par les cellules pancréatique peuvent par exemple être présentés. Cela permet notamment une tolérance envers des Ag tissu-spécifiques au niveau des yeux, du pancréas et des poumons. (2) Le facteur Fezf2, découvert très récemment, régule directement l'expression d'Ag tissu-spécifiques par les CEM qui les présentent alors aux DP et permet la tolérance au sein du cerveau, des reins, des os et des poumons (**Takaba et al. 2015**).

D'autre part, le nombre de gènes HLA permet aux CPA de présenter un nombre optimal de molécules HLA différentes présentant une grande variété de peptides tout en garantissant l'efficacité de la sélection thymique. En effet, un trop grand nombre de molécules HLA différentes en surface des CPA ne permettrait pas à chaque complexe p-HLA de faire survivre des thymocytes durant la sélection positive, et ne permettrait pas non plus d'éliminer suffisamment de thymocytes potentiellement autoréactifs lors de la sélection négative. La sélection négative constitue donc le mécanisme majeur de la tolérance centrale. Enfin, la tolérance envers les peptides du soi non-présentés dans le thymus peut être complétée par la

tolérance périphérique qui limite la prolifération et la réactivité de cellules matures autoréactives. Lorsqu'un SP CD4 présente une affinité forte pour un Ag du soi mais pas suffisamment forte pour induire la délétion clonale, cette cellule pourtant potentiellement autoréactive est conservée par diversion clonale pour se différencier en cellule régulatrice (Treg) (Richards *et al.* 2015). Des signaux de survie médié par l'IL-2 et de costimulation par le CD28 permettent cette différenciation. Le TGF β peut lui aussi convertir des cellules T matures en Tregs en périphérie. Les Tregs ainsi formés expriment le marqueur spécifique Foxp3 et la sous-unité de l'IL-2R et se dispersent dans les tissus périphériques. Ce phénomène est appelé la sélection agoniste puisqu'elle est basée sur une reconnaissance de peptides du soi (Jordan *et al.* 2001). La déplétion de ces Tregs perturbe fortement l'homéostasie immunitaire ce qui souligne leur importance dans la tolérance périphérique.

- Différenciation des Lymphocytes T

Lignage CD4 ou CD8

La différenciation des LT en LT CD8⁺ ou LT CD4⁺ a lieu pendant la sélection positive. Les DP recevant un signal de sélection positive deviennent simples positifs (SP) CD4⁺/CD8^{low}. Si un signal d'interaction du TCR avec un complexe p-HLA de classe II a lieu en l'absence de CD8, alors la non expression génétique de ce dernier est maintenue et le SP devient CD4⁺/CD8⁻, dit SP4 (Singer 2002). Par contre, si le signal par le TCR n'est pas maintenu, alors le passage les SP CD4⁺/CD8^{low} répondent à des signaux cytokiniques (IL-6, IL-7, IL-15, IFN γ , TSLP et TGF β) activant le facteur de transcription Runx3d spécifique au lignage CD8. Les cellules percevant ces signaux perdent alors l'expression génétique puis membranaire du corécepteur CD4 au profit du CD8 et deviennent SP CD4⁻/CD8⁺, dits SP8 (Etzensperger *et al.* 2017). Les SP sont sélectionnés par la suite par leur capacité restrictive à reconnaître des Ag présentés par des molécules HLA de classe différentes selon le lignage engagé. Cependant, des études ont montré que certaines cellules CD4⁺ pouvaient reconnaître des Ag présentés par des molécules HLA de classe I et que des cellules CD8⁺ pouvaient reconnaître des Ag présentés par des molécules HLA de classe II. Le premier type de TCR représente une population très rare de LT CD4⁺, identifiés comme des lymphocytes infiltrant une tumeur (TIL), dont l'activité non cytotoxique s'apparente à un LTh1 et dont l'avidité pour des peptides était 10 à 100 fois moins forte que celle de la plupart des LT CD8⁺ réagissant contre le mélanome (Nishimura *et al.* 1999). Le second type de TCR a été observé chez une souris transgénique, dont les cellules CD8⁺ reconnaissent un Ag viral présenté par des molécules CMH de classe II, mais leur maturation complète nécessitait la présence de molécules CMH de classe I (Kirberg *et al.* 1994). Ces observations constituent des exceptions à la règle de restriction de classe du TCR, mais sont la preuve du chevauchement entre les répertoires de cellules T CD4-8 ainsi de la complexité pour le système immunitaire à développer des stratégies de défense que l'on pense parfois bien cloisonnées. Une fois que le lignage a eu lieu, le lymphocyte T naïf peut rejoindre la circulation sanguine afin de rencontrer des Ag présentés par des cellules diverses pour les LT CD8⁺ par des CPA pour les LT CD4⁺. Pour ces derniers, cette rencontre a lieu le plus souvent dans les ganglions lymphatiques où sont attirées les DC matures suite à l'internalisation d'une molécule antigénique.

Facteurs influençant la différenciation des lymphocytes T CD4

Plusieurs facteurs peuvent cependant influencer la différenciation. Le gène Notch peut y être impliqué puisque sa surexpression favoriserait la différenciation en LT CD8⁺ au détriment des lignées de LT CD4⁺ (Robey *et al.* 1996). Aussi, les molécules HLA-DO exprimées par les CEM peuvent agir en régulant l'activité des molécules HLA-DM sur le chargement des peptides aux molécules HLA de classe II. Elles peuvent en effet limiter la présentation de peptides du soi par les classes II et favorisent la présentation du peptide CLIP. Un déficit en HLA-DM ou un excès de HLA-DO induirait qu'un grand nombre de DP reconnaissent le complexe CLIP-HLA, passent la sélection positive mais pas la négative puisqu'ils reconnaissent le peptide CLIP qui peut être présenté durant la sélection négative, ce qui favoriserait la différenciation en LT CD8⁺. Ces données ont été obtenues lors d'essais sur des souris déficientes en l'équivalent murin des molécules HLA-DM (Wolf *et al.* 1998). La sous-unité catalytique du protéasome Pbsm11 (ou β5t) est exclusivement exprimée par les CEC et est essentielle pour la production de peptides affins avec les molécules HLA de classe I ce qui induit des LT CD8⁺. Pour induire des LT CD4⁺, ce sont les protéases lysosomales cathepsine L et TSSP (*thymus-specific serine protease*), elles aussi exprimées exclusivement par les CEC, qui sont essentielles à la production de peptides affins avec les molécules HLA de classe II. Enfin, les CEC sont capables de présenter des peptides endogènes sur des molécules HLA de classe II par un mécanisme appelé macroautophagie et qui est hautement développé au sein du thymus par rapport aux autres tissus où il a lieu de manière constitutive (Nedjic *et al.* 2008).

- Sous-populations lymphocytaires T CD4

Les lymphocytes T CD4 naïfs

A la sortie du thymus, les LT CD4⁺ naïfs expriment le CD45RA (isoforme de haut poids moléculaire du CD45 portant le domaine A), marqueur de maturité en l'absence d'activation. Avec les DCm, ils expriment CCR7 et sont attirés par la chimiokine CCL21 sécrétée par les cellules de la zone lymphocytaire T des ganglions lymphatiques, ce qui augmente les chances de rencontres entre les deux populations. Ils pénètrent dans les ganglions par les veinules à haut endothélium (HEV) grâce à un mécanisme actif impliquant les molécules d'adhésion LFA-1 et L-Sélectine (CD62L). Ce n'est qu'après avoir rencontré une CPA professionnelle présentant un Ag dont le TCR est spécifique qu'ils sont activés. Les LT CD4 naïfs restent jusqu'à 12 à 24 heures dans un ganglion lymphatique, puis, s'ils n'ont rencontré aucun complexe p-HLA avec lequel interagir, ils regagnent les tissus périphériques la circulation sanguine et rejoindront un ganglion au bout de quelques heures. Un LT CD4 naïf peut survivre ainsi jusqu'à 5 à 7 semaines sans rencontrer d'Ag.

L'activation des LT commence par l'interaction entre le complexe p-HLA et le complexe TCR accompagné du corécepteur CD4, elle nécessite 2 autres signaux clés (Cf. **I.3.3.B. Activation du Lymphocyte T**). Selon l'environnement cytokinique, la nature et la concentration en Ag et les molécules de costimulation sécrétées, les LT CD4 vont se différencier en sous-types, passant par une phase de prolifération clonale suivant la force du signal du TCR et la voie de signalisation empruntée. Le phénotype de DCm impliquées peut aussi intervenir sur la différenciation du LTh activé. La **Figure 10** représente les principales

sous-populations de LTh induites par des signaux cytokiniques, leurs facteurs de transcription associés et les cytokines qu'elles sécrètent. Elle est issue de la figure de l'article de Palmer et de la revue de Luckheeram ([Luckheeram et al. 2012](#), [Palmer & Weaver 2010](#)).

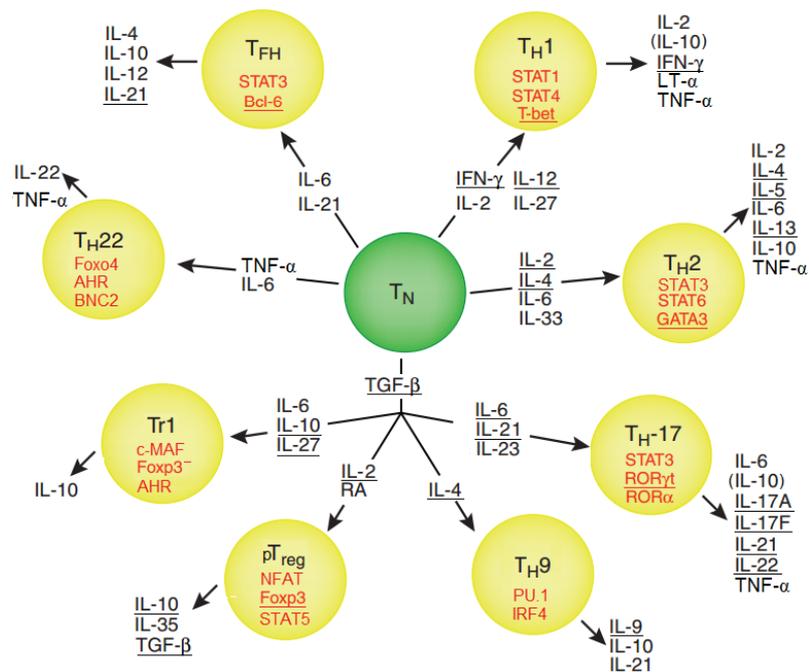


Figure 10 : Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en sous-populations.

Les cytokines sont en noir, les facteurs de transcription en rouge, celles et ceux surlignés sont majeurs. **AHR**, Récepteur d'hydrocarbures d'aryle, **Bcl-6**, Protéine associée au lymphome des cellules B de type 6, **c-MAF**, Protéine proto-oncogène de fibrosarcome musculo-aponévrotique, **Fox**, Protéines *Forkhead box*, **GATA3**, Protéine de liaison aux séquences GATA de type 3, **IFN**, Interféron, **IL**, Interleukines, **IRF4**, Facteur 4 régulateur de l'interféron, **LT- α** , Lymphotoxine α , **PU.1**, Protéine de liaison aux purines de type 1, **pT_{reg}**, Lymphocytes T régulateurs inducibles en périphérie, **RA**, Acide rétinoïque, **ROR**, Récepteur orphelin associé au récepteur à l'acide rétinoïque, **STAT**, Transmetteur de signal et activateur de transcription, **T-bet**, Facteur *T box* exprimé dans les cellules T, **T_{FH}**, Lymphocytes T auxiliaires folliculaires, **TGF**, Facteur de croissance transformant, **T_H**, Lymphocytes T auxiliaires, **T_N**, Lymphocyte CD4 naïf, **TNF**, Facteur de nécrose tumorale, **Tr1**, Lymphocytes T régulateurs de type 1.

Cette différenciation se caractérise par l'expression de marqueurs cellulaires propre à chaque sous-population, pouvant inhiber l'expression des facteurs de transcription des autres sous-populations. C'est le cas du facteur de transcription T-bet, spécifique des Th1, qui supprime le développement des lignées Th2 et Th17 tandis que le facteur GATA3, spécifique des Th2, inhibe en retour T-bet. La différenciation est aussi pendant l'étape à laquelle le caractère effecteur ou régulateur du LT CD4 est adopté, procurant un phénotype et un rôle particuliers. Des différences entre et au sein des cellules effectrices et régulatrices sont établies par la sécrétion de cytokines et l'expression de récepteurs membranaires spécifiques à chaque sous-population. On distingue 6 sous-populations de LTh et 2 sous-populations majeures de LTreg.

Les lymphocytes T CD4 effecteurs

Les Th1 sont induits en présence d'IL-12 sécrétée par des CPA activées et d'IFN γ sécrété par les NK stimulés par l'IL-12 (Hsieh *et al.* 1993) et sont majoritairement impliqués dans l'élimination de pathogènes via l'activation amplifiée de la phagocytose par les macrophages. Les Th1 dont le TCR reconnaît spécifiquement un complexe p-HLA d'un macrophage peuvent l'activer via le CD40L et l'IFN γ qu'ils expriment et sécrètent. Le macrophage activé peut alors neutraliser les agents pathogènes ingérés précédemment en produisant des protéases et des enzymes lysosomales. En retour, le macrophage activé sécrète de l'IL-12, ce qui amplifie la réponse Th1. L'importance des Th1 est soulignée par l'émergence de pathogènes intracellulaires (virus et bactéries) ayant survécu aux mécanismes de l'immunité innée et infectant les macrophages. Les Th1 sont donc l'exemple parfait de la complémentarité entre les immunités innée et adaptative puisqu'ils agissent contre des agents ayant échappé aux premières défenses.

Les Th2 sont induits par l'IL-2 et l'IL-4 et participent grandement à la défense contre les parasites extracellulaires tels que les helminthes en déclenchant l'activation de cellules de l'immunité innée (Zheng 1997). Leur activité effectrice passe par la sécrétion de nombreuses cytokines dont l'IL-4, IL-5, IL-13 et IL-25. Cette dernière régule positivement la sécrétion des précédentes et amplifie la réponse Th2 au détriment des Th17 en inhibant l'expression de leurs cytokines différenciatrices. Les éosinophiles survivent et sont activés par l'IL-5 et peuvent détruire les parasites par dégranulation. L'IL-4 provoque une inflammation en induisant la sécrétion d'IL-6 et de GM-CSF par d'autres cellules immunitaires. L'IL-5 favorise la prolifération et la différenciation des LB tandis que l'IL-4 et l'IL-13 favorisent la commutation de classe et la production d'IgE. Les Fc des IgE activent à leur tour des mastocytes et basophiles qui dégranulent et sécrètent de l'histamine et de la sérotonine, stimulant la contraction des muscles lisses intestinaux. La sécrétion de mucus est augmentée par l'histamine, la sérotonine ainsi que l'IL-13, ces actions cumulées mènent à une excrétion des parasites. Les Th2 sont aussi impliqués dans la défense contre les pathogènes intracellulaires.

Les Th17 ont pour rôle principal de recruter les neutrophiles sur des foyers infectieux via l'activation de cellules sécrétrices de chimiokines pour lutter contre les bactéries et champignons extracellulaires (Acosta-Rodriguez *et al.* 2007). Leur sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F entraîne une dilatation des vaisseaux sanguins, ce qui, avec l'accumulation de cellules immunitaires, constitue une inflammation, amplifiée par la sécrétion de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1, IL-6 et TNF α . Les Th17 activent aussi des cellules sécrétrices de molécules antibiotiques, les défensines. La différenciation d'un LT CD4⁺ naïf en Th17 nécessite 3 phases : différenciation médiée par le TGF β et l'IL-6, auto-amplification par l'IL-21 puis stabilisation du phénotype par l'IL-23 sécrétée par les CPA. L'IL-21 qu'ils sécrètent active les LT et NK, et induit l'activation des LB et leur différenciation en plasmocytes et cellules mémoires. Enfin, l'IL-22 augmente la sécrétion de peptides antimicrobiens et la prolifération de cellules de l'immunité innée.

Les T_{FH} (*T follicular helper*) sont principalement induits par l'IL-12, l'IL-6 et l'IL-21 et participent grandement à l'immunité humorale (Schaerli *et al.* 2000). En effet, ils participent au développement des cellules B en induisant leur maturation et différenciation en plasmocytes et LB mémoires via la sécrétion d'IL-4 et IL-21. Aussi, leur sécrétion spécifique de CXCL13

attire les précurseurs B dans les follicules lymphocytaires. Leur rôle est aussi important pour la formation de CG. Lorsque la différenciation initiale de la lignée T_{FH} débute, ils expriment CXCR5 au détriment du CCR7 et migrent vers les follicules B des organes lymphoïdes secondaires. Ils y interagissent avec les cellules B et finissent leur maturation, l'expression du CXCR5 les maintenant dans les follicules. Selon le type de cytokine principale qu'ils sécrètent et l'isotype d'Ig dont ils favorisent la production, les T_{FH} peuvent former plusieurs sous-populations (Fazilleau *et al.* 2009) :

- les T_{FH1} sécrètent l'IFN γ qui favorise les IgG2a et IgG3 au détriment des IgM, IgE et IgG1,
- les T_{FH2} sécrètent l'IL-4 qui favorise les IgG1 et IgE au détriment des IgM, IgG2a et IgG3, l'IL-5 qui favorise les IgG1 et IgA,
- les T_{FH10} sécrètent l'IL-10 qui favorise les IgA, le TGF β qui favorise les IgA et IgG2b au détriment des IgM et IgG3.

Les lymphocytes T CD4 régulateurs

Les Treg sont primordiaux pour le maintien de l'homéostasie lymphocytaire et la tolérance immunitaire (Takaba & Takayanagi 2017). Ils peuvent être induits à plusieurs moments : à la suite de la sélection négative dans le thymus pour constituer les Treg naturels ou dérivés du thymus (nTreg ou tTreg), et à partir de LT CD4 naïfs après une rencontre avec l'Ag en présence de TGF β et d'IL-2 pour constituer les Treg périphériques ou Treg inductibles (pTreg ou iTreg). Les Treg expriment le facteur de transcription Foxp3 et sécrètent les cytokines immuno-inhibitrices IL-10, IL-35 et TGF β , chacun des deux types participant fortement à la tolérance périphérique aux Ag endogènes. On distingue aussi les T_{R1} issus de la différenciation de LTh en présence d'IL-10 et d'IL-27, ils sont Foxp3⁻ et sécrètent uniquement de l'IL-10 (Pot *et al.* 2009). Les Treg sécrètent leurs cytokines lorsqu'une menace a été neutralisée afin de limiter les dommages aux tissus causés par l'inflammation en supprimant la sécrétion de cytokines proinflammatoires et la production d'IgE, classe d'Ig impliquée dans les allergies.

Les lymphocytes T CD4 mémoires

Le CD45 est une glycoprotéine membranaire originellement appelée Ag commun des leucocytes (LCA) de par son expression par toutes les cellules hématopoïétiques nucléées. Chaque isoforme est issu de l'épissage alternatif d'un exon A, B ou C codant pour le domaine extracellulaire de haut poids moléculaire. Le domaine intracellulaire du CD45 a une activité tyrosine phosphatase et est impliqué dans le développement et l'activation des cellules T. Cette dernière entraîne un changement d'isoforme ne comprenant pas de domaine extramembranaire de haut poids moléculaire, les cellules T activées sont alors CD45RA/CD45RO⁺. Les cellules mémoires expriment aussi ce marqueur, ce qui leur donne un seuil d'activation plus bas, et elles se démarquent des cellules effectrices par leur rôle et leur longévité persistante (Morimoto *et al.* 1985). En effet, une fois qu'une réponse immune primaire a été dirigée contre un Ag, la plupart des cellules T spécifiquement impliquées dans la réponse sont amenées à mourir puisque la menace a été supprimée. Une petite proportion de cellules est cependant conservée au sein l'organisme afin de garder en mémoire les cellules capables de répondre spécifiquement, rapidement et fortement à la prochaine exposition à l'Ag : ce sont les cellules T mémoires. On distingue trois populations de cellules T mémoires selon leurs fonctions effectrices et lieux de

résidence (**Geginat, Sallusto, & Lanzavecchia 2001**) : (1) les cellules centrales mémoires (T_{CM}) sont les cellules T CD4 mémoires les plus nombreuses, elles garantissent une mémoire réactive depuis les ganglions lymphatiques où elles sont retenues par l'expression constitutive de CCR7 et L-Sélectine (CD62L). L'expression haute de CD40L les rend très sensibles aux stimulations par les DC qu'elles peuvent activer en retour. Leur activation simplifiée les fait proliférer puis se différencier en LTh capables de migrer vers le site à l'origine de l'Ag présenté. (2) les cellules effectrices mémoires (T_{EM}) garantissent une mémoire effectrice dans les organes périphériques où elles résident, n'exprimant pas CCR7 et peu CD62L. Elles migrent rapidement vers les sites inflammatoires grâce à leurs récepteurs membranaires et molécules d'adhésion, où elles peuvent agir immédiatement après stimulation par des CPA non professionnelles. Elles prolifèrent par exemple très facilement en présence d'IL-7 et IL-15. A la différence des T_{CM} , elles présentent une polarisation Th1, Th2 ou Th17, et leur expression des récepteurs CD27 et CD28 évolue en fonction du stade de la différenciation : $CD27^+/CD28^+$ en précoce, $CD27^-/CD28^+$ en intermédiaire et $CD27^-/CD28^-$ en différenciation terminale. La perte de l'expression de ces récepteurs est accompagnée de celle de la capacité à sécréter des cytokines effectrices. (3) les cellules tissu-résidentes mémoires (T_{RM}) se situent dans les tissus périphériques (peau, appareil génital par exemple) dans lesquels elles sont retenues grâce à l'expression de molécules chémoattractives spécifiques. Elles constituent la dernière population de cellules T mémoires à avoir été décrites (**Shin & Iwasaki 2013**).

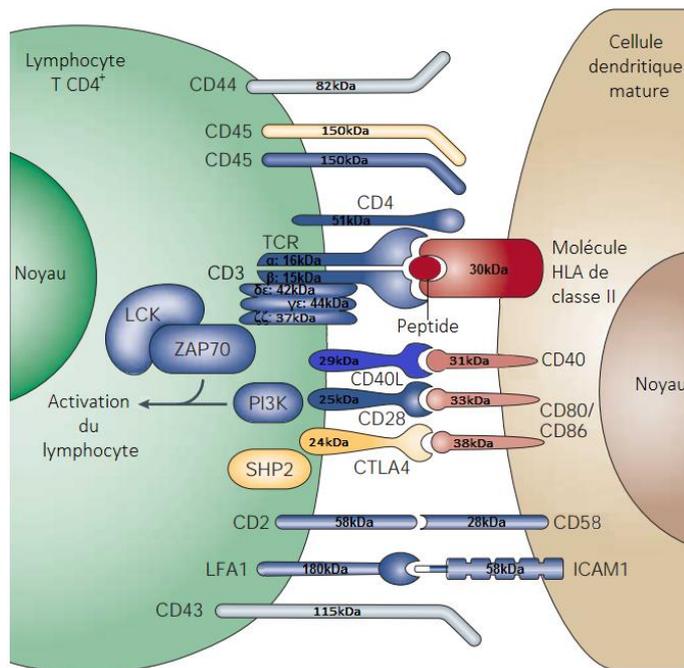
I.3.3.C. Activation du lymphocyte T

- Interaction TCR / peptide-HLA et co-récepteur CD4

Le CD4 est une glycoprotéine monomérique membranaire de 460 résidus toujours proche du complexe TCR et jouant le rôle de co-récepteur. Il est composé de 4 domaines immunoglobuline-like extracellulaires et une région transmembranaire. Les domaines D1 et D3 sont variables, l'un interagit avec les domaines invariables $\alpha 2$ et $\beta 2$ des molécules HLA de classe II et l'autre avec le complexe TCR, tandis que les domaines D2 et D4 sont constants. Cependant, les domaines sont très proches deux à deux, la liaison entre D2 et D3 est plus lâche et donne de la flexibilité au CD4. Ce dernier reconnaît les parties constantes des molécules HLA de classe II lors de la présentation d'un Ag au TCR, il renforce donc la liaison entre les complexes TCR et p-HLA, il transmet aussi le signal d'activation de la cellule T. Il constitue un marqueur des LT restreints aux molécules HLA de classe II, mais pas uniquement car des monocytes, macrophages, DC et des cellules microgliales peuvent l'exprimer aussi (**Perry & Gordon 1987**). La stimulation d'un LT $CD4^+$ par une CPA professionnelle se divise en 3 signaux indispensables : (1) engagement sur TCR avec le complexe p-HLA, (2) cosignal par les molécules de costimulation, (3) sécrétion de cytokines activatrices par les deux parties. Ces processus font intervenir des molécules de costimulation et d'adhésion en plus des complexes p-HLA et TCR. La **Figure 11** présente les différents acteurs impliqués dans la costimulation d'un LT $CD4^+$. Elle est adaptée de celle de l'article de Huppa (**Huppa & Davis 2003**).

Figure 11 : Molécules impliquées dans l'activation d'un lymphocyte T CD4⁺ par une cellule dendritique mature.

Le complexe p-HLA est en rouge, les molécules de costimulation et adhésion sont en bleu, les molécules de co-inhibition sont en jaune et les molécules n'intervenant pas dans la signalisation sont en gris. Le poids moléculaire est exprimé en kDa (kilo Daltons). **CD**, Cluster de différenciation, **CTLA4**, Protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques, **CPA**, Cellule présentatrice d'antigène, **δE-γE-ζζ**, Chaînes composant le CD3, **HLA**, Complexe majeur humain d'histocompatibilité, **ICAM1**, Molécule 1 d'adhésion intercellulaire, **Lck**, Tyrosine-kinase spécifique des lymphocytes, **LFA1**, Antigène 1 associé aux fonctions des lymphocytes, **PI3K**, Phosphoinositide 3-kinase, **SHP2**, Protéine tyrosine phosphatase 2, **TCR**, Récepteur des cellules T, **ZAP70**, Protéine kinase de 70kDa associée aux chaînes ζ.



- Molécules de costimulation et d'adhésion

Les molécules autres que le complexe TCR et son corécepteur participant à l'activation d'un LT par une CPA sont appelées molécules accessoires. Elles sont partagées en deux catégories selon leur rôle dans l'activation (bien que certaines molécules aient deux rôles) : costimulation ou adhésion cellulaire.

Le CD28 est un récepteur membranaire protéique homodimérique ayant un rôle de costimulateur crucial pour la prolifération et différenciation des cellules T et dont la région extracellulaire comprend un domaine immunoglobuline-like. Exprimé en surface des LT chez 90% des CD4⁺ et 50% des CD8⁺, on compte environ 3 molécules CD28 pour un complexe TCR. Il interagit avec le CD80/CD86 après que le TCR se soit engagé avec un complexe p-HLA, fournissant un signal de costimulation complémentaire au signal d'activation du TCR et nécessaire à l'activation de la cellule T (**Lenschow, Walunas, & Jeffrey 1996**). L'affinité du CD28 pour le CD80/CD86 est forte, de l'ordre du μM. Le complexe CD80/CD86 (anciennement B7.1/B7.2, ou B7) est un dimère protéique membranaire exprimé par les CPA professionnelles et les cellules hématopoïétiques. Les deux chaînes présentent une structure homologue et l'on peut les retrouver sous forme de monomères. En effet, le CD80 est exprimé par les DC activées uniquement alors que le CD86 est toujours exprimé, même faiblement, puis son expression augmente après maturation.

Le CD40L (ou CD154) est une protéine membranaire de la superfamille des récepteurs au TNF exprimé par les cellules T dont le TCR vient de s'engager. Sa liaison avec sa cible CD40 exprimée par les DC activées est dépendante de l'IL-2, elle fournit un cosignal complémentaire de celui du CD28 et induit la sécrétion d'IL-4, IL-10 et IL-12 par la DC. Le rôle du CD40L réside ainsi dans l'induction de l'expression d'autres molécules de

costimulation, il permet donc d'amplifier le signal d'activation de la cellule T. Le CD40L agit plus intensément pour l'activation des LT CD4⁺ que des LT CD8⁺, alors que le cosignal du CD28 est équivalent pour les deux types de cellules T (**Cayabyab, Phillips, & Lanier 1994**).

Le CD44 est une protéine membranaire pouvant lier l'acide hyaluronique ainsi que d'autres molécules structurales, elle est exprimée par un large panel de cellules dont les LT. Elle tient un rôle de costimulation dans l'activation des cellules T CD4⁺ en amplifiant la sécrétion d'IL-2 initiée par la liaison du CD28, favorisant ainsi une polarisation Th1 mais pas la prolifération des cellules T qui est régie par un mécanisme différent de la sécrétion d'IL-2 (**Sommer et al. 1995**).

Le LFA1 (ou CD11a-CD18) est une protéine hétérodimérique de la famille des intégrines exprimée par les lymphocytes, macrophages et neutrophiles. Elle constitue la première molécule d'adhésion à connecter la cellule T à une CPA en liant l'ICAM1 (ou CD54). Son affinité pour ICAM1 augmente au fur et à mesure que la synapse immunologique est installée.

Le CD2 est une glycoprotéine exprimée par les LT et NK matures. Il a un rôle de molécule d'adhésion en liant le CD58 (ou LFA3) exprimée par les CPA et transmet un signal intracellulaire qui augmente la sécrétion d'IL-2 et l'expression de son récepteur IL-2R par la cellule T, constituant ainsi un rôle supplémentaire de molécule de costimulation (**Selvaraj et al. 1987**).

Le CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*, ou CD152) est un récepteur homodimérique glycoprotéique membranaire de la superfamille des immunoglobulines qui comprend un domaine variable issu d'un épissage alternatif, une région transmembranaire et une région intracellulaire (**Brunet et al. 1987**). Sa structure est similaire au CD28, mais comparativement à ce dernier, le CTLA-4 est exprimé tardivement par les cellules T activées. Aussi, il interagit par son domaine variable avec 20 fois plus d'affinité avec le CD80/86 pour lequel il est en compétition avec le CD28 et émet un signal inhibiteur afin de limiter la sécrétion d'IL-2 et la prolifération lymphocytaire (**June et al. 1994**). Il est exprimé par nombres de Treg et participe à leur activité inhibitrice qui limite les réponses auto-immunes, on le définit comme une molécule de co-inhibition.

Le CD45 est une glycoprotéine exprimée par les cellules d'origine hématopoïétique dont les lymphocytes T et B, nécessaire à leur activation et la maturation des LT. Elle présente plusieurs isoformes et représente jusqu'à 10% de la surface cellulaire et son activité tyrosine phosphatase est portée par le premier de ses domaines intracellulaires D1 et D2 (**Thomas 1989**). Son activité est intimement liée à l'activation des LT puisque leur capacité à être activés dépend en partie de son expression membranaire.

Le CD43 (ou leucosialine) est une sialoglycoprotéine (glycoprotéine avec acide sialique) membranaire comprenant un domaine cytoplasmique constant et une faible capacité d'adhésion à cause de ses nombreuses glycosylations. Elle est exprimée par un grand nombre de cellules nucléées d'origine hématopoïétique dont les LT et tient un rôle inhibiteur sur l'activation et l'adhésion durant l'activation des LT (**Manjunath et al. 1995**).

- Activation des lymphocytes T CD4

L'activation de la cellule T commence avec le signal 1 : l'engagement du TCR pour un complexe p-HLA. Dans les ganglions lymphatiques où sont rassemblés LT CD4⁺ naïfs et DC matures, le TCR des lymphocytes "balaye" la surface des DC, à la recherche d'un complexe p-HLA pour lequel il aura une affinité forte. Des liaisons de faible affinité entre les molécules d'adhésion des deux types cellulaires facilitent cette "palpation". Au niveau moléculaire, le peptide enchâssé dans le sillon de la molécule HLA de classe II est en quelque sorte pris en sandwich entre cette dernière et le TCR lors de l'engagement du TCR avec un complexe p-HLA. Le paratope du TCR interagit d'une part, avec les résidus du peptide accessibles entre les berges du sillon et d'autre part, plusieurs résidus des hélices α qui bordent le sillon de la molécule HLA. Le TCR reconnaît ainsi un tiers des résidus appartenant au peptide antigénique et deux tiers des résidus appartenant à la molécule HLA engagée. Lorsque le TCR est engagé dans une liaison forte et stable, le CD3 et le CD4 transmettent des signaux à l'intérieur de la cellule T via la phosphorylation des ITAM. La densité en Ag constitue un paramètre important pour l'activation de la cellule T, puisqu'il faut entre un et 10 complexes p-HLA sur une DC pour pouvoir activer complètement un LT CD4⁺, la réponse maximale étant atteinte dès la dizaine de complexes. Aussi, la durée de signalisation soutenue du TCR détermine l'activation ou la mort de la cellule T (**Iezzi, Karjalainen & Lanzavecchia 1998**). En effet, un LT CD4⁺ naïf nécessite une vingtaine d'heures pour amorcer sa prolifération alors que pour une cellule LT effectrice, l'apoptose est engagée si la stimulation antigénique dépasse une heure. Cependant, la costimulation par le CD28 facilite l'activation de la cellule T en diminuant le temps d'engagement du TCR et en protégeant la cellule T de la mort. Mais si la costimulation n'est pas lancée, la cellule T meurt par apoptose ou bien entre dans une phase d'anergie où elle devient incapable de proliférer ou sécréter des cytokines immunostimulantes (**Gimmi et al. 1993**). La costimulation est nécessaire pour activer les LT afin que ces derniers ne prolifèrent pas contre des Ag peu dangereux. En effet, les CPA ayant capté des Ag ne représentant pas un danger (absence d'environnement inflammatoire, *etc.*) présentent peu voire pas les molécules de costimulation, ce qui les rend inaptes à activer les lymphocytes. A l'inverse, les CPA ayant capté des Ag associés à un danger (pathogènes ou tumeur par exemple) expriment ces molécules et sont aptes à déclencher une réponse immunitaire spécifique en activant les LT.

Le signal 2 est lancé en quelques minutes par les interactions successives du CD28 et du CD40L avec leurs cibles. Les queues intracellulaires du CD4 et du CD45 recrutent et activent les kinases Lck et FYN (de la famille des kinases Src), qui phosphorylent les ITAM du CD3 et activent la ZAP-70 (de la famille des kinases Syk). A son tour, la ZAP-70 se lie aux ITAM par ses domaines SH2 et active les protéines adaptatrices transmembranaires LAT (ligand pour l'activation des cellules T) et cytosolique SLP-76 (phosphoprotéine de 76kDa des leucocytes contenant un domaine SH2). Ces deux protéines mettent en place la connexion des voies de signalisation en assemblant un complexe multimoléculaire appelé signalosome (**Bubeck Wardenburg et al. 1996**). On distingue 4 voies de signalisation principales et interconnectées selon les enzymes enrôlées : PLC- γ 1, PKC- θ , MAPK et PI3K. Chacune d'elle agit aux niveaux nucléaire, cytoplasmique et membranaire puisqu'elles recrutent les molécules de costimulation et d'adhésion autour du complexe TCR, et détermine la polarisation future de la cellule T naïve (Th1, Th2, *etc.*) via les facteurs de transcription qui seront exprimés.

C'est à ce moment que la synapse immunologique se met en place afin de stabiliser et amplifier la signalisation du TCR. Elle doit son nom en référence aux synapses neuronales, mais contrairement à ces dernières, la synapse immunologique n'est pas fixée dans le temps (Norcross 1984). Elle se caractérise par une structure hautement organisée et dynamique de la zone d'interaction de la cellule T avec la CPA permettant d'augmenter la surface de contact et l'échange d'informations entre les deux cellules. Ces changements passent par l'interaction entre les molécules d'adhésion des deux partis, une restructuration du cytosquelette (actine filamenteuse, myosine et microtubules) et une polarisation des organites du LT. La formation de la synapse immunologique a été observée avec détails pour la première fois sur des membranes artificielles exprimant les molécules d'adhésion mises en jeu (Dustin *et al.* 1998). Les molécules de surface engagées dans l'activation se regroupent en cercles concentriques autour du TCR engagé selon plusieurs critères, formant alors les SMAC (complexes d'activation supramoléculaires). Les molécules les plus petites et fortement impliquées dans la stimulation sont attirées vers le SMAC central tandis que les molécules encombrantes et celles ayant un rôle inhibiteur sont maintenues au niveau du SMAC périphérique. Plus précisément, la taille, le nombre de récepteurs, l'affinité relative du récepteur pour son ligand et la demi-vie d'association au récepteur du ligand suffisent à expliquer cette organisation (Lee *et al.* 2002). Cette étude a permis de modéliser mathématiquement l'organisation de la synapse en prenant en compte ces paramètres, mais considérait, entre autres, la circulation des molécules dans la membrane comme entièrement libre et l'affinité des molécules d'adhésion pour leur ligand comme constante, alors que l'inverse était observé. En effet, sous l'action des cytokines sécrétées, les molécules d'adhésion gagnent en affinité pour leur ligand, ce qui stabilise encore davantage les échanges entre les deux cellules. La signalisation initiée par le TCR est ainsi optimisée en plaçant stratégiquement tous les acteurs impliqués, de même que son inactivation tardive.

Enfin, le signal 3 est caractérisé par la sécrétion d'IL-2 et l'expression de son récepteur CD25 complet et de haute affinité par le LT, ce qui le rend réceptif à sa propre sécrétion d'IL-2 et amorce sa prolifération. Généralement, la première mitose cellulaire a lieu 36 heures après le premier contact entre le LT et la CPA. Au repos, seules les chaînes β et γ du CD25 sont exprimées et la chaîne α est exprimée suite à la costimulation. D'autres cytokines sont sécrétées par le LT et la CPA et déterminent alors la polarisation du lymphocyte selon leur nature et stimulent d'autres cellules immunitaires. Par exemple, la sécrétion autocrine d'IL-4 et d'IFN- γ et l'expression de leurs récepteurs respectifs par le LT induisent une polarisation en Th2 au détriment du profil Th1 (Maldonado *et al.* 2004).

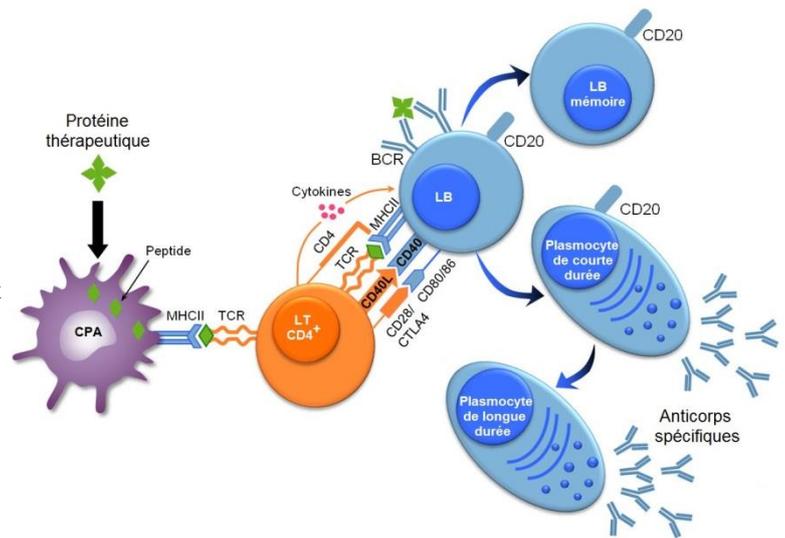
- Réponse humorale initiée par les lymphocytes T CD4⁺

Une fois activés, les LT CD4⁺ peuvent effectuer leur activité auxiliaire sur plusieurs cellules immunitaires en devenant des LTh. Par exemple, la sécrétion d'IFN- γ par les Th1 active la phagocytose par les macrophages et la production d'Ig opsonisantes et fixant le complément, ce qui initie une réponse innée et spécifique contre des pathogènes extracellulaires. La sécrétion d'IL-4 et IL-5 par les Th2 recrute les neutrophiles et éosinophiles vers un foyer d'inflammation et active les LB afin de produire des IgE spécifiques d'un parasite (Hall *et al.* 1999). Ainsi, les LT CD4⁺ interagissent avec des cellules de l'immunité tant innée qu'adaptative, ils initient et

amplifient les réponses contre des Ag.

Figure 12 : Coopération cellulaire dans la réponse en anticorps contre une protéine thérapeutique.

BCR, Récepteur des cellules B, **CD4**, Corécepteur 4, **CD20**, Marqueur spécifique des cellules B, **CD28**, Molécule de costimulation, **CD40**, Molécule de costimulation, **CD40L**, Ligand du CD40, **CD80/86**, Ligands du CD28 et **CTLA4**, **CTLA4**, Protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques, **CPA**, Cellule présentatrice d'antigène, **LB**, Lymphocyte B, **LT CD4⁺**, Lymphocyte T auxiliaire CD4 positif, **MHCII**, Molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, **TCR**, Récepteur des cellules T.



Plus précisément dans notre projet d'étude, les LTh initient la réponse humorale contre des Ag protéiques. La **Figure 12** schématise succinctement la réponse humorale contre une protéine thérapeutique chez l'Homme. Elle est adaptée de celle d'un article de vulgarisation scientifique ([Anon 2012](#)), et ne représente pas le signal de danger reconnu par la DC nécessaire à son activation ainsi que le passage d'un LT CD4⁺ naïf à un LTh.

Lorsqu'une protéine thérapeutique est injectée chez un patient, les DC peuvent capturer de la protéine soluble, l'endociter et la dégrader en peptides pour la présenter à un LT tout en étant activée par un signal de danger. Certains des peptides générés présentant une affinité pour les molécules HLA de classe II peuvent s'y lier, le complexe p-HLA migre en surface de la DC et les peptides sont alors présentés aux LT CD4⁺ au niveau d'un ganglion lymphatique. Si un LT CD4⁺ naïf ayant un TCR spécifique d'un complexe p-HLA rencontre une DC activée, cette interaction peut activer le lymphocyte. Ce dernier modifie son métabolisme et se multiplie par division clonale, un grand nombre de LT spécifiques de l'Ag sont alors formés. Cette multiplication augmente le nombre de cellules spécifiques et donc les chances de rencontrer à nouveau l'Ag dans l'organisme, cela permet une amplification de la réponse primaire. Lors de la multiplication et selon l'environnement cytokinique, les cellules filles vont se différencier en sous-population de LT CD4⁺. Les Th2 induisent une réponse à médiation humorale qui fait se différencier de LB en plasmocytes, et une portion des cellules T filles se différencie en cellules T mémoires. Pour induire la production d'Ig, le LTh doit rencontrer un LB ayant préalablement lié l'Ag par le BCR. Ce dernier est internalisé lorsqu'il reconnaît un Ag, puis la molécule portant l'Ag est dégradée en peptides, et, comme dans la DC, le complexe p-HLA est exprimé en surface. Un LB ayant lié l'Ag est jusqu'à 10 000 fois plus efficace pour le présenter que s'il ne l'a pas lié précédemment. De plus, les LB ayant lié un Ag expriment le récepteur aux chimiokines CCR7 ainsi que LFA1, ces deux molécules les retiennent dans la zone T des ganglions lymphatiques. Le TCR des LTh peut alors reconnaître l'Ag présenté par les cellules B, on parle de reconnaissance combinée. Par l'interaction des couples CD40L/CD40 et CD28/CD80-86 des

deux parts et la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-21 par les LTh, le LB est ensuite activé (Vallé *et al.* 1989). S'en suivent l'activation des LB, une prolifération clonale et une migration dans les cordons médullaires pour former un foyer primaire. Certaines cellules issues de ces divisions migrent ensuite dans un follicule lymphoïde primaire (en périphérie du ganglion) afin de former un CG (ou foyer secondaire). L'affinité des Ig pour l'Ag est augmentée durant cette phase de prolifération intensive par mutations somatiques de cellule en cellule, celles présentant la meilleure affinité sont sélectionnées (Jacob *et al.* 1991). Une part des cellules du CG se différencie en LB mémoires et l'autre en plasmocytes. Ces derniers rejoignent la moelle osseuse et produisent massivement des Ig spécifiques de l'Ag qui sont alors diffusées dans tout l'organisme. Ces Ig se fixeront à l'Ag à chaque nouvelle rencontre et les réponses suivantes seront immédiates, plus spécifiques et plus fortes que lors de la réponse primaire puisque toutes les cellules compétentes pour reconnaître l'Ag sont gardées en mémoire, les LB mémoires jouant le rôle de CPA. Ainsi, des injections répétées d'une PT présentant un potentiel immunogénique modéré peuvent induire une réponse en Ig par ces mécanismes cellulaires. L'apparition d'ADA de classe IgG est d'ailleurs la signature d'une réponse médiée par les Th.

Les ADA sont le fruit d'une activation de LB, et peuvent plus rarement être induits de manière indépendante des Th. En effet, les LB peuvent être activés par des ATI exprimés par la plupart des microorganismes pathogènes. Les ATI induisent une réponse en Ac présentant une faible affinité pour l'Ag car la maturation d'affinité et la commutation de classe ont lieu rarement, de même pour la mise en mémoire des LB (Mond *et al.* 1995). Dans le cas de PT, des facteurs de dénaturation de la PT ou la présence des particules indésirables jouant le rôle d'adjuvants peuvent mener à une réponse humorale similaire à une réponse contre un ATI et fournir un signal de danger. Certains de ces contaminants peuvent constituer un ligand pour certains PRR exprimés par les LB, et ainsi activer directement la cellule. Si le LB internalise la PT dans un tel contexte de danger, des ADA peuvent être produits contre la PT sans l'aide de lymphocytes Th (de Groot and Scott 2007; Sauerborn *et al.* 2010).

I.4. Facteurs de l'immunogénicité

L'immunogénicité d'une PT, matérialisée par l'apparition d'ADA chez des patients, est causée par des facteurs de risque liés au produit, au traitement et au patient. Afin de pouvoir diminuer au maximum ces risques inhérents aux PT, il est primordial d'en comprendre les mécanismes cellulaires. Mais il est aussi important d'identifier, comprendre et maîtriser les facteurs qui en sont à l'origine.

Il a été constaté une grande diversité de cas et de conséquences de l'immunogénicité des PT. Des variations peuvent en effet être observées à plusieurs niveaux : entre PT pour une même pathologie, entre pathologies pour une même PT, entre patients d'une cohorte, chez un patient pour des PT ou des administrations différentes. La prise en compte et la compréhension de ces variations nécessite une analyse à la fois globale et individuelle du problème de l'immunogénicité afin de pouvoir en maîtriser les facteurs (Krishna & Nadler 2016).

I.4.1. Facteurs liés au produit

Les facteurs liés au produit sont parmi les plus complexes mais aussi ceux sur lesquels

il peut être effectué un grand nombre de contrôles et ajustements, avec plus ou moins de marge de manœuvre. Ils comprennent des paramètres propres à la séquence : degré d'humanisation, présence de motifs répétés et d'épitopes non linéaires, affinité pour les molécules HLA de classe II, *etc.* Les facteurs de risque liés à la production de la PT sont relatifs au système de production, de purification et de stockage utilisés : stabilité, capacités de dénaturation et d'agrégation, certaines glycosylations et MPT, présence d'impuretés et contaminants ayant le rôle d'adjuvants, conditions de stockage (en solution ou poudre, température), *etc.* Enfin, ils impliquent l'activité même de la PT : activité immunostimulante ou immunosuppressive, CPA comme cibles cellulaires, *etc.* Des facteurs liés à la qualité et la stabilité du produit constituent donc un risque.

Il faut 3 signaux afin qu'un LTh puisse être activé par une CPA présentant un Ag provenant d'une PT. Le signal 1 est constitué par l'interaction des complexes TCR et p-HLA. Ainsi, tout facteur augmentant la présentation d'un peptide issu d'une PT augmente le risque d'immunogénicité : séquence immunogénique, faible tolérance périphérique, certaines modifications post-traductionnelles (MPT), répétitions de fortes doses, *etc.* Ensuite, les molécules de costimulation fournissent le second signal, tout facteur influençant de manière positive un contexte inflammatoire augmente alors le risque : mode d'administration, état du système immunitaire du patient, *etc.* Ainsi, les facteurs influençant le système immunitaire adaptatif vont plutôt moduler le signal 1, ceux influençant le système immunitaire inné vont plutôt moduler le signal 2 et le signal 3 va moduler le type de réponse immunitaire. S'il favorise une réponse Th2, les LTh peuvent alors activer des LB qui sécréteront des ADA.

I.4.2. Facteurs liés au traitement

Les facteurs de risque liés au traitement concernent l'administration du produit. Une fréquence et une durée du traitement courtes sont des facteurs de risque limitant l'immunogénicité. C'est d'ailleurs la première raison de l'apparition d'ADA contre des PT utilisées pour des maladies chroniques plutôt que pour des maladies aiguës, une unique injection présente bien moins de risques qu'une administration répétée et fréquente. Aussi, une forte dose a plus de risques de captation d'une PT par les CPA qu'une faible dose. Enfin, la voie d'administration peut moduler les risques d'immunogénicité, certaines voies étant plus propices à l'inflammation ou la captation par les CPA que d'autres. L'inhalation, l'injection sous-cutanée, intrapéritonéale, intramusculaire et intraveineuse présente des risques décroissants. Dans une certaine mesure, les facteurs liés au traitement sont donc ceux sur lesquels les professionnels de santé peuvent moduler le plus de paramètres. En effet, il est souvent possible d'ajuster les conditions d'administration tout en conservant un effet thérapeutique. Cependant, un juste équilibre doit être imposé entre une baisse du risque d'immunogénicité et celle de l'efficacité thérapeutique, tout en prenant en compte les facteurs liés au patient et au produit.

I.4.3. Facteurs liés au patient

Les facteurs de risque liés au patient sont nombreux et peuvent concerner une cohorte entière ou le patient de manière individuelle. Ils concernent tous le système immunitaire du patient. Des facteurs génétiques tels que certains phénotypes HLA de classe II, des

polymorphismes portés par des cellules immunitaires (TCR, récepteurs aux cytokines et Fc des Ac, *etc.*), l'absence de protéine homologue endogène ou une version mutée de cette dernière peuvent constituer des facteurs importants. Selon l'âge, le système immunitaire peut présenter un stade de maturité différent chez des patients enfants ou pré-adolescents, il présente généralement des défaillances chez les séniors. La présence d'ADA ou de LT CD4⁺ spécifiques de la PT préexistant chez le patient présente un risque supplémentaire qu'il est possible de prédire. Aussi, une pathologie auto-immune ou inflammatoire peut constituer un contexte physiologique plus risqué comparé à un cancer ou une immunodéficience (malnutrition, SIDA). Enfin, la présence d'un traitement précédent ou parallèle peut modifier le risque d'immunogénicité (immunosuppresseurs, ADA développés contre une PT précédemment utilisées, *etc.*) (European Medicines Agency 2017). Par exemple, l'utilisation du méthotrexate (anti-métabolites) en parallèle de l'Adalimumab (mAb humain anti-TNF α) diminue l'apparition d'ADA dans le traitement de l'AR (Krieckaert, Nurmohamed & Wolbink 2012).

I.5. Evaluation de l'immunogénicité

Les PT, par leur capacité à cibler des molécules de l'organisme avec une grande précision et leur origine biologique, sont devenues de précieux alliés contre un grand nombre de maladies dont les traitements pouvaient comporter de nombreux effets secondaires. Mais ce qui constitue un atout peut aussi devenir une faille, puisque une meilleure acquisition par l'organisme peut impliquer une reconnaissance de la part du système immunitaire. L'immunogénicité des PT est un problème majeur, et ce, depuis les prémices de leur utilisation. Au-delà du danger que les ADA représentent pour la santé des patients, ils peuvent inhiber l'efficacité d'un traitement et en augmenter considérablement le coût. Ce sont ces trois facteurs qui ont poussé les laboratoires pharmaceutiques à entreprendre le développement de PT ayant un risque d'immunogénicité minimal. En se basant sur des modèles de prédiction et sur un suivi clinique des patients, d'importants moyens sont mis en œuvre pour délivrer des produits thérapeutiques de plus en plus sûrs.

I.5.1. Prédiction de l'immunogénicité

Afin de garantir une sécurité d'utilisation et une évolution des PT communes à l'ensemble des pays, les instances de réglementation doivent partager une vision et un dialogue constant. C'est pour ces raisons que les réglementations régissant les biomédicaments aux Etats-Unis, en Union Européenne et au Japon sont globalement similaires. Les réglementations sur l'évaluation préclinique de chaque PT sont centrées autour de trois objectifs : (1) Déterminer une dose sûre chez l'Homme, comprenant une dose minimale thérapeutique et une dose maximale acceptée, (2) Relever la toxicité et ses conséquences (amplitude, organes ou tissus touchés, *etc.*), (3) Identifier les paramètres de sécurité à surveiller en prévision des essais chez l'Homme.

Concernant les facteurs de risque d'immunogénicité des PT, l'évaluation préclinique comprend un grand nombre de tests pouvant les caractériser, à plusieurs niveaux :

(1) Conception : les effets de chaque modification (séquence en acides aminés, MPT, *etc.*) doivent être évalués et validés, les résultats d'études cliniques obtenus précédemment pour une molécule comparable peuvent permettre un allègement de certains tests. Les tests toxicité

permettent en parallèle la recherche d'ADA et de comprendre les données chez l'animal. (2) Production : la formulation et la composition doivent être connues et maîtrisées, les contaminants (molécules issues du système de production et autres) doivent être éliminés plutôt que d'être caractérisés pour leurs effets notoires.

(3) Activité biologique : la cible de la protéine thérapeutique, particulièrement lorsqu'elle est antigénique pour les anticorps, doit être détaillée, leurs effets sur le complément, les cellules immunitaires et un large panel de tissus humains doivent être évalués afin de prédire au mieux leur immunotoxicité.

On peut comparer le problème de l'immunogénicité des PT à celui de la toxicité des COS puisque dans le développement de ces deux familles de médicaments, la détermination de la réversibilité de l'immunogénicité ou de la toxicité est une étape importante pour établir le rapport bénéfice/risque essentiel à la validation d'un médicament. Cependant, l'évaluation préclinique d'un COS peut caractériser au mieux sa toxicité et une extrapolation à l'espèce humaine est possible. Pour une PT, il n'y a pas d'extrapolation possible, l'incidence d'ADA chez les modèles animaux ne peuvent être prédictifs et interrompre une étude préclinique, sauf si des effets graves sont constatés chez plusieurs espèces (au moins deux espèces animales pertinentes sont d'ailleurs recommandées). Seuls des tests de prédiction robustes des risques d'immunogénicité permettent d'anticiper l'immunogénicité des PT. Même s'ils ne sont pour le moment ni obligatoires, ni standardisés, l'utilisation de modèles de prédiction *in silico* et *in vitro* sur des cellules T humaines est conseillé depuis peu aux laboratoires pharmaceutiques dans le cadre de la gestion des risques ([DGPSA Canada 2016](#); [European Medicines Agency 2017](#)).

Plusieurs tests de prédiction ont été développés depuis les 20 dernières années. Ils fournissent une estimation, plus ou moins précise selon le modèle, des risques d'immunogénicité d'une PT. Cependant, les résultats de ces tests aident davantage les laboratoires développeurs à s'orienter vers des molécules candidats plutôt que fournir un avis décisif sur une molécule (*go/no go*). Ils interviennent donc dans le processus de sélection de candidats au même titre que d'autres paramètres tels que la PK, la production, *etc.* ([European Medicines Agency 2017](#); [Food & Drug Administration 2014](#)). Le **Tableau 9** liste les principaux tests de prédiction d'immunogénicité des protéines thérapeutiques. Il est adapté des revues de Brinks, Gokemeijer et Maillère ([Brinks et al. 2013](#), [Gokemeijer et al. 2017](#), [Maillère et al. 2012](#)). Ces différents tests sont basés sur une ou plusieurs étapes clés de la réponse humorale initiée par les LTh et peuvent se compléter.

Compte-tenu des faibles incidence, affinité et durée d'action des ADA induits sans l'aide des Th contre des PT, ces tests sont centrés autour de la réponse T-dépendante. Ils étudient l'implication des CPA, des molécules HLA de classe II, des cellules Th, de cytokines spécifiques et des LB. Les ADA peuvent être induits par deux voies majeures : (1) La mise en route d'une réponse adaptative classique, la PT est considérée par le système immunitaire comme étrangère, au même titre qu'une protéine non humaine par exemple. Cette voie concerne majoritairement les PT dont il n'existe pas (ou très faiblement exprimé) d'homologue endogène chez le patient. (2) La levée d'une tolérance périphérique envers la PT, les cellules B ou T spécifiques de la PT ne sont plus inhibées, au même titre que lors d'une pathologie auto-immune par exemple. Cette voie est nettement moins étudiée que la première, et concerne

majoritairement les PT dont il existe un homologue endogène ou une protéine portant des similarités de séquences chez le patient.

Les parties suivantes décrivent les modèles de prédiction et viennent compléter le **Tableau 9**, elles ont été élaborées à partir des revues de plusieurs revues ([Brinks et al. 2013](#); [Jawa et al. 2013](#); [Yin et al. 2015](#); [Gokemeijer et al. 2017](#)). L'absence de normes communes et standardisées empêche l'utilisation systématique et normalisée de ces modèles. Ils sont le plus souvent utilisés en phase préclinique, plus ou moins tardivement dans les étapes de sélection de candidats, généralement selon leur capacité de criblage : les modèles rapides et faciles à utiliser le sont au début des sélections, les modèles plus lents et complexes sont utilisés pour une liste très réduite de candidats.

Modèle	Type de méthodes	Principe	Avantages	Inconvénients
Animaux humanisés (<i>in vivo</i>)	Souris transgénique pour la PT	Recherche d'ADA	<ul style="list-style-type: none"> - Reproduit les mécanismes généraux de tolérance périphérique envers la PT - Contexte physiologique 	<ul style="list-style-type: none"> - Niveaux de tolérance et d'expression possiblement différents chez l'Homme - Pas d'éducation des cellules T sur les molécules HLA de classe II - Long et cher
	Souris transgénique pour une molécule HLA de classe II	Recherche d'ADA	<ul style="list-style-type: none"> - Prend en compte la spécificité de la molécule HLA de classe II - Contexte physiologique 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité d'un grand nombre de souris pour une représentation du polymorphisme HLA - PT considérée comme étrangère - Long et cher
	Souris reconstituée avec des cellules souches hématopoïétiques humaines	Recherche d'ADA	<ul style="list-style-type: none"> - Prise en compte de la diversité humaine - LT et LB humains - Contexte physiologique 	<ul style="list-style-type: none"> - RI partielle - Education des cellules T humaines sur des molécules CMH de classe II non humaines - Long et cher
<i>In silico</i>	Programmes informatiques de prédiction	Recherche d'épitopes T linéaires potentiels	<ul style="list-style-type: none"> - Très rapide et peu onéreux - Grande capacité de criblage - Onze algorithmes disponibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Faux positifs et faux négatifs - Ne renseigne pas sur l'amplitude de la réponse - Ne prend en compte que la structure primaire (pas les modifications non naturelles, agrégation, <i>etc.</i>)
Bio-chimique	Tests de liaison aux molécules HLA de classe II	Mesure de l'affinité pour les molécules HLA de classe II	<ul style="list-style-type: none"> - Données expérimentales - Rapide et peu onéreux - Grande capacité de criblage 	<ul style="list-style-type: none"> - Faux positifs et faux négatifs - Ne renseigne pas sur l'amplitude de la réponse - Nécessite des molécules HLA de classe II purifiées
<i>In vitro</i>	Tests cellulaires basés sur des cultures de LTh	Détection de LTh spécifiques chez des sujets sains et naïfs	<ul style="list-style-type: none"> - Reproduit la présentation par les CPA et l'activation des LTh - Evaluation de l'intensité et de la fréquence des répondeurs (amplitude du répertoire T) - Prend en compte des facteurs produit et patient (agrégation, hétérozygotie HLA, <i>etc.</i>) - Cartographie d'épitopes T 	<ul style="list-style-type: none"> - Long et cher - Nécessite un large panel de donneurs - Faible capacité de criblage

Tableau 9 : Principaux modèles de prédiction d'immunogénicité des protéines thérapeutiques.

Ac, Anticorps, **ADA**, Anticorps anti-drogue, **CPA**, Cellules présentatrices d'antigènes, **HLA**, Complexe majeur d'histocompatibilité humain, **LTh**, Lymphocytes T auxiliaires, **PT**, Protéine thérapeutique, **RI**, Réponse immunitaire, **SI**, Système immunitaire.

I.5.1.A. Modèles de prédiction *in vivo*

Le modèle murin a largement contribué à une compréhension des mécanismes impliqués dans les réponses immunitaires, tant leurs modes de fonctionnement sont proches de ceux de l'Homme. Cependant, les séquences protéiques enrôlées dans l'immunité sont spécifiques à chaque espèce, et les systèmes immunitaires murin et humain restent incompatibles. Des souris humanisées ont été développées afin de présenter des caractéristiques moléculaires et/ou cellulaires humaines. Les souches murines les plus utilisées comme modèle de prédiction *in vivo* sont les BALB/c (*Bagg Albinos*, du nom de son développeur) et les NOD (*non-obese diabetic*). Au cours d'un traitement avec une PT similaire à celui destiné à l'Homme, les ADA sont détectés et caractérisés chez chaque souris, regroupées par lots (sexe, âge, conditions de traitement, *etc.*) afin de diminuer la variabilité individuelle. Ces animaux sont des modèles d'étude vivants intéressants, ils disposent d'un système immunitaire inné et adaptatif fonctionnels. Il en existe trois sortes selon les modifications :

- (1) Les souris transgéniques exprimant une protéine humaine. Elles ont un système immunitaire murin tolérant envers la protéine car elle est synthétisée par l'organisme et peut être présentée aux cellules T et B durant leur ontogénie. Ce modèle permet d'étudier le mécanisme de levée de la tolérance, on peut citer la souris exprimant de l'IFN β humain développée pour étudier les effets de modifications (agrégation, oxydation, *etc.*) sur cette levée ([Hermeling et al. 2005](#)). Cependant, les molécules de CMH restent murines, et l'expression de la protéine peut différer de celle chez l'Homme (concentration, organes, *etc.*). Seuls les mécanismes généraux observés chez ces souris peuvent avoir une valeur descriptive, non prédictive, chez l'Homme.
- (2) Les souris transgéniques dont les CPA expriment un haplotype de molécules HLA de classe II (DR1, DR4, *etc.*). Elles sont obtenues après déplétion des gènes murins CMH de classe II puis insertion de gènes HLA de classe II. Les LT murins sont éduqués par une molécule HLA de classe II présentant des peptides murins. Les ADA sont formés par la différenciation de LTh contre la PT après présentation par la molécules HLA ([Pan et al. 1998](#)). Cependant, ces souris présentent une déficience en LT circulants, les processus d'apprêtement des Ag sur les molécules HLA sont murins et la PT est étrangère au système immunitaire. Enfin, il faut un grand nombre de souris exprimant différentes molécules HLA pour avoir une représentation minimale du polymorphisme HLA. Leur capacité de prédiction est donc très limitée.
- (3) Les souris reconstituées avec des cellules hématopoïétiques humaines. Elles sont immunodéficientes dès la naissance par mutation et à un stade encore jeune (meilleur taux de reconstitution), elles subissent une transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou de tissus humains afin de reconstituer leur système immunitaire. Les cellules souches proviennent de sang de cordon ombilical humain et les tissus humains implantés sont la moelle osseuse, le thymus, la rate, ou le foie. Il existe une quinzaine de souches de souris reconstituées, les combinaisons possibles de mutations suppressives et de reconstitutions sont nombreuses. Chaque souche présente un phénotype et des caractéristiques immunitaires particulières. Les mutations suppressives les plus couramment introduites sont au niveau des gènes :
 - PRKDC : code pour l'enzyme de réparation de l'ADN lors de la formation des BCR et TCR, sa suppression induit le syndrome *severe combined immunodeficient*, et se note -scid.
 - IL2RG : code pour la chaîne commune γ du récepteur à l'IL-2, sa suppression induit une déficience en lymphocytes, et se note IL2 γ^{null} .

- RAG1/RAG2 : codent pour les recombinaisons RAG-1/2 catalysant les recombinaisons génétiques lors de la formation des BCR et TCR, leur suppression induit une déficience en lymphocytes, et se note Rag1^{null}/Rag2^{null}.
- PRF1 : code pour les enzymes perforines, sa suppression induit une baisse de l'activité cytotoxique des lymphocytes Tc et NK, et se note Prf^{null}.

Les lymphocytes des souris reconstituées sont humains et éduqués par des molécules CMH de classe II murines. Cependant, aucun ADA de classe IgG n'a été détecté contre les PT testées, seuls des IgM sont induits de manière thymo-indépendante. Ces souris peuvent être utilisées à d'autres fins que la prédiction de l'immunogénicité, comme par exemple l'étude du développement du système immunitaire, de certaines pathologies humaines touchant les lymphocytes ou le développement de ces derniers (Brehm *et al.* 2010), ou encore des fins vaccinales contre des antigènes reconnus par des LT CD8⁺.

Les modèles de souris humanisées permettent de comparer la réponse humorale contre des PT proches ou des biosimilaires, mais leurs résultats ne sont pas prédictifs, sauf peut-être pour les protéines dont la séquence est conservée parmi les espèces. Aucun de ces modèles ne présente de système immunitaire entièrement humain, les parties murines restantes ayant une réactivité différente des équivalents humains. Aussi, leur bas débit de criblage et leur prix constituent des inconvénients de poids, les rendant inapplicables en phases précoces de développement ou en tests de routine.

I.5.1.B. Modèles de prédiction *in silico*

Ces modèles de prédiction utilisent des algorithmes et des matrices mathématiques basées sur des résultats expérimentaux de tests de liaison de peptides aux molécules HLA de classe II ou d'apprêtement des peptides par les CPA. En effet, plus un peptide a d'affinité pour un grand nombre de molécules, plus il a de chances d'être présenté à un LT CD4⁺ et l'activer. Ces algorithmes modélisent la capacité de séquences linéaires de 15 acides aminés à se lier aux nombreuses molécules HLA de classe II répertoriées. Ces peptides sont issus d'une séquence protéique à étudier et couvrent tous les 15-mer possibles. Chaque résidu d'un 15-mer est pris en compte selon ses caractéristiques physicochimiques (charge électrique, polarité, chaîne latérale, *etc.*). Un score lui est donné pour chaque position du sillon de liaison d'une molécule HLA, chaque 15-mer présente un score propre à un positionnement dans le sillon d'une molécule HLA. La répartition de chaque molécule HLA dans la population humaine ainsi que les séquences communes au génome humain et au microbiome peuvent aussi être pris en compte. Le score de chaque 15-mer donne lieu à un classement, allant des moins affins aux plus affins. Dans une séquence protéique donnée, des épitopes de cellules T CD4 potentiels peuvent être identifiés en fonction de leur affinité pour les molécules HLA de classe II. Il existe onze algorithmes dont la plupart sont destinés à un usage public, les autres sont destinés à la commercialisation. Ces algorithmes se différencient principalement par leur manière d'aligner les séquences et de générer des résultats. Il y a cinq méthodes principales de prédiction *in silico* à usage public : réseau artificiel neuronal évolutif (NetMHCIIpan et NN-align), matrice de stabilisation des alignements (SMM-align), bibliothèque combinatoire à balayage de positions (Combinatorial library), matrice de notation (Sturniolo) et liaison relative moyenne (ARB) (Paul *et al.* 2013).

Un modèle mathématique basé sur l'effet des ADA sur la clairance des PT a aussi été développé. Inspiré de traditionnels modèles mathématiques de PK/PD, il établit une relation entre l'altération de la PK d'une PT et l'ampleur de la réponse en ADA (délai et intensité, taux d'affinité, *etc.*). Ce modèle permet d'anticiper l'immunogénicité dans un contexte physiologique et considère d'autres paramètres que les modèles *in silico* traditionnels (apprêtement et présentation de l'Ag, *etc.*), il constitue donc un complément si ce n'est une alternative intéressante aux modèles de prédiction *in silico* classiques (Chen *et al.* 2013).

Cependant, ces modèles *in silico* ne prennent pas en compte le répertoire des cellules T qui peut répondre aux épitopes identifiés, ainsi que les mécanismes cellulaires à l'origine du chargement des Ag sur les molécules HLA. Ils ne prennent par exemple pas en compte les sites de clivage des protéases contenus dans les PT, ni le rôle d'éditeur important de la molécule HLA-DM dans l'apprêtement des peptides aux molécules HLA de classe II, *etc.* (Messitt *et al.* 2011; Sant *et al.* 2005). Ils ne sont donc pas suffisants à la conception de PT non immunogènes.

Les modèles *in silico* sont le plus souvent utilisés en phase précoce de développement pour leur haut débit de criblage. Ils permettent d'identifier de potentiels épitopes et de guider les industriels dans la conception et l'obtention d'une liste réduite de candidats présentant un risque minimal. Ils peuvent aussi se révéler utiles pour limiter le nombre d'épitopes et de sites favorables à l'agrégation des PT par exemple. La prédiction est néanmoins plus précise pour les molécules HLA de classe I que pour les classes II qui peuvent lier des peptides de longueurs différentes (Wang *et al.* 2008). Ces modèles *in silico* sont sans cesse améliorés, notamment par l'intégration de paramètres tels que la stabilité des complexes p-HLA, des sites de restriction des protéases endosolysosomales et de MPT, *etc.*

I.5.1.C. Modèles *in vitro* de liaison aux molécules HLA de classe II

Ces modèles mesurent l'affinité de peptides pour les molécules HLA de classe II. Cette affinité donne une estimation de leur capacité à être présentés aux LT CD4⁺ par les CPA. Il existe de deux types de modèles :

(1) Modèle biochimique : c'est un ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de liaison aux molécules HLA de classe II qui mesure une IC₅₀ pour chaque peptide testé sur une molécule HLA précise. Le test peut se faire en compétition avec un traceur biotinylé ou en direct avec diverses techniques de séparation du peptide (colonne d'élution suivie d'une électrophorèse sur gel, *etc.*). L'ELISA en compétition est le plus répandu des deux car plus reproductible, facile et rapide. L'IC₅₀ est calculée par une analyse en régression non-linéaire des résultats des différentes dilutions du peptide à tester. Elle est ensuite comparée à celle d'un peptide de référence présentant une bonne affinité pour la molécule HLA, donnant une affinité relative. Plus l'IC₅₀ du peptide est grande par rapport à celle de la référence, moins le peptide a d'affinité pour la molécule. Aussi, plus un peptide présente d'affinité pour un grand nombre de molécules HLA de classe II, plus il a de chances d'être présenté à un Th (Justesen *et al.* 2009).

(2) Modèle *MHC-Associated Peptides Proteomics* (MAPPS) : analyse les peptides associés aux molécules HLA par chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse (LC-MS) après les avoir fait apprêter par des CPA. Ce test est plus complet car il prend en compte l'internalisation, le clivage et le chargement des peptides par les CPA contrairement au modèle biochimique qui ne prend en compte que la dernière étape. Un nombre plus restreint de

potentiels épitopes de cellule T peut en résulter, permettant d'identifier des épitopes de cellule T potentiellement dominants au profit d'un grand nombre de peptides bons ligands. Cependant, il est plus complexe à effectuer, notamment par le traitement des CPA suivi de l'analyse par LC-MS. De plus, ce système n'apporte pas de valeur d'affinité pour les molécules HLA de classe II et peut limiter la présentation de certains épitopes T au profit de peptides non désirés (CLIP, protéines du milieu, *etc.*) (Park *et al.* 2003). Ce test est souvent utilisé en parallèle de modèles de culture *in vitro* sur plusieurs PT afin de pouvoir les comparer (Anette, Spindeldreher & Frank 2016).

Au même titre que les modèles *in silico*, ceux-là ne traitent que la phase de présentation des peptides en surface des CPA. Ils ne prennent par exemple pas en compte les facteurs d'activation des LT CD4⁺ ni des LB, et n'informent aucunement sur le répertoire de cellules T et ses caractéristiques (LT naïfs ou mémoires, affinité pour les peptides, *etc.*). Ils ne mesurent que des paramètres propres à la présentation d'Ag, et non à sa reconnaissance. De plus, l'affinité mesurée est relative, et dépend donc de celle du peptide de référence et peut varier d'une molécule HLA de classe II à une autre.

Ces modèles ne représentent pas une méthode de prédiction du potentiel d'immunogénicité d'une PT à eux seuls, il est nécessaire de les coupler à d'autres modèles. Ils fournissent cependant les données expérimentales qui ont servi de bases aux algorithmes des modèles de prédiction *in silico*. Leur débit important a permis de collecter des résultats sur un grand nombre de séquences peptidiques et de molécules HLA de classe II.

I.5.1.D. Modèles de prédiction *in vitro* de culture de cellules T humaines

Ces modèles consistent en la culture en lignées de LT CD4⁺ issus de donneurs sains avec amplification de cellules spécifiques d'une PT ou de peptides chevauchants couvrant une séquence de PT. La stimulation des LT CD4⁺ par des CPA autologues préalablement chargées avec la PT permet l'activation des cellules spécifiques. La phase d'amplification est nécessaire pour détecter le signal de précurseurs dont la fréquence est très faible. En caractérisant l'activation des LTh (sécrétion cytokinique, expression de marqueurs de surface, *etc.*) lors d'une ultime stimulation, il est possible d'estimer le nombre de cellules spécifiques de la PT circulant dans le sang des donneurs sains. Ces modèles de prédiction du potentiel d'immunogénicité des PT sont les plus précis de tous et s'inspirent des mécanismes d'activation des LTh au sein des ganglions lymphatiques. Contrairement aux autres modèles, ils prennent en compte les étapes internes aux CPA (internalisation, clivage, apprêtement et présentation de l'Ag) et l'activation des lymphocytes Th. Aussi, des facteurs de risque d'immunogénicité liés au produit (contaminants, MPT, *etc.*) peuvent être étudiés et ils permettent d'identifier avec précision des épitopes T, chose dont les autres modèles sont incapables.

L'évaluation de la spécificité des lignées de LT CD4⁺ se fait en comparant l'expression de cytokine(s) spécifique(s) d'activation (IFN γ) ou de prolifération (IL-2) avec ou sans PT. Cette évaluation peut se faire par test ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) ou FluoroSpot (ELISpot avec marqueurs fluorescents), par analyse de cytométrie en flux ou par ELISA, avec une précision respective décroissante. Les tests ELISpot et FluoroSpot permettent de quantifier le nombre de cellules activées par la sécrétion de cytokines marquées par des *spots* (Castelli *et al.* 2007). L'analyse en cytométrie en flux permet de quantifier l'expression de marqueurs de

surface. L'ELISA permet de mesurer la quantité de cytokines sécrétées dans le surnageant par puits de culture. Il existe actuellement quatre principaux protocoles de culture de LTh avec des DC autologues chargées avec la protéine à étudier. Chacun d'eux est développé par un laboratoire et comporte une durée de culture et une évaluation de spécificité propres : (1) Antitope cultive durant cinq jours et évalue la prolifération cellulaire en présence de thymidine tritiée et la sécrétion d'IL-2 par ELISpot. (2) Le CEA cultive durant trois semaines, assure la prolifération cellulaire par des stimulations hebdomadaires et évalue la sécrétion d'IFN γ par ELISpot. (3) Lonza cultive durant une durée confidentielle et évalue la prolifération en présence de 5-éthynyl-2'-déoxyuridine (EdU) par cytométrie et la sécrétion d'IFN γ par FluoroSpot. (4) Proimmune cultive durant sept jours et évalue la prolifération en présence de carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE) par cytométrie. Notons que la durée de culture influence la sensibilité tandis que le test d'évaluation influence la précision. Une longue durée de culture cellulaire permet d'amplifier le nombre de cellules et de détecter un signal très faible contrairement à une durée courte qui permet en contrepartie de gagner du temps et d'effectuer davantage de tests en parallèle. Un test d'évaluation précis permet de se rapprocher le plus possible de la valeur réelle à mesurer mais se traduit généralement par un coût et une demande de moyens plus élevées. Ainsi, un choix entre précision et rendement du protocole est à faire selon les besoins d'étude d'une PT. Concernant le protocole développé par le CEA, il constitue la formule la plus fidèle et précise puisqu'il est le seul à quantifier les résultats de manière absolue. Les autres modèles mesurent les résultats de manière relative en comparant plusieurs molécules. Une formule statistique de loi uniforme est appliquée au nombre de lignées spécifiques et au nombre de cellules introduites dans chaque lignée en début de culture, et donne une estimation du nombre de LTh spécifiques par million de LTh dans le sang. Plus ce résultat est élevé, plus la PT présente de cellules spécifiques au sein d'un répertoire naïf de cellules T. Ce résultat est directement lié au potentiel immunogénique car la réponse mémoire dépend de la taille du répertoire naïf de cellules T. Si les tests sur des cellules issues de patients sont difficiles à effectuer en raison de leur faible disponibilité, la sélection des donneurs peut apporter des informations importantes (phénotype HLA de classe II, âge, sexe, *etc.*).

Cependant, ces modèles ne reproduisent pas entièrement la réponse humorale puisqu'ils ne prennent pas en compte l'activation des LB. Aussi, leur mise en œuvre est très onéreuse et chronophage, leur faible débit les rendant inapplicables à large échelle en phase préliminaire de développement. Il faut un nombre conséquent de donneurs pour avoir une bonne représentation des phénotypes HLA de classe II. On compte une vingtaine de donneurs pour couvrir les phénotypes HLA majeurs, et attendre les résultats plusieurs semaines. L'expansion des cellules spécifiques nécessite en effet plusieurs stimulations hebdomadaires. Des méthodes culture cellulaire sur de courtes périodes permettent de tester davantage de donneurs mais perdent nettement en sensibilité. Enfin, un même donneur ne peut fournir assez de cellules que pour l'évaluation en parallèle de quelques molécules seulement.

Ces modèles sont utilisés en complément des modèles *in silico* durant les phases tardives de développement, lorsqu'un nombre restreint de candidats ont été sélectionnés, pour valider des modifications visant à baisser le potentiel immunogénique par exemple. Ils ont aussi permis de confirmer l'immunogénicité cliniquement observée pour de nombreuses PT (Maillère *et al.* 2012). Enfin, plusieurs améliorations pourraient être apportées à ces modèles : une meilleure

distinction statistique des donneurs non-répondeurs, une comparaison de résultats de donneurs sains avec des patients, meilleure caractérisation des cellules étudiées (LT mémoires parmi les LTh, *etc.*).

I.5.2. Evaluation clinique

I.5.2.A. Stratégies

Afin de moduler les risques d'immunogénicité et dans l'intérêt des patients, les agences internationales de contrôle des médicaments comme la FDA et l'EMA ont adapté les règles de la pharmacovigilance aux PT. En effet, les tests de prédiction de risques d'immunogénicité des PT restent des modèles prédictifs et il est actuellement impossible de prendre en compte tous les facteurs de risques dans ces modèles, dont les résultats devront être confirmés ou infirmés lors des essais cliniques par le dosage d'ADA. Les laboratoires pharmaceutiques ont donc mis en place des stratégies d'évaluation et de minimisation des risques de l'immunogénicité. Ces stratégies se basent principalement sur trois phases successives ([European Medicines Agency 2017](#)) :

- (1) Analyse des facteurs de risque : données précliniques de la PT ou de sa classe de molécules, modèles animaux (*Cf. Tableaux 9*).
- (2) Evaluation de l'immunogénicité : avant, pendant et après les essais cliniques, tests de prédiction, titrage des ADA, classe et spécificité des ADA, effets sur la PK et l'activité biologique, étude de la réponse cellulaire, *etc.*
- (3) Diminution des risques : identification des groupes de patients à risque, dé-immunisation de la séquence, choix d'un voie d'administration, composition du produit, *etc.*

I.5.2.B. Méthodes d'évaluation

Les paramètres qui composent l'évaluation de l'immunogénicité d'une PT n'ont pas la même importance selon le contexte clinique et doivent être mis en commun afin d'apporter une évaluation la plus complète possible. Par exemple, il n'existe pas encore de marqueur ni de technique non invasive permettant l'étude de la pharmacodynamique (PD), et les données sur la PD et la PK seules ne renseignent pas sur l'immunogénicité d'une PT. Aussi, la caractérisation des ADA est un élément important puisque leur influence sur le traitement et la santé du patient doit être connue le plus tôt possible. L'occurrence de NADA est associée à un risque élevé pour la santé des patients puisqu'ils peuvent diminuer l'effet du traitement et induire une réaction autoimmune lorsqu'il existe un homologue endogène à la PT. Au contraire, la présence de NADA peut ne pas être corrélée avec l'efficacité du traitement comme c'est le cas avec les IFN β dans le traitement contre la SEP ([Link et al. 2017](#)). La baisse d'efficacité du traitement peut être due à des CADA, des NADA ou une combinaison des deux ([Kramer 2016](#)). Enfin, la caractérisation des ADA peut varier selon les méthodes utilisées, puisque chacune d'elle comporte des paramètres différents (seuil de détection, précision, capacité de criblage, *etc.*). Il existe six tests principaux de détection des ADA ([Nencini et al. 2014](#); [Yin et al. 2015](#)) :

- (1) ELISA : les ADA sont capturés par la PT fixée au support, la détection se fait par des anti-ADA ou la PT marquées. Ce test détient une sensibilité acceptable, une haute capacité de

criblage et un coût faible, c'est pourquoi il est le plus couramment utilisé. Les résultats peuvent être cependant perturbés par la présence de la PT circulante et ne pas détecter des ADA issus d'une réponse primaire (faible affinité ou se dissociant rapidement).

(2) *Radio-ImmunoAssay* (RIA) : les ADA sont capturés sur une colonne Sepharose et détectés par la PT radio-marquée. Ce test détient une excellente sensibilité, une capacité de criblage et un coût modérés. Comme l'ELISA, les résultats du RIA peuvent être perturbés par la présence de la PT circulante et ne pas détecter des ADA issus d'une réponse primaire.

(3) *Electrochemiluminescence-assay* (ECLA) : les ADA sont capturés par la PT et détectés par des anti-ADA marqués au ruthénium (métal). Ce test détient une excellente sensibilité et une haute capacité de criblage. Il a cependant un coût important selon les réactifs et ne détecte pas bien les ADA se dissociant rapidement.

(4) *Surface plasmon resonance* (SPR) : les ADA sont capturés par la PT et détectés par oscillations de la résonance causées par la liaison à la PT. Ce test détient une excellente sensibilité, une capacité de criblage modérée et un coût important. Il peut aussi détecter des ADA issus de la réponse primaire et déterminer la classe des ADA.

(5) *pH-shift anti-Idiotypic Antigen-binding* (PIA) : les complexes immuns sont dissociés par changement de pH, les ADA libres puis les ADA libérés sont ensuite détectés par un test de liaison à l'Ag (ELISA, RIA, etc.). Ce test détient une capacité de criblage et un prix moyens. Il peut cependant différencier les ADA libres des ADA liés à la PT sous forme de complexe immun et il n'est pas sensible à la présence de PT circulante. Il est encore peu utilisé car son développement est récent.

(6) *Homogeneous mobility shift assay* (HMSA) : les complexes immuns sont dissociés par baisse de pH, les ADA libres puis les ADA libérés sont ensuite capturés par la PT marquée et détectés par fluorescence. Ce test détient une excellente sensibilité (détecte toute classe d'ADA) une capacité de criblage faible et un coût important. Comme le HMSA, il est insensible à la présence de PT circulante et son développement est encore récent.

Enfin, la phase de diminution des risques constitue la phase décisionnelle durant laquelle le laboratoire adapte les résultats obtenus précédemment aux besoins d'utilisation de la PT. D'un point de vue purement clinique, les conséquences des ADA importent davantage que leur occurrence. En effet, il est préférable d'avoir un grand nombre de patients développant des ADA sans conséquences sur leur santé ou le traitement plutôt qu'un faible taux de patients développant des ADA ayant des conséquences graves (**Kramer 2016**). A titre d'exemple, la FDA a retiré du marché en 2013 le Pégénésatide dont le risque de réaction anaphylactique fatale est de 1 / 2500 alors l'étecalcétide est toujours autorisé avec un taux d'ADA de 7,1% (ces ADA n'influencent ni la PK, ni l'efficacité thérapeutique, ni la santé des patients) (**Hermanson, Bennett & Macdougall 2016; Kroenke et al. 2017**).

CHAPITRE II. LA RELAXINE-2 HUMAINE

II.1. Historique et classification

II.1.1. Historique

La Relaxine est une protéine découverte en 1926 suite à l'observation de la relaxation du ligament pubien de femelles cochon d'Inde vierges durant les chaleurs et après injection de sérum de femelle gestante (**Hisaw 1926**). C'est en 1930 que l'hormone fut nommée Relaxine, suite à sa purification à partir du corps jaune chez la truie. Il faudra cependant attendre les années 1960 pour que la Relaxine regagne en intérêt scientifique, le contexte économique durant la seconde guerre mondiale étant un frein sérieux à la recherche sur un sujet annexe tel que la reproduction. Durant cette période incertaine, seules quelques expériences à partir de Relaxine de porc montraient des effets physiologiques pendant la gestation qui furent validés des années plus tard. Dans les années 1960, les équipes de Casten ont tenté d'utiliser certaines propriétés de la Relaxine porcine chez l'Homme, nommée à l'époque Releasin et administrée sous forme de solution partiellement purifiée, afin de traiter la sclérodémie, le syndrome de Raynaud et optimiser le déclenchement et la durée de l'accouchement (**Casten & Boucek 1958, Casten et al. 1960**). Ces expériences se basaient respectivement sur la capacité de la Relaxine à modifier la structure du collagène dans la peau, à faire disparaître les symptômes du syndrome de Raynaud durant le premier trimestre de la gestation, et à modifier la contractilité et la maturation de certains tissus de l'utérus. Ces observations avaient été notées à la fois sur des modèles animaux et chez l'Homme. Les injections intramusculaires de Releasin ont eu pour effets temporaires d'amplifier les problèmes de circulation sanguine déjà présents chez les patients, et n'ont montré aucune efficacité sur les effets escomptés. Par ailleurs, la FDA durcissait sa réglementation, ce qui mit rapidement fin aux tests de la Releasin sur l'Homme et limita l'intérêt pour la Relaxine jusqu'aux années 1980. Les méthodes de caractérisation des protéines ont permis de mieux étudier la Relaxine et sa structure, mais elle représentait toujours un sujet délicat sur plusieurs aspects. Entre autres, son activité physiologique espèce-dépendante, sa structure complexe difficilement synthétisable et le peu de connaissances sur ses récepteurs ont considérablement ralenti l'avancée de la Relaxine dans la littérature et les expériences scientifiques (**Sherwood 2004**). Depuis le début des années 2000, elle représente un enjeu scientifique et commercial important dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Aujourd'hui, la Relaxine a été identifiée et étudiée chez plus de 25 espèces mammifères.

II.1.2. La famille de peptides Relaxine

La famille de peptides Relaxine est composée de 7 peptides possédant 6 résidus cystéine conservés formant 3 ponts disulfures mais une séquence protéique propre. Ces peptides ont des équivalents chez tous les mammifères et jouent des rôles différents dans les systèmes reproducteur principalement, mais aussi nerveux et cardiovasculaire. Leurs fonctions physiologiques ont été observées chez des mammifères modèles (cochon d'Inde, rat, porc) puis chez l'Homme, et diffèrent selon les espèces. On distingue deux sous-groupes à l'intérieur de

la famille de peptides Relaxine : les peptides Relaxine-1-2-3, et les *Insulin Like Peptides* INSL-3-4-5-6. Dans ce manuscrit, on nommera par la suite les peptides Rln et les gènes correspondant RLN. Cette dichotomie dans la nomenclature des peptides découle directement de leur structure, et la numérotation de l'ordre de leur découverte. La Rln2 constitue la Relaxine que l'on retrouve sécrétée dans le sang et le peptide le plus connu de la famille Relaxine. D'ailleurs, le terme général Relaxine fait référence à ce peptide, sur lequel nous nous concentrerons dans ce chapitre puisqu'il a constitué notre modèle d'étude.

II.1.3. La superfamille d'hormones Insuline

L'hormone Insuline, les facteurs de croissance *Insulin-Like Growth Factors* (IGF) I et II et les 7 peptides de la famille Relaxine font partie de la superfamille d'hormones Insuline. Ils partagent une faible homologie de séquence, autour de 25%, avec l'Insuline mais une similarité structurelle importante : une chaîne α et une chaîne β dont la chaîne α contient un pont disulfure intra-domaine, les deux chaînes étant reliées par deux autres ponts disulfures. D'ailleurs, cette structure commune laissera longtemps penser que la Relaxine et l'Insuline étaient identiques et compliquera l'identification des récepteurs à la Relaxine. Il faudra attendre de pouvoir purifier et caractériser précisément les protéines en 1977 pour que l'on différencie les deux hormones et crée la superfamille d'hormones Insuline ([Schwabe & McDonald 1977](#)), suite au postulat de l'existence d'un gène ancestral commun à la Relaxine et l'Insuline. La biosynthèse de l'Insuline humaine constitua d'ailleurs la toute première protéine recombinante ([Weinges, Ehrhardt, & Enzmann 1981](#)).

II.2. Génétique

II.2.1. Organisation génique

Les travaux de Hsu soutiennent le postulat d'un gène ancestral entre les différents peptides de la famille en montrant une structure génétique commune aux 7 gènes codant pour les peptides de la famille Relaxine ([Hsu 2003](#)). En effet, tous les peptides sont issus de précurseurs peptidiques similaires formant 2 chaînes peptidiques après découpage et activation par des proprotéines convertases. En 2005, il sera montré que le peptide Relaxine-3 constitue l'ancêtre des peptides de la famille Relaxine chez les mammifères, c'est le seul qui ait conservé les résidus de liaison et d'activité biologique quelle que soit l'espèce ([Wilkinson et al. 2005](#)). La **Figure 13** schématise l'organisation du gène RLN2 et sa transcription en ARNm, elle est tirée de l'article de Bathgate ([Bathgate, Hsueh, & Sherwood 2006](#)).

Le gène RNL2 est constitué de 4 712 pb, organisées en 2 exons de part et d'autre d'un intron de 3 924 pb, cette organisation est similaire aux autres gènes RLN. L'épissage alternatif peut donner lieu à 2 isoformes. Chez l'Homme, il est localisé en 24^{ème} position du bras court du chromosome 9, notée 9p24, tout juste avant les gènes RNL1 et INSL4-6 ([Bathgate et al. 2013](#)). Les gènes RLN3, INSL3 et INSL5 ont respectivement pour localisation 19p13.3, 19p13.2 et 1p31.1. Son clonage chez l'Homme a été effectué l'année après celui du RLN1 par la même équipe de chercheurs ([Hudson et al. 1984](#)). Les gènes RNL1 et RNL2 ont 95% d'homologie de séquence mais ont une expression différente selon le tissu dans l'organisme ([Garibay-Tupas et al. 2004](#)). La Rln1 est le premier peptide de la famille dont le gène, nommé

RNL1, ait été cloné en 1983 à partir d'ADNc de Relaxine porcine (Hudson *et al.* 1983). L'humain et les grands primates sont les seuls mammifères à détenir les gènes RNL1-2, tandis que les autres ne disposent que du gène RNL1, il semblerait que cette différence provienne de la duplication du gène durant l'évolution des primates. Le rôle du gène RNL1 chez l'Homme et les grands primates est d'ailleurs très mal connu, tandis que le peptide issu du gène RNL1 chez les autres mammifères pendant la gestation correspond à la Rln2 durant la grossesse chez l'Homme. Cependant, la Rln1 semble avoir des homologues chez certains poissons et crapauds, indiquant que l'apparition de son gène date d'avant la différenciation du taxon des mammifères dans l'évolution des espèces (Wilkinson *et al.* 2005).

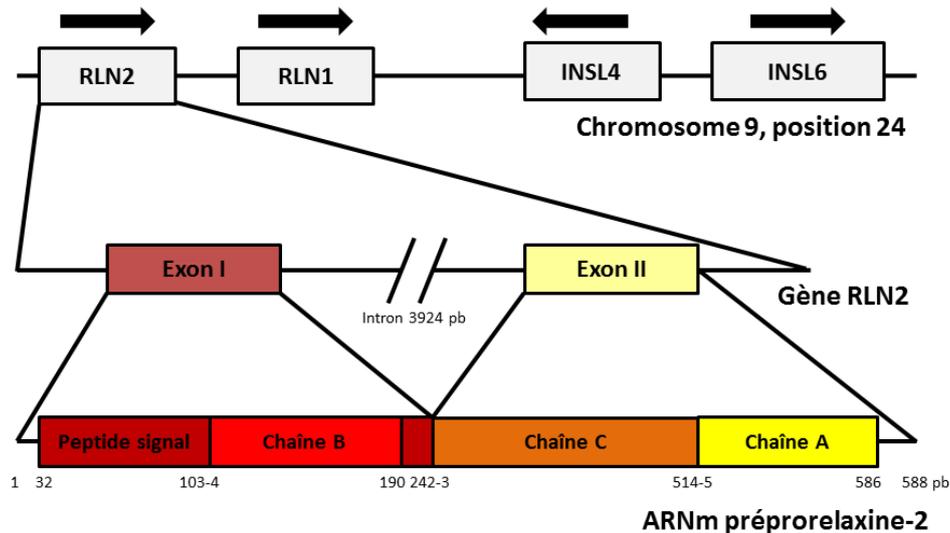


Figure 13 : Représentation schématique de la transcription du gène humain de la Relaxine-2.

ARNm, Acide désoxyribonucléique messenger, **INSL**, Gène codant pour le peptide pseudo-Insuline, **pb**, paires de bases azotées, **RLN**, Gène codant pour le peptide Relaxine.

II.2.2. Expression et régulation

Comme leurs fonctions, l'expression des peptides de la famille Relaxine concerne principalement les organes impliqués dans la reproduction, mais aussi des organes tels que le cœur, le cerveau, le thymus, et les reins. Ces organes varient selon le peptide et le mammifère. Par exemple, la Relaxine circulant dans le sang est produite en partie par le corps jaune chez le rat, la souris, le cochon et l'Homme tandis qu'elle est produite par le placenta chez le lapin (Sherwood 1994).

La Rln2 est produite par une multitude de tissus dans le corps humain : cerveau, cœur, vaisseaux sanguins, poitrine chez la femme, poumons, peau, reins, foie, os et gonades chez les deux sexes. Son niveau de circulation dans l'organisme, homme ou femme, est extrêmement bas, de l'ordre du nanomolaire. Chez la femme, elle est sécrétée par les ovaires sous l'action de l'œstrogène durant la phase lutéale du cycle menstruel, juste après l'ovulation et jusqu'au dernier jour du cycle ovarien. Son expression et celle de RXFP1 est aussi importante dans l'endomètre utérin à cette période du cycle. Chez la femme enceinte, sa sécrétion par le corps

jaune à l'intérieur des ovaires après l'ovulation est contrôlée par la progestérone de ce dernier. Elle connaît son plus haut taux de sécrétion durant le premier cycle de la grossesse et n'agit pas directement lors de l'accouchement contrairement à ce qui a été observé chez d'autres espèces. En l'absence de fécondation, la prolactine et la progestérone maintiennent une expression haute de la Rln2 jusqu'à la fin de la phase lutéale. Chez l'homme, la Rln2 est à une concentration sanguine faible et est presque 10 fois plus concentrée dans le sperme (autour de 10 nM). Elle est sécrétée par les testicules et par la prostate.

L'expression de RLN2 est régulée par un promoteur, situé en amont dans l'ADN. Il a été montré que RLN2 peut s'autoréguler positivement par la liaison de la Rln2 à un récepteur de glucocorticoïdes à l'intérieur du noyau (**Dschietzig, Bartsch, et al. 2009**). Le complexe Rln2-récepteur se lie ensuite à des portions d'ADN situées environ 200pb en amont du promoteur du gène RLN2, nommées Eléments de Réponse aux Glucocorticoïdes (GRE), qui vont activer le promoteur du gène RLN2 et par conséquent augmenter son expression dans la cellule. C'est le même mécanisme qui a été observé durant l'étude de Garibay-Tupas sur l'effet de la progestérone et des glucocorticoïdes sur l'expression de RLN2. Il a aussi été démontré que l'expression des gènes RLN1 et RLN2 pouvait être augmentée par différents facteurs : le MPA et le Dex chez des lignées de choriocarcinome et la progestérone et les glucocorticoïdes chez un autre modèle cellulaire. Des cellules de choriocarcinome placentaire JAR ont servi de modèle cellulaire dans cette étude car l'expression de RLN2 est trop faible dans tous les types de cellule primaire humaine (**Garibay-Tupas et al. 2004**). Chez l'homme, l'expression de RLN2 est augmentée durant la différenciation neuroendocrine des cellules de la prostate (**Figueiredo et al. 2005**). Il a d'ailleurs été démontré *in vitro* que RLN2 est surexprimé dans les cellules de prostate cancéreuses par rapport aux cellules saines, cette surexpression étant causée par la liaison d'une protéine mutante, P53, directement au promoteur de RLN2. Les mutations de P53 sont à l'origine d'environ 70% des cancers de la prostate (**Vinall et al. 2006**). La Rln2 peut aussi induire l'expression d'un antigène spécifique de la prostate à travers un récepteur des androgènes, mais aussi augmenter la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de prostate cancéreuses (**Vinall et al. 2011**). Ces découvertes font de RLN2 un marqueur potentiel dans le domaine du cancer de la prostate, d'autres études ont depuis repris cette thématique.

La Rln1 elle est produite principalement par les gonades et n'est pas sécrétée dans le sang chez l'Homme. Une récente étude a entre autres démontré une sous-expression du gène RLN1 chez des lignées cellulaires d'adénocarcinome de prostate par rapport aux tissus normaux, résultats encourageants pour l'étude du rôle de RLN1, puisqu'à ce jour aucun intérêt clinique n'a été découvert pour la Rln1 (**Tevz et al. 2016**).

La Rln3 est un neuropeptide, sécrété par les neurones et joue principalement un rôle de neuromodulateur. Il est le dernier peptide de la famille Relaxine à avoir été découvert en 2002, lors du criblage du génome humain (**Bathgate et al. 2002**) et était alors appelé INSL7. Elle contient aussi le motif d'acides aminés Arg-X-X-X-Arg-X-X-Ile requis pour la liaison et l'activation du récepteur à la Relaxine (**Sudo et al. 2003**) : elle est majoritairement exprimée dans le système nerveux central, plus particulièrement dans le noyau incertus, situé dans la partie postérieure du cerveau chez l'Homme. La Rln3 est aussi exprimée dans la colonne vertébrale, le thymus et les testicules (**Liu et al. 2003**), son rôle dans les mécanismes liés à la reproduction est encore très peu connu.

Le peptide INSL3 a été découvert en 1993 grâce au clonage du gène INSL3 codant pour sa synthèse chez le sanglier, à partir d'une bibliothèque d'ADNc de cellules testiculaires (**Adham et al. 1993**). Plus précisément, il s'agissait de cellules de Leydig, qui sécrètent 95% de la testostérone chez l'homme, d'où son nom originel *Leydig cell Insulin-Like peptide* (Ley I-L). INSL3 est quasi-exclusivement sécrété dans les gonades, puisqu'il est aussi synthétisé mais en très faible quantité dans la poitrine, le placenta, la glande thyroïde (**Bathgate 2006**), le cerveau, les reins et les os.

Le gène INSL4 a été cloné pour la première fois en 1995, le peptide codé était alors appelé Placentine, nom rappelant son lieu d'expression majoritaire (**Chassin et al. 1995**). Depuis, seuls quelques effets potentiels dans le développement osseux lui ont été conférés (**Laurent et al. 1998**). Les peptides INSL4 et INSL6 sont les peptides de la famille Relaxine sur lesquels on connaît le moins de choses, on ne connaît ni leurs rôles physiologiques ni leurs récepteurs associés, et leurs lieux d'expression sont très peu renseignés.

Le peptide INSL5 a été identifié en 1999 à partir d'intestin humain (**Conklin et al. 1999**), organe où il est hautement exprimé, plus précisément par les cellules L entéro-endocrines. Il est essentiellement exprimé dans l'intestin mais aussi dans d'autres organes : gonades, cœur, cerveau, reins et os. Tout comme le peptide Rln1, l'INSL5 semble avoir des peptides homologues chez des espèces de crapauds et de poissons.

L'INSL6 a été identifié en 2000, à partir de l'étude de cellules testiculaires de rat et d'humain (**Lok et al. 2000**), où il est principalement synthétisé, plus précisément par les spermatozytes durant leur maturation.

II.3. Structure

II.3.1. Structure générale

Les Rln1-2-3 contiennent le motif d'acides aminés Arg-X-X-X-Arg-X-X-Ile situé au milieu de la chaîne β , nécessaire à leur activité biologique via la liaison aux récepteurs de la Relaxine, nommés RXFP, tandis que les autres peptides de la famille ne contiennent qu'au plus une partie de ce motif (**Büllesbach & Schwabe 2000**). Ce motif est d'ailleurs commun à plusieurs espèces mammifères, tout comme les ponts disulfure, le reste de la séquence des Rln variant beaucoup d'une espèce à une autre. Notamment, la chaîne α connaît davantage de disparités de séquence entre les espèces que la chaîne β (**Sherwood 1994**). La **Figure 14** ci-dessous détaille les séquences des peptides de la famille Relaxine humaine, elle est tirée de l'article de Patil (**Patil et al. 2017**).

La Relaxine-2 est une hormone de nature protéique composée de 2 chaînes peptidiques de 24 et 29 résidus chacune pour une masse moléculaire totale de 5 989 Da. Ce sont les ponts disulfures, situés au niveau des 6 cystéines hautement conservées au sein de chacun des peptides de la superfamille Insuline, qui stabilisent la structure de ces peptides. De plus, le résidu glycine en 14^{ème} position de la chaîne β est commun à tous les peptides de la famille Relaxine excepté INSL4 où il est remplacé par une isoleucine, et tient un rôle dans la flexibilité et la structure (**Büllesbach & Schwabe 1994**). La chaîne α contient un pont intra-domaine la repliant sur elle-même et se présente sous la forme d'un « U » : deux hélices aux sens antiparallèles séparées par un brin. La chaîne β forme une hélice centrale reliée aux deux petites hélices α par les ponts

disulfures. Cette structure bien particulière représente encore aujourd'hui un réel obstacle pour la synthèse chimique de ces peptides. Tout comme l'Insuline, la Rln3 et l'INSL3, la Rln2 active est formée par la division du pro-peptide ayant la configuration suivante : peptide signal en N-terminale, un domaine B, un domaine C et un domaine A en C-terminale (Hudson *et al.* 1981). Ce précurseur est composé de 185 acides aminés pour une masse moléculaire de 21 043 Da. Durant la maturation du pro-peptide, le peptide signal ainsi que le domaine C sont supprimés pour permettre la formation des 3 ponts disulfures par repliement oxydatif entre les domaines A et B qui formeront respectivement une chaîne α et une chaîne β (Büllesbach & Schwabe 2002). Un pont disulfure supplémentaire est aussi formé en intra-domaine sur la chaîne α . Un tel mécanisme est supposé mais n'a toujours pas été démontré pour les autres peptides de la famille Relaxine. Les structures tridimensionnelles des peptides Rln3 et INSL3-5 sont très similaires à celle de la Rln2. Celles des peptides Rln1, INSL4-6 sont sous documentées.

Chaîne α	Relaxine-1	R P Y V A L F E K C C L I G C T K R S L A K Y C
	Relaxine-2	Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R S L A R F C
	Relaxine-3	D V L A G L S S S C C K W G C S K S E I S S L C
	INSL3	A A A T N P A R Y C C L S G C T Q Q D L L T L C P Y
	INSL4	S G R H R F D P F C C E V I C D D G T S V K L C
	INSL5	Q D L Q T L C C T D G C S M T D L S A L C
	INSL6	R K R R G Y S E K C C L T G C T K E E L S I A C
Chaîne β	Relaxine-1	K W K D D V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S T W S
	Relaxine-2	D S W M E E V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S T W S
	Relaxine-3	R A A P Y G V R L C G R E F I R A V I F T C G G S R W
	INSL3	P T P E M R E K L C G H H F V R A L V R V C G G P R W S T E A
	INSL4	E S L A A E L R G C G P R F G K H L L S Y C P M P E K T F T T T P
	INSL5	K E S V R L C G L E Y I R T V I Y I C A S S R W
	INSL6	~ S D I S S A R K L C G R Y L V K E I E K L C G H A N W S Q F R F E ~

Figure 14 : Comparaison des séquences des peptides de la famille Relaxine.

Les acides aminés sont colorés selon leur nature : basiques en bleu (R, K et H), acides en rouge (D et E), hydrophobes en vert (A, V, I, L, F, W, Y, P et M), hydrophiles en noir (S, T, N et Q) et glycines G en gris. Les cystéines C sont surlignées en jaune et les ponts disulfures représentés par des traits noirs.

Les résidus du motif Arg-X-X-X-Arg-X-X-Ile sont encadrés en rouge.

II.3.2. Les récepteurs RXFP

Les 4 récepteurs apparentés aux peptides de la famille Relaxine sont nommés RXFP1, 2, 3 et 4, (RXFP pour *Relaxin/insulin-like Family Peptide receptor*) et appartiennent à la famille des GPCR. Cette famille de récepteurs est caractérisée par leur activation qui mène au couplage à des protéines hétérotrimériques liant le GTP (protéines G), qui à leur tour transmettent le signal à des effecteurs intracellulaires produisant une réponse cellulaire précise. La découverte récente de ces 4 récepteurs et de leur interaction avec leur ligand date des années 2000, on les a longtemps pris pour des récepteurs à activité tyrosine kinase de par la ressemblance entre les peptides de la famille Relaxine, l'Insuline et les peptides IGF-I et II (de Meyts 2004). De plus, ces récepteurs étaient à l'époque qualifiés de récepteurs orphelins car leurs ligands n'étaient pas clairement identifiés. Ceux des peptides Rln1 et INSL4-6 sont d'ailleurs toujours inconnus.

Les récepteurs RXFP1 et RXFP2 sont associés chacun à la Rln2 et l'INSL3 (Hsu 2002, Kumagai *et al.* 2002), et font partie de la sous-classe LGR de la famille A des GPCR. Ils contiennent chacun 757 et 737 résidus et autour de 80% d'homologie de séquence ainsi qu'une structure tridimensionnelle similaire. Ce sont les premiers récepteurs à avoir été associés aux peptides de la famille Relaxine, ils étaient autrefois appelés respectivement LGR7 et LGR8 car ils contiennent un domaine de séquences répétitives riches en leucine (LRR). Ce sont les seuls récepteurs de la famille GPCR à contenir un module LDL-A. Ce module de lipoprotéines joue un rôle fonctionnel important puisqu'elles inhibent la dimérisation homologue, permettent la maturation et le bon positionnement membranaire de ces récepteurs (Kern & Bryant-Greenwood 2009) ainsi que la stabilisation du ligand au domaine LRR. La partie extracellulaire de RXFP1 et RXFP2 est composée de 3 domaines : un domaine charnière lié à la partie transmembranaire, un domaine de 10 LRR puis le module LDL-A en fin de chaîne. Le domaine LRR possède une forme tubulaire légèrement courbée sous laquelle les ligands Rln2 et INSL3 sont reconnus et liés sous l'action d'un différentiel de charges électrostatiques avec le reste de la surface du LRR. En effet, la surface inférieure du LRR est chargée négativement et attire les charges positives des résidus arginine de la chaîne β des ligands. De plus, une poche de liaison formée par 4 résidus hydrophobes, toujours à la surface inférieure du LRR, va accueillir le résidu Isoleucine de la chaîne β (Büllesbach & Schwabe 2005). Une fois que cette première interaction de haute affinité entre les résidus de la chaîne β du peptide et ceux du LRR du récepteur est en jeu, c'est au tour du module LDL-A et hypothétiquement la chaîne α du ligand d'interagir avec les résidus exposés de la partie transmembranaire du récepteur pour activer ce dernier et transmettre le signal à l'intérieur de la cellule (Sudo *et al.* 2003).

Les récepteurs RXFP3 et RXFP4 sont associés chacun à la Rln3 et l'INSL5 (Liu *et al.* 2003, 2005) et font partie de la classe A de la famille Rhodopsine des GPCR. Ils étaient autrefois appelés respectivement GPCR135 ou SALPR et GPCR142 ou GPR100. Ils contiennent chacun 469 et 374 résidus car ils ont une partie extracellulaire bien plus réduite que RXFP1 et RXFP2. Comme pour la liaison de la Rln2 et INSL3 aux RXFP1 et RXFP2, les résidus arginine situés entre les cystéines de la chaîne β de la Rln3 participent à la liaison au RXFP3 par des interactions électrostatiques avec deux résidus acide aspartique et glutamique de la partie extramembranaire de ce dernier. Chez les vertébrés, le RXFP3 est exprimé dans les noyaux paraventriculaires hypothalamiques qui fournissent des induisent sécrétion de GnRH (*gonadotropin release hormone*) dans l'axe hypothalamique-hypophysaire-gonadique, ce qui souligne l'importance du rôle de son ligand la Rln3 dans le système nerveux central (McGowan *et al.* 2008). Plus récemment, il a été prouvé que les neurones d'un précurseur du circuit neuronal sensoriel et neuroendocrine chez les vertébrés expriment le gène RXFP3 (Abitua *et al.* 2015). Ces résultats laissent supposer l'hypothèse de la présence du récepteur RXFP3 et son ligand la Rln3 bien avant la division du taxon des mammifères, et corrobore donc le postulat selon lequel la Rln3 constitue l'ancêtre des peptides de la famille Relaxine chez les mammifères. Pour les 4 RXFP, la partie transmembranaire est quant à elle composée de 7 domaines transmembranaires, caractéristique des GPCR. C'est cette partie, aidée par les protéines intracellulaires partenaires qui vont activer les mécanismes des voies de transduction du signal initié par la liaison du ligand au récepteur. De ces chaînes réactionnelles vont découler une réponse cellulaire propre à chaque récepteur et à son ligand. Le **Tableau 10** répertorie les

ligands de chacun des 4 récepteurs, ainsi que les voies de signalisation associées et la répartition dans les organes humains des RXFP. Il est adapté de ceux retrouvés dans des articles de Sherwood, Bathgate et Van Der Westhuizen (Sherwood 2004, Bathgate 2006, Bathgate *et al.* 2013, Van Der Westhuizen *et al.* 2007). La **Figure 15** schématise l'organisation membranaire des RXFP1-2 et RXFP3-4. Elle est tirée de l'article de Bathgate (2013).

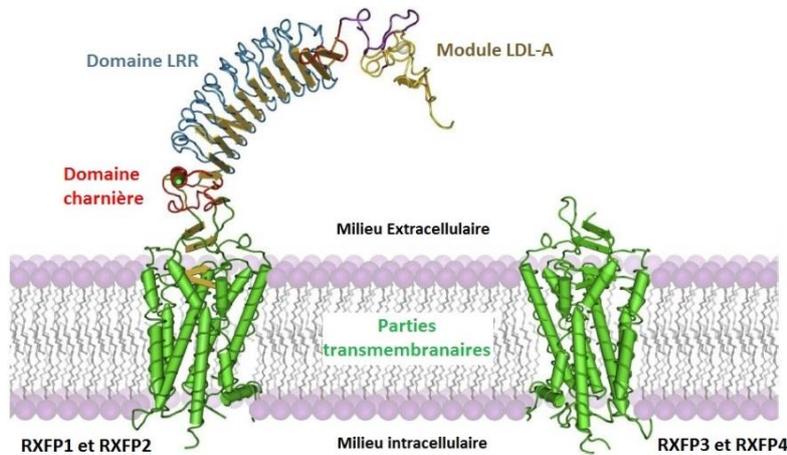


Figure 15 : Organisation générale des récepteurs RXFP humains à travers la membrane plasmique.

LDL-A, Lipoprotéine de basse densité de classe A, LRR, Répétition riche en leucine, RXFP, Récepteur aux peptides de la famille Relaxine.

- Site d'activité biologique

La chaîne β de la Rln2 porte l'activité biologique sur le RXFP1, plus précisément le motif Arg-X-X-X-Arg-X-X-Ile en milieu de chaîne. Comme travaux importants sur la relation structure-fonction de la Rln2, on peut notamment citer ceux des équipes de Hossain et plus tard de Haugaard-Kedström. La chaîne α des Rln2-3 a été tronquée jusqu'à 8 et 9 résidus en N-terminale afin d'étudier son rôle dans la liaison et l'activation de la voie de l'AMPC par les RXFP1-2-3. Cette troncature a fait perdre l'activité de liaison et d'activation de la Rln2 pour RXFP1-2 et de la Rln3 pour RXFP1 seulement, il avait été précédemment observé le même phénomène pour l'INSL3 et RXFP2. Cela signifie que les Rln2-3 interagissent de manière similaire avec RXFP1 mais que Rln3 agit différemment avec son récepteur puisque la troncature en N-terminale de sa chaîne α n'influence ni la liaison ni l'activation de RXFP3, seule sa chaîne β compte. Pour la Rln2 et l'INSL3, la chaîne α comporte un rôle secondaire mais significatif dans la liaison et l'activation de leur récepteur associé (Hossain *et al.* 2008). Ensuite, la troncature jusqu'à 6 et 5 résidus de la chaîne β par chacune des extrémités N-terminale et C-terminale n'a montré que peu d'effet sur l'activité biologique de la Rln2 (Hossain, Rosengren, *et al.* 2011). Plus tard, les extrémités C-terminale des deux chaînes de la Rln2 ont été amidées résidu par résidu afin d'étudier l'impact sur la liaison au RXFP1. Cette amidation a inhibé la dimérisation (spontanée en solution) de la Rln2 mais n'a eu aucun effet significatif sur la liaison à RXFP1. Ces résultats prouvent que cette dernière n'est pas engagée par les extrémités C-terminales contrairement aux autres peptides de la famille Relaxine et que la Rln2 peut être active sous forme de monomère (Haugaard-Kedström *et al.* 2015). D'après ces études, le rôle de la chaîne α peut donc varier selon le peptide et le récepteur engagé, mais dans le cas précis de l'activation du RXFP1 par la Rln2, l'activité biologique semble être principalement portée par la partie centrale de la chaîne β .

Récepteur	RXFP1	RXFP2	RXFP3	RXFP4
Ligands	Rln2 > Rln1 > Rln3 >> INSL3	INSL3 > Rln2 = Rln1 >> Rln3	Rln3	INSL5 = Rln3
Voies de signalisation	- Augmentation de la transcription de l'IGFBP1 - Augmentation de la production de NO et augmentation du GMPc - Activation des MAPK - Augmentation de l'AMPc - Phosphorylation des tyrosines - Augmentation de l'expression du VEGF	- Baisse de l'AMPc dans les cellules germinales, ovocytes et tubes séminifères - Augmentation de l'AMPc (gubernaculum)	- Baisse de l'AMPc - Activation des MAPK	- Baisse de l'AMPc
Localisation dans les Systèmes :	- Ovaires , oviducte, utérus, muscles lisse utérins, cervix, vagin, endomètre Placenta, poitrine , tétons - Testicules , prostate	- Utérus - Testicules, gubernaculum	- Placenta, poitrine, tétons - Testicules	- Placenta - Testicules , prostate
Reproducteur				
Nerveux	Cerveau	Cerveau	Cerveau	Cerveau
Sanguin	Cœur, reins , glandes surrénales Muscles, cellules du sang périphérique, peau	Reins Muscles	Glandes surrénales	Reins
Digestif	Foie , glandes salivaires, pancréas		Glandes salivaires, pancréas	Glandes salivaires Colon
Respiratoire	Poumons			
Immunitaire	Moelle osseuse, thyroïde Monocytes et lymphocytes circulants	Moelle osseuse, thyroïde Lymphocytes circulants	Thymus	Thyroïde, thymus Leucocytes

Tableau 10 : Ligands, voies de signalisation et localisation des RXFP chez l'Homme.

Les ligands en gras représentent le ligand associé à chacun des récepteurs. Les voies de signalisation en couleur et en gras sont communes à 2 récepteurs au moins. Les organes en gras sont ceux dans lesquels le ligand et le récepteur ont été localisés tous les deux. **AMPc**, Adénosine monophosphate cyclique, **GMPc**, Guanosine monophosphate cyclique, **IGFBP1**, Protéine liant le facteur de croissance pseudo-insuline, **INSL**, Peptide pseudo-insuline, **MAPK**, Protéine kinase mitogène activée, **NO**, Oxyde nitrique, Rln, Peptide Relaxine, **RXFP**, Récepteur aux peptides de la famille Relaxine, **VEGF**, Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

II.4. Fonctions biologiques

II.4.1. Fonctions des peptides de la famille Relaxine

Tout comme son récepteur associé, le rôle physiologique de la Rln1 reste inconnu, aucune forme naturelle n'ayant été isolée à ce jour chez l'Homme. Cependant, une Rln1 de synthèse a montré avoir des propriétés biologiques similaires à celles de la Rln2 vis-à-vis du récepteur RXFP1 apparenté à la Rln2 (Tan *et al.* 1998).

Chez le rat, de nombreux effets de la Rln3 sur le comportement et la gestion du stress ont été mis en évidence, notamment des effets sur l'attention, la mémoire ou même l'appétit et l'addiction aux drogues (Hida *et al.* 2006). Les résultats de ces études des 15 dernières années sur le modèle rat sont très positifs quant aux nombreux rôles physiologiques qu'occupe la Rln3 et aux applications thérapeutiques possibles chez l'Homme, en neurologie et pour le traitement des troubles du comportement ou de l'addiction. De plus, il a été montré que la Rln3 présente les mêmes propriétés anti-fibrotiques que la Rln2 à travers le récepteur RXFP1 (Hossain, Man, *et al.* 2011) et peut aussi activer le récepteur RXFP4 (Liu *et al.* 2005). Cependant, la Rln3 semble n'exercer son activité biologique qu'à travers son récepteur associé RXFP3 (Liu *et al.* 2003).

En 1995, l'INSL3 sera appelé *Relaxin-Like Factor* (RLF) suite à l'observation de sa structure et de l'augmentation de l'élargissement de l'articulation antérieure du bassin normalement médié par la Relaxine lors de l'administration couplée chez la souris de Relaxine et de peptide Ley I-L de synthèse humaine (Bullesbach & Schwabe 1995). Depuis, les trois termes Ley I-L, RLF et INSL3 peuvent être utilisés et mais les deux derniers, plus récents, sont favorisés. Chez le rat et la souris, il joue un rôle crucial dans le mécanisme de descente des testicules à travers le développement du gubernaculum (Nef & Parada 1999) et semble limiter l'apoptose des follicules chez les femelles (Spaniel-Borowski *et al.* 2001). Son rôle sur le maintien de la fertilité des deux sexes est donc confirmé chez ces rongeurs. Chez le fœtus humain, INSL3 est aussi responsable de la première phase de la descente des testicules, et ce, dès la détermination du sexe. Il sert d'ailleurs aujourd'hui de marqueur constitutif pour évaluer le développement fœtal et post-natal (Ivell, Agoulnik, & Anand-Ivell 2017). En plus d'être exprimé dans les testicules chez l'homme, il est aussi présent chez la femme, puisqu'il est exprimé par les ovaires et aide notamment l'induction de la maturation des ovocytes normalement gérée par l'hormone lutéinisante (Kawamura *et al.* 2004). Contrairement aux 3 autres peptides INSL qui ne contiennent qu'une Arginine entre les 2 cystéines de la chaîne β , l'INSL3 contient une portion (Arg-X-X-X-Arg) du motif Arg-X-X-X-Arg-X-X-Ile, portion qui lui permet d'interagir avec son récepteur apparenté RXFP2.

Comme pour l'INSL4, la fonction biologique de l'INSL5 n'est toujours pas bien connue chez l'Homme. Chez la souris, il régule positivement l'appétit et joue donc un rôle dans la prise de poids (Grosse *et al.* 2014). De plus, un KO sur le gène INSL5 affecte aussi légèrement la spermatogénèse, mais son rôle dans la reproduction est encore sous documenté. Cependant, le peu de littérature sur l'INSL5 et la fonction espèce-dépendante observée pour la plupart des peptides de la famille Relaxine ne permettent pas de transposer ces résultats chez l'Homme.

D'après les travaux de Burnicka-Turek, un KO sur le gène INSL6 chez la souris interrompt la progression de la spermatogénèse, suggérant un rôle du peptide INSL6 dans la fertilité masculine (Burnicka-Turek *et al.* 2009). Cependant, pour les mêmes raisons énoncées précédemment pour l'INSL5, il est difficile de transposer ces résultats chez l'Homme.

II.4.2. Rôles dans le système reproducteur

La Rln2 présente un grand nombre de rôles biologiques, qui varient en fonction de l'espèce étudiée. Son action peut viser des cellules voisines des cellules sécrétrices ou bien les cellules sécrétrices elles-mêmes, on parle de facteur paracrine ou autocrine, respectivement. L'activité de la Rln2 est quasi-restreinte à l'activation du RXFP1, son activité via RXFP2 étant anecdotique chez l'Homme (Hsu 2002).

Chez la femme enceinte, elle prépare les tissus utérins à l'implantation de l'embryon principalement, puis accessoirement à la grossesse et à l'accouchement (Bond *et al.* 2004). La Rln2 augmente l'angiogenèse de l'endomètre et active la maturation du cervix de sorte à assouplir et relaxer l'utérus ainsi que les ligaments pelviens. Cependant, son rôle n'est pas crucial pour la grossesse ni l'accouchement puisque des femmes sans ovaires ont pu donner naissance après implantation d'un embryon (Johnson *et al.* 1991).

Son implication dans la reproduction côté mâle est bien moins référencée. En effet, son action avec RXFP1 sur les spermatozoïdes a longtemps fait débat, mais il est établi depuis plusieurs années qu'elle leur permet de limiter le déclin naturel de leur mobilité ainsi que leur apoptose et de maintenir une activité mitochondriale haute (Ferlin *et al.* 2012). Dans le cadre de la reproduction chez le mâle aussi, la fonction de la Rln2 est espèce-dépendante puisque de nombreuses études montrent des effets différents chez les rongeurs et autres mammifères (Ivell *et al.* 2017).

II.4.3. Rôles dans le système cardiovasculaire

Les effets de la Rln2 sur le système cardiovasculaire sont dus à ses deux activités biologiques principales : activité anti-fibrotique par modulation de la prolifération de fibroblastes et la production de collagène, et vasodilatatrice par l'augmentation de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF. En plus de son rôle préparatoire à l'implantation, son impact positif sur le système cardiovasculaire de la mère va permettre au fœtus de mieux se développer. Elle permet entre autres la vasodilatation autour du cœur, d'améliorer l'angiogenèse et de limiter les fibroses et l'endommagement des tissus, ce qui a pour conséquences d'augmenter la contractilité et la fréquence cardiaque et rendre de cœur plus résistant.

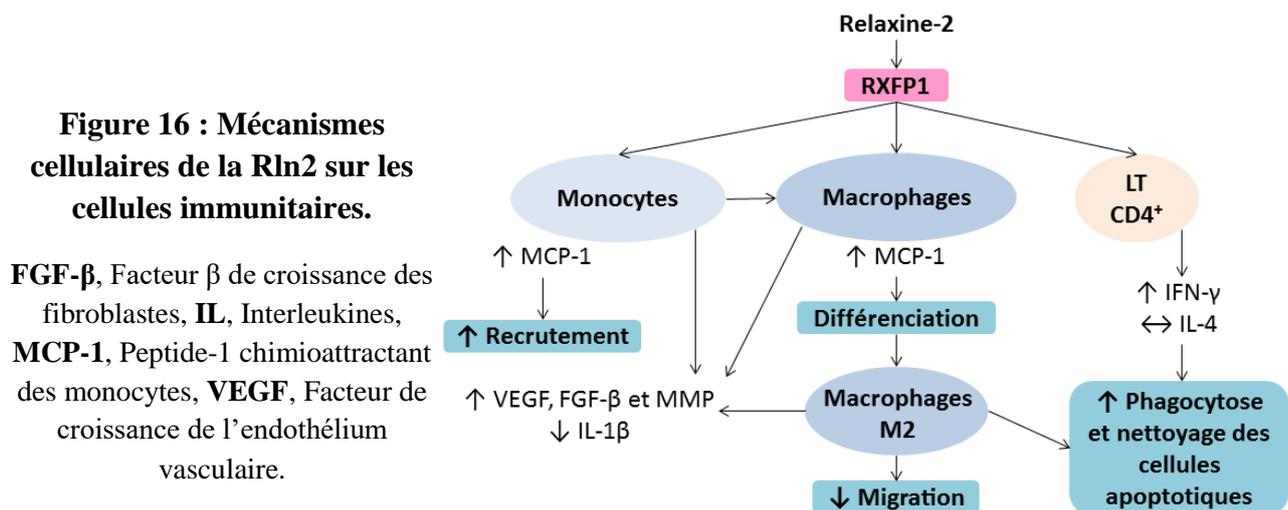
II.4.4. Rôles dans des systèmes annexes

D'une part, elle limite la fibrose dans les reins, la peau, le foie et les poumons. D'autre part, elle permet une meilleure filtration rénale, une meilleure irrigation du cerveau et une augmentation des échanges gazeux dans les poumons. Ces effets sont relayés par les différentes voies de signalisation de RXFP1 (Cernaro *et al.* 2014). Les connaissances sur l'action de la Rln2 sur d'autres systèmes que reproducteur sont nombreuses pour plusieurs animaux modèles

(rat, souris, cochon d'Inde, etc.) mais restent cependant restreintes pour l'humain. En effet, l'étude chez l'Homme reste la plus complexe, tant sur l'aspect technique qu'éthique, les activités physiologiques de la Rln2 sont donc encore peu connues en dehors de celles enrôlées pour la reproduction. On notera que la très faible concentration sérique de la Rln2 chez l'Homme, entre autres, rend difficile l'étude de son rôle dans des processus non liés à la reproduction.

II.4.5. Rôle dans le système immunitaire

Enfin, la Rln2 tient un rôle de modulateur immun, identifié récemment durant des recherches sur le cancer et la Rln2. Les actions de la Rln2 sont relayées par le récepteur RXFP1 présent sur les monocytes, macrophages et LT CD4⁺, et principalement par le peptide MCP-1 exprimé en surface des monocytes et macrophages. La **Figure 16** ci-dessous synthétise les principaux effets de la Rln2 sur les cellules immunitaires. Elle est adaptée des articles de Figueiredo et de Perumal ([Figueiredo et al. 2006](#), [Perumal & Dhanasekaran 2014](#)).



Le rôle immunitaire de la Rln2 peut être expliqué par son rôle dans la reproduction. En effet, durant le développement fœtal et de l'endomètre, de nombreux cycles cellulaires sont en cours, nécessitant une immunité sous contrôle afin de limiter les réactions auto-immunes. L'expression combinée de la Rln2 et du peptide MCP-1 a pour finalité de nettoyer l'endomètre des cellules apoptotiques en recrutant et différenciant des macrophages au sein de l'endomètre, et ce durant chaque cycle menstruel. Enfin, la Rln2 peut inhiber la survie ou la différenciation de monocytes, LTc ou de LB par le biais de l'action immunorégulatrice de la glycodeline dans l'endomètre ([Tseng et al. 1999](#)). Ces différentes actions de la Rln2 sur l'immunité ont principalement pour but d'aider à établir une tolérance maternelle et ainsi éviter des réactions immunitaires contre le fœtus.

II.5. Applications thérapeutiques

La Rln2 représente depuis plus de 20 ans une molécule d'intérêt pharmaceutique, notamment grâce à son potentiel biologique très varié. En effet, même si de nombreux effets de la Rln2 constatés chez l'animal ne sont pas applicables à l'Homme, les champs thérapeutiques

liés aux voies de signalisation de son récepteur RXFP1 et à son expression dans une multitude d'organes restent abondants. Administrée sous forme de Relaxine porcine impure jusqu'aux années 1980 aux prémices des protéines de synthèse à visée thérapeutique, la Rln2 est depuis administrée sous sa forme recombinante humaine, nommée Serelaxin. La Serelaxin a connu depuis son développement dans les années 1990 une trentaine d'essais cliniques sur l'Homme, dans plusieurs domaines thérapeutiques : sclérodermie, maladies cardiovasculaires, problèmes rénaux ou hépatiques, liés à l'accouchement, ou même dentaires (McGorray *et al.* 2012). Le **Tableau 10** résume les principales études cliniques complètes portées sur la Serelaxin dans le cadre de traitements des conditions d'accouchement, de la sclérodermie systémique et de problèmes rénaux et hépatiques. Le **Tableau 11** résume les principales études cliniques complètes portées sur la Serelaxin dans le cadre de traitements de l'insuffisance cardiaque (chronique, CHF, et aigüe, AHF). Ces 2 tableaux sont adaptés de ceux retrouvés dans les articles de Cernaro et Unemori, et les rapports de Novartis, de la FDA et de l'EMA (Cernaro *et al.* 2014, Unemori 2017, Novartis 2014, Blank & McDowell 2014, European Medicines Agency 2014).

II.5.1. Essais cliniques contre la sclérodermie systémique

Dans le **Tableau 11**, on peut observer que les effets de la Serelaxin sur les symptômes de la maladie sont rares, cette application thérapeutique de la Rln2 est toujours en suspens. On peut aussi noter la mise en évidence de son potentiel immunogénique à travers l'apparition d'*Anti Drug Antibodies* (ADA), que nous développerons en fin de chapitre.

II.5.2. Essais cliniques sur l'amélioration des conditions d'accouchement

La faible pénétration de la Rln2 à travers les parois vaginales est mise en cause pour justifier du peu de résultats dans ce cadre thérapeutique, en supplément de son faible rôle physiologique dans l'accouchement chez la femme. En effet, la Rln2 et RXFP1 agissent principalement au moment l'implantation de l'embryon dans les parois de l'endomètre en favorisant l'accumulation d'AMPC et la production de VEGF (Bond *et al.* 2004).

II.5.3. Essais cliniques contre l'insuffisance cardiaque

Dans le **Tableau 12**, on peut observer que la Serelaxin montre des effets positifs et significatifs sur le traitement de l'insuffisance cardiaque. Même si de nombreux résultats d'études n'ont pas été publiés pour des raisons de confidentialité, le nombre d'études menées récemment laisse à penser que la Serelaxin présente des atouts intéressants pour le traitement de cette maladie. Aujourd'hui, la Rln2 représente un enjeu majeur dans le traitement des maladies cardiovasculaires, mais son étude chez l'Homme remonte au début des années 2000. L'insuffisance cardiaque se caractérise par une incapacité du cœur à faire circuler le sang dans l'organisme, cette maladie représente l'une des premières causes de mortalité et d'hospitalisation dans les pays développés. Cette difficulté a très vite des conséquences néfastes sur les organes vitaux, comme par exemple une perte des fonctions rénales ou une fatigue accélérée du système nerveux sympathique qui essayent de pallier le problème (Bathgate *et al.* 2013). Lorsque plusieurs effets observés sur le modèle rat ont été confirmés lors d'études de la

Rln2 sur la sclérose, des recherches dans le domaine des maladies cardiovasculaires sur l'Homme ont été menées. L'observation du lien entre les niveaux de Rln2 plasmatique et insuffisance cardiaque constitue la première mise en valeur d'un rôle potentiel de la Rln2 dans la gestion de l'insuffisance cardiaque (Dschietzig *et al.* 2001). Puis, une étude sur un modèle *in vitro* d'artères humaines a prouvé que la Rln2 induisait une vasodilatation dépendante de l'endothélium artériel (Fisher *et al.* 2002). Enfin, le rôle de la Rln2 durant la grossesse sur plusieurs paramètres du système cardiovasculaire afin de s'adapter aux besoins de la mère et du fœtus a constitué la troisième preuve de l'intérêt de l'hormone dans ce domaine thérapeutique (Jeyabalan *et al.* 2007). Depuis, la Rln2 connaît un succès croissant dans ce domaine thérapeutique.

De manière plus générale, les effets de la Rln2 pourraient être appliqués à d'autres problèmes du système cardiovasculaire. Par exemple, la pré-éclampsie, qui est une hypertension artérielle qui survient chez la femme enceinte en deuxième moitié de grossesse et qui réduit l'afflux sanguin vers le placenta, semblait pouvoir être soulagée par la vasodilatation et l'induction locale du VEGF suite à une injection de Rln2 (Unemori, Sibai & Teichman 2009). La Figure 17 ci-dessous représente les différentes voies de signalisations engagées dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Elle est tirée de l'article de Díez (Díez & Ruilope 2016).

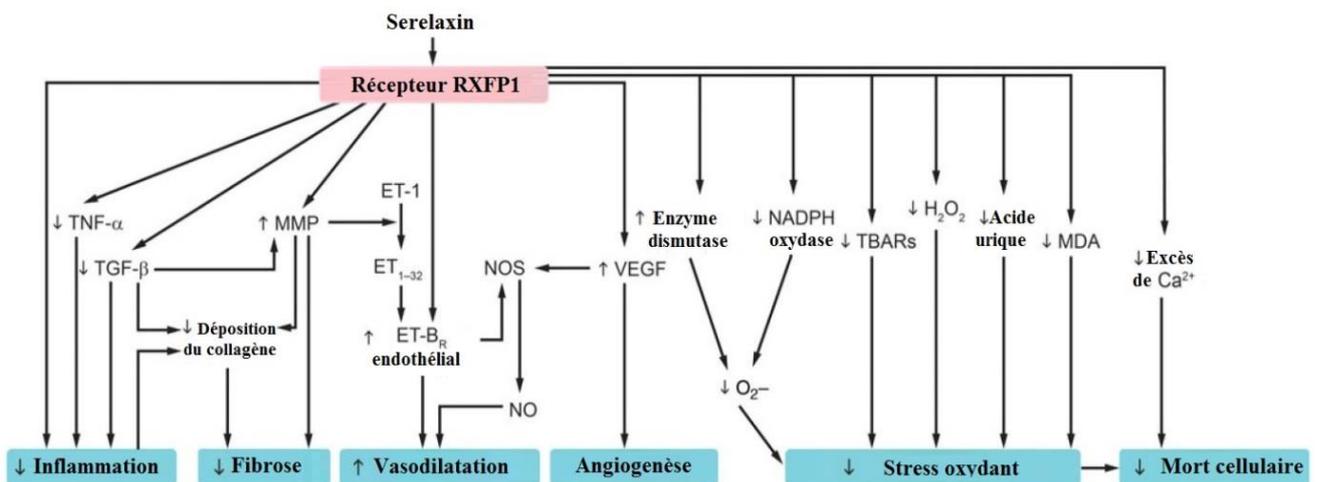


Figure 17 : Mécanismes cellulaires et voies de signalisation de la Serelaxin dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

ET, Endothéline, ET-BR, Récepteur à endothéline de type B, MDA, Malondialdéhyde, MMP, Métalloprotéinase matricielle, NO, Oxyde nitrique, NOS, Oxyde nitrique synthase, TBARs, Substance réactive à l'acide thiobarbiturique, TGF, Facteur de croissance en transformant, TNF, Facteur de nécrose tumorale, VEGF, Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Phase	Identifiant Année (Référence)	Population Dose (µg/kg/jour) / Durée / Administration	Effets observés Détection d'ADA
II	(R0204g) (Bell et al. 1993)	40 femmes en pré-accouchement 0 ou 1.5 mg / dose unique / ovule vaginale	Aucun effet observé Aucun ADA détecté (ni mère ni nouveau-né)
I	(RLXN.C.002) 1996	12 patients SS 0 ou 25 / 24 à 48 sem / injection SC	Pas de résultats publiés 92% d'ADA positifs
II	(R0279g) (Brennand et al. 1997)	96 femmes enceintes (9-10 mois) 0, 1, 2 ou 4 mg / dose unique / gel intravaginal	Aucun effet du traitement observé Pas de test d'ADA effectué
II	(RLXN.C.004) 1998	12 patients SS 0 ou 25 / 24 sem / injection SC	Pas de résultats publiés 50% d'ADA positifs
I	(R9401) (Seibold et al. 1998)	30 patients SS 0, 6, 12, 50, 100 ou 200 / 28 j / injection SC	Aucun effet observé Aucun ADA détecté à j43
III	(RLXN.C.006) 2000	87 patients SS 0 ou 25 / 52 sem / injection SC	Etude incomplète 43% d'ADA positifs
II	(RLXN.C.003) (Seibold et al. 2000)	68 patients SS 0, 25 ou 100 / 24 sem / injection SC	Réduction de l'épaississement de la peau Amélioration de la mobilité
III	NCT00704665 (RLXN.C.005) (Khanna et al. 2009)	231 patients SS 0, 10 ou 25 / 24 sem / injection SC	Pas d'amélioration par rapport au placebo Effets indésirables rénaux graves
I	NCT01875523 (Dahlke et al. 2016)	36 insuffisants rénaux 10 / 4 h dose unique / injection IV	Aucun problème de PK observé Aucun ADA détecté à j15
II	#2010-022528-58 (CRLX030A2103) (Dahlke, 2015)	40 sujets sains 0, 10, 30 ou 100 / 48 h dose unique / injection IV	Filtration glomérulaire augmentée à j2-3 Aucun ADA détecté à j10
II	NCT01433458 (CRLX030A2101) (Kobalava et al. 2015)	49 insuffisants hépatiques 30 / 24 h dose unique / injection IV	1 ADA positif (à j -1 et j15, ADA non-neutralisants)
II	NCT00259103 (RLX.CR.001) (Weiss et al. 2016)	72 femmes en pré-accouchement 0, 7.5, 25 ou 75 / 24 h dose unique / injection IV	Aucun effet observé Aucun ADA détecté (ni la mère ni le nouveau-né)

Tableau 11 : Liste non exhaustive des études cliniques complètes en Phase I-II ou III sur l'administration de Serelaxin chez l'Homme dans divers domaines thérapeutiques.

Les données comprennent les phases, les références, conditions et résultats pour chaque étude. Ces études sont classées dans l'ordre chronologique de publication des résultats. Les identifiants sont soit officiels (clinicaltrials.gov ou EudraCT) soit ceux utilisés par le sponsor. Les études en gris concernent le traitement de la sclérose, celles en jaune le déclenchement de l'accouchement, en vert les problèmes rénaux ou hépatiques et en rose la pharmacocinétique de la Serelaxin sur des sujets sains. Les résultats positifs aux ADA sont mis en évidence en gras. **ADA**, Anticorps anti-drogue, **h**, Heure(s), **IV**, Intraveineuse, **j**, Jour(s), **PK**, Pharmacocinétique, **SC**, Sous-cutanée, **sem**, Semaine(s), **SS**, Sclérose systémique.

Phase	Identifiant Année (Référence)	Population Dose (µg/kg/jour) / Durée	Effets observés Détection d'ADA
II	NCT00259116 (RLX.CHF.001) (Dschietzig, Teichman, et al. 2009)	16 patients AHF 10 à 960 / 3 doses x 8 à 24 h	Vasodilatation et amélioration des marqueurs rénaux 1 ADA positif à j9 (exposition récente au traitement)
IIb	NCT00520806 (RLXN.CHF.003.PRE) (Teerlink et al. 2009)	234 patients AHF 0, 10, 25, 100 ou 250 / 48 h, 12 j	Amélioration du soulagement de la dyspnée et du pronostic vital 40% d'ADA positifs (dose réponse, ADA non-neutralisants)
III	NCT01870778 (RLX.CHF.003) (Filippatos et al. 2014; Metra et al. 2013; Teerlink et al. 2013)	1161 patients AHF 0 ou 30 / 48 h	Amélioration du soulagement de la dyspnée et de la mortalité à 180j Aucun ADA détecté
II	NCT01546532 (Voors et al. 2014)	65 patients CHF 0 ou 30 / 24 h	Amélioration du débit et de la fraction de filtration rénaux Pas de test d'ADA effectué
II	NCT01543854 (CRLX030A2201) (Ponikowski et al. 2014)	71 patients AHF 0 ou 30 / 20 h	Effets positifs sur la pression pulmonaire (capillaire et artérielle) 1 ADA positif à j30 (niveau très faible, ADA non-neutralisants)
II	NCT02002702 (CRLX030A1201) (N. Sato et al. 2015)	46 patients AHF 0, 10 ou 30 / 48 h	Traitement toléré et sûr pour la population testée (Japonais) Aucun ADA détecté à j14
II	NCT01982292 (CRLX030A2209) (Kumar et al. 2015; Teerlink et al. 2016)	321 patients CHF 0 ou 30 / 3 x 48 h, 4 sem	Amélioration du soulagement de la dyspnée 1 ADA positif à j14 (ADA non-neutralisants)
II	NCT01979614 (CRLX030A2203) 2016	58 patients AHF 0 ou 30 / 24 h	Résultats non publiés Test d'ADA effectué
III	NCT02064868 (CRLX030A3301) 2017	2653 patients AHF 0 ou 30 / 48 h	Résultats non publiés Pas de test d'ADA effectué
III	NCT02007720 (CRLX030A2302) (Sato et al. 2017)	1520 patients AHF 0 ou 30 / 48 h	Résultats non publiés Pas de test d'ADA effectué
II	NCT02625922 (CRLX030A2211) 2017	24 patients CHF 0 ou 30 / 48 h	Résultats non publiés Pas de test d'ADA effectué
III	NCT01870778 (CRLX030A2301) (Teerlink et al. 2017)	6 505 patients AHF 0 ou 30 / 48 h	Résultats non publiés Pas de test d'ADA effectué

Tableau 12 : Liste non exhaustive des études cliniques complètes en Phase II-III sur l'administration de Serelaxin chez l'Homme dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique (CHF) et aiguë (AHF).

Les données comprennent les phases, références, conditions et résultats pour chaque étude. Elles sont classées dans l'ordre chronologique de publication des résultats. Les identifiants sont soit officiels (clinicaltrials.gov) soit ceux utilisés par le sponsor. La voie d'administration pour toutes ces études consistent en une injection intraveineuse. Les études comprenant des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique (CHF) sont en bleu clair, celles avec des patients atteints d'insuffisance cardiaque aiguë (AHF) sont en bleu. **ADA**, Anticorps anti-drogue, **AHF**, Insuffisance cardiaque aiguë, **CHF**, Insuffisance cardiaque chronique, **h**, Heure(s), **j**, Jour(s), **sem**, Semaine(s).

II.5.4. Champs thérapeutiques potentiels

La Rln2 connaît d'autres champs thérapeutiques que cités précédemment, puisque de récentes études montrent ses effets et implications dans plusieurs mécanismes cellulaires, encourageants pour son développement. L'implication de la Rln2 dans la croissance et la dispersion tumorales est montrée depuis le début des années 2010 chez l'Homme. En effet, des cellules tumorales produisent davantage de Rln2 que les cellules saines en tant que facteur endogène pour remodeler la matrice extracellulaire et favoriser la croissance des tissus. Plus particulièrement, les cellules cancéreuses de l'endomètre, du sein, de la thyroïde et de la prostate expriment la Rln2. Dans ces cas précis, le récepteur RXFP1 augmente localement l'angiogenèse et la restructuration de la matrice extracellulaire, établissant un contexte favorable à la croissance des cellules cancéreuses elles-mêmes productrices de Rln2 ([Bathgate et al. 2013](#)). De plus, l'inhibition *in vitro* par des ARNsi de l'expression de la Rln2 chez des cellules d'ostéosarcome a limité significativement leur migration, invasivité et prolifération, prouvant le rôle positif de la Rln2 sur ce type de cellules ([Ma et al. 2015](#), [Ren et al. 2015](#)). Bien que plusieurs voies de signalisation impliquées aient été identifiées, les mécanismes moléculaires impliqués restent inconnus. L'équipe de Marioni a évalué son rôle dans le pronostic de cas de carcinome oral de cellules squameuses d'après sa capacité à induire la différenciation des ostéoclastes et à les activer ([Marioni et al. 2016](#)). Enfin, un parallèle a été fait entre des patients atteints de lupus systémique érythémateux (SLE) étant moins touchés par les carcinomes mammaire, ovarien, endométrial, thyroïdien ou de la prostate. En effet, l'un des nombreux effets de cette maladie auto-immune est d'avoir un niveau d'expression de la Rln2 plus bas que la normale dans certains organes, ce qui pourrait expliquer la plus faible incidence de ces types de cancers chez les patients SLE ([Perumal & Dhanasekaran 2014](#)). Même si la Rln2 ne constitue pas un bon marqueur pour le SLE, tous ces résultats sont des preuves que la Rln2 pourrait constituer cependant un marqueur tumoral intéressant.

Il a été très récemment montré que la Rln2 permet d'inhiber l'inflammation et la fibrose rénale dans le cadre du traitement de l'insuffisance rénale chronique. Cette maladie incurable se manifeste par une altération irréversible des fonctions tubulaires rénales, les reins ne peuvent plus réabsorber ni sécréter, cette maladie peut être mortelle. La Rln2 agit dans ce contexte pathologique en modulant l'activité des cellules immunitaires d'une part, et en restructurant le tissu conjonctif d'autre part. Les équipes de Chen ont découvert que la Rln2 inhibe la signalisation du récepteur TLR4 (CD284) en surface des macrophages dans des modèles *in vitro* de reins ([Chen et al. 2017](#)), mais elle contrôle aussi leur polarisation en phénotype M2 et limite leur migration, ce qui a pour conséquence de réduire l'inflammation. D'autre part, la Rln2 limite la synthèse et l'excès de collagène du tissu conjonctif déposé en cas de fibrose rénale. Ainsi, la Rln2 présente un intérêt clinique dans le traitement de l'insuffisance rénale chronique, une étude a eu lieu récemment et a montré une pharmacocinétique et une tolérance au traitement chez 36 patients ([Tableau 11](#), NCT01875523), et devrait ouvrir la voie à des études futures. Plus généralement, la Rln2 a prouvé par de nombreuses études cliniques qu'elle détient un potentiel thérapeutique dans un vaste répertoire chez l'Homme.

II.5.5. Réponses immunitaires en essais cliniques

Malgré les quelques effets positifs de la Serelaxin sur les symptômes de la sclérose, observables dans le **Tableau 11**, on peut noter l'apparition d'ADA chez de nombreux patients. Ces taux, qui reflètent un potentiel immunogénique important de la Serelaxin, sont expliqués par les auteurs par 3 facteurs : (1) la maladie elle-même, puisque la sclérose est une maladie auto-immune qui peut augmenter l'induction d'anticorps auto-immuns, (2) les injections sous-cutanées et leur nombre important qui créent une inflammation locale et multiplient le risque de réaction immunitaire contre la Serelaxin, (3) la qualité de la Serelaxin injectée qui était certainement de qualité moindre par rapport à celle produite les années suivantes. Les études présentées dans le **Tableau 11** ont donc permis d'invalider le rôle thérapeutique de la Serelaxin dans le traitement de certaines maladies mais aussi de mettre en évidence son potentiel immunogénique.

Dans le **Tableau 12**, on peut observer les effets positifs de la Serelaxin dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, ainsi qu'un potentiel immunogénique moindre par rapport à celui observé précédemment. En effet, l'administration par injection intraveineuse, son faible nombre de répétitions ainsi que l'absence de symptômes auto-immuns chez les patients traités constituent un contexte limitant aux réponses immunitaires contre la Serelaxin. Même si plusieurs patients ont développé des ADA durant certaines études, cela reste anecdotique. Dans le cas de la dose réponse observée durant l'étude sur 234 patients (**Tableau 12**, NCT00520806), la longueur de l'étude de 24 semaines peut expliquer en quoi les patients ont pu développer des ADA, en multipliant les injections, on multiplie le risque de réponse immunitaire. Les ADA induits contre la Relaxine sont généralement non-neutralisants, leur classe et fonction étant rarement décrites dans les études.

Ainsi, les nombreux essais cliniques ont mis en évidence le potentiel immunogénique de la Serelaxin, potentiel variant surtout en fonction de l'administration et du profil des patients. L'étude de ce potentiel représente donc un intérêt certain afin de mieux en comprendre les mécanismes cellulaires.

CHAPITRE III. IMMUNOGENICITE DES MODIFICATIONS CHIMIQUES

III.1. Modifications des protéines thérapeutiques

III.1.1. Modifications post-traductionnelles

Selon le type de cellules productrices (bactéries, levures, mammifères, plantes, *etc.*), la synthèse protéique comporte des modifications post-traductionnelles (MPT) spécifiques qui peuvent être ajoutées généralement au niveau du RE ou du Golgi. Les organismes procaryotes n'ont pas de processus de maturation des protéines et n'introduisent pas de MPT aux protéines qu'ils produisent. Ces MPT sont généralement réversibles et permettent aux protéines de diversifier les propriétés biochimiques "limitées" aux 22 acides aminés protéinogènes et d'acquérir une structure et une activité bien particulières. Elles sont communes à l'ensemble des protéines eucaryotes, c'est pourquoi les procaryotes sont moins souvent utilisés comme cellules productrices de PT lorsque la séquence comporte une structure complexe et nécessite des groupes non-protéiques (chaînes carbohydrates ou lipidiques, *etc.*).

Cependant, si ces modifications augmentent les possibilités d'activité des protéines, elles peuvent être espèce-spécifiques et être reconnues par le système immunitaire. De plus, les systèmes de production des PT étant des cellules non humaines, certaines MPT peuvent présenter un risque d'immunogénicité. Il existe plus d'une dizaine de MPT, et les PT peuvent être modifiées par des modifications chimiques introduites intentionnellement ou non durant le processus de production. Seules quelques-unes de ces modifications utilisées dans les processus de production de PT, faisant l'objet de cibles thérapeutiques ou présentant des risques d'immunogénicité seront abordées ([Karve & Cheema 2011](#); [Zhong & Wright 2013](#); [Jefferis 2016](#)).

III.1.1.A. Modifications post-traductionnelles des protéines

- Phosphorylation

La phosphorylation consiste en l'ajout d'un groupe phosphoryle par des enzymes kinases sur la sérine, la thréonine, l'histidine et la tyrosine lors du passage des protéines dans le RE. Elle est la MPT la plus répandue chez les eucaryotes, on peut souligner son importance par les plusieurs centaines d'enzyme kinases et phosphatases recensées rien que dans le génome humain. Elle représente aussi la première MPT à avoir été découverte et la plus étudiée du système immunitaire et concerne environ 30% des protéines eucaryotes. La phosphorylation joue un rôle régulateur crucial notamment dans les réactions énergie-dépendantes, les interactions entre protéines, la protéolyse et un grand nombre de voies de signalisation comme l'activation des LT via les MAPK (*Cf. Activation des lymphocytes T*) ([Liu, Qian & Cao 2016](#)).

Enfin, on compte très peu de PT connues pour être phosphorylées. Les facteurs V et IX recombinants humains comportent par exemple peu de phosphorylations car les cellules CHO qui les produisent semblent ne pas exprimer assez d'exokinases (kinases actives en dehors du noyau cellulaire). Ils se différencient de leurs homologues plasmatiques mais semblent avoir la même activité biologique ([Kalafatis *et al.* 1993](#); [Rand, Kalafatis & Mann 1994](#)). Chez la

souris, la phosphorylation semble augmenter l'immunogénicité (Sato *et al.* 2015), aussi, une hyperphosphorylation des sérines de la progranuline paraît augmenter son immunogénicité chez l'Homme et serait impliquée dans plusieurs pathologies auto-immunes médiées par des autoanticorps (Thurner *et al.* 2015).

- Glycosylation

La glycosylation consiste en l'ajout d'une chaîne carbohydrate au niveau de l'azote ou de l'oxygène d'un résidu (N-glycosylation ou O-glycosylation). La N-glycosylation est la seconde MPT la plus commune des protéines eucaryotes puisqu'elle concerne la quasi-totalité des protéines membranaires ou sécrétées et tient un rôle important dans leur structure et fonction. Cette importance dans le protéome est aussi soulignée par les centaines d'enzymes glycosyltransférases et les milliers de chaînes carbohydrates possibles. La N-glycosylation est effectuée lors de la maturation protéique entre le RE et l'appareil de Golgi, le plus souvent sur un résidu (sauf la proline) situé entre une asparagine et une sérine ou une asparagine et une thréonine. L'O-glycosylation est moins fréquente chez les mammifères que chez les plantes, elle est introduite au niveau du Golgi et comporte au départ un seul groupement sucré et peut être rallongée par la suite. Il n'y a pas de motif d'ancrage particulier même si des sucres peuvent être affiliés à certains résidus. Durant la maturation protéique, les chaînes carbohydrates des glycoprotéines peuvent aussi subir des modifications (sulfatation, méthylation ou acétylation, *etc.*), augmentant considérablement le nombre de chaînes et de fonctionnalités possibles.

La N-glycosylation des mAbs représente un enjeu important puisque certaines chaînes carbohydrates peuvent modifier le repliement des chaînes lourdes et légères. La plupart de mAbs sont N-glycosylés au niveau de leur fragment Fc, certains le sont au niveau de leur fragment Fab, la glycosylation dépendant de l'origine des cellules productrices (animales, levures, *etc.*). L'O-glycosylation tient un rôle modulateur similaire envers la structure et la stabilité des protéines, elle peut par exemple les protéger de la dégradation par le pH, thermique ou enzymatique (Xia *et al.* 2016). La glycosylation peut aussi moduler l'agrégation, l'activité et le transport des protéines, comme par exemple l'IFN β - γ dont la glycosylation maintient l'activité biologique et la demi-vie dans l'organisme. A l'inverse, la N-glycosylation diminue l'activité biologique du facteur IX recombinant humain alors qu'elle est essentielle à la sécrétion des facteurs homologues V et VIII (Kaufman 1998). Aussi, la nature du motif N-glycosylé peut moduler la liaison du Fc des mAbs pour des récepteurs cellulaires et réduire leur activité ADCC, le développement d'un système d'expression permettant le maintien de cette activité est donc nécessaire (Liu 2015).

La glycosylation peut aussi jouer un rôle important sur le caractère immunogène des glycoprotéines. En effet, les peptides portant une courte chaîne carbohydrate (N ou O-glycosylation) peuvent être apprêtés sur les molécules HLA de classe II sans être déglycosylés par les CPA (Vlad *et al.* 2002). Le TCR à qui est présenté le complexe glycopeptide-HLA peut alors interagir avec la chaîne carbohydrate et la reconnaître spécifiquement. L'effet d'une glycosylation sur l'immunogénicité d'une protéine dépend évidemment de la séquence en acides aminés porteuse, mais peut aussi varier selon la taille, la composition et la position de la glycosylation. Une chaîne carbohydrate de plus de trois sucres a tendance à empêcher le glycopeptide d'être chargé sur une molécule HLA de classe II. Aussi, une glycosylation à

l'extrémité d'un épitope peut augmenter sa liaison aux molécules HLA de classe II tandis qu'une glycosylation interne neutralise la liaison (Cudic, Ertl & Otvos 2002). La composition en sucre a son importance, comme l'a montré le Galactose- α -1,3-Galactose ayant provoqué par réaction croisée un choc anaphylactique chez des patients traités au Cetuximab (mAb chimérique anti-TNF α) présentant des ADA préexistants (Chung *et al.* 2008). En augmentant la solubilité d'une PT, la glycosylation peut aussi indirectement mais efficacement diminuer son immunogénicité. Par exemple, la N-glycosylation de l'IFN β recombinant diminue respectivement de 20 et 10% l'apparition d'ADA et de NADA chez des patients traités contre la SEP (Fernández *et al.* 2001). Des effets différents d'O-glycosylations sur l'immunogénicité ont été observés sur des peptides humains en développement vaccinateur en oncologie. La forme O-glycosylée du peptide MUC1 permet une levée de la tolérance au MUC1 chez des souris exprimant le peptide et tolérantes. La forme O-glycosylée semble donc constituer un néo-épitope pour les cellules T et B murines spécifiques du MUC1 (Pinkhasov *et al.* 2011). D'autre part, l'O-glycosylation du MUC6 affecte la liaison du peptide aux molécules HLA de classe II et abroge la réponse de type Th1 au profit d'une réponse Th17. L'O-glycosylation semble dans ce cas inhiber la réponse immunitaire (Freire *et al.* 2011). Si la grande majorité des PT portent des N-glycosylations, comme les mAbs, on compte un peu moins de PT O-glycosylées, notamment à cause de leur plus faible fréquence dans le protéome humain. Des IgA1 en développement sont par exemple O-glycosylés au niveau de leur région charnière afin d'améliorer leur stabilité métabolique. Ces mAbs seraient une alternative aux mAbs de classe IgG pour atteindre de nouvelles cibles et fonctionnalités cellulaires (Bakema & van Egmond 2011).

III.1.2. Modifications non-naturelles

Les modifications non naturelles peuvent être introduites de manière intentionnelle afin d'optimiser une molécule (PEGylation, *etc.*) ou de manière non intentionnelle. Ces dernières ont le plus souvent un effet néfaste sur l'activité ou la stabilité de la PT. Les connaissances sur les effets de modifications non naturelles sur l'immunogénicité des peptides et PT sont très restreintes. Seuls les effets de la PEGylation, l'agrégation, l'oxydation, les peptides rétro-inverso et les acides aminés D sont connus sur l'immunogénicité ou ont du moins été étudiés. L'effet de l'amidation sur le système immunitaire est peu décrit, il a été montré chez la souris l'existence de reconnaissance spécifique de l'extrémité C-terminale amidée par des Ac (Maillère & Hervé 1997). La lipidation consiste en l'ajout de groupes lipidiques sur une séquence peptidique. Elle connaît un essor notable depuis plusieurs années mais encore peu de pT sont lipidés sur le marché. Le lucinactant est un peptide de synthèse utilisé en spray pour le traitement des troubles respiratoires et dont la lipidation permet une absorption par les voies aériennes (Donn 2005). Le liraglutide est aussi un lipopeptide de synthèse, utilisé comme antidiabétique. Son immunogénicité est réduite par rapport à son homologue peptidique l'exénatide. Cette réduction d'immunogénicité peut être expliquée par une différence de séquence en acides aminés ou la présence de lipidation (Buse *et al.* 2011). Compte tenu de leurs faibles description dans la littérature et capacité à constituer un risque d'immunogénicité, ces modifications ne sont que citées.

III.1.2.A. PEGylation

La PEGylation d'une PT consiste en la liaison covalente de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) sur une la chaîne principale de la protéine. Le PEG est un polymère inerte, généralement linéaire, faiblement toxique qui comporte une structure simple et une excellente solubilité. La PEGylation sert aussi à augmenter la stabilité sérique de pT, comme par exemple une version raccourcie de l'érythropoïétine ([Macdougall et al. 2013](#)). Le PEG peut être conjugué à une PT de deux méthodes : (1) Aspécifique, le rendement de PEGylation est modéré, l'activité biologique de la PT peut être affectée et le produit final est hétérogène. Cette méthode est utilisée pour sa facilité et pour les protéines de petite taille, un seul PEG est généralement introduit. (2) Spécifique, nécessite la conception d'un site de conjugaison (liaison amine à l'extrémité N-terminale, liaison thiol, *etc.*) et un contrôle de la taille mais le produit final est homogène. La PEGylation peut aussi se faire sous action enzymatique ([Ginn et al. 2014](#)).

La PEGylation d'une PT a pour le but d'augmenter sa stabilité métabolique et diminuer l'immunogénicité sans modifier sa conformation. En augmentant la taille d'une PT, la PEGylation diminue sa filtration rénale et sa sensibilité aux protéases ainsi que sa reconnaissance par les cellules immunitaires, améliorant ainsi la PK de la PT. La PEGylation peut aussi rendre inaccessible aux cellules un épitope d'une PT. L'encombrement stérique du site d'activation de la PT par le PEG est cependant possible, mais il est largement contrebalancé par une PK accrue et une protection contre l'agrégation de la protéine ([Bhawani et al. 2017](#)). C'est une pratique qui date du début des années 1990, la première PT PEGylée à obtenir une AMM est une enzyme adénosine déaminase ([Levy et al. 1988](#)). Depuis, la PEGylation est devenue le moyen le plus répandu pour rallonger la PK d'une PT à travers son efficacité, sa facilité et son faible coût. Une vingtaine de PT PEGylées sont aujourd'hui sur le marché : cinq IFN, cinq enzymes, trois facteurs sanguins, un mAb, *etc.* Si les qualités pharmaceutiques de la PEGylation ont permis d'effectuer un grand nombre de tests de PT PEGylées chez l'animal puis l'Homme, ces tests ont aussi permis de dévoiler son immunogénicité à travers l'observation d'Ac anti-PEG.

Plusieurs études ont montré l'induction d'IgM et d'IgG spécifiques ainsi que l'activation du complément par le PEG sous ses différentes formes (liposomes, micelles, *etc.*), menant à un clairance accrue du PEG et des PT PEGylées. Une revue explique l'apparition d'Ig anti-PEG, en particulier chez des sujets sains, par une liaison aspécifique du PEG aux IgM, IgG et protéines du complément, accélérant une clairance ([Schellekens, Hennink & Brinks 2013](#)). Cependant, le nombre d'articles relatant des ADA contre les PT PEGylées et le PEG chez des patients et des sujets sains laisse penser qu'il existerait plutôt une part de la population présentant naturellement des Ig contre le PEG.

En effet, une récente étude a identifié sept polymorphismes mononucléotidiques (SNP) responsables d'une prédisposition génétique à induire une réponse humorale envers le PEG au sein d'un large panel de sujets sains taiwanais. Ces SNP se situent tous dans le segment de gène codant pour la séquence variable des chaînes lourdes d'IgM et sont corrélés aux IgM et IgG anti-PEG préexistants. Plus précisément, les chercheurs ont observés quatre profils de populations dont les trois premiers seulement présentaient les SNP identifiés : (1) anti-PEG⁺ de classe IgM, (2) anti-PEG⁺ de classe IgG, (3) anti-PEG⁺ de classes IgM et IgG, (4) anti-PEG⁻. Ils expliquent ces profils par des variations génétiques au niveau de la séquence variable des

chaînes lourdes entre deux populations de cellules B mémoires, chacune développant une réponse humorale différente suite à la rencontre avec le PEG issu de l'environnement (produits cosmétiques, *etc.*) : des LB mémoires produisant des IgM anti-PEG et les LB mémoires commutés produisant des IgG anti-PEG. Les premiers développent une réponse thymo-indépendante rapide et peu spécifique anti-PEG tandis que les seconds développent une réponse thymo-dépendante plus spécifique depuis les CG. Enfin, un des sept SNP présente une excellente corrélation avec la présence et la concentration en IgM et IgG anti-PEG dans le plasma. Il pourrait bien constituer un marqueur de prédisposition génétique universel puisqu'il contient des similarités de fréquences d'allèles chez les autres ethnies dans le monde ([Chang et al. 2017](#)).

Cette impressionnante étude semble invalider les hypothèses jusque-là nombreuses sur l'origine et la signification des Ig anti-PEG. Enfin, il est plutôt clair que le PEG présente un potentiel immunogène non négligeable, notamment pour les conséquences que peuvent engendrer les ADA. Aussi, un dépistage de la prédisposition génétique décrite ci-dessus pourrait constituer un outil d'aide à la décision d'administrer ou non une PT PEGylée à un patient.

III.1.2.B. Oxydation

L'oxydation consiste en l'ajout d'un atome d'oxygène sur des résidus sensibles tels que la méthionine ou l'asparagine, moins souvent le tryptophane et la cystéine. Dans l'organisme, elle fait suite à un stress oxydant. Lors du métabolisme cellulaire, des espèces réactives à l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ou ROS) sont naturellement formées et des enzymes les neutralisent. Lors d'un stress cellulaire ou d'une inflammation par exemple, ces enzymes ne suffisent plus à traiter tous les ROS qui sont alors libérées dans le milieu extracellulaire et provoquent un stress oxydant. Les ROS peuvent modifier les membranes et des macromolécules (y compris les protéines) par des réactions d'oxydo-réduction. Suite au stress oxydant auquel peuvent être sujettes les cellules produisant des PT, nombre d'entre elles contiennent des oxydations involontaires, notamment les mAbs par exemple. Hors de l'organisme, l'oxydation d'une protéine peut survenir par l'action de l'air si le tampon dans lequel elle est diluée ne l'en protège pas. Les conditions de stockage (solution, tampon, durée, température, UV, *etc.*) peuvent augmenter l'oxydation des résidus sensibles des PT. Par exemple, les taux d'oxydation des méthionines d'un mAb en solution sont similaires entre un stockage à 2-8°C pendant 3 ans et un stockage à 25°C pendant 6 mois.

Pour les mAbs, les méthionines situées au niveau de la région charnière et de la région entre le CH₂ et le CH₃ sont généralement les premières à être oxydées. Les tryptophanes oxydés sont plutôt situés au niveau des CDR ([Liu et al. 2008](#)). L'oxydation peut donc affecter l'activité biologique des protéines suivant les résidus qu'elle modifie. Par exemple, l'oxydation de méthionines situées dans les sites d'activité de l'hormone de croissance et de la somatomammotrophine chorionique humaines affecte leur liaison au récepteur et par conséquent leur activité biologique ([Teh et al. 1987](#)).

L'oxydation des protéines peut être la cause de plusieurs pathologies inflammatoires et autoimmunes. Elle joue un rôle prépondérant dans la levée de la tolérance envers les LDL dans l'apparition de l'athérosclérose. En effet, des LDL oxydées peuvent constituer des néo-épitopes

et induire une réponse immunitaire humorale, pouvant mener à des symptômes autoimmuns graves. Ce mécanisme appelé “intolérance à l’oxydation post-traductionnelle” est responsable d’autres pathologies autoimmunes (lupus et maladie pulmonaire obstructive chronique) (Hörkkö *et al.* 1996; Virella & Lopes-Virella 2008). Les ROS sont associés à d’autres modifications post-traductionnelles indésirables des protéines résultant de réactions secondaires. La nitration d’une tyrosine produit la 3-nitrotyrosine, et la liaison d’un carbohydrate modifié par une réaction de Maillard avec une lysine ou une arginine constitue la glycation, ce sont deux modifications aux effets souvent néfastes. En effet, des autoanticorps peuvent être développés contre des protéines modifiées (collagènes, protéoglycanes, etc.) et provoquer des symptômes d’AR. Notons que 90% des patients atteints d’AR présentent des taux élevés de ROS (Burska *et al.* 2014). Aussi, la glycation de l’IFN β recombinant augmente son immunogénicité chez des patients traités contre la SEP (Bozhinov *et al.* 2012). Au vu des effets que peut causer l’oxydation de protéines endogènes, et de son incidence parmi les mAbs notamment, des moyens de précaution et de contrôle liés à l’oxydation des PT sont pris par les laboratoires développeurs. Ces derniers peuvent modifier les résidus présentant des risques d’oxydation par exemple, et surtout améliorer les conditions de stockage du produit final.

III.1.2.C. Agrégation

L’agrégation est une agglutination anormale de protéines en solution relevant d’une instabilité physique de celles-ci. Un agrégat se forme le plus souvent de façon désordonnée et dépasse largement le poids moléculaire de la protéine sous sa forme monomérique. Une protéine en solution peut être agrégée sous sa forme repliée et active, partiellement ou totalement dépliée, ces différentes conformations peuvent caractériser les agrégats. Ces derniers peuvent aussi être caractérisés par leur taille, réversibilité, conformation, morphologie et par la présence de modifications des liaisons covalentes (Narhi *et al.* 2012). L’agrégation peut impliquer des liaisons faibles réversibles (forces de van der Waals, interactions, hydrophobes, etc.) des ponts disulfures covalents réductibles et des ponts dityrosines covalents non-réductibles, de type carbone-carbone ou carbone-sulfure. Les agrégats réversibles peuvent être dissociés en modifiant les caractéristiques physicochimiques du milieu aqueux (dilution, pH, etc.) ou par l’action d’agents réducteurs. *In vivo*, l’agrégation est par exemple responsable de la maladie d’Alzheimer. Très brièvement, le peptide β -amyloïde s’agrège dans le milieu extracellulaire, s’accumule en plaques amyloïdes insolubles qui compriment les neurones et déclenchent les symptômes de la maladie (Rudelli, Ambler & Wisniewski 1984).

L’agrégation d’une PT peut être causée par de nombreux facteurs : un processus de repliement incomplet dans l’appareil de Golgi, réactions chimiques par les ROS, rupture et néoformation de ponts disulfures, chocs physiques ou thermiques, pH basique, etc. Elle peut survenir après sécrétion de la cellule de production (milieu de culture, stockage), pendant les étapes de transformation (extraction, purification, etc.) ainsi que dans les étapes précédant l’administration (transport, stockage, seringue, etc.). La glycosylation et la PEGylation peuvent protéger les résidus hydrophobes d’une PT et limiter son agrégation en augmentant sa solubilité (Fernández *et al.* 2001). Au contraire, d’autres MPT peuvent augmenter sa capacité d’agrégation en modifiant l’équilibre entre les formes repliées et dépliées de la protéine, notamment la glycation, l’oxydation, l’hydrolyse, etc. La capacité d’agrégation varie d’une

protéine à une autre, elle dépend de la stabilité physicochimique et de la taille de la protéine. Par exemple, les IgG4 s'agrègent plus facilement que les IgG1 car moins elles sont stables, et les protéines de petite taille s'agrègent moins facilement que les grandes car davantage de liaisons sont nécessaires à leur stabilité (Moritz & Stracke 2017; Strand, Huang & Xu 2013). Aussi, les Ac sont connus pour contenir dans leur séquence des régions favorisant l'agrégation (*aggregation prone regions*, ou APR), situées au niveau du Fc et des CDR. Les APR favorise l'auto-association et la formation de dimères, puis d'oligomères, jusqu'à la formation d'agrégats insolubles (Wang, Singh, and Kumar 2010).

Dans une utilisation thérapeutique des protéines, l'agrégation est toujours redoutée puisqu'elle neutralise leur activité biologique et augmente considérablement leur potentiel immunogène. Une PT agrégée peut en effet induire des réponses immunitaires thymo-indépendante et thymo-dépendante. D'une part, la PT agrégée peut agir comme un ATI en activant directement des LB et induire une production d'IgM de faible affinité pour la PT. Des expériences ont montré que des protéines agrégées (β -amyloïde *in vivo* et différents mAbs *in vitro*) peuvent lier plusieurs BCR à la fois, se lier aux TLR2-4 et présenter des épitopes conformationnels reconnus par les LB. Les protéines agrégées peuvent donc constituer un signal de danger semblable à un MAMP (*Microbe-Associated Molecular Pattern*) et induire la sécrétion de cytokines proinflammatoires menant à une réponse humorale thymo-indépendante. Plus précisément sur les mAbs, leurs affinités pour des protéines du complément et des récepteurs au Fc augmentent avec l'agrégation et la taille de l'agrégat. L'agrégation présente donc un risque fort d'immunogénicité pour les mAbs. D'autre part, une protéine agrégée peut être plus facilement phagocytée par des CPA, provoquer sa maturation et induire des signaux de danger ainsi que des signaux de costimulation. Elle peut là aussi être reconnue comme un MAMP par les DC. Cette antigénicité est due à sa taille et à la présence et la fréquence de néo-épitopes à sa surface. Davantage de peptides de la PT sont ensuite associés aux molécules HLA de classe II puis présentés à des LTh, et des IgG de forte affinité peuvent être développés contre la PT après activation des LTh puis des LB. Enfin, l'agrégation peut lever la tolérance envers une PT si celle-ci détient un homologue endogène (Brinks, Jiskoot & Schellekens 2011; Moussa *et al.* 2016). Ces mécanismes immunitaires se traduisent cliniquement par une augmentation de l'apparition d'ADA de tous types (NADA, *etc.*). Cependant, il est difficile d'associer précisément l'apparition d'ADA à l'agrégation. Il y a plusieurs raisons à cela : il n'y a pas de réponse immunitaire spécifique de l'agrégation, les facteurs d'immunogénicité sont nombreux et complexes, et c'est surtout une modification non intentionnelle variable à tous niveaux (lot, protéine, injection, *etc.*). Seuls des tests de prédiction peuvent donc associer des ADA à l'agrégation, ils restent cependant des modèles prédictifs. Les laboratoires développeurs pratiquent donc des contrôles qualitatifs importants afin de se prémunir du risque d'immunogénicité sérieux que constitue l'agrégation. De plus, les techniques de stockage limitant les risques d'agrégation sont favorisées, la lyophilisation permet par exemple de limiter les interactions physicochimiques des PT et ainsi de maintenir leur stabilité sur une longue période.

III.1.2.D. Acides aminés non naturels

Les pT, bien plus récents que les PT dans la pharmacopée, peuvent aussi être modifiés.

Ils sont le plus souvent issus d'une synthèse chimique. Durant cette synthèse, des modifications non naturelles peuvent être introduites précisément afin d'améliorer le peptide. Leur stabilité, solubilité, activité biologique et d'autres paramètres peuvent ainsi être augmentés par l'introduction d'acides aminés non naturels (aaNN). Cependant, les effets des aaNN sur la toxicité et surtout sur l'immunogénicité sont encore peu décrits. En-dessous de neuf résidus, les peptides présentent une faible immunogénicité car leur taille ne leur permet pas de constituer un épitope. C'est par exemple le cas de l'eptifibatide, composé de sept résidus, qui n'induit pas d'ADA malgré sa séquence non humaine ([Lorenz et al. 1999](#)).

Plusieurs pT ont obtenu une AMM et contiennent des modifications introduites chimiquement. Le sermorelin, un peptide semi-synthétique analogue de l'hormone de libération de l'hormone de croissance humaine contient une amidation à son extrémité C-terminale. Après synthèse par voie recombinante, un groupement NH₂ est ajouté par voie enzymatique et augmente l'activité biologique du peptide. Ce peptide contient aussi des aaNN à son extrémité N-terminale, dont un tryptophane D et une alanine désaminée, ces derniers augmentent sa stabilité métabolique ([Bongers et al. 1992](#)).

- Acides aminés D

Les acides aminés D (aaD) sont des énantiomères des acides aminés L (aaL) naturellement protéinogènes. Leur chaîne latérale et l'hydrogène de part et d'autre du carbone α sont inversés par rapport aux aaL. Les aaD sont bien plus rares dans le vivant que les aaL. De très nombreux antibiotiques d'origine bactérienne contiennent des aaD et sont utilisés chez l'Homme (gramicidine, tyrocidine, *etc.*). L'introduction d'aaD dans une séquence peptidique augmente sa stabilité enzymatique car peu de protéases sont capables de couper des liaisons peptidiques comprenant des aaD chez les organismes pluricellulaires ([Gentilucci, De Marco & Cerisoli 2010](#)). Les AMPs naturels composés d'aaD, partiellement ou complètement, ont donc une résistance accrue aux protéases par rapport à leurs analogues composés uniquement d'aaL. Leur activité antibactérienne n'est cependant pas augmentée et la dose efficace est souvent proche de la toxicité, rendant difficile leur développement thérapeutique malgré une certaine teneur en aaD et une plus longue demi-vie dans l'organisme ([Hamamoto et al. 2002](#)). Il faut attendre que l'introduction d'aaD dans des AMPs se développe avec les technologies de synthèse chimique et de criblage dans les années 2000 pour que les aaD puissent augmenter la toxicité sélective des AMPs ([Li et al. 2016](#)). Aujourd'hui, plusieurs pT sur le marché contiennent des aaD, dont principalement des AMPs antibiotiques locaux (gramicidines, actinomycines, bacitracines, lantibiotiques, *etc.*) et des agonistes de GPCR (brémélanotide, afamélanotide, icatibant, ételcalcétide, *etc.*) ([Ericson et al. 2017](#); [Feng & Xu 2016](#); [Goodwin et al. 2012](#)).

Les aaD sont les aaNN pour lesquels les effets sur l'immunogénicité ont été le plus étudiés. En 1965, des tests sur la réponse immunitaire contre des séquences peptidiques répétitives sont effectués sur le cochon d'Inde, le lapin, la souris et l'Homme. Ils évaluent les réactions cutanées, d'hémagglutination et de précipitation sérique (formation de complexes immuns) après des injections répétées de séquences contenant des aaD et/ des aaL. Seuls les séquences de poly-aaL déclenchent des réponses immunitaires observables chez chacune des espèces ([Maurer 1965](#)). Suite à la déclaration d'Helsinki en 1964, les essais scientifiques sur

l'Homme sont interdits, les effets des aaD sur l'immunogénicité de peptides seront par la suite évalués exclusivement sur les animaux. En 1968, une étude confirme que les séquences peptidiques répétitives en poly-aaD sont moins immunogènes chez le lapin que chez le cochon d'Inde. L'immunogénicité réduite des aaD est elle aussi confirmée chez les deux rongeurs, les auteurs expliquent cette réduction par l'absence de protéases capables de découper les chaîne poly-aaD (**Jaton & Sela 1968**). En 1993, une première étude montre qu'une protéine immunogène composée entièrement d'aaD n'induit aucun IgG contrairement à son homologue composée d'aaL (**Dintzis et al. 1993**). La même année et toujours chez la souris, une seconde étude montre que le remplacement d'un à plusieurs aaL par un aaD dans un peptide immunogène induit plus tardivement des Ig, dont des IgG3 en plus grande proportion que la normale (**Benkirane et al. 1993**). L'année suivante, une étude montre qu'une version en aaD de la toxine d'abeille mélittine s'avère moins immunogène chez la souris que la version originelle en aaL (**King et al. 1994**). Les trois études notent une rétention *in vivo* accrue des séquences contenant des aaD, et expliquent sur la baisse d'immunogénicité par une plus faible capacité des séquences contenant des aaD à être clivées, apprêtées et présentées en surface des CPA. La même année, l'équipe de Hill étudie l'effet d'une modification ponctuelle de plusieurs types, dont des aaD, sur la liaison d'un peptide aux molécules HLA-DR1-4. Pour les deux molécules, l'introduction d'un unique aaD dans le core du peptide diminue modérément à fortement la liaison. Plus précisément, un aaD au niveau de la poche d'ancrage P1 a un effet délétère similaire à une alanine (CH₃ en chaîne latérale) (**Hill et al. 1994**). Ces travaux constituent la première étude systématique évaluant l'effet des aaD sur des molécules de présentation humaines, confirmant l'effet important que peut avoir l'introduction ponctuelle d'un aaD dans une séquence peptidique. En 1994, l'équipe de Maillère démontre l'effet délétère de l'introduction d'un aaD dans le core d'un peptide sur sa liaison à une molécule de présentation murine. Cet effet est semblable à la méthylation du carbone α (résultat similaire à l'alanine) et se répercute sur la capacité des peptides contenant de aaD à activer des cellules T murines, confirmant les résultats obtenus précédemment (**Maillère, Mourier, Cotton, et al. 1995**).

En 2003, une étude vient compléter ces observations avec l'introduction d'un aaD au niveau des poches d'ancrage P6 ou P7 d'un peptide bon ligand de la molécule HLA-DR1. Mise à part la D-proline en P7, chaque aaD introduit dans ces poches diminue significativement l'affinité du peptide pour la molécule HLA (**Zavala-Ruiz et al. 2003**). Ces résultats ne traitent néanmoins que d'un nombre limité de molécules HLA de classe II, il serait difficile d'avancer des résultats similaires pour les autres molécules. De plus, ils ne tiennent pas compte du répertoire T qui pourrait réagir face à des Ag contenant des aaD. En 2005, une autre étude confirme que l'introduction de trois aaD aux extrémités N et C-terminales de MUC2, un épitope tumoral, protège le peptide des protéases contenues dans le sérum et lysosome humains. De plus, il faut au moins trois aaD à l'extrémité N-terminale de MUC2 pour diminuer significativement sa reconnaissance par un mAb murin spécifique, l'introduction d'aaD en C-terminale n'a que peu d'effet sur la reconnaissance par le mAb (**Tugyi et al. 2005**). Ces résultats sont les premiers à étudier l'effet des aaD sur la reconnaissance directe par un Ac, bien que murin.

Très récemment, il fut révélé que le pt ételcalcétide induit des ADA chez 7,1% des patients traités contre l'insuffisance rénale chronique. L'ételcalcétide est une chaîne peptidique

de 7 aaD acétylée en N-terminale et reliée par un pont disulfure à une L-cystéine. Les ADA n'ont pas d'effet sur la PK, l'efficacité thérapeutique ni la santé des patients, la plupart sont préexistants (**Kroenke et al. 2017**). C'est le premier cas d'immunogénicité avéré chez l'Homme contre une séquence d'aaD, la L-cystéine ayant peu de chances de constituer un épitope à elle seule. Au vu de la faible incidence d'ADA et de leur faible impact sur la réponse immunitaire on peut affirmer que les aaD comportent un risque d'immunogénicité minimal chez l'Homme. En effet, les nombreux résultats présentés ci-dessus sont pour la plupart vérifiés chez l'animal et témoignent d'une baisse générale de l'immunogénicité. Cette baisse serait due à une perte d'affinité pour les molécules de présentation, l'effet des aaD sur la liaison à deux molécules HLA de classe II a été évalué et corrobore ces observations, même si peu de tests chez le modèle humain ont à ce jour été effectués.

- Peptides rétro-inverso

Les peptides rétro-inverso (RI) sont des peptides linéaires de synthèse chimique dont les résidus sont des aaD reliés par des liaisons peptidiques inversées. Afin de mimer l'activité d'un peptide, l'ordre de sa séquence en aaD est lui aussi inversé. Les peptides RI sont moins sensibles aux protéases qui ne reconnaissent pas les liaisons peptidiques inversées. Ils gardent une activité similaire au peptide natif en aaL grâce aux chaînes latérales qui conservent la même topologie, des différences de liaison au récepteur peuvent cependant exister (**Wei et al. 2014; Xie et al. 2015**). A ce jour, aucun peptide RI n'a obtenu d'AMM. Cependant, des candidats prometteurs sont en développement, comme par exemples le peptide RI-3, un anti-métastatique testé chez la souris, et le peptide RICK (*retro-inverso CADY-K peptide*), un CPP testé *in vitro* permettant le transport intracellulaire d'ARNsi à activité anti-cancéreuse (**Carriero et al. 2017; Vaissière et al. 2017**).

Au même titre que les aaD, les peptides RI contiennent des aaNN et l'étude de leur immunogénicité est richement décrite comparativement aux autres modifications non-naturelles. Dès 1994, les équipes de Muller et Guichard se penchent sur la reconnaissance de peptides RI par des Ig chez la souris immunisée contre un peptide issu de l'histone H3. Ils montrent que l'analogue RI est reconnu de la même manière que le peptide natif par des IgG3 (**Guichard et al. 1994**) puis avec la même affinité que la protéine native par les IgG (**Benkirane et al. 1995**). Aussi, des autoanticorps issus de sérum de patients atteints d'une maladie auto-immune et de souris atteintes de lupus montrent la même affinité pour les peptides RI que pour la protéine native, respectivement (**Briand et al. 1995**). Des peptides RI issus de la protéine virale VP1 et couplés à un liposome transporteur activent *in vitro* et *in vivo* des lymphocytes T CD4 murins spécifiques de peptides natifs mais avec un signal réduit, notamment à cause du manque de liaisons hydrogènes entre les peptides RI et les molécules de présentation murines (**Bartnes et al. 1997; Mézière et al. 1997**). Une étude récente chez le lapin a montré *in vitro* et *in vivo* qu'une version RI d'un épitope B est reconnue de la même manière que le peptide et la protéine native par des IgG (**Li et al. 2015**). Deux études vont montrer des résultats différents dans d'autres modèles puisque les IgG dirigés contre un peptide natif seul ne reconnaissent pas la version RI (**Hervé et al. 1997**) et les versions RI d'épitopes T et B d'un parasite ne sont pas reconnues respectivement par des PBMC ni des IgG issus de patients infestés (**Iwai et al. 2001**). L'antigénicité des versions RI paraît donc dépendre soit de

l'espèce étudiée et semble différente chez l'Homme, soit de la séquence étudiée. En 2003, l'équipe de Salunke compare les structures des peptides RI avec les séquences natives et montre *in vitro* que la présentation en surface cellulaire et la reconnaissance par des LT et IgG murins d'un peptide natif et de sa version RI dépendent des propriétés structurales de ces derniers. Pour qu'une version RI présente un mimétisme fonctionnel et antigénique, elle doit conserver la structure du peptide natif, cette dernière dépendant évidemment de la séquence (Nair *et al.* 2003).

Ces observations seront étayées par l'étude de la liaison de versions RI aux molécules de présentation aboutissant à une baisse d'affinité générale. Les travaux de Hill montrent une très faible affinité qu'un peptide RI a pour les molécules HLA-DR1-4, les liaisons hydrogènes entre la chaîne principale du RI et les molécules HLA semblent ainsi compromises (Hill *et al.* 1994). Chez la souris, des peptides RI issus de VP1 et couplés à un liposome transporteur sont testés et leur liaison aux molécules CMH de classe II est réduite par rapport à celle du peptide natif (Bartnes *et al.* 1997; Mézière *et al.* 1997). Ensuite, une très faible affinité *in vitro* de quatre peptides RI d'origines différentes pour deux molécules CMH de classe II murines par rapport aux peptides natifs est observée et confirme la tendance à la baisse d'affinité (Hervé *et al.* 1997).

Enfin, l'immunogénicité des versions RI est étudiée chez différents rongeurs, la souris représentant le modèle d'étude le plus décrit, et ces études révèlent une tendance des peptides RI à être aussi immunogènes que la forme native, du moins en présence d'une protéine conjuguée. Chez la souris, un peptide RI seul semble incapable d'induire une prolifération *in vitro* de LT et une réponse humorale *in vivo*, notamment à cause d'une réduction considérable d'affinité pour les molécules CMH de classe II causée par la rétro-inversion (Hervé *et al.* 1997). Cette étude a été menée sans conjugaison du peptide RI et indique que la présence d'une protéine conjuguée semble jouer un rôle dans l'augmentation des réponses immunitaires contre les peptides RI puisque les études suivantes obtiendront des résultats différents. En 2002, une immunisation efficace contre la grippe par voie nasale est effectuée avec une version RI d'un épitope B de la grippe conjugué à un adjuvant, les souris immunisées développent alors une forte réponse humorale (IgG sériques et IgA bronchiques) (Ben-Yedidia *et al.* 2002). L'année suivante, une version RI de l'hormone peptidique GnRH conjuguée et injectée chez la souris avec et sans adjuvant induit une réponse humorale, les IgG neutralisent la version RI de la GnRH ainsi que la GnRH endogène (Fromme *et al.* 2003). Plus tard, des souris sont immunisées efficacement contre deux toxines par des peptides RI comprenant des épitopes respectifs, sans conjugué par voie orale et avec conjugué par voie parentérale. Seules les versions RI insensibles aux protéases gastriques permettent une immunisation par voie orale et les IgG induits contre chaque peptide reconnaissent les homologues ainsi que la toxine native (Fischer *et al.* 2007). D'après ces études, les peptides RI peuvent donc être immunogènes et reconnus de la même manière que leurs homologues natifs chez la souris, la rétro-inversion donnant l'avantage de protéger la séquence de la digestion. Chez le cochon d'Inde, un peptide RI dérivé de la protéine virale VP1 et conjugué à une protéine transporteur induit davantage d'anticorps neutralisants et une réponse humorale plus durable que le peptide natif, l'immunogénicité semble donc augmentée chez ce rongeur (Briand *et al.* 1997).

Ainsi, les différences de réponses immunitaires observées face aux peptides RI testés semblent dépendre prioritairement de leurs propriétés structurales comparativement à celles du

peptide natif, de la présence d'une protéine conjuguée et du modèle animal choisi. Aussi, les RI semblent avoir une capacité réduite à se lier aux molécules de présentation comme cela a été observé chez la souris, mais cette perte d'affinité semble pouvoir réduire la réponse immunitaire contre les peptides RI mais pas suffisamment en présence d'une protéine immunogène conjuguée, expliquant une immunogénicité comparable entre les versions RI et les formes natives chez la souris.

- Acides iso-butyriques

Les acides iso-butyriques (aib) sont caractérisés par un groupement méthyle de part et d'autre du carbone α , ils équivalent à une alanine C_{α} -méthylée ou une glycine C_{α} -diméthylée. Cette modification limite drastiquement le nombre de conformations possibles de la chaîne principale et favorise une configuration en hélice α . Ils constituent une alternative intéressante à l'insertion d'une proline (forme un coude dans une séquence peptidique) pour modifier une conformation particulière, ils peuvent ainsi diminuer efficacement la capacité d'agrégation (**Kumita et al. 2003**). Les aib peuvent aussi moduler l'activité biologique selon leur position en modifiant la structure de la séquence, ils sont très courants chez les microorganismes (**Prasad & Balaram 1984**). Un aib est ajouté en milieu de séquence d'une construction peptidique immunogène et la protège des protéases après injection chez le lapin et la souris. L'aib permet ici de remplacer la fonction non métabolisable des constituants lipidiques de l'adjuvant de Freund généralement utilisé pour augmenter une réponse immunitaire (**Krikorian et al. 2005**). Un petit facteur de transcription de synthèse dimérique contenant des aib a été développé afin de mimer l'activité régulatrice de la protéine Cro du bactériophage λ . Le dimère se lie avec une excellente affinité pour le même site opérateur que Cro grâce à sa structure en hélice et a été testé *in vivo* chez *E. coli* et représente un enjeu prometteur pour la production de facteurs de transcription synthétiques (**Mazumder et al. 2012**). Un inhibiteur d'interactions entre protéines impliquées dans la prolifération de mélanomes, le TRTK-12, est en développement et contient un aib qui lui confère une configuration hélicoïdale. Cette dernière lui permet de se lier à une protéine avec une grande affinité et de neutraliser son activité. Couplé à un CPP, le TRTK-12 montre un effet apoptotique des cellules de mélanome murin avec une toxicité insignifiante (**Dhar et al. 2014**). Puis, les aib insérés dans une construction peptidique polymérique immunogène injectée chez la souris maximisent la formation d'hélices α nécessaires à la stabilité de la construction exprimée en surface de micelles (**Kim et al. 2017**).

La reconnaissance des aib a été étudiée uniquement envers des anticorps humain, des IgG spécifiques d'un épitope de parasite et issus de patients infestés montrent une affinité accrue pour un peptide contenant des aib. Ces résultats montrent qu'une stabilité conformationnelle portée par un aib semble aussi induire une meilleure reconnaissance par des IgG (**Bossus et al. 1997**). La liaison aux molécules du CMH n'a été étudiée que sur une classe I chez la souris, l'introduction d'un à deux aib dans un épitope T CD8 peu immunogène augmente *in vitro* la liaison à une molécule CMH et rallonge sa présentation en surface (**Baratin et al. 2002**). L'effet des aib sur l'immunogénicité est décrit par quelques articles seulement et uniquement chez les rongeurs. En 1995, une étude sur la réponse humorale *in vivo* chez le lapin montre qu'un aib peut modifier la structure secondaire d'un peptide et favoriser une structure en hélice α , améliorant l'immunogénicité du peptide porteur (**Gurunath et al. 1995**). Toujours

chez le lapin, un oligopeptide transporteur contenant un aib est conçu afin d'améliorer l'immunogénicité d'un peptide conjugué portant un épitope B. La stabilité d'une structure hélicoïdale permise par l'aib améliore à nouveau la réponse humorale *in vivo* envers le peptide conjugué et semble induire une réponse T indépendante (Sakarellos-Daitsiotis *et al.* 1999). Chez la souris, la capacité du complexe transporteur à augmenter les réponses humorale et cytotoxique *in vivo* envers un épitope viral est confirmée bien plus tard (Skarlas *et al.* 2011).

Ainsi, les aib peuvent augmenter l'immunogénicité d'une séquence peptidique chez le rongeur en stabilisant les hélices α . Cependant, aucune étude n'a encore étudié la reconnaissance spécifique des aib par des récepteurs cellulaires, quelle que soit l'espèce.

- Acétylation

L'acétylation consiste en l'ajout d'un groupe acétyle COCH_3 par des enzymes acétyltransférases, le plus souvent au niveau de la lysine des protéines intracellulaires. C'est une modification co-traductionnelle et post-traductionnelle qui peut avoir lieu chez les organismes procaryotes, au niveau des acides glutamique et aspartique. Au même titre que l'acétylation, elle peut donc être naturelle mais est généralement introduite par voie chimique lors de la synthèse des pT. L'acétylation intervient dans la division cellulaire, le transport de molécules vers le noyau et le métabolisme cellulaire. Dans le noyau, elle sert par exemple à diminuer l'affinité des histones pour l'ADN en neutralisant la charge électrique de la lysine afin de rendre l'ADN plus accessible, une déacétylation le rend à l'inverse moins disponible à la lecture (Allfrey, Faulkner & Mirsky 1964). Aussi, les acétylations multiples des lysines du facteur de transcription GATA1 lui permettent de se lier à la chromatine (Lamonica, Vakoc & Blobel 2006). Ce dernier régule l'expression de tous les gènes spécifiques aux cellules érythroïdes et mégacaryocytes, les mutations de GATA1 sont associées à une anémie congénitale ou une leucémie mégacaryoblastique (Gamsjaeger *et al.* 2011).

Les effets de l'acétylation sur le système immunitaire sont peu décrits dans la littérature. L'activation des LT murins par un peptide issu d'une neurotoxine de serpent est considérablement augmentée lorsque celui-ci subit une acétylation de l'extrémité N-terminale et une amidation de l'extrémité C-terminale. Cette antigénicité amplifiée est décrite comme le résultat d'une protection des exoprotéases accrue et une présentation plus longue en surface des CPA (Maillère *et al.* 1995). Aussi, l'acétylation augmente l'affinité du peptide pour une molécule CMH de classe II murine. Elle ne semble cependant pas augmenter l'immunogénicité du peptide chez la souris immunisée contrairement à l'amidation qui induit davantage d'Ig spécifiques de l'extrémité C-terminale amidée (Maillère & Hervé 1997). Ces résultats chez la souris sont difficilement transférables à l'Homme, mais témoignent de l'effet que peut avoir une modification n'affectant pourtant qu'un seul résidu. On peut aussi citer la protéine allergène végétale Art v 1 dont l'acétylation par voie chimique a baissé l'allergénicité tout en augmentant son immunogénicité. La baisse de l'allergénicité a été évaluée par une réduction de la réponse en IgE au profit d'une réponse en IgG bloquants chez des lapins immunisés. D'autre part, des tests d'activation de basophiles et de prolifération de PBMC issus de patients allergiques ont montré une diminution de l'allergénicité de la protéine ainsi acétylée mais avec un maintien de l'immunogénicité chez le lapin (Perovic *et al.* 2009).

Enfin, depuis la tombée du brevet en 2006 du Neupogen (filgrastim), une version

recombinante non glycosylée du G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), une dizaine de biosimilaires se sont développés. Tous présentent des différences mineures de séquences (inférieures à 1% de la séquence), dont un biosimilaire présente une acétylation. Ces différences sont dues aux systèmes de production qui diffèrent de celui du filgrastim de référence, et semblent ne pas impliquer de différences cliniques (**Hausberger et al. 2016**). Enfin, le peptide enfuvirtide inhibiteur de la fusion du VIH-1 contient une acétylation introduite chimiquement à son extrémité N-terminale. Cette modification le protège des exoprotéases sans modifier son activité inhibitrice (**McGaughey et al. 2003**).

- Méthylation

La méthylation consiste en l'ajout d'un groupe méthyle CH₃ par des enzymes méthyltransférases, le plus souvent au niveau des résidus de lysine et l'arginine, davantage sur l'azote (N-méthylation) que sur le carbone α (C α -méthylation). La N-méthylation intervient elle aussi dans l'accessibilité de l'ADN en modulant l'affinité des histones à ce dernier (**Allfrey et al. 1964**), ainsi que dans la voie NF κ B de production cytokinique et de survie des LB et la mobilité des DC et neutrophiles.

La méthylation des peptides est bien plus répandue dans le vivant que celle des protéines, surtout dans les organismes marins et microorganismes. Cette plus grande fréquence se retrouve dans les pT, notamment par la commercialisation d'acides aminés N-méthylés prêts à l'emploi pour la synthèse chimiques. Par exemple la ciclosporine A contient sept résidus N-méthylés sur les onze qu'elle contient, elle a été approuvée par la FDA en 1983 comme immunosuppresseur à la suite d'une transplantation chez l'Homme (**Flechner et al. 1984**). La méthylation augmente la stabilité enzymatique des peptides en limitant leur dégradation, cette protection peut varier en fonction des résidus méthylés. Elle permet aussi de modifier la conformation de la séquence peptidique et parfois son activité biologique. En introduisant une N-méthylation sur chaque résidu d'un peptide candidat, les relations structure-activité (*Structure-Activity Relationship*, SAR) peuvent être étudiées facilement, cette technique est largement répandue dans le développement des pT (**Gentilucci, De Marco & Cerisoli 2010**). Quelques PT sont N-méthylées afin d'augmenter leur stabilité ou leur activité biologique en modifiant leur conformation : somatostatine, angiotensine II, endothéline, etc. (**Biron et al. 2008**). La C α -méthylation est bien moins décrite et répandue dans les protéines et peptides thérapeutiques, notamment à cause de l'absence d'acides aminés C α -méthylés prêts à l'emploi et de leur introduction peu aisée par voie de synthèse en phase solide (**Sagan et al. 2004**). Elle est toute de même présente dans plusieurs PT synthétisées dans des bactéries, cette modification étant plus courante chez les procaryotes que les eucaryotes. L'hémoglobine humaine synthétisée par *E.coli* contient par exemple des C α -méthylations par remplacement de la leucine par une norvaline selon la composition du milieu de culture, cette modification ne modifie pas sa fonction (**Apostol et al. 1997**). Elle est aussi utilisée afin de radiomarquer des peptides d'intérêts thérapeutiques ou bien en oncologie (**Chin et al. 2013**).

Les effets d'une N-méthylation sur l'immunogénicité d'une séquence peptidique sont décrits dans quelques articles seulement, ceux concernant la C α -méthylation sont inexistantes. En 1975, la N-méthylation chimique des lysines de la toxine tétanique limite sa flexibilité mais pas sa conformation générale. Ces changements ne diminuent que très faiblement sa toxicité

chez la souris, empêchant l'étude de son effet sur l'immunogénicité (**Robinson, Picklesimer & Puett 1975**). Plus tard, il a été montré *in vitro* qu'une N-méthylation ponctuelle sur un peptide immunogène pouvait diminuer son affinité pour une molécule de CMH de classe II murine ainsi que son antigénicité face à des cellules T murines. Des résultats différents selon la position de la N-méthylation soulignent l'importance des résidus d'ancrage dans la liaison aux molécules de présentation ainsi que ceux reconnus par le TCR (**Cotton et al. 1998**). Quelques années plus tard, l'effet inverse est démontré sur un peptide bon ligand pour une molécule de présentation humaine. La N-méthylation au niveau du résidu d'ancrage P7 du peptide augmente son affinité pour la molécule HLA-DR1 (**Zavala-Ruiz et al. 2003**). Chez le cochon d'Inde, la méthylation et l'acétylation de lysines contenues dans des lipoprotéines *low density* (LDL) les rendent séparément immunogènes. Les Ac anti-LDL ne reconnaissent spécifiquement que les LDL modifiées (**Steinbrecher et al. 1984**). Plus tard, il sera découvert un mécanisme autoimmun similaire chez l'Homme, l'athérosclérose, caractérisée par l'induction d'auto-anticorps dirigés contre des LDL modifiées. Ces LDL sont modifiées non pas par acétylation ou méthylation comme chez le cochon d'Inde, mais par oxydation (**Virella & Lopes-Virella 2008**). Ces différences inter-espèces montrent la complexité du système immunitaire adaptatif, il induit évidemment des réponses espèces-dépendantes face à des Ag protéiques, mais aussi face à des modifications de séquences non protéiques, plus petites que la glycosylation par exemple.

- Réduction

La réduction d'un acide aminé consiste en l'incorporation d'une liaison peptidique réduite CH₂-NH au lieu de CO-NH, elle est souvent utilisée afin de protéger une séquence peptidique des protéases. La réduction d'une liaison peptidique est par exemple essentielle à la haute stabilité du pseudopeptide DIPP-NH₂[Ψ] agoniste des récepteurs opiacés μ et δ et en développement comme analgésique (**Gentilucci et al. 2010**). Il n'y a pas de peptide ni de protéine thérapeutique sur le marché contenant une liaison peptidique réduite.

Les effets d'une réduction sur l'antigénicité sont eux aussi peu décrits, ces effets sont soit comparés à d'autres modifications, soit couplés à l'étude de la liaison aux molécules de présentation. Des analogues réduits issus d'une protéine humaine montrent une protection accrue aux protéases et miment *in vitro* la séquence native face à des mAbs murins spécifiques de la protéine (**Guichard et al. 1994**). Chez l'Homme, la protection contre la trypsine que procure une réduction est confirmée. Aussi, une unique réduction permet de conserver *in vitro* l'antigénicité d'un épitope de parasite face à des LTc ou un mAb humains spécifiques du parasite alors qu'en parallèle, un unique aaD fait généralement perdre cette antigénicité (**Bastian et al. 2004**). Chez la souris et en parallèle de l'étude sur la N-méthylation d'un épitope, Cotton crible l'effet d'une unique réduction sur les mêmes paramètres : affinité pour une molécule de CMH de classe II et antigénicité face à des cellules T. L'effet est bien plus large que pour la N-méthylation puisqu'une unique réduction divise entre 5 et plus de 50 fois l'affinité et entre 20 et plus de 1000 fois l'antigénicité (**Cotton et al. 1998**). Toujours chez la souris, il est montré qu'une unique réduction dans un peptide le protège des protéases et augmente *in vitro* sa liaison à une molécule de classe I murine sur les cinq premières liaisons de l'épitope. Cependant, la plupart des réductions font perdre l'antigénicité *in vitro* de la

séquence face à des LTC murins spécifiques de la séquence native (Quesnel *et al.* 2001). Ces résultats sont différentes de ceux observés lors du criblage l'effet d'une réduction d'un épitope T de parasite sur l'affinité à une molécule CMH de classe I murine puisque les analogues présentent une affinité réduite à inexistante pour la molécule (Guichard *et al.* 1995). En 1996, une autre équipe montre qu'une réduction sur un épitope réduit *in vitro* l'affinité de la séquence pour une molécule CMH de classe II murine et fait perdre la reconnaissance par des LT murins spécifiques de la séquence native (Ettouati *et al.* 1996).

L'étude de la réduction sur l'immunogénicité est nettement moins décrite et chez la souris uniquement. Une réduction d'une des trois premières liaisons peptidiques de l'épitope de l'histone H3 permet de conserver l'immunogénicité de la séquence native (Benkirane *et al.* 1996). Plus tard, un pseudopeptide portant une liaison réduite est développé et est capable de mimer *in vitro* et *in vivo* l'immunogénicité de l'épitope T tumoral natif tout en augmentant sa stabilité enzymatique (Calbo *et al.* 2000). Ainsi, la réduction d'une liaison peptidique permet de protéger un peptide des protéases, quelle que soit la séquence et l'espèce. Cependant, les effets sur la liaison aux molécules de présentation et l'antigénicité diffèrent selon la séquence native, les molécules de présentation en jeu et l'espèce étudiée. Il est donc encore difficile d'établir une règle générale directe concernant l'effet d'une réduction sur l'immunogénicité, d'autant plus que très peu d'études ont concerné des molécules et cellules humaines.

- Peptoïdes

Les peptoïdes sont des résidus dont la chaîne latérale est transférée sur l'azote d'un acide aminé, ils équivalent à une succession de glycines N-méthylées. Cette modification non naturelle diminue l'hydrophobie de la séquence, la protège des protéases et peut modifier sa topologie et sa flexibilité (Zuckermann *et al.* 1992). Leur synthèse est plutôt aisée car des résidus primaires sont disponibles, mais encore aucun peptoïde thérapeutique n'est disponible sur le marché. Le peptoïde sarcosine est une N-méthylglycine, son introduction dans des protéines transmembranaires permet de les marquer et d'augmenter leur solubilité sans compromettre leur insertion dans la membrane (Stone and Deber 2017). En 2010, une équipe développe un peptoïde capable de se lier avec une grande affinité au CD28 et d'inactiver *in vitro* la prolifération et la réponse de LT murins et humains. *In vivo*, il atténue la maladie du greffon contre l'hôte chez la souris, ces résultats sont encourageants pour le développement d'immunomodulateurs résistants aux protéases (Li *et al.* 2010). De plus, l'utilisation de peptoïdes connaît un intérêt récent dans la conception de molécules anticancéreuses résistantes aux protéases et dont la solubilité est augmentée (Bhowmik, Basu & Ghosh 2017).

Les peptoïdes étant plus récents et moins répandus que les modifications précédentes, l'étude de leurs effets sur l'immunogénicité est très peu documentée. En 2002, des peptoïdes sont introduits dans un peptide bon ligand à une molécule CMH de classe II de rat, au niveau de résidus n'interagissant pas avec le sillon de la molécule CMH. En modifiant les caractéristiques de l'azote des résidus exposés à l'extérieur du sillon, les peptoïdes semblent inhiber les liaisons faibles impliquées dans la liaison du peptide à la molécule CMH, ce qui se traduit par une baisse d'affinité pour la molécule (de Haan *et al.* 2002).

Ainsi, les aaNN ont des effets différents les uns des autres sur la réponse immunitaire, mais induisent tous une meilleure résistance enzymatique et ont principalement été étudiés chez

la souris. Les aaD, les RI, la N-méthylation et les peptoïdes ont tendance à réduire les propriétés immunogéniques des séquences peptidiques, notamment à travers une baisse d'affinité pour les molécules CMH. La réduction semble diminuer l'affinité pour les molécules CMH mais maintenir l'immunogénicité. Les aib et l'acétylation semblent augmenter les interactions avec les molécules CMH et avoir un effet positif sur la reconnaissance par le système immunitaire. Enfin, la C_α-méthylation n'a jamais été étudiée pour ses effets sur le système immunitaire.

OBJECTIFS

Ce projet de thèse a pour objectif initial d'accompagner le développement préclinique de l'hormone relaxine (Rln2) au sein de Sanofi et comporte deux volets différents.

- *Comprendre l'immunogénicité clinique de la relaxine*

La Rln2 constitue un candidat prometteur pour le traitement de l'insuffisance cardiaque, mais elle a révélé une immunogénicité clinique lors d'injections répétées pour différents traitements. Afin de minimiser les risques d'ADA contre leur produit final, les équipes de Sanofi souhaitent comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces réponses immunitaires.

Compte tenu du rôle des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des antigènes dans le déclenchement des réponses immunitaires, mon premier volet d'expériences consiste en la quantification de lymphocytes T CD4 spécifiques de la Rln2 dans un large panel de donneurs sains afin d'évaluer le répertoire naïf de cellules T de la Rln2. La fréquence de cellules naïves spécifiques de la Rln2 est une information pour estimer le risque de développement d'ADA chez des patients puisque la réponse mémoire dépend de la taille du répertoire naïf. Cette dernière pourrait rendre compte de l'immunogénicité de la relaxine.

Dans un deuxième volet, il s'agira d'effectuer une cartographie des épitopes T de la Rln2 afin de mettre en évidence des zones de la séquence présentant un risque d'immunogénicité. Dans la perspective de conception d'analogues peptidiques de la relaxine qui seraient aussi actifs mais moins immunogènes, la connaissance de ces séquences pourrait s'avérer utile.

- *Etudier l'impact des modifications non naturelles sur l'immunogénicité des peptides*

La Rln2 présente une demi-vie dans l'organisme de plusieurs minutes seulement ainsi qu'une affinité élevée pour son récepteur mais qui pourrait être augmentée. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la Rln2 en modulant ces deux aspects, les équipes de Sanofi souhaitent y intégrer des modifications chimiques sans en augmenter l'immunogénicité. Les modifications chimiques couramment utilisées pour augmenter la demi-vie ou l'activité biologique ont des impacts encore largement méconnus sur le système immunitaire humain.

Mon deuxième objectif est d'étudier l'effet de l'introduction des modifications chimiques dans un peptide modèle sur son immunogénicité afin de faciliter le choix des modifications à introduire dans un peptide thérapeutique.

Six modifications chimiques seront étudiées. Elles seront introduites à la plupart des positions du peptide et leur impact sur la reconnaissance par des cellules T spécifiques du peptide natif, leur liaison aux molécules HLA et la capacité à induire des lymphocytes T CD4 sera étudié.

En parallèle de ces travaux, l'étude du potentiel immunogénique d'analogues de la Rln2 conçus par les équipes de Sanofi a constitué un travail supplémentaire dans son développement préclinique.

Ce projet de thèse se situe donc à la croisée des chemins entre l'acquisition de connaissances nouvelles en immunologie et leur application dans des processus de conception et de gestion des risques de peptides thérapeutiques.

RESULTATS

Article 1: Healthy donors exhibit a CD4 T cell repertoire specific to the immunogenic hormone H2-relaxin before any injection.

La Rln2 est une hormone peptidique composée de deux chaînes jouant un rôle dans la grossesse et la préparation à l'accouchement chez la femme et la survie des spermatozoïdes chez l'homme. Durant différents essais cliniques de la Rln2 incluant des injections répétées, des ADA ont été détectés chez un grand nombre de patients. Chez les patients traités contre la sclérodermie par exemple, 42% en moyenne ont développé des ADA non-neutralisants et diminuant la clairance de la Rln2 recombinante. La Rln2 présente des activités vasodilatatrice, anti-fibrotique et anti-inflammatoire et constitue un candidat prometteur pour le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique et aigüe. Cependant, la répétition des injections inhérentes au traitement ainsi que son immunogénicité nous ont amené à nous pencher sur les mécanismes impliqués dans l'apparition d'ADA. En reproduisant les mécanismes d'initiation d'une réponse humorale dans un modèle *in vitro* développé au laboratoire du docteur Maillère, le répertoire naïf de cellules T spécifiques de la Rln2 a pu être étudié précisément.

A partir de lymphocytes T CD4 issus de 23 sujets sains, des lignées cellulaires spécifiques ont été induites et amplifiées par des stimulations hebdomadaires. Ces stimulations se font en présence de DC immatures dérivées de monocytes autologues et préalablement chargées avec la Rln2. Trois semaines d'amplification sont nécessaires pour détecter le signal de cellules en fréquence très faible dont la spécificité est évaluée par ELISpot à IFN γ . La distribution des lignées positives suit une loi de Poisson et nous permet d'estimer la fréquence de cellules spécifiques de la Rln2 par million. Ce nombre permet d'aborder quantitativement le potentiel immunogénique de la Rln2 et de le comparer à d'autres PT ayant été testées sur le même modèle *in vitro*. Le nombre de donneurs et leurs différents phénotypes HLA de classe II prennent en compte l'important polymorphisme du système HLA.

Parmi les 23 donneurs ayant permis les expériences précédentes, la reconnaissance de peptides chevauchants de la Rln2 par les lignées spécifiques de cette dernière a été évaluée chez 14 donneurs dans un second ELISpot à IFN γ . La cartographie des épitopes T a ainsi été effectuée et a identifié précisément les zones responsables du potentiel immunogène de la Rln2.

L'affinité de chacun des peptides chevauchant avec dix molécules HLA de classe II a ensuite été mesurée par des ELISA en compétition. Cette affinité donne une estimation des peptides chevauchant de la Rln2 pouvant être le plus facilement présentés aux LT par les CPA. Elle permet aussi de confirmer l'immunodominance des épitopes T précédemment identifiés.

La Rln2 possède un nombre de cellules T spécifiques circulantes similaire à l'EPO, mais quasiment le double de donneurs ont induits des lignées spécifiques contre la Rln2. Ce potentiel immunogénique est porté par les extrémités N-terminales des deux chaînes de la Rln2 dans des proportions similaires. Enfin, ces régions présentent une bonne affinité pour une à plusieurs molécules HLA de classe II, expliquant la grande proportion de donneurs répondeurs malgré des phénotypes HLA variés. Regroupés, ces résultats permettent d'expliquer l'apparition d'ADA contre la Rln2 par l'existence d'un répertoire naïf de cellules T chez un grand nombre de patients. Durant l'ontogénie des LT, quelques-unes d'entre elles sont susceptibles de réagir

spécifiquement à la Rln2 suite à l'échappement thymique. L'expression très faible de la Rln2 dans l'organisme semble favoriser une ignorance durant l'ontogénie et permettre une tolérance de la part de ces cellules en périphérie. Mais des injections répétées de Rln2 recombinante peuvent fournir les signaux déclencheurs d'une réponse humorale contre la Rln2, à l'origine des ADA observés cliniquement.

**Healthy donors exhibit a CD4 T-cell repertoire
specific to the immunogenic human hormone H2-relaxin
before injection.**

Aurélien Azam^(1,2), Sergio Mallart⁽³⁾, Stephane Illiano⁽⁴⁾, Olivier Duclos⁽³⁾, Catherine Prades⁽¹⁾
and Bernard Maillère*⁽²⁾.

⁽¹⁾ Sanofi R&D, Biologics Research, 94400 Vitry sur Seine, France

⁽²⁾ CEA-Saclay, Université Paris-Saclay, SIMOPRO, 91191 Gif-sur-Yvette, France

⁽³⁾ Sanofi R&D, Integrated Drug Discovery, 91380 Chilly Mazarin, France

⁽⁴⁾ Sanofi R&D, Cardiovascular Diseases & Metabolism, 91380 Chilly Mazarin, France.

Running title: RLN2-specific CD4 T-cells from healthy donors.

Correspondence

Bernard Maillère*: bernard.maillere@cea.fr

Text word count (text and citations): 3603

Keywords:

Relaxin, immunogenicity, CD4 T-cell response, healthy donors, T-cell repertoire, naïve.

Abstract

H2-relaxin (RLN2) is a two-chain peptide hormone structurally related to insulin with a therapeutic potential in multiple indications. However, multiple injections of human RLN2 induced anti-RLN2 antibodies in patients, hampering its clinical development. As T-cell activation is required to produce antibodies, we wondered whether T-cells specific for RLN2 might be already present in the human blood before any injection. We therefore quantified the RLN2-specific T-cell repertoire using PBMCs collected from healthy donors. CD4 T-cells were stimulated in multiple replicates by weekly rounds of stimulation by dendritic cells loaded with RLN2 and their specificity was assessed by IFN- γ ELISpot. The number of specific T-cell lines was used to estimate the frequency of circulating T-cells. *In vitro* T-cell response was demonstrated in 18 of the 23 healthy donors, leading to the generation of 70 independent RLN2-specific T-cell lines. The mean frequency of RLN2-specific CD4 T-cells was similar to that of T-cells specific for known immunogenic therapeutic proteins. Using overlapping peptides, we identified two major T-cell epitopes hosted in the *N*-terminal parts of the α and β chains and common to multiple donors in agreement with their capacity to bind to multiple HLA-DR molecules. Our results provide important clues to the immunogenicity of H2-relaxin and highlight the weak central immune tolerance induced against this self-hormone.

Introduction

H2-relaxin (RLN2), a two-chain peptide hormone structurally related to insulin, is secreted by the corpus luteum and placenta during pregnancy (Bathgate *et al.*, 2013). RLN2 promotes growth of epithelial and stromal cells in the cervix and softens the pelvic ligaments in preparation for parturition. RLN2 also contributes to the cardiovascular changes that occur during pregnancy by increasing cardiac output. In addition, RLN2 has anti-inflammatory, angiogenic, and anti-fibrotic properties (Bathgate *et al.*, 2013). Owing to its broad biological functions, recombinant RLN2 has been tested in multiple acute clinical applications including cervical ripening (Weiss *et al.*, 2016) and heart failure (Teerlink *et al.*, 2013) and in chronic conditions in systemic sclerosis (Seibold *et al.*, 2000). Although a single dose or a reduced number of injections is well tolerated, multiple injections of RLN2 as applied in systemic sclerosis led to a high immunization rate (Seibold *et al.*, 2000; Blank and McDowell, 2014). After chronic subcutaneous administration, anti-RLN2 antibodies were detected at two weeks in 43% of scleroderma subjects (Seibold *et al.*, 2000). These antibodies were non-neutralizing, but were associated with increased serum concentrations of recombinant RLN2 which might hamper drug efficacy owing to the bell-shaped curve effect observed in different preclinical and clinical settings (Seibold *et al.*, 2000; Blank and McDowell, 2014).

Immunogenicity issues are frequently observed with replacement enzymes and therapeutic antibodies (Porter, 2001) as a result of differences in peptide sequence with endogenously produced counterparts. They have also been encountered for some but not all human recombinant hormones and cytokines. Most diabetic patients develop anti-human insulin antibodies that are generally not neutralizing (Mianowska *et al.*, 2011) but might prolong insulin lifetime (Chen *et al.*, 2005). Altered batches of recombinant erythropoietin were found to induce autoimmune symptoms (Casadevall *et al.*, 2002), while IFN- β , GM-CSF and IL-2

were immunogenic in many patients (Porter, 2001). Thus multiple lines of evidence indicate that recombinant proteins with a complete human sequence could be immunogenic.

CD4 T-cells contribute to humoral responses including anti-drug antibody (ADA) responses by providing cognate signals and cytokines for the B lymphocytes to differentiate into antibody-secreting plasma cells (van Schouwenburg *et al.*, 2014; Hamze *et al.*, 2017). CD4 T-cells are selected by self-peptides presented by HLA class II molecules in the thymus. A large number of the autoreactive CD4 T-cells are deleted by this process, thus ensuring immune tolerance to many self-proteins. Multiple lines of evidence indicate that the amplitude of the CD4 T-cell response to foreign antigens (Moon *et al.*, 2007; Geiger *et al.*, 2009; Kwok *et al.*, 2012; Castelli *et al.*, 2013) and therapeutic proteins (Delluc *et al.*, 2010; 2011) relies on the size of the naïve T-cell repertoire resulting from thymic selection. A large naïve T-cell repertoire is indeed found for immunogenic peptides (Moon *et al.*, 2007; Kwok *et al.*, 2012; Castelli *et al.*, 2013) and proteins (Geiger *et al.*, 2009; Delluc *et al.*, 2010; 2011), while in the absence of pre-existing antigen-specific CD4 T-cells, antigen injection did not lead to any immune responses, even in the presence of adjuvant (Cibotti *et al.*, 1992).

To shed light on the immunogenicity of RLN2, we quantified the RLN2-specific CD4 T-cell repertoire in healthy donors and identified the CD4 T-cell epitopes that contribute to its immunogenicity. A large T-cell repertoire was found to be principally supported by two main T-cell epitopes.

Material and methods

Proteins and peptides

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Brebieres, France). RLN2 (PMID: 25547165) and overlapping peptides (Table 1) were synthesized by Peptides&Elephants GmbH (Hennigsdorf, Germany)

Generation of RLN2-specific T-cell lines

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from the blood of anonymous healthy donors who gave informed consent (Etablissement Français du Sang, Rungis, France). Monocyte-derived dendritic cells (DCs) were generated from plastic-adherent cells of PBMCs after 5-day of culture in AIM-V medium (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) supplemented with 1000 units/mL rhIL-4 and rhGM-CSF (both from R&D systems, Lille, France). CD4 T-cells were isolated from autologous non-adherent PBMCs by positive selection using magnetic labeling with anti-CD4 mAbs conjugated to magnetic microbeads followed by magnetic cell sorting, as recommended by the manufacturer (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)(Delluc *et al.*, 2010; 2011). DCs were loaded overnight at 37°C with either RLN2 (2 µM) or KLH (0.25 µM) and matured with lipopolysaccharide (1 µg/mL). 1-3×10⁴ protein-loaded DCs were added to 1-3×10⁵ autologous CD4 T-cells seeded in multiple round-bottom wells of culture plates in 200 µL IMDM (Invitrogen) supplemented with 10% human AB serum (Lonza, Levallois-Perret, France), 0.24 mM glutamine, 0.55 mM asparagine, 1.5 mM arginine (all amino acids from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen) (complete IMDM) containing 1000 U/mL rh-IL-6 and 10 ng/mL rh-IL-12 (both R&D systems). CD4 T lymphocytes were restimulated at days 7 and 14 with 1-3×10⁴ autologous DCs freshly loaded with a protein or peptides depending on the donor, and were grown in complete IMDM medium supplemented with 10 U/mL rh-IL-

2 (R&D systems) and 5 ng/mL rh-IL-7 (R&D systems). Each T-cell line (expanded T-cell contained in one well) was collected at day 21 and its specificity assessed by IFN- γ ELISPOT.

IFN- γ ELISPOT

Multiscreen hemagglutinin (HA) 96-well plates (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France) were coated overnight at 4°C with 2.5 μ g/mL anti-human IFN- γ mAb (1-D1K; Mabtech, Nacka Strand, Sweden) in PBS (Invitrogen). Wells were saturated for 2 h at 37°C with complete IMDM and washed with PBS. RLN2 (3 μ M) or KLH (1 μ M) was loaded onto iDCs in AIM-V for 4 h at 37°C, while peptides (10 μ g/mL) were directly added to Multiscreen plates. PBMCs (5×10^4 /well) or iDCs (5×10^3 /well) were used as antigen-presenting cells and co-cultured in the plates with approximately 10 - 25×10^3 CD4 T-cells in AIM-V supplemented with 0.5 ng/mL rh-IL-7. After overnight incubation at 37°C and washing, plates were subsequently treated with 0.25 μ g/mL biotinylated anti-human IFN- γ mAb (7-B6-1; Mabtech) in PBS/BSA 1%, extravidin-phosphatase (dilution 1:3000 in PBS/ Tween 20 0.05%/BSA 1%; Sigma-Aldrich) and NBT/BCIP (Sigma-Aldrich). Spot number was determined by the AID ELISPOT Reader System (AID GmbH, Ebinger, Germany). CD4 T-cell lines were considered as specific when a spot count was 2-fold higher in the presence of the protein or peptide than in its absence, with a minimal difference of 25 spots. CD4 T-cell precursor frequencies were estimated using the Poisson distribution according to the following formula: Frequency = $-\ln$ ((Number of non-specific CD4 T-cell lines/Total number of CD4 T-cell lines seeded)/(Number of CD4 T-cells/well)).

HLA-DR and -DP specific binding assays

The binding properties of the overlapping peptides to common HLA class II molecules were determined by competitive ELISA, as previously described (Castelli *et al.*, 2013). Each allele is present in a frequency of at least 5% in the Caucasian population. Briefly, HLA-DR and -DP molecules were immunopurified by affinity chromatography using monomorphic antibodies

L243 and B7/21, respectively. Binding assays were performed by diluting HLA class II molecules with an appropriate biotinylated peptide and serial dilutions of competitor peptides. After 24 to 72 hrs incubation and pH neutralization, samples were applied to 96-well maxisorp ELISA plates (Nunc MaxiSorp, Invitrogen) previously coated with 10 µg/mL L243 or B7/21. Bound biotinylated peptide was detected by addition of streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (GE Healthcare, Buc, France), and 4-methylumbelliferyl phosphate substrate (Sigma-Aldrich). Emitted fluorescence was measured at 450 nm upon excitation at 365 nm. Sequences of the biotinylated reporter peptides and IC₅₀ values of their unlabeled forms (reference peptides) were the following: HA306–318 (PKYVKQNTLKLAT) for DRB1*0101 (3 nM), DRB1*0401 (40 nM), DRB1*1101 (20 nM), DRB1*0701 (30 nM) and DRB5*0101 (15 nM); A3 152–166 (EAEQLRAYLDGTGVE) for DRB1*1501 (2 nM); MT 2–16 (AKTIAYDEEARRGLE) for DRB1*0301 (16 nM); OXY 271–287 (EKKYFAATQFEPLAARL) for DPB1*0401 (5 nM) and HLADPB1*0402 (10 nM), and E2/E168 (AGDLLAIETDKATI) for DRB4*0101 (90 nM). Peptide concentrations that prevented binding of 50% of the labeled peptide (IC₅₀) were calculated. Data are expressed as relative activity (ratio of the IC₅₀ of the peptide to the IC₅₀ of the reference peptide, which is a high binder to the HLA class II molecule).

Results

A majority of healthy donors exhibited a RLN2-specific T-cell repertoire

Because of the low frequency of antigen-specific T-cells in healthy donors, we attempted to detect RLN2-specific T-cells by generating T-cell lines. CD4 T-cells collected from healthy donors were stimulated in multiple culture wells by 3 rounds of stimulation with DCs loaded with RLN2 or KLH, KLH being introduced as a positive control to exclude immunosuppressed donors. Antigen specificity was assessed by IFN- γ ELISpot, the T-cell being skewed to a Th1 phenotype by addition of IL-12 in the cell culture. As shown in Fig 1A and 1B, 7 and 5 of the 20 seeded culture wells contained T-cell lines specific for RLN2 from the donors #329 and #321, respectively. They specifically reacted to RLN2, while KLH-specific T-cell lines were not stimulated by RLN2. A total of 70 RLN2-specific T-cell lines were isolated from the 18 responders out of 23 donors with diverse HLA (supplemental Table S1). As demonstrated previously (Delluc *et al.*, 2011), the distribution of the antigen-specific CD4 T-cells at the initiation of our assay follows a Poisson's distribution. This allowed us to calculate a mean frequency of RLN2-specific CD4 T-cells of 0.61 cells per million with a maximum response of 2.23 cells per million, as shown Fig.1C.

RLN2 T-cell epitopes were found in both α and β chains

Peptide specificity of CD4 T-cell lines from 14 donors was investigated using overlapping peptides (Table 1). T-cell lines were submitted to a first ELISPOT assay using peptide pools and their specificity was confirmed in a second independent ELISPOT with individual peptides (Fig. 2). The T-cell lines reacted strongly to either a single peptide or to adjacent peptides. As examples, T cell lines #85.2 (donor #85, well #2), #85.21, #321.25, #390.8, #356.20 specifically reacted with peptides A1-15. T cell line #379.18 was specific for the peptides B1-15, B4-18 and B7-21. T-cell line #398.16 was specific for peptide B1-15, while T-cell line #356.18 was specific for peptides B1-15 and 4-18. Together, T-cell lines specific for RLN2 peptides were

isolated from 12 donors (Table S2, Fig 3A). Half of the T-cell lines reacted with the peptide A1-15 and half of the donors responded to this peptide. Almost all the remaining RLN2-specific T-cells were specific for peptides included in the sequence B1-21. Therefore, the T-cell response to RLN2 relies mainly on the three peptides A1-15, B1-15 and B4-18.

RLN2 peptides of both α and β chains bound to multiple HLA class II molecules

All the peptides were submitted to binding assays specific for 10 common HLA class II molecules (Fig 3B and Table 2). A1-15 bound with high affinity to HLA-DRB1*0101 and HLA-DRB1*1501, and with moderate affinity to DRB1*0701. All other peptides from the α chain appeared to be scarcely active. In contrast, all the peptides of the β chain bound with high or moderate affinity to at least one HLA class II molecule. Peptides B4-18, B7-21, B10-24 and B13-27 bound to at least 4 molecules, the peptides B4-18 being a ligand for 6 different HLA class II molecules. Peptides B1-15 and B1-29 bound to one of the selected HLA class II molecules, only. The relatively broad specificity of peptides A1-15 and B4-18 for HLA class II molecules appeared to coincide with the multiple donors responding to these peptides (Fig 3B).

Discussion

Because of the clinical immunogenicity observed for RLN2, a human hormone with clinical potential, we looked for RLN2-specific T-cells in the blood of healthy donors with the perspective to understand the unexpected immune response to this self-protein.

We derived T-cell lines by three weekly rounds of stimulation with RLN2 and estimated the frequency of RLN2 specific cells in the blood of the donors by counting the proportion of RLN2-specific T-cell lines. We have already applied this long-term T-cell assay to various therapeutic proteins (Delluc *et al.*, 2010; 2011; Hamze *et al.*, 2017; Meunier *et al.*, 2017) and found a very good concordance with their immunogenicity in humans (Delluc *et al.*, 2010; 2011; Castelli *et al.*, 2013). This assay has been designed to measure the size of the antigen-specific CD4 T-cell repertoire, owing to the role of the naïve T cell repertoire to shape the antigen-specific memory T cell response (Moon *et al.*, 2007; Kwok *et al.*, 2012; Castelli *et al.*, 2013). By this approach, we detected RLN2-specific CD4 T-cells in 18 responders out of 23 donors and estimated there were 0.61 pre-existing RLN2-specific CD4 T-cells per million CD4 T-cells in the blood of healthy donors. The frequency of RLN2-specific CD4 T-cells was in the range of immunogenic therapeutic antibodies (Delluc *et al.*, 2011) and human erythropoietin (EPO) (Delluc *et al.*, 2010) and above that of recombinant interferon-beta (not shown), insulin (Delluc *et al.*, 2010) and the non-immunogenic anti-trypsin and anti-thrombin proteins (Delluc *et al.*, 2010).

In the absence of any external stimulation by RLN2 injection, the presence of circulating RLN2-specific T-cells appears to be the result of an escape from the thymic negative selection. As an endogenous hormone, RLN2 circulates at very low concentration in the blood and probably at an insufficient level to be detected by immune cells. It is unknown whether RLN2 is expressed by mTec, in contrast to human insulin (Fan *et al.*, 2009), these antigen-presenting cells being

involved in the negative selection of self-reactive T-cells (Yano *et al.*, 2008). As we already proposed for human EPO (Delluc *et al.*, 2010) and FVIII (Meunier *et al.*, 2017), we suggest that RLN2 is at least partially ignored by the immune cells during T-cell ontogeny (Ohashi *et al.*, 1991). RLN2-specific T-cells are therefore poorly counter-selected in the thymus and are potentially functional but remain inactive, owing to insufficient signals of T-cell activation. However, repeated injections of recombinant RLN2 might provide sufficient local concentrations of RLN2 and inflammatory signals resulting from tissue damage provoked by the injection (Matzinger and Kamala, 2011) or provided by RLN2 itself (Piccinni *et al.*, 1999) to initiate a T-cell response and the subsequent ADA response in agreement with the clinical immunogenicity of RLN2 (Seibold *et al.*, 2000; Blank and McDowell, 2014).

We also characterized the T-cell epitope content of RLN2 by assessing the reactivity of T-cell lines raised against RLN2 to overlapping peptides encompassing its whole sequence. Two regions appeared to host the most of the CD4 T-cell epitopes, namely A1-15 and B1-21. As already shown for EPO (Tangri *et al.*, 2005) or therapeutic antibodies (Hamze *et al.*, 2017), T-cell epitopes of RLN2 mainly corresponded to peptides with a good to moderate affinity to HLA class II molecules. As the T-cell epitopes contribute to the immunogenic properties of the proteins by stimulating the CD4 T-cells, their localization would permit their removal from the RLN2 sequence and the engineering of non-immunogenic but active RLN2-like molecule. This de-immunisation strategy has been already applied with success to EPO (Tangri *et al.*, 2005), FVIII (Moise *et al.*, 2012) or Pseudomonas exotoxin A (Mazor *et al.*, 2012). In contrast, our data illustrate the limit of sequence humanization to circumvent immunogenicity and highlight the risk of immunogenicity for therapeutic proteins whose endogenous and self-counterparts circulate at low level in the blood of patients.

By quantifying and characterizing RLN2-specific CD4 T-cells isolated from the blood of healthy donors, we provided an explanation model to account for the clinical immunogenicity

of RLN2. Our data also highlight the relevance of investigating the naïve T-cell repertoire to anticipate immunogenicity of therapeutic proteins in humans.

Acknowledgements

The authors thank Dr Thomas Bouquin (SANOFI, Biologicals research) for critical reading of the manuscript. The research leading to these results was supported by SANOFI and CEA. This work was also supported by the Labex in Research on Medication and Therapeutic Innovation (LERMIT) (to B.M).

Abbreviations

AHF, acute heart failure; EPO, erythropoietin; KLH, keyhole limpet hemocyanin; mTec, medullary thymic epithelial cells; RLN2, H2-relaxin.

Author contributions

A. A. designed and performed the research, analyzed data and wrote the paper, S. M., S. I., O. D. and C. P. designed the research and analyzed data, and B. M. designed the research, analyzed data and wrote the paper.

Conflict of interest

A.A., S. M., S. I., O. D. and C. P. are part of SANOFI R&D. B. M. has no conflict of interest to declare

References

- Bathgate, R.A., Halls, M.L., van der Westhuizen, E.T., Callander, G.E., Kocan, M., and Summers, R.J. (2013). Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol Rev* 93(1), 405-480. doi: 10.1152/physrev.00001.2012.
- Blank, M., and McDowell, T.Y. (2014). "A phase II/III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of Relaxin in subjects with acute heart failure", in: *FDA Briefing Document for the Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee (CRDAC)*.
- Casadevall, N., Nataf, J., Viron, B., Kolta, A., Kiladjian, J.J., Martin-Dupont, P., *et al.* (2002). Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 346(7), 469-475. doi: 10.1056/NEJMoa011931.
- Castelli, F.A., Szely, N., Olivain, A., Casartelli, N., Grygar, C., Schneider, A., *et al.* (2013). Hierarchy of CD4 T cell epitopes of the ANRS Lipo5 synthetic vaccine relies on the frequencies of pre-existing peptide-specific T cells in healthy donors. *J Immunol* 190(11), 5757-5763. doi: 10.4049/jimmunol.1300145.
- Chen, J.W., Frystyk, J., Lauritzen, T., and Christiansen, J.S. (2005). Impact of insulin antibodies on insulin aspart pharmacokinetics and pharmacodynamics after 12-week treatment with multiple daily injections of biphasic insulin aspart 30 in patients with type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol* 153(6), 907-913. doi: 10.1530/eje.1.02021.
- Cibotti, R., Kanellopoulos, J.M., Cabaniols, J.P., Halle-Panenko, O., Kosmatopoulos, K., Sercarz, E., *et al.* (1992). Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1), 416-420.
- Delluc, S., Ravot, G., and Maillere, B. (2010). Quantification of the preexisting CD4 T-cell repertoire specific for human erythropoietin reveals its immunogenicity potential. *Blood* 116(22), 4542-4545. doi: 10.1182/blood-2010-04-280875.
- Delluc, S., Ravot, G., and Maillere, B. (2011). Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *Faseb J* 25(6), 2040-2048. doi: 10.1096/fj.10-173872.
- Fan, Y., Rudert, W.A., Grupillo, M., He, J., Sisino, G., and Trucco, M. (2009). Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *Embo J* 28(18), 2812-2824. doi: 10.1038/emboj.2009.212.
- Geiger, R., Duhon, T., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med* 206(7), 1525-1534.

- Hamze, M., Meunier, S., Karle, A., Gdoura, A., Goudet, A., Szely, N., *et al.* (2017). Characterization of CD4 T Cell Epitopes of Infliximab and Rituximab Identified from Healthy Donors. *Front Immunol* 8, 500. doi: 10.3389/fimmu.2017.00500.
- Kwok, W.W., Tan, V., Gillette, L., Littell, C.T., Soltis, M.A., LaFond, R.B., *et al.* (2012). Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. *J Immunol* 188(6), 2537-2544. doi: 10.4049/jimmunol.1102190.
- Matzinger, P., and Kamala, T. (2011). Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol* 11(3), 221-230. doi: 10.1038/nri2940.
- Mazor, R., Vassall, A.N., Eberle, J.A., Beers, R., Weldon, J.E., Venzon, D.J., *et al.* (2012). Identification and elimination of an immunodominant T-cell epitope in recombinant immunotoxins based on Pseudomonas exotoxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(51), E3597-3603. doi: 10.1073/pnas.1218138109.
- Meunier, S., Menier, C., Marcon, E., Lacroix-Desmazes, S., and Maillere, B. (2017). CD4 T cells specific for factor VIII are present at high frequency in healthy donors and comprise naive and memory cells. *Blood Adv* 1(21), 1842-1847. doi: 10.1182/bloodadvances.2017008706.
- Mianowska, B., Szadkowska, A., Pietrzak, I., Zmyslowska, A., Wegner, O., Tomczonek, J., *et al.* (2011). Immunogenicity of different brands of human insulin and rapid-acting insulin analogs in insulin-naive children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 12(2), 78-84. doi: 10.1111/j.1399-5448.2010.00659.x.
- Moise, L., Song, C., Martin, W.D., Tassone, R., De Groot, A.S., and Scott, D.W. (2012). Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clin Immunol* 142(3), 320-331. doi: 10.1016/j.clim.2011.11.010.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., *et al.* (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27(2), 203-213.
- Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., *et al.* (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65(2), 305-317.
- Piccinni, M.P., Bani, D., Beloni, L., Manuelli, C., Mavilia, C., Vocioni, F., *et al.* (1999). Relaxin favors the development of activated human T cells into Th1-like effectors. *Eur J Immunol* 29(7), 2241-2247. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2241::AID-IMMU2241>3.0.CO;2-E.
- Porter, S. (2001). Human immune response to recombinant human proteins. *J Pharm Sci* 90(1), 1-11.

- Seibold, J.R., Korn, J.H., Simms, R., Clements, P.J., Moreland, L.W., Mayes, M.D., *et al.* (2000). Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 132(11), 871-879.
- Tangri, S., Mothe, B.R., Eisenbraun, J., Sidney, J., Southwood, S., Briggs, K., *et al.* (2005). Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J Immunol* 174(6), 3187-3196.
- Teerlink, J.R., Cotter, G., Davison, B.A., Felker, G.M., Filippatos, G., Greenberg, B.H., *et al.* (2013). Serelaxin, recombinant human relaxin-2, for treatment of acute heart failure (RELAX-AHF): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 381(9860), 29-39. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61855-8.
- van Schouwenburg, P.A., Kruihof, S., Votsmeier, C., van Schie, K., Hart, M.H., de Jong, R.N., *et al.* (2014). Functional analysis of the anti-adalimumab response using patient-derived monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 289(50), 34482-34488. doi: 10.1074/jbc.M114.615500.
- Weiss, G., Teichman, S., Stewart, D., Nader, D., Wood, S., Breining, P., *et al.* (2016). Recombinant human relaxin versus placebo for cervical ripening: a double-blind randomised trial in pregnant women scheduled for induction of labour. *BMC Pregnancy Childbirth* 16, 260. doi: 10.1186/s12884-016-1046-1.
- Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., *et al.* (2008). Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med* 205(12), 2827-2838. doi: 10.1084/jem.20080046.

Figure and table legends

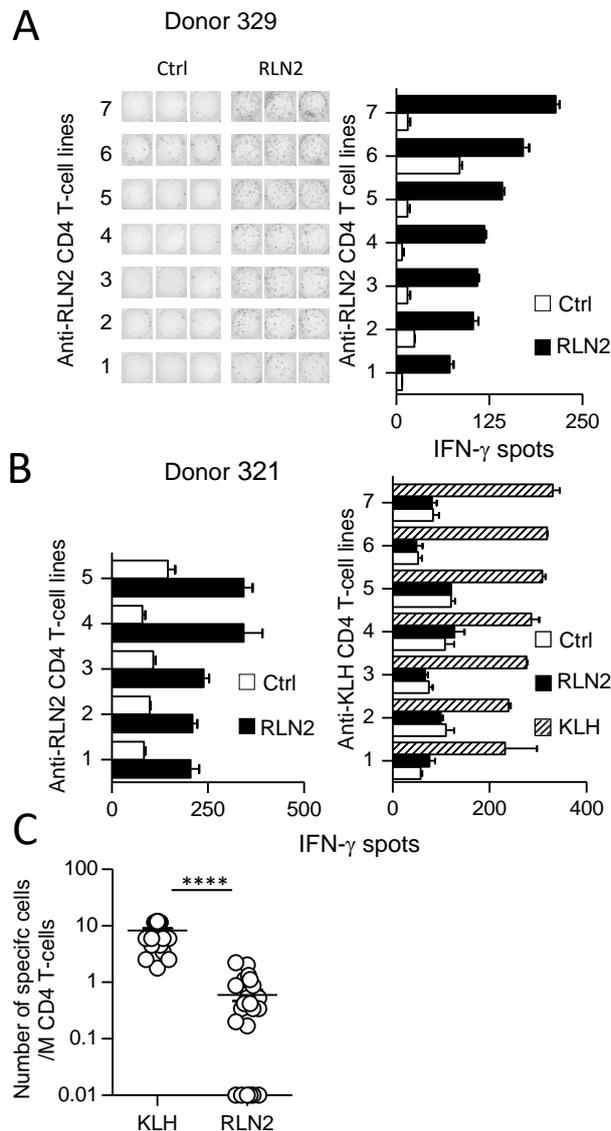


Fig. 1

Figure 1. Generation of RLN2-specific CD4 T-cells from healthy individuals.

T-cell lines (T-cells contained in a single well) were generated by 3 weekly rounds of stimulation with RLN2 or KLH and their specificity was tested by IFN- γ ELISPOT with autologous DCs alone (Ctrl) or with DCs previously loaded with RLN2 or KLH. A). RLN2-specific T-cell lines generated from donor #329. B) Cross-reactivity analysis between KLH- and RLN2- specific T-cell lines. C) Frequencies of CD4 T-cells specific for RLN2 and KLH estimated for 23 healthy blood donors. The frequency of CD4 T-cell precursors was calculated using the Poisson's distribution as described in the M&M section. The statistical significance was assessed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test (****: $p < 0.0001$).

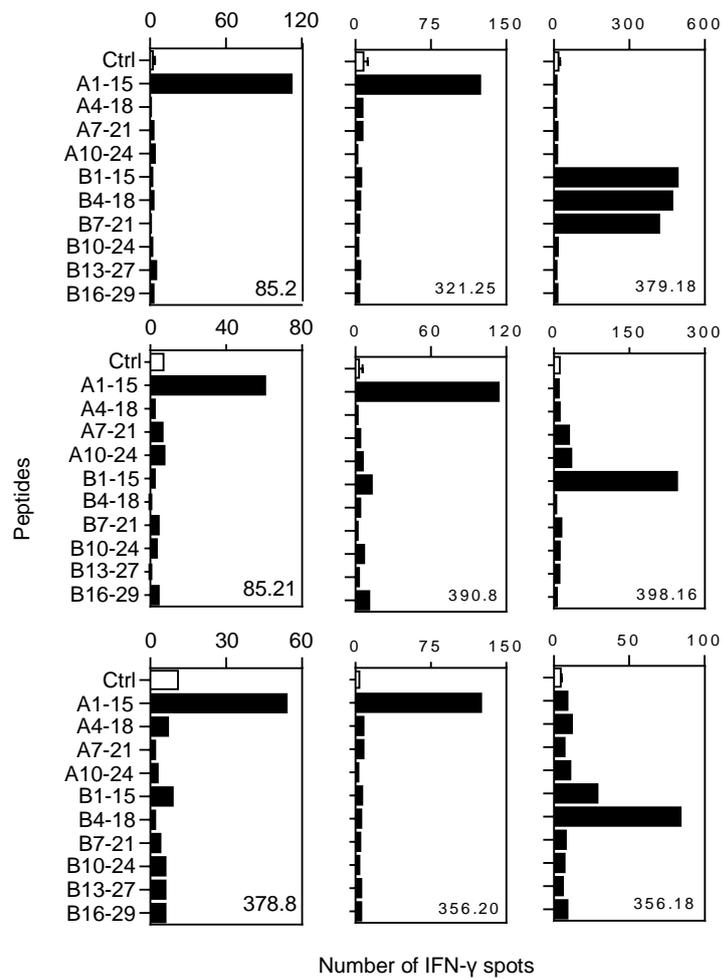


Fig. 2

Figure 2. Characterization of RLN2-specific CD4 T-cell subsets

RLN2-specific CD4 T-cell lines from 14 donors generated as described in Fig. 1 were tested for recognition of the 10 overlapping RLN2 peptides by IFN- γ ELISPOT. CD4 T-cell lines were considered as specific in two independent experiments when a spot count was 2-fold higher in the presence of the protein or peptide than in its absence, with a minimal difference of 25 spots. Examples of peptide-specific T-cell lines from the donors #85, #321, #356, #378, #379, #390 and #398.

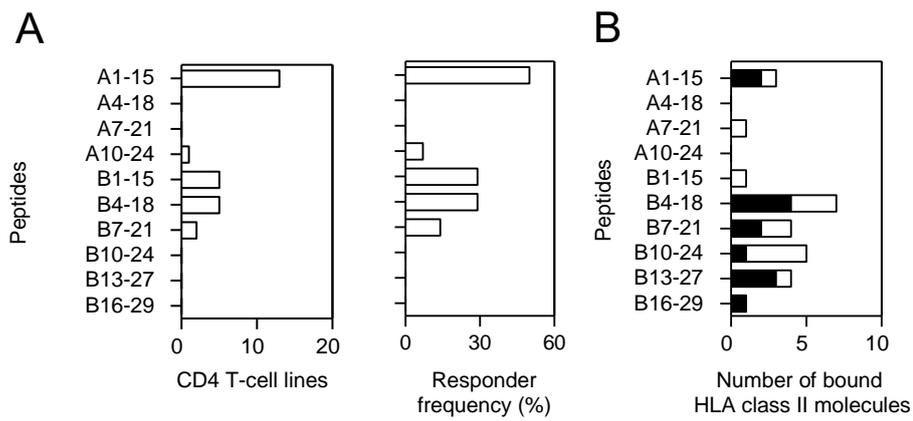


Fig. 3

Figure 3: comparison of T-cell stimulating properties and HLA class II binding of RLN2 peptides

A) Number of specific CD4 T-cell lines and frequency of responding donors were reported for each peptide. B) Number of HLA class II molecules bound by the individual RLN2 peptides. Relative affinities ≤ 100 but >20 correspond to good affinities (blank), and those ≤ 20 correspond to high affinities (bold)

Peptides	RLN2 Sequence																																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29					
α -Chain	Z	L	Y	S	A	L	A	N	K	C	C	H	V	G	C	T	K	R	S	L	A	R	F	C										
A1-15	Z	L	Y	S	A	L	A	N	K	C	C	H	V	G	C																			
A4-18				S	A	L	A	N	K	C	C	H	V	G	C	T	K	R																
A7-21							A	N	K	C	C	H	V	G	C	T	K	R	S	L	A													
A10-24											C	C	H	V	G	C	T	K	R	S	L	A	R	F	C									
β -Chain	D	S	W	M	E	E	V	I	K	L	C	G	R	E	L	V	R	A	Q	I	A	I	C	G	M	S	T	W	S					
B1-15	D	S	W	M	E	E	V	I	K	L	C	G	R	E	L																			
B4-18				M	E	E	V	I	K	L	C	G	R	E	L	V	R	A																
B7-21							V	I	K	L	C	G	R	E	L	V	R	A	Q	I	A													
B10-24											L	C	G	R	E	L	V	R	A	Q	I	A	I	C	G									
B13-27																																		
B16-29																																		

Table 1. Sequence of RLN2 and overlapping synthetic peptides.

Z stands for pyroglutamic acid.

Donor	HLA-DR typing		RLN2 peptides				Total	
	DRB1	DRB1	A1-15	A10-24	B1-15	B4-18		B7-21
85	01:01	15:10 8	2					2
321	04:01	13:01	2					2
356	01:01	01:02	1		1	1		3
378	10:01	13:01	1					1
379	04:01	09:01			1	1	1	3
387	04:04	11:04			2	1		3
389	04:07	14:54	1					1
390	01:01	13:02	4					4
395	01:01	14:54	2					2
398	11:04	15:01		1	1	2	1	5
Number of specific T-cell lines			13	1	5	5	2	26
Total responder frequency (%)			50	7	29	29	14	71

Table 2. Peptide specificity of T-cell lines induced *in vitro* with RLN2.

RLN2-specific CD4 T-cell lines were tested for recognition of the 10 overlapping RLN2 peptides by IFN- γ ELISpot. Number of peptides were reported for each HLA-Typed responding donor.

RLN2 peptide	HLA Class II molecules										Bound HLA class II	
	DRB1 0101	DRB1 0301	DRB1 0401	DRB1 0701	DRB1 1101	DRB1 1501	DRB4 0101	DRB5 0101	DPB1 0401	DPB1 0402	High	Moderate
A1-15	0.7	>626	135	<u>82</u>	392	2	>114	153	>1 667	800	2	1
A4-18	>3 144	>626	>238	>373	>539	1 250	>114	>813	1 500	>1 000	0	0
A7-21	3 000	>626	>238	>373	<u>78</u>	10 000	>114	>813	1 333	>1 000	0	1
A10-24	>3411	>626	>238	>373	207	1 028	>114	824	>1 667	>1 000	0	0
B1-15	<u>42</u>	>626	>238	211	120	298	>114	731	>1 667	900	0	1
B4-18	0.4	<u>33</u>	>238	>373	14	3	0.3	<u>75</u>	>1 667	100	4	2
B7-21	7	157	>238	>373	<u>82</u>	1 527	14	755	>1 667	<u>84</u>	2	2
B10-24	<u>30</u>	>626	<u>88</u>	>373	<u>45</u>	486	3.5	<u>35</u>	1 000	700	1	4
B13-27	0.4	>626	11	>373	>539	<u>44</u>	>114	4	167	>1 000	3	1
B16-29	7.5	>626	>238	>373	>539	>5 059	>114	369	1 000	>1 000	1	0

Table 3. Relative affinities of the overlapping peptides of the sequence of RLN2.

10 overlapping peptides covering the sequence of human RLN2 were submitted to competitive ELISA specific for 10 HLA class II molecules. Data are expressed as relative activity (ratio of the IC₅₀ of the peptide to the IC₅₀ of the reference peptide, which is a high binder to the HLA class II molecule). Values result from at least two independent experiments. Relative affinities ≤100 but >20 correspond to good affinities (underlined), and those ≤20 correspond to high affinities (Bold).

Donor	HLA DRB1 typing		RLN2-specific CD4 T-cell lines
85	01:01	15:108	3
297	04:04	07:01	2
315	04:05	07:01	0
321	04:01	13:01	5
325	07:01	07:01	10
328	01:01	01:04	6
329	03:01	11:01	7
350	11:01	13:03	0
351	01:02	11:04	1
352	04:04	08:01	0
354	07:01	08:01	1
356	01:01	01:02	2
376	03:01	11:01	3
378	10:01	13:01	3
379	04:01	09:01	4
387	04:04	11:04	4
389	04:07	14:54	2
390	01:01	13:02	5
395	01:01	14:54	2
398	11:04	15:01	9
399	04:04	07:01	0
400	07:01	13:01	0
402	03:57	15:01	1

Table S1. Specificity of T-cell lines *in vitro* induced with RLN2.

CD4⁺ T-cell lines were obtained as described in Fig. 1. CD4 T-cell lines were considered as specific when a spot count was two-fold higher in the presence of RLN2 than in its absence, with a minimal difference of 25 spots.

Article 2 (en cours d'écriture) : Effets d'acides aminés non-naturels sur la reconnaissance par des TCR et l'induction de lignées spécifiques d'un épitope de lymphocyte T CD4 immunoprévalent.

Les pT forment un groupe de biomédicaments en pleine croissance, notamment grâce à leur facilité de synthèse. Leur spécificité élevée et taille réduite en font des molécules à haute activité et disponibilité biologiques. Cependant, leur demi-vie dans l'organisme est très réduite à cause de la dégradation enzymatique et la filtration rénale limitant fortement leur efficacité thérapeutique. Afin de pallier ce problème, de nombreuses modifications peuvent être introduites au sein des pT. Plus particulièrement, des modifications non-naturelles sont couramment introduites lors de la synthèse par voie chimique de pT afin de rendre les séquences insensibles aux protéases. Si les effets sur la dégradation sont largement détaillés, la reconnaissance de ces modifications par le système immunitaire humain reste méconnue, et constitue la problématique de cet article. Afin d'évaluer l'effet des modifications chimiques sur la reconnaissance et la stimulation des cellules T de séquences peptidiques, nous avons introduit une unique modification sur chaque résidu d'un peptide modèle de 13 acides aminés. Le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ (HA) est issu de la glycoprotéine de surface hémagglutinine du virus de la grippe et constitue un épitope T chez l'Homme. Il représente un modèle d'étude intéressant car des cellules T mémoires spécifiques sont induites par une immunité naturelle contre la grippe et sont présentes chez l'Homme en fréquence importante, il présente une forte affinité pour plusieurs molécules HLA-DR et enfin, des LT naïfs spécifiques circulent en grande proportion dans le sang de sujets sains. 69 peptides analogues du HA ont été testés et contiennent un unique acide aminé modifié à une position précise : aaD, Aib, N-méthylé, C α -méthylé, peptoïde ou réduit. Toutes les modifications n'ont pas pu être introduites dans chaque résidu en raison des coûts de production dans certains cas.

A partir de cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains, des lignées de cellules T mémoires ont été induites à court terme contre le HA. Après 10 jours de culture, un ELISpot à IFN γ permet d'évaluer la réactivité croisée des cellules mémoires envers chaque analogue modifié. Le nombre de spots IFN γ par puits contenant un analogue reflète sa capacité à être reconnu par des cellules T générées contre le HA. En groupant les données de plusieurs donneurs pour chaque analogue, on obtient une estimation de l'effet d'une unique modification (type et position) sur la reconnaissance par le TCR pour plusieurs molécules HLA de classe II.

L'affinité de chacun des analogues avec des molécules HLA-DR a ensuite été mesurée par des ELISA en compétition. Comparée à celle du HA, l'affinité relative moyenne informe sur l'effet d'une modification sur la liaison aux molécules HLA-DR.

Enfin, à partir de lymphocytes T CD4 issus de sujets sains, des lignées cellulaires spécifiques ont été induites contre le HA et des analogues contenant des Daa ou des Aib, puis amplifiées par des stimulations hebdomadaires. Ces stimulations se font en présence de DC matures dérivées de monocytes autologues, préalablement chargées avec chaque peptide. Trois semaines d'amplification sont nécessaires pour détecter le signal de cellules en fréquence forte mais dont le nombre mis en culture est réduit, leur spécificité est évaluée par ELISpot à IFN γ . Le nombre moyen de lignées spécifiques de chaque analogue comparé à celui du HA reflète la capacité de chacun à activer des cellules T naïves restreintes à plusieurs molécules HLA, c'est-à-dire leur potentiel immunogénique.

Les modifications situées en dehors du core du peptide HA ont généralement un faible effet sur les paramètres étudiés. Les aaD constituent la modification étudiée la plus efficace de toutes pour réduire la reconnaissance par le TCR, la liaison aux molécules HLA et la stimulation de cellules T naïves. Une forte corrélation entre la perte de liaison aux molécules HLA et la reconnaissance par les TCR est observée pour les aaD, elle est modérée pour les Aib et les C α -méthylés et faible pour les autres modifications. Enfin, une corrélation modérée existe entre la perte de liaison aux molécules HLA et la capacité à induire des lignées de cellules T spécifiques pour les aaD et les Aib introduits dans le core du peptide. Ainsi, ces résultats forment les premières preuves que ces modifications peuvent constituer atout intéressant pour diminuer la sensibilité de peptides aux protéases ainsi que leurs propriétés immunogènes, puisque pour la moitié d'entre elle, une perte de liaison aux molécules HLA peut induire une baisse de l'antigénicité ou de la capacité à générer des lignées de lymphocytes T spécifiques.

Effets d'acides aminés non-naturels sur la reconnaissance par des TCR et l'induction de lignées spécifiques d'un épitope de lymphocyte T CD4 immunoprévalent.

Introduction

Les peptides thérapeutiques représentent un cinquième des produits biothérapeutiques et présentent une bonne spécificité et mobilité biologique (Usmani *et al.* 2017). Cependant, les peptides sont très sensibles à la digestion enzymatique et à la filtration rénale par rapport aux protéines thérapeutiques. Afin d'améliorer leur résistance aux protéases, leur spécificité et leur solubilité, ils comprennent généralement des modifications chimiques non-naturelles dont les effets sur la stabilité, la conformation structurale et la biodisponibilité sont déjà décrits dans la littérature (Goodwin *et al.* 2012; Stone & Deber 2017). Néanmoins, leurs effets sur l'immunogénicité chez l'Homme sont à peine décrits pour la plupart des modifications non-naturelles, alors que l'immunogénicité des peptides thérapeutiques représente un enjeu important pour leur développement et leur utilisation sûre chez l'Homme. Des anticorps spécifiques résultant d'injections de peptides thérapeutiques peuvent perturber la pharmacocinétique des peptides, induire une perte d'efficacité thérapeutique ou provoquer des symptômes auto-immuns et allergiques. Pour anticiper les problèmes d'immunogénicité, des approches prédictives ont été développées en s'appuyant sur la modélisation des interactions peptidiques avec les molécules HLA dans le but d'identifier les épitopes des lymphocytes T. En stimulant les lymphocytes T CD4, les épitopes initient la réponse immunitaire et la production d'anticorps. Cependant, les programmes de prédiction d'épitopes des cellules T ont été développés avec des séquences naturelles (Paul *et al.* 2013) et ne sont donc pas appropriés pour évaluer le potentiel d'immunogénicité de peptides contenant des modifications non-naturelles.

Une vaste bibliothèque de modifications non-naturelles existe et certaines d'entre elles sont largement utilisées en chimie thérapeutique. Ces modifications consistent principalement en des acides aminés D (aaD), N-méthylation (Nm), C α -méthylation (Cm), acides aminés isobutyriques (Aib), Ψ (CH $_2$ NH) réduction de la liaison peptidique (Rd) et peptoïdes (Pep). Les acides aminés D (aaD) sont les formes énantiomères des L-aminoacides et font partie des modifications non-naturelles les plus répandues (Ericson *et al.* 2017; Feng & Xu 2016; Goodwin *et al.* 2012). Ils sont principalement introduits dans les peptides pour améliorer leur stabilité métabolique (Hamamoto *et al.* 2002) et leur activité spécifique (Li *et al.* 2016). Les expériences réalisées sur des animaux avec des peptides contenant des aaD ont montré une immunogénicité généralement plus faible que les peptides naturels (Benkirane *et al.* 1993; Dintzis *et al.* 1993; Jaton & Sela 1968; King *et al.* 1994; Maillère, Mourier, Cotton, *et al.* 1995; Maurer 1965). Chez l'humain, des anticorps anti-drogue (ADA) spécifiques d'un peptide contenant des aaD ont été observés chez 7,1% des patients traités et se sont révélés non neutralisants (Kroenke *et al.* 2017). Cette faible immunogénicité des polypeptides contenant des aaD pourrait résulter de l'incapacité des cellules présentatrices d'antigène à cliver les séquences non-naturelles (Benkirane *et al.* 1993; Dintzis *et al.* 1993; Jaton & Sela 1968;

King et al. 1994) mais aussi d'une faible capacité des molécules HLA de classe II (**Hervé et al. 1997; Maillère et al. 1995**) incluant les allèles HLA-DR1 et DR4 (**Hill et al. 1994; Zavala-Ruiz et al. 2003**) à lier les peptides contenant des aaD. La N-méthylation (Nm) et la C α -méthylation (Cm) sont généralement introduites à l'extrémité C-terminale des peptides pour les protéger des protéases et moduler la conformation structurale ou l'activité biologique (**Biron et al. 2008; Gentilucci, De Marco, and Cerisoli 2010; Sagan et al. 2004**). Sur les deux modifications, seule la Nm est détaillée pour son effet sur la liaison aux molécules du CMH de classe II (**Cotton et al. 1998; Zavala-Ruiz et al. 2003**) et l'antigénicité chez le rongeur (**Cotton et al. 1998; Steinbrecher et al. 1984**). Les Aib consistent en une α , α -diméthyle glycine et sont principalement introduits pour favoriser la conformation en hélice α (**Dhar et al. 2014; Kim et al. 2017**). Les acides isobutyriques (Aib) semblent augmenter l'immunogénicité chez le lapin (**Gurunath et al. 1995; Sakarellos-Daitsiotis et al. 1999**), chez la souris (**Baratin et al. 2002; Skarlas et al. 2011**) et augmenter la reconnaissance par les IgG humaines spécifiques d'une séquence native (**Bossus et al. 1997**). Les réductions de liaison peptidique (Rd) sont généralement utilisées pour protéger le peptide des protéases (**Gentilucci et al. 2010**). Les Rd semblent réduire la liaison aux molécules murines du CMH (**Cotton et al. 1998; Ettouati et al. 1996; Guichard et al. 1995**), l'antigénicité chez la souris (**Quesnel et al. 2001**) et imiter la protéine native face à des anticorps murins (**Bossus et al. 1997; Kim et al. 2017**) ou humains (**Bastian et al. 2004**). Enfin, les peptoïdes (Pep) consistent en un transfert de la chaîne latérale sur l'azote de la chaîne principale et sont généralement utilisés pour réduire l'hydrophobicité de la séquence, la protéger des protéases et moduler sa flexibilité (**Zuckermann et al. 1992**). Une seule étude a observé un Pep introduit dans les résidus extérieurs au sillon de liaison, inhibant la formation de liaisons hydrogènes avec une molécule du CMH de classe II de rat et diminuant l'affinité pour la molécule du CMH (**de Haan et al. 2002**). Mises en commun, une mosaïque de données existe sur l'immunogénicité des peptides contenant des modifications non-naturelles mais ne fournit aucun indice sur la façon d'anticiper l'immunogénicité de nouvelles séquences modifiées et comment ces modifications pourraient être introduites dans une séquence pour atténuer ses propriétés immunogènes.

Nous avons donc cherché à résoudre ce problème en évaluant les effets de l'introduction de 6 modifications non-naturelles courantes individuellement dans un peptide immunogène sur l'aptitude à se lier aux molécules HLA de classe II et à activer les lymphocytes T CD4 humains. Nous avons choisi le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ (HA) comme modèle pour bénéficier de sa forte affinité pour les molécules HLA-DR (**Hill et al. 1994**), l'étude détaillée de ses interactions de liaison avec les molécules HLA-DR (**Stern et al. 1994**) et des TCR (**Kirberg et al. 1994**) et sa capacité à être naturellement reconnu par plusieurs donneurs ayant développé une réponse de cellules T spécifiques de la grippe. Nous avons introduit à plusieurs positions de sa séquence une modification non-naturelle et évalué la réactivité des cellules T et la capacité de liaison aux molécules HLA de classe II de 69 peptides modifiés de HA contenant chacun une modification (analogues).

Matériel et méthodes

Peptides

Le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ (HA) et les 69 peptides modifiés de HA contenant chacun une modification (analogues) (**Fig. 1**) ont été synthétisés par Peptides&Elephants GmbH (Hennigsdorf, Allemagne).

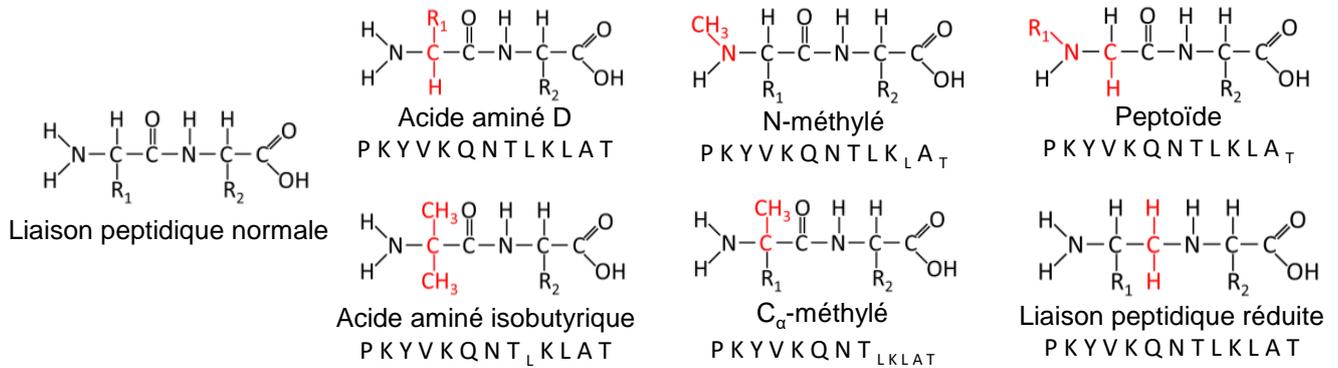


Figure 1

Figure 1 : Représentation schématique des modifications introduites dans le peptide HA. Une liaison peptidique normale est représentée comme référence, R1 et R2 renvoient aux chaînes latérales des résidus 1-2 impliqués dans la liaison peptidique. Chaque analogue a été obtenu en introduisant une modification à la fois dans la séquence native du HA, les groupes chimiques colorés en rouge désignent les modifications chimiques. La séquence peptidique renvoie aux analogues testés pour chaque modification introduite sur le résidu 1 correspondant, les lettres en indice correspondent aux analogues non testés.

Echantillons sanguins de donneurs et génotypage HLA-DR

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été obtenues à partir de cellules sanguines collectées par l'Établissement Français du Sang (EFS, Rungis, France), en tant que préparations de couche leucoplaquettaire de donneurs anonymes sains ayant donné leur consentement en accord avec les recommandations de l'EFS. Les PBMC ont été isolés par gradient de densité en centrifugation dans des Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Buc, France). Les DC dérivées de monocytes ont été générées à partir de cellules adhérentes au support plastique issues de PBMC après 4 à 5 jours de culture dans du milieu AIM-V (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) supplémenté par 1000U/mL d'IL-4 recombinante humaine (rh-IL-4; R&D systems, Lille, France) et de rh-GM-CSF (R&D systems). Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés à partir de PBMC autologues par sélection positive en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD4 couplé à des microbilles magnétiques (Miltenyi Biotech, Paris, France) et un tri cellulaire magnétique, selon le protocole du fournisseur. L'homogénéité des cellules a été évaluée par cytométrie en flux (Delluc, Ravot & Maillere 2010, 2011). Les phénotypes HLA-DR des donneurs ont été déterminés en utilisant le kit de typage Gold SSP DRB1 (Invitrogen) après extraction d'ADN à partir de PBMC avec le kit NucleoSpin Blood L (Macherey Nagel, Hoerdt, France).

Culture à court-terme des lymphocytes T

Les PBMC ont été ensemencés à 5 millions/mL en présence de HA (10 µg/mL) dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 5% de SAB, 20 U/mL de rh-IL-2 (R&D systems) et 1 µg/mL d'anticorps anti-CD28 (Miltenyi). Le milieu de culture a été renouvelé tous les 2 à 3 jours, les cellules ont été récupérées au 10^{ème} jour et soumises à un test ELISpot (enzyme-linked immunospot) à interféron-γ (IFNγ) en présence de HA ou des analogues individuellement comme décrits ci-après.

Génération de lignées lymphocytaires T spécifiques des peptides

Les DC dérivées des monocytes ont été maturées avec 1 µg/mL de lipopolysaccharide (LPS, Sigma, St Louis, Missouri) pendant 2 jours à 37°C puis chargées 4 heures à 37°C avec soit le HA, soit les peptides HA modifiés contenant des aaD ou Aib (analogues aaD ou analogues Aib, 3 µM). Après les lavages, les DC chargées sont ajoutées dans 10 répliquas par peptide à raison de 20 000 cellules/puits dans des micropuits à fond rond contenant 200 000 lymphocytes T CD4⁺ autologues dans 200 µL de milieu Iscove's Dulbecco supplémenté par 10% de sérum AB humain (IMDM, Lonza, Levallois-Perret, France), 1000 U/mL de rh-IL-6 (R&D systems) et 10 ng/mL de rh-IL-12 (R&D systems). Les co-cultures ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ durant 21 jours. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été restimulés aux jours 7 et 14 avec des DC fraîches chargées avec des peptides, 10 U/mL de rh-IL-2 (R&D systems) et 5 ng/mL de rh-IL-7 (R&D systems). La spécificité de chaque réplica de culture cellulaire (lignée lymphocytaire T CD4⁺) a été évaluée par un test ELISpot à IFN-γ en présence du HA ou des analogues sélectionnés individuellement le 21^{ème} jour (Delluc *et al.* 2010, 2011).

Test ELISpot à IFN-γ

50 000 cellules issues de la culture à court-terme ou un mélange de 50 000 cellules issues de lignées lymphocytaires T et de 5 000 PBMC autologues ont été incubés en présence de HA ou d'analogues individuellement (10µg/mL) dans des plaques Multiscreen à 96 puits (Merck Millipore, Bedford, Massachussets) préalablement recouvertes avec 2,5 µg/mL d'un anticorps monoclonal anti-IFN-γ humain (mAb, 1-D1K; Mabtech, Nacka, Suède). Après une incubation sur la nuit, les points ont été révélés en utilisant 0,25 µg/mL d'un mAb secondaire anti-IFN-γ humain (7-B6-1; Mabtech) dans un tampon salin-phosphate / sérum d'albumine bovine à 1%, extravidine-phosphatase (dilution au 1:3000 dans du tampon salin-phosphate / Tween 20 à 0,05% / sérum d'albumine bovine à 1%; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), et du sel bleu nitro tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-toluidine (Sigma-Aldrich). Le nombre de points a été déterminé par un système de lecture AID ELISpot (AID GmbH, Ebinger, Allemagne). Les lignées lymphocytaires T CD4 ont été considérées spécifiques lorsque le nombre de points en présence du peptide est le double de celui en son absence avec une différence minimum de 25 points.

Test de liaison spécifique HLA-DR

Les molécules de l'antigène leucocytaire humain (HLA)-DR ont été obtenues à partir de cellules B lymphoblastoïdes EBV homozygotes comme précédemment décrit (Texier *et al.*

2000, 2002). Les molécules HLA-DR ont été immunopurifiées par chromatographie d'affinité en utilisant des mAbs L243 monomorphes (BioLegend GmbH, Fell, Allemagne). La liaison du HA et des analogues aux molécules HLA-DR (HLA-DRB1*01:01, 04:01, 07:01, 11:01 et DRB5*01:01) a été évaluée par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en compétition (Chevaleyre *et al.* 2015; Wang *et al.* 2008). Le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ (HA) constitue un ligand fort pour plusieurs molécules HLA de classe II et a été introduit dans chaque test comme peptide référence et sa forme biotinylée (bHA) comme peptide traceur. Les tests de liaison ont été effectués par dilution des molécules HLA de classe II avec le bHA et des dilutions en série des analogues compétiteurs. Après 24 à 72 heures d'incubation et une neutralisation par le pH, les échantillons ont été introduits dans des plaques ELISA à 96 puits (Nunc MaxiSorp, Invitrogen) préalablement couvertes avec 10 µg/mL d'anticorps L243. Le bHA a ensuite été détecté par addition de l'enzyme conjuguée streptavidine-alkaline phosphatase (GE Healthcare) et le substrat 4-méthylumbelliféryl phosphate (Sigma-Aldrich). La fluorescence émise a été mesurée à 450 nm lors d'une excitation à 365 nm. Les concentrations en peptide empêchant la liaison de 50% du bHA (IC₅₀) ont été calculées. Les valeurs d'IC₅₀ du HA pour chaque molécule HLA de classe II étaient de 0,8 nM (DRB1*0101), 37 nM (DRB1*0401), 29 nM (DRB1*0701), 20 nM (DRB1*1101) et 8 nM (DRB5*0101). Les données ont été rapportées comme une affinité relative correspondant au rapport de l'IC₅₀ de l'analogue testé à celle du HA. Les moyennes ont été calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes.

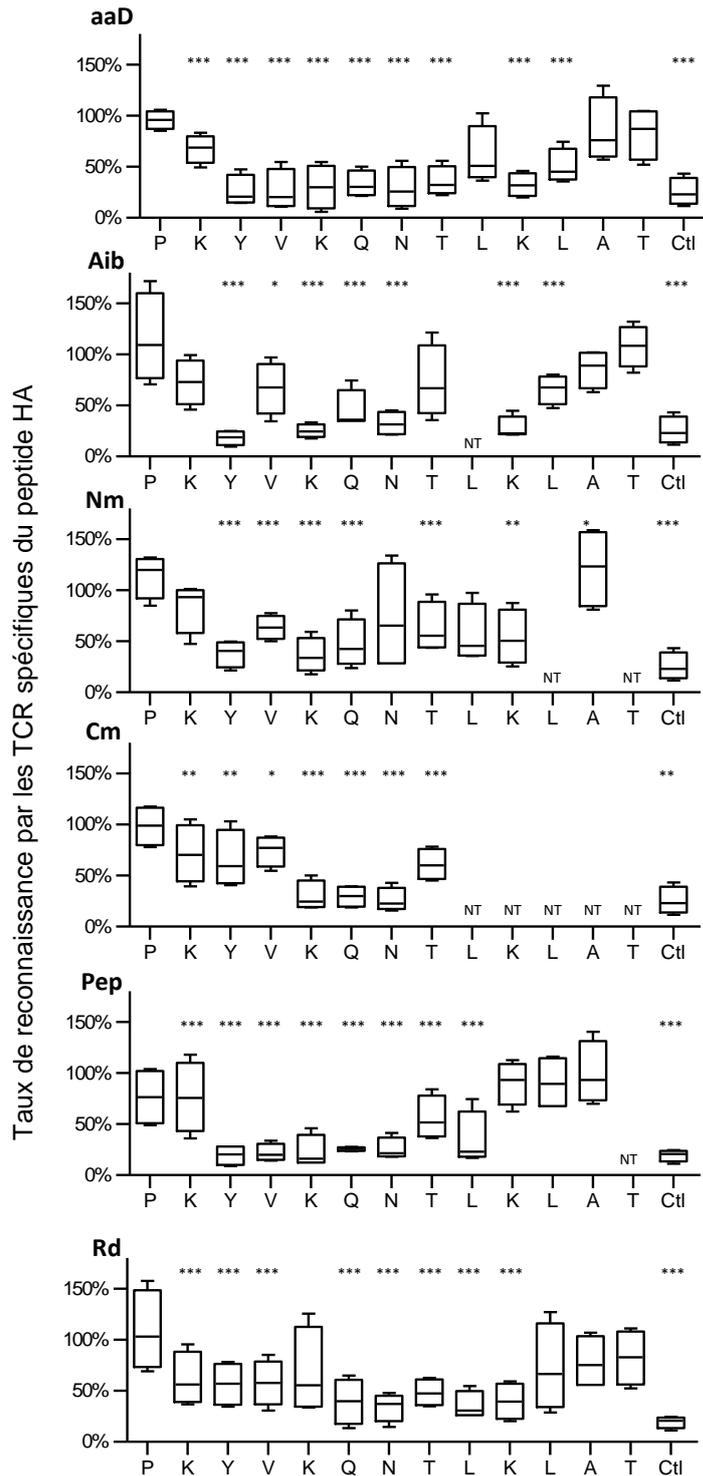
Analyse de données

Le test non-paramétrique U de Wilcoxon à deux extrémités a été utilisé pour des échantillons appariés afin d'évaluer si les résultats obtenus pour chaque analogue différaient de façon statistiquement significative de celles du HA en se basant sur le test de comparaison statistique de la somme des rangs. Notre hypothèse pour chaque analogue et test était que les résultats ne changeaient pas par rapport à ceux du HA, l'analyse statistique a été réalisée sur la comparaison entre les résultats du HA et chaque analogue. Les données utilisées pour ces analyses étaient le nombre moyen de points IFN γ dans la culture de cellules T à court terme, les affinités relatives moyennes dans le test de liaison HLA-DR et le nombre moyen de lignées positives de lymphocytes T générées dans la culture de cellules T à long terme.

Résultats

Reconnaissance des analogues par des lymphocytes T mémoires spécifiques du HA

Nous avons d'abord évalué la reconnaissance des analogues par des cellules T spécifiques du HA. Brièvement, les PBMC ont été enrichis en cellules T spécifiques du HA par une culture de 10 jours et soumis à un test ELISpot à IFN- γ avec le HA ou les analogues individuellement. Comme le montre la **Figure 2**, la plupart des analogues ont conduit à une diminution de la reconnaissance par les lymphocytes T. Le HA et les analogues interagissent avec les molécules HLA-DR au niveau d'un noyau peptidique commençant à la position P1-Y₃₀₈ (poche d'ancrage 1) et se terminant à la position P9-L₃₁₆ (poche d'ancrage 9), les acides aminés restants dans les extrémités N et C des peptides constituent les régions flanquantes. Les aaD, les Pep, les Aib et les Rd ont montré de puissants effets inhibiteurs de la reconnaissance par les TCR spécifiques du HA (***) P < 0,05) sur respectivement 8, 7, 6 et 6 positions au sein du noyau. Les Cm et les Nm ont révélé des effets mixtes, montrant aussi de fortes diminutions sur certaines positions, mais elles n'ont pas été testées respectivement sur trois et deux positions. La P7-L₃₁₄ aaD a été la seule position dans le noyau qui n'a pas perdu la reconnaissance par les TCR spécifiques du HA de manière significative, toutes les autres positions de la K₃₀₇ à la L₃₁₈ contenant un aaD sont significativement moins reconnues. Les Aib ont présenté les effets les plus forts sur la P1-Y₃₀₈, la K₃₁₀, la N₃₁₂ et la K₃₁₅.



Positions des modifications sur la séquence du peptide HA

Figure 2

Figure 2 : Reconnaissance *in vitro* des analogues modifiés par des lymphocytes T mémoires spécifiques du peptide HA issus de donneurs sains. Après une culture à court terme de PBMC de donneurs sains avec le HA, des lymphocytes T CD4 ont été soumis à un test ELISpot à IFN- γ en présence d'analogues individuellement ou du milieu de culture (contrôle). L'axe X représente les analogues et l'axe Y représente la reconnaissance relative des lymphocytes T (rapport de la moyenne du nombre de

points IFN- γ de chaque analogue par donneur sur de celle du HA) en pourcentage. Les diagrammes en boîtes s'étendent du 25^{ème} au 75^{ème} centile, la ligne au milieu de la boîte représente la médiane et les segments délimitent la plus petite valeur et la plus grande. La signification statistique a été évaluée en utilisant le test de Wilcoxon. *** P <0,02, ** P <0,05, * P <0,1. Ctl, contrôle. NT, non testé.

Les Nm ont induit des effets décroissants significatifs sur les positions restreintes au noyau, sauf sur la P6-N₃₁₃, la P7-L₃₁₄ et la P9-L₃₁₈ (non testée). Les Cm ont provoqué des effets inhibiteurs significatifs de la K₃₀₇ à la P6-T₃₁₃, les autres positions n'ont pas été testées. Les Pep ont révélé un effet négatif important de la K₃₀₇ à la P7-L₃₁₄, plus spécialement de la P1-Y₃₀₈ à la N₃₁₂. Ensuite, les Rd ont montré les effets les plus forts de la P4-Q₃₁₁ à la K₃₁₅. La P1-Y₃₀₈ et la P4-Q₃₁₁ constituent les seules positions pour lesquelles toute modification induit un déclin significatif de la reconnaissance par les TCR spécifiques du HA. Aussi, la K₃₀₇ et la T₃₁₈ sont en dehors du noyau et ont pourtant réduit la reconnaissance avec un aaD, une Cm, un Pep et une Rd, respectivement. Enfin, la seule augmentation significative de la reconnaissance a été induite par l'A₃₁₇ Nm située en dehors du noyau.

Affinité pour les molécules HLA de classe II

Le HA et les analogues ont été soumis à différents tests de liaison spécifique pour 5 molécules HLA-DR (DRB1*01:01, 04:01, 07:01, 11:01 et DRB5*01:01). Trois de ces allèles sont exprimés par trois des donneurs soumis aux tests de reconnaissance par les TCR, deux donneurs exprime DRB1*01:01 et un a exprimé à la fois les allèles 04:01 et 11:01 (**Tableaux supplémentaires 1 et 2**). Selon la **Figure 3**, les effets de modifications sur l'affinité pour les molécules HLA de classe II varient d'insignifiants à très fortement décroissants (**** P <0,01 et médiane <10⁻²). La position K₃₀₇ située juste avant le noyau, la P1-Y₃₀₈, la V₃₀₉ et la K₃₁₀ induisent des effets réducteurs forts à très forts lorsqu'elles sont modifiées de quelque façon que ce soit. Les aaD constituent la seule modification induisant une perte d'affinité d'au moins 100 fois sur chaque position au sein du noyau, montrant les effets les plus forts sur la P1-Y₃₀₈, la V₃₀₉ et la K₃₁₀. Les Rd et les Aib ont montré de effets fortement décroissants (**** P <0,01 et médiane <10⁻¹) sur respectivement 8 et 7 positions dans la séquence du HA. D'autres modifications ont induit des effets significatifs mais moins forts et nombreux. Les Nm et les Pep ont provoqué des effets avec une tendance similaire, un effet négatif important sur la P1-Y₃₀₈, de forts effets négatifs sur la K₃₀₇, la V₃₀₉ et la K₃₁₀, puis un effet faible ou nul sur les autres positions. Des augmentations significatives d'affinité sont induites respectivement par une Cm, une Nm, un Pep et un Aib sur la P₃₀₆, l'A₃₁₇, l'A₃₁₇ et la T₃₁₈.

Comme le montre la **Figure 4**, des distributions très différentes de reconnaissance par des lymphocytes T en fonction de l'affinité pour les molécules HLA de classe II sont observées d'une modification à l'autre. Une forte corrélation pour les aaD ($\rho = 0,9648$) et de bonnes corrélations pour les Cm ($\rho = 0,7833$) et les Aib ($\rho = 0,7802$) ont été observées. Pour les Pep ($\rho = 0,6209$), les Rd ($\rho = 0,5868$) et les Nm ($\rho = 0,5594$), la perte de reconnaissance par le TCR est faiblement corrélée à la perte d'affinité pour les molécules HLA de classe II. Pour les aaD, les Aib, les Nm et les Pep, une modification de la P1-Y₃₀₈ induit l'effet négatif le plus fort à la fois sur l'affinité pour les molécules HLA de classe II et la reconnaissance par des TCR alors que la P4-Q₃₁₁ et la N₃₁₂ sont critiques respectivement pour les Rd et les Cm.

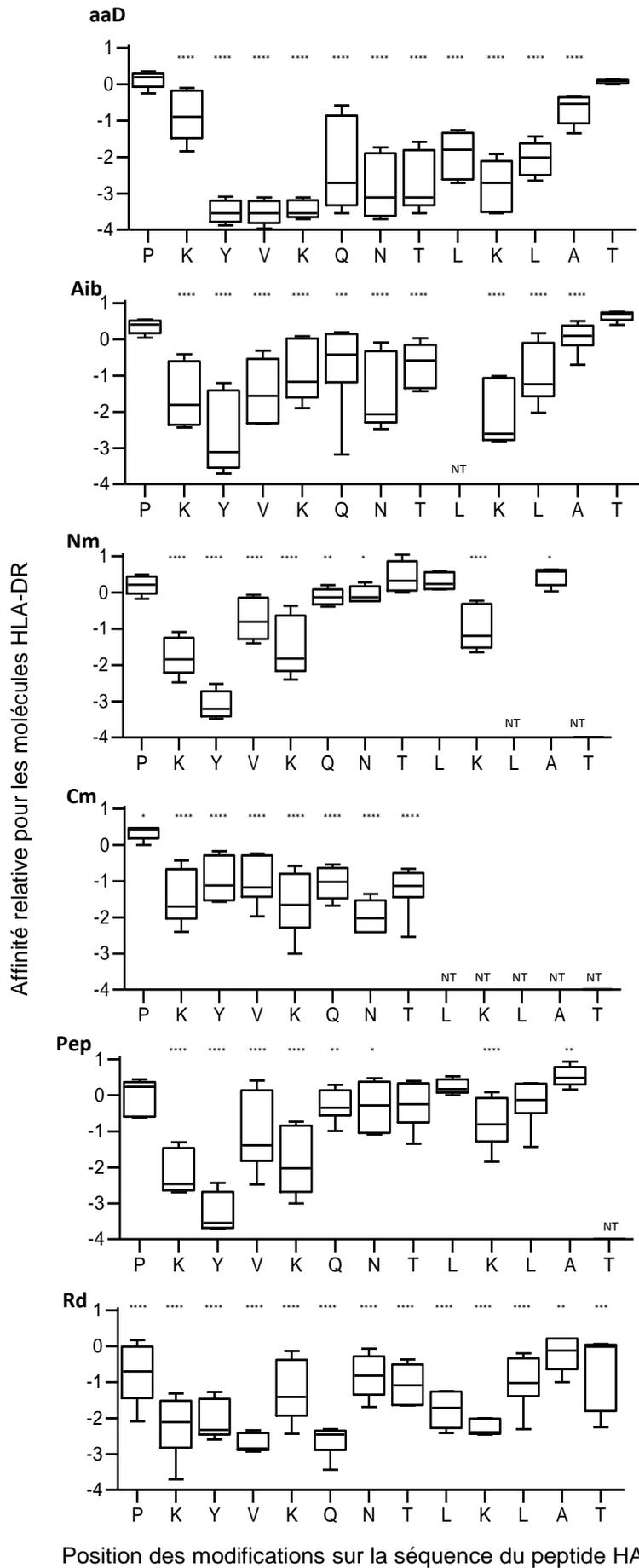


Figure 3

Figure 3 : Liaison d'analogues modifiés à cinq molécules d'antigène leucocytaire humain (HLA)-DR communes. Le HA et les 69 analogues ont été soumis à un ELISA compétitif spécifique des molécules HLA-DR suivantes: DRB1*01:01, *04:01, *07:01, *11:01 et DRB5*01:01. L'axe X représente les analogues et l'axe Y représente l'affinité relative aux molécules HLA-DR (rapport de l'IC₅₀ de chaque analogue par molécule HLA sur celle du HA) en échelle logarithmique. Les diagrammes en boîtes s'étendent du 25^{ème} au 75^{ème} centile, la ligne au milieu de la boîte représente la médiane et les segments délimitent la plus petite valeur et la plus grande. La signification statistique a été évaluée en utilisant le test Wilcoxon. **** P <0,01, *** P <0,02, ** P <0,05, * P <0,1. NT, non testé.

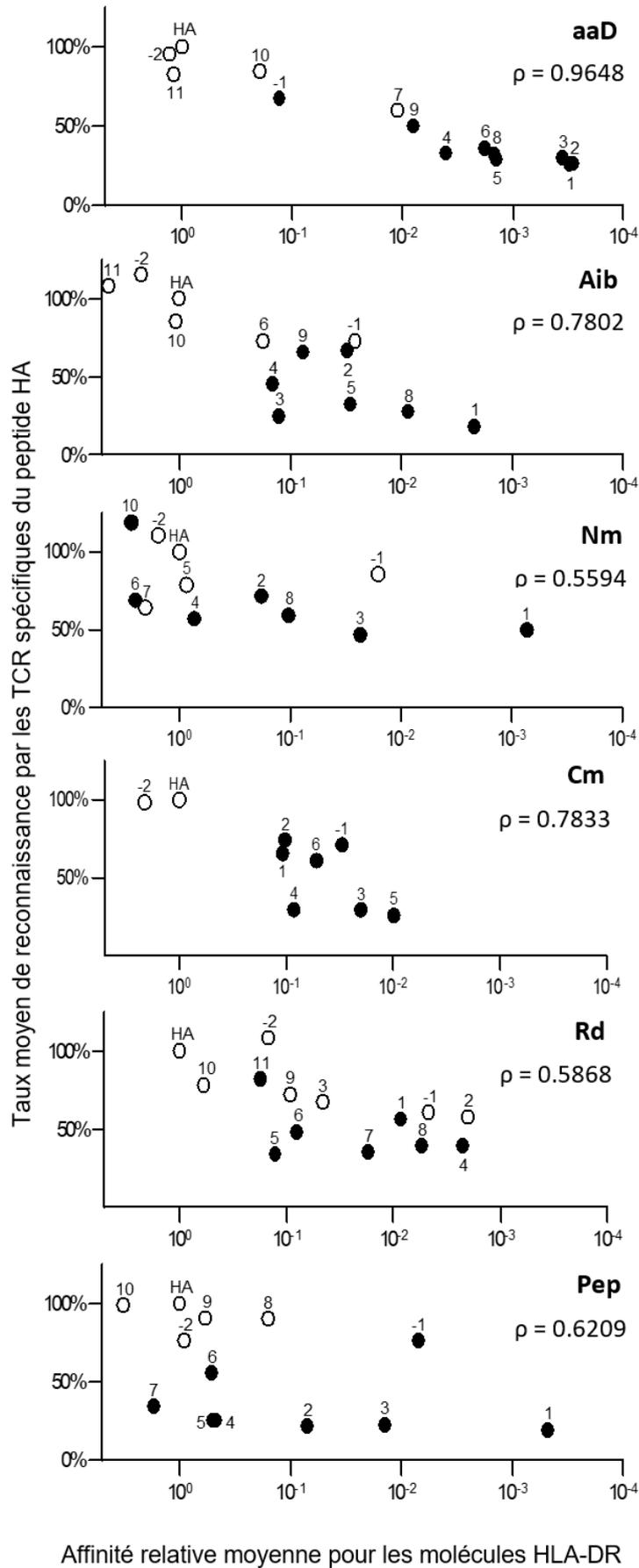


Figure 4

Figure 4 : Comparaison des effets des modifications sur la liaison moyenne aux molécules HLA-DR et de reconnaissance par des lymphocytes T. L'axe X représente la moyenne des affinités relatives aux molécules HLA-DR (rapport de l'IC₅₀ de chaque analogue sur celle du HA) en échelle logarithmique et l'axe Y représente la moyenne de la reconnaissance relative par le TCR (rapport du nombre de points IFN- γ de chaque analogue par celui du HA) en pourcentage. Les moyennes sont représentées par des points, les nombres renvoient à la position par rapport au noyau du HA (le troisième résidu de la séquence du HA correspond au premier résidu du noyau) et HA renvoie aux résultats du HA. Les analogues présentant une différence statistiquement significative dans le test de Wilcoxon (***) P < 0,02 pour la reconnaissance relative par le TCR sont marqués en noir, les autres sont marqués en blanc. ρ fait référence au coefficient de corrélation de rang de Spearman, une mesure statistique non-paramétrique de la corrélation entre les moyennes d'affinité relative et de reconnaissance par les cellules T, plus ρ est proche de 1, plus la corrélation est grande.

Induction de lignées de lymphocytes T spécifiques

Dans le but d'évaluer la capacité d'induire des lignées spécifiques des analogues contenant des aaD ou des Aib (analogues aaD et analogues Aib), le nombre de lignées T CD4⁺ spécifiques après une culture à long terme a été utilisé comme valeur de notation. D'après la **Figure 5A**, tous les analogues aaD testés ont induit une baisse de l'induction de lignées spécifiques, dont presque la moitié d'entre eux de manière statistiquement significative. Quasiment tous les analogues Aib restreints au noyau ont diminué significativement l'induction de lignées spécifiques. Les allèles DRB1*01:01, 04:01 et 11:01 ont été exprimés respectivement par deux et quatre donneurs de tests d'immunogénicité des aaD et des Aib, (**Tableau supplémentaire 5**). Comme le montre la **Figure 5B**, de bonnes corrélations pour les aaD ($\rho = 0,8667$) et les Aib ($\rho = 0,7660$) ont été observées entre la perte d'affinité pour les molécules HLA de classe II et la diminution du nombre de lignées spécifiques. Nous avons observé un seuil minimum nécessaire de perte d'affinité de 977 pour diminuer significativement le nombre de lignées de lymphocytes T spécifiques générées. La perte d'affinité au-delà de ce seuil semble efficace pour diminuer l'activation et l'induction de lignées lymphocytaires T spécifiques quel que soit le type de modification ou la position. Les aaD semblent cependant mener plus facilement à une telle perte d'affinité que les Aib. A l'exception de la P1-Y₃₀₈ qui joue un rôle important dans la liaison aux molécules HLA de classe II, les modifications sur les positions exposées au TCR génèrent moins de réponses T que les modifications sur les positions associées aux poches d'ancrage (P4, P6, P7 et P9) pour les deux types de modifications.

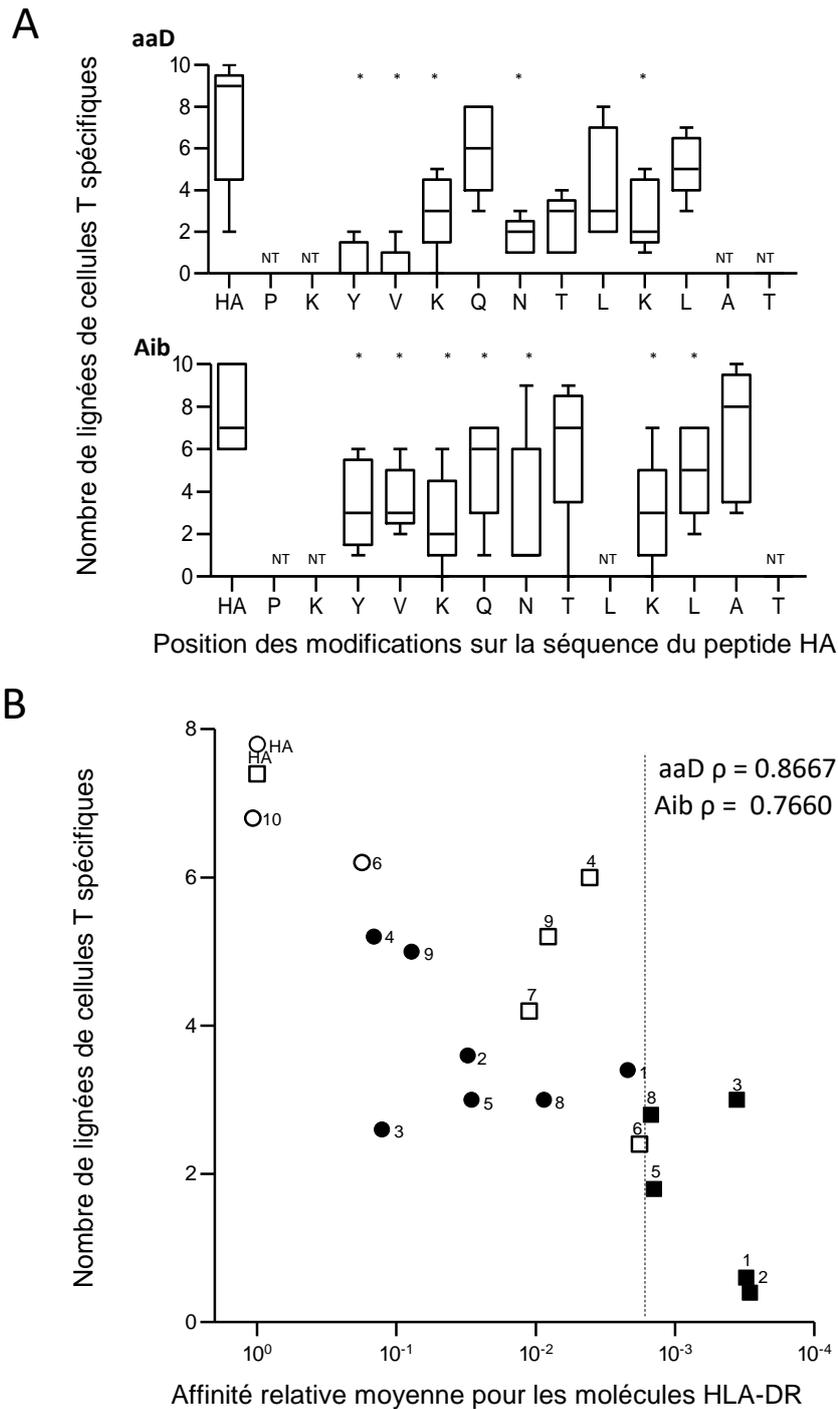


Figure 5

Figure 5 : A. Induction de lymphocytes T CD4 spécifiques du peptide HA et des analogues modifiés issus de donneurs sains. Des lignées de lymphocytes T CD4⁺ provenant de donneurs sains ont été induites contre le peptide HA et les analogues contenant des aaD ou des Aib. L'axe X représente les analogues et l'axe Y représente le nombre de lignées de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques par donneur. Les diagrammes en boîtes s'étendent du 25^{ème} au 75^{ème} centile, la ligne au milieu de la boîte correspond à la médiane et les segments descendent de la plus petite valeur jusqu'à la plus grande. La signification statistique a été évaluée en utilisant le test de Wilcoxon. * P < 0,01. NT, non testé. **B. Comparaison des effets des modifications sur la liaison moyenne aux molécules HLA-DR et sur l'induction de lignées de lymphocytes T spécifiques.** L'axe X représente la moyenne des affinités relatives aux

molécules HLA-DR (rapport de l'IC₅₀ de chaque analogue à celle du HA) en échelle logarithmique et l'axe Y représente la moyenne du nombre de lignées de lymphocytes T spécifiques. Les moyennes sont indiquées en carrés pour les analogues contenant des aaD et en cercles pour les analogues contenant des Aib, les nombres renvoient à la position relative au noyau du HA (le troisième résidu de la séquence du HA correspond au premier résidu du noyau) et HA renvoie aux résultats du HA. Les analogues présentant une différence statistiquement significative dans le test de Wilcoxon (* P < 0,1) sur le nombre de lignées de lymphocytes T sont marqués en noir, les autres sont marqués en blanc. ρ fait référence au coefficient de corrélation de rang de Spearman, mesure statistique non-paramétrique de la corrélation entre les moyennes d'affinité relative aux molécules HLA-DR et le nombre de lignées de lymphocytes T spécifiques, plus ρ est proche de 1, plus la corrélation est grande. La ligne verticale en pointillés limite la perte d'affinité nécessaire à une perte significative d'induction de lignées spécifiques pour les analogues contenant des aaD ou des Aib d'à peu près de 10^{-3} .

Discussion

A partir d'un peptide hautement immunogène, le peptide HA, 69 analogues contenant une modification non-naturelle à une position ont été synthétisés. Nous avons étudié les capacités des modifications à moduler individuellement trois paramètres : (1) la reconnaissance par des TCR spécifiques de la séquence non-modifiée, ces tests ont consisté en l'activation de cellules T mémoires spécifiques du HA chez 4 donneurs, à leur mise en culture sur une courte durée puis à une évaluation de leur capacité à être stimulés par les analogues individuellement. Cette étude permet d'évaluer dans des conditions *in vitro* la capacité d'une unique modification à moduler la présentation par les cellules de présentation et l'interaction avec les TCR. Elle détient un bon débit de criblage et les différents donneurs permettent de considérer le polymorphisme HLA ainsi que le répertoire de cellules T mémoires spécifiques du HA. (2) l'affinité pour des molécules HLA de classe II, ces tests ont consisté en un ELISA de chaque analogue en compétition avec le HA pour cinq molécules HLA de classe II pour lesquelles il présente une bonne affinité. Cette étude détient un très bon débit de criblage et informe sur la capacité d'une unique modification à moduler l'activité de liaison pour les molécules de présentations. (3) l'induction de lignées de cellules T spécifiques, ces tests ont consisté en la génération et la mise en culture sur une longue durée de lignées de lymphocytes T CD4⁺ en présence du HA et des analogues contenant un aaD ou un Aib, puis à l'évaluation de la spécificité de chaque lignée. Cette étude détient un faible débit de criblage mais permet de quantifier avec précision le nombre de cellules T naïves capables d'être activées par les analogues en considérant le polymorphisme HLA grâce aux différents donneurs.

Nous avons confrontés nos résultats à des études précédentes sur les effets des modifications sur la reconnaissance par des récepteurs du système immunitaire, notamment dans des modèles animaux. Et nos résultats ont confirmé et étendu les connaissances sur l'effet de modifications non-naturelles sur les propriétés immunogènes sur des molécules et cellules humaines. La comparaison des résultats de modifications présentant des points communs d'un point de vue stérique permet de mieux comprendre et expliquer les effets observés. Les aaD et les Pep ont en commun un transfert de la chaîne latérale, l'un à l'opposé du carbone α , l'autre sur l'azote de la chaîne principale (**Figure 1**). Les effets observés pour ces deux modifications soulignent l'importance de la chaîne latérale pour chaque position et de sa localisation exacte par rapport à l'acide aminé naturel. Les aaD ont eu le même effet critique sur la P1-Y₃₀₈, la V₃₀₉ et la K₃₁₀, et réduit plus largement l'affinité pour les molécules HLA de classe II, prolongeant de précédentes observations sur les molécules HLA-DR1 et DR4 ([Hill et al. 1994](#); [Zavala-Ruiz et al. 2003](#)). De plus, ils semblent en effet diminuer la capacité d'induction de lignées spécifiques en réduisant l'affinité pour les molécules HLA de classe II, comme cela a été révélé précédemment sur des modèles de rongeurs ([Benkirane et al. 1993](#); [Dintzis et al. 1993](#); [Jaton and Sela 1968](#); [King et al. 1994](#); [Maillère et al. 1995](#); [Maurer 1965](#)). Les Pep ont diminué fortement l'affinité pour les molécules HLA de classe II aux positions K₃₀₇ et Y₃₀₈ entourant la P1, et faiblement aux autres positions, comme décrit sur la molécule du CMH II de rat ([de Haan et al. 2002](#)). Les deux modifications présentent une reconnaissance par les cellules T similaires de la P1-Y₃₀₈ à la N₃₁₂, prouvant la nécessité de la chaîne latérale sur la reconnaissance des TCR sur ces positions. Cependant, l'affinité pour les molécules HLA de classe II des formes aaD est

au moins 40 fois plus faible que celle des formes Pep homologues sauf pour la P1-Y₃₀₈ dont le rôle critique de la chaîne latérale et sa localisation stricte sont décrits précisément ([Hill et al. 1994](#)). Ainsi, les Pep ne semblent pas déplacer suffisamment la chaîne latérale pour empêcher la liaison aux molécules HLA de classe II mais suffisamment pour rompre la reconnaissance par le TCR, induisant une mauvaise corrélation entre l'affinité et la reconnaissance contrairement aux aaD.

Les Aib et les Cm ont en commun l'introduction d'un groupe méthyle, l'un de part et d'autre du carbone α , l'autre à la place de l'hydrogène du carbone α tout en conservant la chaîne latérale (**Figure 1**). Les résultats des Aib ont montré des effets complémentaires de ceux précédemment observés sur l'affinité pour une molécule HLA I ([Baratin et al. 2002](#)) et leur capacité à imiter ou augmenter l'immunogénicité sur les modèles de rongeurs³⁹⁻⁴¹ et les IgG humaines ([Bossus et al. 1997](#)) par une plus grande stabilité de la conformation de l'hélice. Les Cm ont montré pour la première fois une bonne capacité à diminuer la reconnaissance par les TCR et l'affinité pour les molécules HLA de classe II pour toutes les positions testées à l'exception de la P₃₀₆. Les formes Aib et Cm homologues ont des effets très proches sur la reconnaissance et l'affinité en dehors du core du HA et des effets voisins pour les autres positions, à l'exception de la P1-Y₃₀₈. En effet, la perte de la chaîne latérale en P1 diminue drastiquement les deux paramètres entre la forme Cm et Aib. Pour les autres positions, l'affinité varie davantage que la reconnaissance d'une forme Aib à son homologue Cm, ce qui souligne le rôle de la chaîne latérale dans l'interaction avec les molécules HLA, vraisemblablement davantage que pour la reconnaissance par les TCR. De plus, une corrélation quasi-identique entre les deux paramètres a été obtenue pour les deux modifications.

Les Nm et les Rd ont en commun une modification de l'azote et du carbone impliqués dans la liaison peptidique, l'une comprend une méthylation de l'azote, l'autre une réduction du carbone (**Figure 1**). Les Nm ont présenté des effets mixtes sur la reconnaissance par les lymphocytes T, dont de faibles effets sur les positions associées aux poches d'ancrage voire aucun effet sur la P7-L₃₁₄, comme il l'avait été démontré sur les modèles murins ([Cotton et al. 1998](#)) et la molécule HLA-DR1 ([Zavala-Ruiz et al. 2003](#)). La méthylation de l'azote semble donc inhiber la formation de liaisons hydrogène avec les TCR, réduisant la reconnaissance indépendamment de l'affinité et limitant une quelconque corrélation entre les deux paramètres. Les Rd ont diminué à la fois l'affinité pour les molécules HLA de classe II et la reconnaissance par les TCR, comme observé précédemment chez la souris ([Cotton et al. 1998](#); [Ettouati et al. 1996](#); [Guichard et al. 1995](#); [Quesnel et al. 2001](#)). Cependant, ils n'ont pas adopté un comportement mimétique sur la reconnaissance par les TCR comme dans un modèle murin ou face à des IgG humaines ([Bastian et al. 2004](#); [Benkirane et al. 1996](#); [Calbo et al. 2000](#)). Excepté pour les positions P1-Y₃₀₈ et K₃₁₀, chaque forme Nm présente une plus grande affinité pour les molécules HLA de classe II que son homologue Rd, la méthylation semble donc inhiber plus faiblement les interactions avec les molécules de présentation que la réduction. De plus, l'effet d'une Rd ou d'une Nm sur la reconnaissance par les TCR est similaire pour la position P₃₀₆ et de la P1-Y₃₀₈ à la P4-Q₃₁₁, pour les autres positions, la méthylation a aussi un effet inhibiteur plus petit. Comparativement, la méthylation semble donc moins efficace que la réduction pour affecter séparément la reconnaissance et l'affinité. Enfin, une faible corrélation entre les deux

paramètres pour les deux modifications a été obtenue, certainement du fait qu'elles affectent la liaison peptidique plutôt que le carbone α comme les modifications précédentes.

Des positions du HA ont été identifiées comme non-permissives, c'est-à-dire que leur modification a systématiquement induit un effet sur la reconnaissance par les TCR et/ou l'affinité pour les molécules HLA de classe II. Ainsi, la P1-Y₃₀₈ et la P4-Q₃₁₁ constituent les positions les moins permissives du HA alors les positions associées aux trois autres poches (P6-T₃₁₃, P7-L₃₁₄ et P9-L₃₁₆) sont les plus permissives au sein du core du peptide. Comme attendu, les positions modifiées autour du core du HA n'ont montré que très peu d'effet, du fait de leur faible implication directe dans les interactions avec le TCR ou les molécules de présentation.

Enfin, l'induction de lignées lymphocytaires T spécifiques envers des analogues aaD ou Aib restreints au core du HA a été évaluée (**Figures 5A et 5B**). Les aaD se sont révélés avoir un effet négatif plus intense que les Aib sur la génération de lignées mais sur un nombre plus restreint de positions. Cependant, les deux modifications ont obtenu une corrélation similaire entre l'affinité pour les molécules HLA-DR et le nombre de lignées induites. Ainsi, une perte d'affinité causée par un Aib semble diminuer plus facilement le nombre de lignées spécifiques générées que pour un aaD à la même position, mais les aaD semblent pouvoir diminuer bien plus l'affinité pour les molécules de présentation ainsi que le nombre de lignées de cellules T spécifiques. Un seuil général de perte d'affinité au-delà duquel le nombre de lignées générées décroît significativement quel que soit la modification ou la position est observé avec une valeur de 977.

Conclusion

La plupart des analogues ont induit des effets statistiquement significatifs sur la reconnaissance par le TCR et l'affinité pour les molécules HLA de classe II, en particulier au sein du noyau du HA. Chaque modification testée a révélé des effets spécifiques et généralement négatifs, et presque tous ont confirmé et élargi les résultats antérieurs obtenus sur les modèles de rongeurs principalement. La P1-Y₃₀₈ et plus étonnamment la P4-Q₃₁₁ constituent les seules positions pour lesquelles toute modification a induit un déclin significatif de la reconnaissance par le TCR. La seule augmentation de la reconnaissance a été observée sur l'A₃₁₇ Nm. Les aaD et les Aib constituent les modifications les plus efficaces pour chaque test effectué. La corrélation entre une perte de reconnaissance et la perte d'affinité s'est révélée élevée seulement pour le aaD et bonne pour les Cm et les Aib. Enfin, les analogues restreints au noyau contenant des aaD et des Aib ont été évalués pour leur capacité à induire des lignées de cellules T spécifiques, les aaD ont une capacité d'induction plus réduite mais sur moins de positions que les Aib. Aussi, de bonnes corrélations entre l'affinité pour les molécules HLA de classe II et le nombre de lignées spécifiques induites ont été démontrées pour les deux modifications. Les aaD et les Aib affectent donc efficacement la liaison aux molécules de présentation, limitant leur reconnaissance par les lymphocytes T ainsi que l'activation de ces derniers. En conclusion, ces travaux constituent la première étude sur les rôles des modifications non-naturelles sur la reconnaissance par des TCR humains, l'affinité pour des molécules de présentation et l'induction de lignées de cellules T spécifiques. Les résultats sont encourageants pour l'utilisation des modifications testées car elles ont toutes induit une diminution des propriétés immunogéniques du HA.

Tableaux supplémentaires

Donneurs	A07	A12	A13	A18
HA & analogues	Typage HLA classe II (DRB1)			
	04:01 11:01	03:01 13:03	01:01 15:01	01:01 13:01
Contrôle	41	6	12	11
HA	94	51	61	42
aaD1	93	54	52	39
aaD2	46	36	41	35
aaD3	24	8	10	20
aaD4	25	7	7	23
aaD5	38	3	12	23
aaD6	34	13	13	21
aaD7	30	5	12	24
aaD8	29	18	14	24
aaD9	47	19	62	22
aaD10	43	14	12	16
aaD11	45	22	45	15
aaD12	121	35	51	24
aaD13	98	53	32	30
Aib1	66	63	104	40
Aib2	43	35	60	33
Aib3	24	5	9	10
Aib4	66	50	39	15
Aib5	24	9	15	14
Aib6	33	18	45	16
Aib7	37	11	14	19
Aib8	34	36	74	27
Aib10	22	11	27	10
Aib11	58	38	49	20
Aib12	73	52	61	27
Aib13	103	55	80	35
Contrôle	20	13	5	9
HA	101	53	44	40
Pep1	50	55	43	23
Pep2	37	35	52	35
Pep3	29	7	4	11
Pep4	22	8	8	14
Pep5	47	7	6	8
Pep6	24	14	11	11
Pep7	23	22	8	8
Pep8	61	45	19	15
Pep9	26	40	8	9
Pep10	114	33	43	36
Pep11	70	62	49	27
Pep12	84	75	46	28

Table S1. Nombre moyen de points IFN- γ par donneur pour le peptide HA et les analogues contenant des aaD, Aib et Pep.

36 analogues contenant des aaD, des Aib ou des Pep ont été soumis au test ELISpot à IFN- γ pour leur capacité à stimuler les lymphocytes T spécifiques du peptide HA provenant de donneurs sains. Les valeurs résultent des résultats de deux micropuits, les analogues contenant des aaD et des Aib ont été testés avec le même contrôle et micropuits HA, les analogues contenant des Pep ont été testés séparément. La réponse antigénique a été considérée comme spécifique lorsqu'un nombre de points en présence du peptide était le double de celui du témoin, avec une différence minimale de 25 points (Gras).

Donneurs	A07	A12	A13	A18
HA & analogues	Type HLA classe II (DRB1)			
	04:01 11:01	03:01 13:03	01:01 15:01	01:01 13:01
Contrôle	41	6	12	11
HA	94	51	61	42
Nm1	80	58	80	53
Nm2	45	46	59	43
Nm3	32	11	30	20
Nm4	56	40	41	21
Nm5	56	9	20	15
Nm6	38	41	15	19
Nm7	126	15	62	12
Nm8	42	49	27	28
Nm9	34	19	59	23
Nm10	38	13	53	26
Nm12	90	77	96	34
Cm1	73	60	68	36
Cm2	37	54	36	35
Cm3	97	36	30	17
Cm4	79	28	54	30
Cm5	47	10	18	8
Cm6	37	11	23	8
Cm7	40	8	14	10
Cm8	49	40	42	19
Contrôle	20	13	5	9
HA	101	53	44	40
Rd1	70	84	54	34
Rd2	37	35	42	19
Rd3	35	23	35	29
Rd4	31	30	38	24
Rd5	38	67	33	14
Rd6	31	35	6	20
Rd7	15	20	21	15
Rd8	64	21	25	14
Rd9	27	29	16	11
Rd10	30	32	9	20
Rd11	51	68	37	12
Rd12	57	50	47	23
Rd13	68	59	44	21

Table S2. Nombre moyen de points IFN- γ par donneur pour le peptide HA et les analogues contenant des Nm, Cm et Rd.

33 analogues contenant des Nm (N-méthylation), des Cm (C α -méthylation) ou des Rd (liaison peptidique réduite) ont été soumis au test ELISpot à IFN- γ pour leur capacité à stimuler les lymphocytes T spécifiques du peptide HA provenant de donneurs sains. Les valeurs résultent des résultats de deux micropuits, les analogues contenant des Nm et des Nm ont été testés avec le même contrôle et micropuits HA, les analogues contenant des Rd ont été testés séparément. La réponse antigénique a été considérée comme spécifique lorsqu'un nombre de points en présence du peptide était le double de celui du témoin, avec une différence minimale de 25 points (Gras).

HA & analogues	Molécules HLA de classe II				
	DRB1*0101	DRB1*0401	DRB1*0701	DRB1*1101	DRB5*0101
HA	1	1	1	1	1
aaD1	0,7	0,9	0,6	0,4	1,8
aaD2	1,9	1,3	<u>70</u>	19	7,9
aaD3	7475	2 183	3 508	5 000	1 240
aaD4	9227	2 183	3 508	5 000	1 307
aaD5	3996	1 910	3 508	5 000	1 307
aaD6	3,8	<u>82</u>	3 508	1 500	523
aaD7	140	<u>55</u>	3 508	5 000	1 307
aaD8	<u>38</u>	204	3 508	1 500	1 307
aaD9	18	<u>27</u>	<u>63</u>	350	523
aaD10	302	<u>82</u>	3 508	3 000	523
aaD11	103	<u>27</u>	246	450	<u>91</u>
aaD12	3,5	8,2	2,2	<u>22</u>	2,3
aaD13	0,7	0,8	0,8	1,0	0,9
Aib1	0,3	0,5	0,4	0,9	0,3
Aib2	8,6	2,6	272	200	<u>65</u>
Aib3	<u>69</u>	2 728	16	5 000	1 307
Aib4	12	2,0	210	200	<u>37</u>
Aib5	1,2	0,8	<u>27</u>	<u>15</u>	<u>78</u>
Aib6	0,8	1 494	2,6	7,7	0,7
Aib7	7,8	1,2	149	300	117
Aib8	0,9	3,9	3,2	<u>27</u>	19
Aib10	10	13	555	400	653
Aib11	<u>23</u>	0,7	105	17	12
Aib12	0,8	0,9	0,3	5,0	0,6
Aib13	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2
Pep1	0,5	0,4	4,1	3,7	0,6
Pep2	<u>52</u>	20	293	400	489
Pep3	4 614	273	3 508	5 000	1 848
Pep4	5,2	0,4	<u>25</u>	300	<u>37</u>
Pep5	9,8	5,4	105	1 000	320
Pep6	0,5	2,2	9,9	2,2	1,2
Pep7	0,3	12,2	0,6	10,0	1,9
Pep8	0,4	0,5	3,3	<u>22</u>	1,8
Pep9	0,5	0,7	1,0	0,3	0,7
Pep10	2,3	0,8	<u>70</u>	11,2	6,4
Pep11	0,5	1,3	0,5	<u>27</u>	1,7
Pep12	0,3	0,1	0,3	0,7	0,4

Table S3. Affinité relative du peptide HA et des analogues contenant des aaD, Aib et Pep.

36 analogues contenant des aaD (acide aminé D), des Aib (acides amino-isobutyrique) ou des Pep (peptide) ont été soumis à un ELISA en compétition spécifique de molécules HLA de classe II. Chaque allèle est présent à une fréquence minimale de 5% dans la population caucasienne. Les valeurs résultent d'au moins deux expériences indépendantes. Les affinités relatives ≤ 100 mais > 20 correspondent à de bonnes affinités (Souligné), et celles ≤ 20 correspondent à de hautes affinités (Gras).

HA & analogues	Molécules HLA de classe II				
	DRB1*0101	DRB1*0401	DRB1*0701	DRB1*1101	DRB5*0101
HA	1	1	1	1	1
Nm1	<u>33</u>	12	<u>70</u>	300	111
Nm2	2 307	1 637	333	3 000	1 307
Nm3	1,2	1,7	16	25	6,4
Nm4	2,3	<u>67</u>	<u>35</u>	250	104
Nm5	0,6	1,3	1,9	2,5	1,2
Nm6	1,0	1,3	1,7	1,7	0,5
Nm7	0,3	0,5	0,8	1,0	0,1
Nm8	0,3	0,8	0,6	0,3	0,8
Nm9	1,7	2,7	16	<u>45</u>	<u>26</u>
Nm10	0,2	0,2	0,5	0,9	0,3
Nm12	<u>33</u>	12	<u>70</u>	300	111
Cm1	0,3	0,4	0,4	1,0	0,5
Cm2	16	2,7	<u>70</u>	250	<u>51</u>
Cm3	2,8	1,5	<u>31</u>	<u>37</u>	13
Cm4	2,3	1,7	16	15	<u>93</u>
Cm5	16	3,9	105	1000	<u>45</u>
Cm6	3,5	11	<u>22</u>	<u>47</u>	5,8
Cm7	<u>23</u>	<u>67</u>	105	250	261
Cm8	8,5	14	14	350	4,5
Rd1	2,3	0,7	5,0	122	15
Rd2	<u>92</u>	20	351	5 000	131
Rd3	<u>63</u>	19	210	224	392
Rd4	692	218	702	316	847
Rd5	10	1,3	<u>50</u>	274	<u>26</u>
Rd6	283	2 728	246	200	453
Rd7	1,2	5,5	<u>50</u>	14	6,5
Rd8	2,3	5,5	<u>44</u>	<u>42</u>	12
Rd9	<u>52</u>	18	258	150	18
Rd10	283	109	248	100	261
Rd11	3,5	11	13	200	1,6
Rd12	0,6	2,7	1,3	10	0,6
Rd13	1,0	177	0,9	<u>39</u>	1,0

Table S4. Affinité relative du peptide HA et des analogues contenant des Nm, Cm et Rd.

33 analogues contenant des Nm (N-méthylation), des Cm (C α -méthylation) ou des Rd (liaison peptidique réduite) ont été soumis à un ELISA en compétition spécifique de molécules HLA de classe II. Chaque allèle est présent à une fréquence minimale de 5% dans la population caucasienne. Les valeurs résultent d'au moins deux expériences indépendantes. Les affinités relatives ≤ 100 mais > 20 correspondent à de bonnes affinités (Souligné), et celles ≤ 20 correspondent à de hautes affinités (Gras).

Donneurs	P429	P435	P440	P454	P455
HA & analogues	Type HLA classe II (DRB1)				
	01:01 04:01	08:01 11:01	12:01 15:01	03:01 13:01	09:01 09:01
HA	2	10	9	9	7
aaD3	0	0	1	0	2
aaD4	2	0	0	0	0
aaD5	3	3	4	5	0
aaD6	5	6	8	8	3
aaD7	2	1	1	3	2
aaD8	3	3	1	4	1
aaD9	3	8	2	2	6
aaD10	1	4	5	2	2
aaD11	3	5	7	5	6
Donneurs	P430	P454	P473	P549	P554
HA & analogues	Type HLA classe II (DRB1)				
	01:01 10:01	03:01 13:01	01:01 11:01	03:01 11:01	04:01 11:01
HA	10	6	6	10	7
Aib3	5	1	6	3	2
Aib4	6	3	3	4	2
Aib5	2	0	2	6	3
Aib6	7	6	5	7	1
Aib7	3	1	1	9	1
Aib8	9	0	8	7	7
Aib10	3	0	2	7	3
Aib11	7	4	5	7	2
Aib12	10	4	3	9	8

Table S5. Nombre moyen de lignées de cellules T spécifiques du peptide HA ou des analogues contenant des aaD ou des Aib.

18 analogues contenant des aaD (acide amine D) ou des Aib (acide amino-isobutyrique) ont été soumis à un test ELISpot à IFN- γ pour leur capacité à générer des lignées de cellules T CD4⁺ spécifiques à partir de donneurs sains. Les valeurs résultent de 10 lignées de cellules T par peptide et par donneur, chaque lignée de cellules T a été testée en doublon. Les lignées de cellules T ont été considérées comme spécifiques lorsqu'un nombre de points en présence du peptide était le double de celui du témoin, avec une différence minimale de 25 points (Gras).

Références

- Aray, Yosslen, Ricardo Aguilera-García, and Daniel R. Izquierdo. 2018. "Exploring the Nature of the H-Bonds between the Human Class II MHC Protein, HLA-DR1 (DRB*0101) and the Influenza Virus Hemagglutinin Peptide, HA306-318, Using the Quantum Theory of Atoms in Molecules." *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 1–17. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29246090>).
- Baratin, Myriam et al. 2002. "Amino Acid Modifications in the Wild Type Sequence p53 232-240 Overcome the Poor Immunogenicity of This Self Tumour Epitope." *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 8(7):327–34. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148782>).
- Bastian, Max, José Manuel Lozano, Manuel Elkin Patarroyo, Gerd Pluschke, and Claudia A. Daubenberger. 2004. "Characterization of a Reduced Peptide Bond Analogue of a Promiscuous CD4 T Cell Epitope Derived from the Plasmodium Falciparum Malaria Vaccine Candidate Merozoite Surface Protein 1." *Molecular Immunology* 41(8):775–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234557>).
- Benkirane, N. et al. 1993. "Antigenicity and Immunogenicity of Modified Synthetic Peptides Containing D-Amino Acid Residues. Antibodies to a D-Enantiomer Do Recognize the Parent L-Hexapeptide and Reciprocally." *The Journal of Biological Chemistry* 268(35):26279–85. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253750>).
- Benkirane, N., G. Guichard, J. P. Briand, and S. Muller. 1996. "Exploration of Requirements for Peptidomimetic Immune Recognition. Antigenic and Immunogenic Properties of Reduced Peptide Bond Pseudopeptide Analogues of a Histone Hexapeptide." *The Journal of Biological Chemistry* 271(52):33218–24. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8969178>).
- Biron, Eric et al. 2008. "Improving Oral Bioavailability of Peptides by Multiple N-Methylation: Somatostatin Analogues." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 47(14):2595–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297660>).
- Bossus, M. et al. 1997. "Improved Detection of Human Antibodies to a Plasmodium Antigen Using a Peptide Modified with Aib Residues." *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 3(1):47–53. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230470>).
- Calbo, S. et al. 2000. "Antitumor Vaccination Using a Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I-Restricted Pseudopeptide with Reduced Peptide Bond." *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 23(1):125–30. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10687145>).
- Chevaleyre, Claire et al. 2015. "The Tumor Antigen Cyclin B1 Hosts Multiple CD4 T Cell Epitopes Differently Recognized by Pre-Existing Naive and Memory Cells in Both Healthy and Cancer Donors." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195(4):1891–1901. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136431>).
- Cotton, J., M. Hervé, S. Pouvelle, B. Maillère, and A. Ménez. 1998. "Pseudopeptide Ligands for MHC II-Restricted T Cells." *International Immunology* 10(2):159–66. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9533443>).

- Delluc, Stephanie, Gilles Ravot, and Bernard Maillere. 2011. "Quantitative Analysis of the CD4 T-Cell Repertoire Specific to Therapeutic Antibodies in Healthy Donors." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(6):2040–48. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368101>).
- Delluc, Stéphanie, Gilles Ravot, and Bernard Maillere. 2010. "Quantification of the Preexisting CD4 T-Cell Repertoire Specific for Human Erythropoietin Reveals Its Immunogenicity Potential." *Blood* 116(22):4542–45. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702780>).
- Dhar, Amlanjyoti et al. 2014. "Simultaneous Inhibition of Key Growth Pathways in Melanoma Cells and Tumor Regression by a Designed Bidentate Constrained Helical Peptide." *Biopolymers - Peptide Science Section* 102(4):344–58.
- Dintzis, H. M., D. E. Symer, R. Z. Dintzis, L. E. Zawadzke, and J. M. Berg. 1993. "A Comparison of the Immunogenicity of a Pair of Enantiomeric Proteins." *Proteins* 16(3):306–8. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346194>).
- Ericson, Mark D. et al. 2017. "Bench-Top to Clinical Therapies: A Review of Melanocortin Ligands from 1954 to 2016." *Biochimica et Biophysica Acta* 1863(10 Pt A):2414–35. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28363699>).
- Ettouati, L. et al. 1996. "Substitution of Peptide Bond 53-54 of HEL(52-61) with an Ethylene Bond rather than Reduced Peptide Bond Is Tolerated by an MHC-II Restricted T Cell." *Peptide Research* 9(5):248–53. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000251>).
- Feng, Zhaoqianqi and Bing Xu. 2016. "Inspiration from the Mirror: D-Amino Acid Containing Peptides in Biomedical Approaches." *Biomolecular Concepts* 7(3):179–87. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159920>).
- Fineberg, S.Edwin et al. 2007. "Immunological Responses to Exogenous Insulin." *Endocrine Reviews* 28(6):625–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785428>).
- Gentilucci, Luca, Rossella De Marco, and Lucia Cerisoli. 2010. "Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization." *Current Pharmaceutical Design* 16(28):3185–3203. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687878>).
- Goodwin, D., P. Simerska, and I. Toth. 2012. "Peptides as Therapeutics with Enhanced Bioactivity." *Current Medicinal Chemistry* 19(26):4451–61. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22830348>).
- Guichard, G. et al. 1995. "Efficient Binding of Reduced Peptide Bond Pseudopeptides to Major Histocompatibility Complex Class I Molecule." *The Journal of Biological Chemistry* 270(44):26057–59. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592803>).
- Gurunath, R., T. K. Beena, P. R. Adiga, and P. Balam. 1995. "Enhancing Peptide Antigenicity by Helix Stabilization." *FEBS Letters* 361(2–3):176–78. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535246>).
- de Haan, Ellen C. et al. 2002. "Major Histocompatibility Complex Class II Binding Characteristics of Peptoid-Peptide Hybrids." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10(6):1939–45. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937352>).

- Hamamoto, Kumiko, Yutaka Kida, Ye Zhang, Takashi Shimizu, and Koichi Kuwano. 2002. "Antimicrobial Activity and Stability to Proteolysis of Small Linear Cationic Peptides with D-Amino Acid Substitutions." *Microbiology and Immunology* 46(11):741–49. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516770>).
- Hamze, Moustafa et al. 2017. "Characterization of CD4 T Cell Epitopes of Infliximab and Rituximab Identified from Healthy Donors." *Frontiers in Immunology* 8:500. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529511>).
- Hervé, M. et al. 1997. "On the Immunogenic Properties of Retro-Inverso Peptides. Total Retro-Inversion of T-Cell Epitopes Causes a Loss of Binding to MHC II Molecules." *Molecular Immunology* 34(2):157–63. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188848>).
- Hill, C. M. et al. 1994. "Exploration of Requirements for Peptide Binding to HLA DRB1*0101 and DRB1*0401." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152(6):2890–98. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144889>).
- Hill, C. Mark et al. 1994. "Exploration of Requirements for Peptide Binding to HLA DRB1*0101 and DRB1*0401." *Journal of Immunology* 152(6):2890–98. Retrieved (<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028316567&partnerID=tZOtx3y1>).
- Hymes, Jeffrey et al. 2007. "Dosing Patterns, Drug Costs, and Hematologic Outcome in Anemic Patients with Chronic Kidney Disease Switching from Darbepoetin Alfa to Epoetin Alfa." *Current Medical Research and Opinion* 23(8):1931–37. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624232>).
- Jaton, J. C. and M. Sela. 1968. "Role of Optical Configuration in the Immunogenicity and Specificity of Synthetic Antigens Derived from Multichain Polyproline." *The Journal of Biological Chemistry* 243(21):5616–26. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5699055>).
- Jelkmann, Wolfgang. 2011. "Regulation of Erythropoietin Production." *The Journal of Physiology* 589(Pt 6):1251–58. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273483>).
- Kharagjitsingh, Aantje V et al. 2005. "Incidence of Recombinant Erythropoietin (EPO) Hyporesponse, EPO-Associated Antibodies, and Pure Red Cell Aplasia in Dialysis Patients." *Kidney International* 68(3):1215–22. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105053>).
- Kim, Cheol Joo, Eri Hara, Naoki Watabe, Isao Hara, and Shunsaku Kimura. 2017. "Modulation of Immunogenicity of Poly(sarcosine) Displayed on Various Nanoparticle Surfaces due to Different Physical Properties." *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 23(12):889–98. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29110375>).
- King, T. P. et al. 1994. "Structure-Immunogenicity Relationship of Melittin, Its Transposed Analogues, and D-Melittin." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153(3):1124–31. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027544>).
- Kirberg, J. et al. 1994. "Thymic Selection of CD8+ Single Positive Cells with a Class II Major Histocompatibility Complex-Restricted Receptor." *The Journal of Experimental Medicine*

- 180(1):25–34. Retrieved
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Kobalava, Zhanna et al. 2015. “Pharmacokinetics of Serelaxin in Patients with Hepatic Impairment: A Single-Dose, Open-Label, Parallel Group Study.” *British Journal of Clinical Pharmacology* 79(6):937–45. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25511105>).
- Kroenke, Mark A. et al. 2017. “Clinical Immunogenicity of the D-Amino Acid Peptide Therapeutic Etelcalcetide: Method Development Challenges and Anti-Drug Antibody Clinical Impact Assessments.” *Journal of Immunological Methods* 445:37–44. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28274835>).
- Lamb, J. R. et al. 1995. “The Effects of Changes at Peptide Residues Contacting MHC Class II T-Cell Receptor on Antigen Recognition and Human Th0 Cell Effector Function.” *Immunology* 85(3):447–54. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7558134>).
- Li, Hao et al. 2016. “Roles of D-Amino Acids on the Bioactivity of Host Defense Peptides.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(7). Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376281>).
- Li, X., R. Li, and Z. Li. 2006. “Inhibitory Effects on HLA-DR1-Specific T-Cell Activation by Influenza Virus Haemagglutinin-Derived Peptides.” *Tissue Antigens* 67(1):45–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16451200>).
- Maillère, B. et al. 1995. “Probing Immunogenicity of a T Cell Epitope by L-Alanine and D-Amino Acid Scanning.” *Molecular Immunology* 32(14–15):1073–80. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8544857>).
- Maurer, P. H. 1965. “Antigenicity of Polypeptides (Poly Alpha Alpha Amino Acids). 13. Immunological Studies with Synthetic Polymers Containing Only D- or D- and L-Alpha-Amino Acids.” *The Journal of Experimental Medicine* 121:339–49. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14271319>).
- Naquet, P. et al. 1988. “T Cell Autoreactivity to Insulin in Diabetic and Related Non-Diabetic Individuals.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 140(8):2569–78. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2451692>).
- Paul, Sinu et al. 2013. “Evaluating the Immunogenicity of Protein Drugs by Applying in Vitro MHC Binding Data and the Immune Epitope Database and Analysis Resource.” *Clinical & Developmental Immunology* 2013:467852. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24222776>).
- Perumal, Madhusoothanan Bhagavathi and Saranya Dhanasekaran. 2014. “Relaxin: A Missing Link in the Pathomechanisms of Systemic Lupus Erythematosus?” *Modern Rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 24(4):547–51. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251992>).
- Piccinni, M. P. et al. 1999. “Relaxin Favors the Development of Activated Human T Cells into Th1-like Effectors.” *European Journal of Immunology* 29(7):2241–47. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10427987>).
- Pinto, Sheena et al. 2013. “Overlapping Gene Coexpression Patterns in Human Medullary

- Thymic Epithelial Cells Generate Self-Antigen Diversity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(37):E3497-505. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23980163>).
- Quesnel, A. et al. 2001. “Synthesis and Antigenic Properties of Reduced Peptide Bond Analogues of an Immunodominant Epitope of the Melanoma MART-1 Protein.” *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 7(3):157–65. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297352>).
- Sagan, Sandrine, Philippe Karoyan, Olivier Lequin, Gérard Chassaing, and Solange Lavielle. 2004. “N- and Calpha-Methylation in Biologically Active Peptides: Synthesis, Structural and Functional Aspects.” *Current Medicinal Chemistry* 11(21):2799–2822. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544477>).
- Sakarellos-Daitsiotis, M. et al. 1999. “Peptide Carriers: A Helicoid-Type Sequential Oligopeptide Carrier (SOC(n)) for Multiple Anchoring of Antigenic/immunogenic Peptides.” *Methods (San Diego, Calif.)* 19(1):133–41. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10525449>).
- Samuel, Chrisan S. et al. 2005. “The Relaxin Gene Knockout Mouse: A Model of Progressive Scleroderma.” *The Journal of Investigative Dermatology* 125(4):692–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16185267>).
- Skarlas, Theodore et al. 2011. “Influenza Virus H5N1 Hemagglutinin (HA) T-Cell Epitope Conjugates: Design, Synthesis and Immunogenicity.” *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 17(3):226–32. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21308879>).
- Steinbrecher, U. P., M. Fisher, J. L. Witztum, and L. K. Curtiss. 1984. “Immunogenicity of Homologous Low Density Lipoprotein after Methylation, Ethylation, Acetylation, or Carbamylation: Generation of Antibodies Specific for Derivatized Lysine.” *Journal of Lipid Research* 25(10):1109–16. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6439810>).
- Stern, L. J. et al. 1994. “Crystal Structure of the Human Class II MHC Protein HLA-DR1 Complexed with an Influenza Virus Peptide.” *Nature* 368(6468):215–21. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145819>).
- Stone, Tracy A. and Charles M. Deber. 2017. “Therapeutic Design of Peptide Modulators of Protein-Protein Interactions in Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1859(4):577–85. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.08.013>).
- Tangri, Shabnam et al. 2005. “Rationally Engineered Therapeutic Proteins with Reduced Immunogenicity.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174(6):3187–96. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749848>).
- Teerlink, John R. et al. 2009. “Relaxin for the Treatment of Patients with Acute Heart Failure (Pre-RELAX-AHF): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled, Parallel-Group, Dose-Finding Phase IIb Study.” *The Lancet* 373(9673):1429–39. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60622-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60622-X)).
- Texier, C. et al. 2000. “HLA-DR Restricted Peptide Candidates for Bee Venom

- Immunotherapy.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164(6):3177–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706708>).
- Texier, Catherine et al. 2002. “Emerging Principles for the Design of Promiscuous HLA-DR-Restricted Peptides: An Example from the Major Bee Venom Allergen.” *European Journal of Immunology* 32(12):3699–3707. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516563>).
- Usmani, Salman Sadullah et al. 2017. “THPdb: Database of FDA-Approved Peptide and Protein Therapeutics.” *PloS One* 12(7):e0181748. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759605>).
- Wang, Peng et al. 2008. “A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach.” *PLoS Computational Biology* 4(4):e1000048. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18389056>).
- Zavala-Ruiz, Zarixia et al. 2003. “Exploration of the P6/P7 Region of the Peptide-Binding Site of the Human Class II Major Histocompatibility Complex Protein HLA-DR1.” *The Journal of Biological Chemistry* 278(45):44904–12. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952957>).
- Zuckermann, Ronald N., M.Kerr H. Janice, Stephen B. Kent, and H.Moos. Walter. 1992. “Efficient Method for the Preparation of Peptoids [oligo(N-Substituted Glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis.” *J. Am. Chem.* 114(26):10646–47.

Résultats complémentaires (résultats non publiés) : Etude du potentiel immunogénique des analogues de la Rln2.

Introduction

En parallèle des travaux sur la Rln2, un grand nombre d'analogues de la protéine ont été développés par les équipes de Sanofi, dont 19 ont été testés sur les modèle de prédiction d'immunogénicité utilisés au laboratoire. Pour des raisons de confidentialité, aucune information sur leur séquence ni leur nature ne sera révélée. Un numéro de 1 à 19 leur est attribué dans l'ordre chronologique de leur étude au sein des quatre sessions d'expériences effectuées. Le choix des analogues étudiés dans les tests de prédiction a résulté principalement des essais sur leur activité biologique et stabilité métabolique ainsi qu'en fonction de l'avancement du processus de sélection. Pour les tests de culture *in vitro*, la Rln2 et la KLH ont été évaluées lors des deux premières sessions en parallèle des quatre premiers analogues afin de fournir une valeur de référence. La troisième session a été effectuée sans la Rln2 ni la KLH, l'analogue N°1 servant de référence pour les quatre derniers analogues testés. Pour les tests de liaison aux molécules HLA de classe II, 14 analogues ont été évalués, ni la Rln2 ni la KLH n'ont été évaluée en raison de leur taille. Ces travaux ont apporté aux équipes de Sanofi des éléments importants sur les propriétés immunogéniques des analogues testés et les ont ainsi accompagnées dans le processus de sélection.

Matériel et méthodes

Analogues

Les 19 analogues de la Rln2 ont été développés et synthétisés par les équipes de Sanofi R&D.

Echantillons sanguins de donneurs et génotypage HLA-DR

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été obtenues à partir de cellules sanguines collectées par l'Etablissement Français du Sang (EFS, Rungis, France), en tant que préparations de couche leucoplaquettaire de donneurs anonymes sains ayant donné leur consentement en accord avec les recommandations de l'EFS. Les PBMC ont été isolés par gradient de densité en centrifugation dans des Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Buc, France). Les DC dérivées de monocytes ont été générées à partir de cellules adhérentes au support plastique issues de PBMC après 4 à 5 jours de culture dans du milieu AIM-V (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) supplémenté par 1000U/mL d'IL-4 recombinante humaine (rh-IL-4; R&D systems, Lille, France) et de rh-GM-CSF (R&D systems). Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés à partir de PBMC autologues par sélection positive en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD4 couplé à des microbilles magnétiques (Miltenyi Biotech, Paris, France) et un tri cellulaire magnétique, selon le protocole du fournisseur. L'homogénéité des cellules a été évaluée par cytométrie en flux. Les phénotypes HLA-DR des donneurs ont été déterminés en utilisant le kit de typage Gold SSP DRB1 (Invitrogen) après extraction d'ADN à partir de PBMC avec le kit NucleoSpin Blood L (Macherey Nagel, Hoerd, France).

Génération de lignées lymphocytaires T spécifiques des analogues

Les DC dérivées des monocytes ont été chargées sur une nuit à 37°C avec soit la Rln2 ou ses analogues (3 µM), soit la KLH (0.25 µM) et maturées avec du lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL). Après les lavages, les DC chargées sont ajoutées dans 10, 25 ou 30 répliquas par molécule à raison de 20 000 cellules/puits dans des micropuits à fond rond contenant 200 000 lymphocytes T CD4⁺ autologues dans 200 µL de milieu Iscove's Dulbecco supplémenté par 10% de sérum AB humain (IMDM, Lonza, Levallois-Perret, France), 1000 U/mL de rh-IL-6 (R&D systems) et 10 ng/mL de rh-IL-12 (R&D systems). Les co-cultures ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ durant 21 jours. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été restimulés aux jours 7 et 14 avec des DC fraîches chargées avec des protéines, 10 U/mL de rh-IL-2 (R&D systems) et 5 ng/mL de rh-IL-7 (R&D systems). La spécificité de chaque répliqua de culture cellulaire (lignée lymphocytaire T CD4⁺) a été évaluée par un test ELISpot à IFN-γ en présence de chacune des protéines individuellement le 21^{ème} jour.

Test ELISpot à IFN-γ

Un mélange de 50 000 cellules issues de lignées lymphocytaires T et de 5 000 DC immatures autologues a été incubé en présence de chaque protéine individuellement (10 µM) dans des plaques Multiscreen à 96 puits (Merck Millipore, Bedford, Massachusetts) préalablement recouvertes avec 2,5 µg/mL d'un anticorps monoclonal anti-IFN-γ humain (mAb, 1-D1K; Mabtech, Nacka, Suède). Après une incubation sur la nuit, les points ont été révélés en utilisant 0,25 µg/mL d'un mAb secondaire anti-IFN-γ humain (7-B6-1; Mabtech) dans un tampon salin-phosphate / sérum d'albumine bovine à 1%, extravidine-phosphatase (dilution au 1:3000 dans du tampon salin-phosphate / Tween 20 à 0,05% / sérum d'albumine bovine à 1%; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), et du sel bleu nitro tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-toluidine (Sigma-Aldrich). Le nombre de points a été déterminé par un système de lecture AID ELISpot (AID GmbH, Ebinger, Allemagne). Les lignées lymphocytaires T CD4 ont été considérées spécifiques lorsque le nombre de points en présence du peptide est le double de celui en son absence avec une différence minimum de 25 points.

Test de liaison spécifique HLA-DR

Les molécules de l'antigène leucocytaire humain (HLA)-DR ont été obtenues à partir de cellules B lymphoblastoïdes EBV homozygotes. Les molécules HLA-DR ont été immunopurifiées par chromatographie d'affinité en utilisant des mAbs L243 monomorphes (BioLegend GmbH, Fell, Allemagne). La liaison de chaque analogue de la Rln2 aux molécules HLA-DR (HLA-DRB1*01:01, 03:01, 04:01, 07:01 et 11:01) a été évaluée par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en compétition. En présence d'un peptide référence, des dilutions des molécules HLA-DR avec le peptide traceur (peptide référence biotinylé) et des dilutions en série des analogues compétiteurs ont été effectuées. Après 24 à 72 heures d'incubation et une neutralisation par le pH, les échantillons ont été introduits dans des plaques ELISA à 96 puits (Nunc MaxiSorp, Invitrogen) préalablement couvertes avec 10 µg/mL d'anticorps L243. Le traceur a ensuite été détecté par addition de l'enzyme conjuguée streptavidine-alkaline phosphatase (GE Healthcare) et le substrat 4-méthylumbelliféryl phosphate (Sigma-Aldrich).

La fluorescence émise a été mesurée à 450 nm lors d'une excitation à 365 nm. Les concentrations en peptide empêchant la liaison de 50% du traceur (IC_{50}) ont été calculées. Les séquences des peptides référence et leurs valeurs d' IC_{50} pour chaque molécule HLA-DR étaient : HA₃₀₆₋₃₁₈ (PKYVKQNTLKLAT) pour DRB1*0101 (2 nM), DRB1*0401 (42 nM), DRB1*0701 (50 nM) et DRB1*1101 (25 nM); MT₂₋₁₆ (AKTIAYDEEARRGLE) pour DRB1*0301 (59 nM). Les données ont été rapportées comme une affinité relative correspondant au rapport de l' IC_{50} de la protéine testée à celle du peptide référence. Les moyennes ont été calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes.

Résultats et discussion

Induction de lignées de lymphocytes T spécifiques des analogues de la Rln2

La capacité d'induire des lignées spécifiques a été évaluée pour 8 analogues de la Rln2, le nombre de lignées T CD4⁺ spécifiques après une culture à long terme étant utilisé comme valeur de notation. D'après la **Figure 1**, tous les analogues de la Rln2 testés ont induit au moins une lignée spécifique de cellules T. Les analogues N°5, 6 et 8 ont un potentiel immunogénique réduit par rapport à la Rln2 et les autres analogues. Aussi, on observe une grande reproductibilité des résultats pour les mêmes molécules testées d'une session à une autre. La diversité des allèles HLA représentés dans les panels de donneurs permet d'avoir une bonne représentation du polymorphisme HLA (**Tableaux 1, 2 et 3**).

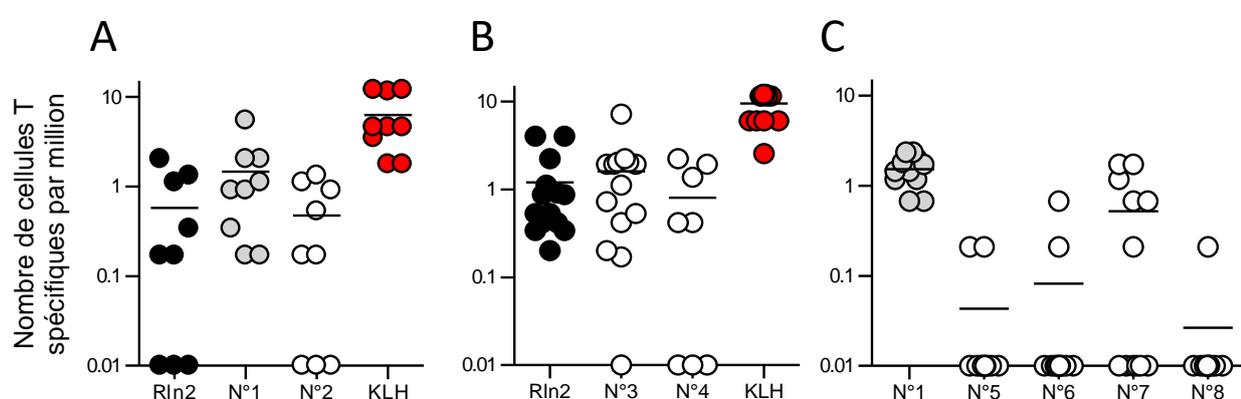


Figure 1

Figure 1 : A, B et C : Induction de lymphocytes T CD4 spécifiques des analogues de la Rln2 issus de donneurs sains de la Session 1, Session 2 et Session 3. Des lignées de lymphocytes T CD4⁺ provenant de donneurs sains ont été induites contre la KLH, la Rln2 et 8 de ses analogues (N°1 à N°8).

Donneur	Typage HLA-DRB1		Nombre de lignées de cellules T CD4 spécifiques			
			Rln2	KLH	N°1	N°2
297	04:01	07:01	2/30	6/10	5/30	0/30
315	04:01	07:01	0/30	3/10	1/30	1/30
325	07:01	07:01	10/30	5/10	1/30	5/30
328	01:01	04:01	6/30	3/10	10/30	1/30
329	03:01	11:01	7/30	10/10	20/30	7/30
350	11:01	13:03	0/30	10/10	2/30	0/30
351	01:02	11:04	1/30	6/10	5/30	0/30
352	04:04	08:01	0/30	9/10	10/30	6/30
354	07:01	08:01	1/30	6/10	6/30	3/30
Nombre moyen de lignées			3/30	7/10	7/30	3/30
Pourcentage de répondeurs			67%	100%	100%	67%
Nombre de L _T CD4 spécifiques / 10 ⁶ L _T CD4			0,57	6,50	1,46	0,47

Tableau 1 : Session 1 d'induction de lymphocytes T CD4 spécifiques des analogues de la Rln2.

Donneur	Typage HLA-DRB1		Nombre de lignées de cellules T CD4 spécifiques			
			Rln2	KLH	N°3	N°4
85	01:01	15:108	3/30	9/10	1/30	NT
321	04:01	13:01	5/30	7/10	1/30	NT
356	01:01	01:02	2/30	4/10	0/30	NT
376	03:01	11:01	3/30	7/10	0/30	NT
378	10:01	13:01	3/30	7/10	7/30	NT
379	04:01	09:01	4/25	9/10	19/25	NT
387	04:04	11:04	4/25	10/10	9/25	6/25
389	04:07	14:54	2/25	10/10	5/25	0/25
390	01:01	13:02	5/25	7/10	8/25	2/25
395	01:01	14:54	2/25	9/10	2/25	0/25
398	11:04	15:01	9/25	10/10	8/25	8/25
399	04:04	07:01	0/25	9/10	0/25	0/25
400	07:01	13:01	0/25	10/10	8/25	9/25
402	03:57	15:01	1/25	10/10	1/25	2/25
Nombre moyen de lignées			3/25	8/10	5/25	3/25
Pourcentage de répondeurs			86%	100%	79%	63%
Nombre de L _T CD4 spécifiques / 10 ⁶ L _T CD4			0,64	9,47	1,60	0,80

Tableau 2 : Session 2 d'induction de lymphocytes T CD4 spécifiques des analogues de la Rln2.

Donneur	Typage HLA-DRB1		Nombre de lignées de cellules T CD4 spécifiques				
			N°1	N°5	N°6	N°7	N°8
401	04:01	10:01	4/24	0/24	0/24	0/24	0/24
426	04:07	11:01	3/24	0/24	0/24	0/24	0/24
435	08:01	11:01	5/24	0/24	0/24	0/24	0/24
454	03:01	13:01	5/24	1/24	0/24	3/24	0/24
461	07:01	11:01	6/24	0/24	0/24	5/24	0/24
471	01:01	13:102	9/24	0/24	1/24	3/24	1/24
472	01:01	13:01	7/24	0/24	0/24	7/24	0/24
474	07:01	07:01	6/24	0/24	0/24	0/24	0/24
488	03:01	15:01	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
491	01:01	15:01	9/24	0/24	0/24	0/24	0/24
492	03:01	11:04	NT	0/24	3/24	7/24	NT
498	04:01	16:23	3/24	1/24	0/24	1/24	0/24
Nombre moyen de lignées			5/24	0/24	0/24	2/24	0/24
Pourcentage de répondeurs			91%	17%	17%	50%	8%
Nombre de L _T CD4 spécifiques / 10 ⁶ L _T CD4			1,34	0,04	0,07	0,51	0,02

Tableau 3 : Session 3 d'induction de lymphocytes T CD4 spécifiques des analogues de la Rln2.

Affinité des analogues de la Rln2 pour les molécules HLA de classe II

Les analogues de la Rln2 ont été soumis à différents tests de liaison spécifique pour 5 molécules HLA-DR (DRB1*01:01, 03:01, 04:01, 07:01 et 11:01). Chacun de ces allèles est exprimé par au moins 5 donneurs parmi les différentes sessions (**Tableaux 1, 2 et 3**). Selon le **Tableau 4**, les analogues de la Rln2 présentent tous une affinité plus faible pour les molécules de présentation que l'analogue N°1 qui a présenté le plus fort potentiel immunogénique. Parmi ceux évalués avec le modèle *in vitro* (N°1, 2, 3, 4 et 6), on observe une diminution générale de l'affinité pour les molécules HLA-DR pouvant jouer un rôle dans l'obtention d'un potentiel immunogénique restreint. Ce rôle ne semble pas lié proportionnellement puisque l'analogue N°3 présente un potentiel immunogénique similaire au N°1 mais une affinité bien plus faible pour quatre molécules HLA. Aussi, on peut noter que les analogues N°10 à 19 présentent une affinité encore plus faible que les analogues précédents, les modifications introduites semblent donc diminuer les caractéristiques immunogéniques des derniers analogues développés.

Peptide	Molécules HLA de classe II					Liaison aux molécules	
	DRB1 01:01	DRB1 03:01	DRB1 04:01	DRB1 07:01	DRB1 11:01	Haute	Bonne
Référence	1	1	1	1	1	5	0
N°1	1,5	1,3	4,8	12	12	5	0
N°2	<u>25</u>	169	476	147	<u>80</u>	0	2
N°3	150	5,1	1 905	800	4,2	2	0
N°4	2 958	12	238	200	17	2	0
N°6	5 000	169	238	1 200	400	0	0
N°10	20 000	169	238	200	400	0	0
N°11	4 500	169	238	2 000	2 400	0	0
N°13	10 000	<u>34</u>	238	2 000	212	0	1
N°14	10 000	169	238	200	400	0	0
N°15	5000	169	238	200	400	0	0
N°16	40 000	169	238	200	400	0	0
N°17	5 000	169	238	200	400	0	0
N°18	25 000	169	238	1 200	400	0	0
N°19	15 000	169	238	1 200	4 000	0	0

Tableau 4 : Affinité relative des analogues de la Rln2. 14 analogues de la Rln2 ont été soumis à un ELISA en compétition spécifique de molécules HLA-DR. Chaque allèle est présent à une fréquence minimale de 5% dans la population caucasienne. Les valeurs résultent d'au moins deux expériences indépendantes. Les affinités relatives ≤ 100 mais > 20 correspondent à de bonnes affinités (Souligné), et celles ≤ 20 correspondent à de hautes affinités (Gras).

En évaluant la taille du répertoire naïf des cellules T des analogues de la Rln2 ainsi que leur capacité à se lier aux molécules de présentation, nous avons pu vérifier que les composés 5, 6, 7 et 8 ont montré un potentiel immunogène réduit par rapport à la Rln2. Ces résultats constituent un critère de sélection supplémentaire pour poursuivre l'évaluation de ces composés dans des tests précliniques.

DISCUSSION GENERALE

L'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques est une problématique qui intéresse d'une part, les laboratoires académiques pour sa complexité et les mécanismes qu'elle peut souligner, d'autre part les laboratoires pharmaceutiques pour le risque qu'elle représente pour la santé des patients. Ainsi, plusieurs laboratoires ont d'ores et déjà développé des moyens de la comprendre, la prédire et l'empêcher. L'immunogénicité concerne un grand nombre de séquences protéiques, par conséquent un grand nombre de domaines pathologiques. L'insuffisance cardiaque constitue un problème majeur de santé publique touchant un million de personnes en France. Le vieillissement de la population, l'allongement de l'espérance de vie, une activité physique décroissante et une alimentation riche dans les pays industrialisés sont autant de facteurs favorables à l'accroissement de l'incidence de cette maladie qui touche principalement les plus de 50 ans. Compte-tenu de l'enjeu que constitue la lutte thérapeutique contre l'insuffisance cardiaque, le développement d'un traitement efficace et non-invasif serait une avancée majeure. C'est dans cette optique que le développement de la Rln2 pour le traitement de l'insuffisance cardiaque a été initié par les équipes de Sanofi R&D. La Rln2 possède de très bonnes activités et spécificités biologiques et aucune toxicité chez observée. L'hormone recombinante possède cependant deux freins majeurs à son développement : une immunogénicité cliniquement prouvée et une demi-vie très courte dans l'organisme. Ces travaux de thèse représentent un support scientifique théorique et appliqué important au développement préclinique de la Rln2 dans le cadre du traitement contre l'insuffisance cardiaque. D'une part, une meilleure compréhension de l'immunogénicité de la Rln2 a été acquise, d'autre part, les effets d'acides aminés modifiés sur l'apprêtement, la reconnaissance par les lymphocytes T et la capacité d'une séquence peptidique à induire des lignées spécifiques ont été étudiés.

Immunogénicité de la Relaxine-2

Rôles des lymphocytes T CD4 dans l'induction d'ADA contre la Relaxine-2

Comme dans la plupart des cas d'immunogénicité de PT, celle de la Rln2 est initiée par des lymphocytes T CD4 naïfs. D'une part, les ADA induits de manière thymo-indépendante contre des PT restent rares, d'autre part, parmi ces essais, un seul patient a présenté des ADA préexistants. Ces derniers étaient non-neutralisants et les auteurs pensent qu'ils s'agissaient d'Ac ayant une réactivité croisée avec la Rln2 ([Kobalava et al. 2015](#)). L'hypothèse de la présence de cellules spécifiques de la Rln2 activées et ayant induit des anticorps avant traitement est donc à écarter. L'absence apparente d'ADA préexistants et une incidence d'ADA allant de faible à forte sur plusieurs pathologies permettent de penser que des cellules spécifiques de la Rln2 circulent naturellement dans l'organisme. L'absence d'ADA préexistants n'est cependant pas fermement définie, puisqu'elle est basée sur les quelques études cliniques ayant effectué des tests de détection d'ADA, l'absence de preuve n'étant pas une preuve d'absence. La mise en lumière et la quantification du répertoire T naïf de la Rln2 durant ces travaux permettent donc de mieux comprendre son immunogénicité et soulignent le mécanisme d'échappement thymique étant à l'origine de l'apparition d'ADA.

Rôle immunologique de la Relaxine-2

Malgré les ADA détectés dans plusieurs essais cliniques de la Rln2, aucune analyse de son potentiel immunogénique n'avait été entreprise afin d'en comprendre les causes ou prévenir les risques. Ces travaux constituent donc une première étude *in vitro* sur la réactivité de LTh humains à la Rln2 recombinante. Des travaux précédents avaient identifié une activité immunomodulatrice de la Rln2, notamment sur les LTh à travers l'activité de son récepteur spécifique RXFP1 (Perumal & Dhanasekaran 2014; Piccinni *et al.* 1999). Dans l'étude *in vitro* de Piccinni, la Relaxine porcine a été introduite à différentes concentrations dans une culture de clones de LT spécifiques d'une toxine bactérienne sur cinq jours en présence de cette dernière afin d'évaluer sa capacité à favoriser une différenciation de LT humains en LTh et la sécrétion d'IFN γ . En présence de la toxine, la quantité d'IFN γ augmente avec celle de la Relaxine alors que celle de l'IL-4 n'évolue pas, la Relaxine porcine semble donc augmenter la sécrétion d'IFN γ humain sans spécificité dans ces conditions. Les concentrations et surtout l'origine de la Relaxine dans ces travaux diffèrent de celles de nos conditions, compte-tenu des différences fonctionnelles de la Rln2 observées d'une espèce à une autre, la Rln2 humaine peut avoir des effets différents sur les LTh. Dans notre étude, la sécrétion d'IFN γ par des lignées de LT spécifiques de la KLH fut la même en présence et en l'absence de Rln2. Bien que l'action de la Rln2 n'ait pas été testée en présence de KLH, la Rln2 ne semble pas stimuler à elle seule la sécrétion d'IFN γ par les cellules T spécifiques de la KLH, attestant l'absence d'activité immunologique dans nos conditions. De plus, le fait que les lignées positives à la Rln2 reconnaissent des peptides chevauchant constitue une seconde preuve de l'absence d'activité de la Rln2 sur les LT dans nos conditions. Ainsi, les lignées spécifiques de la Rln2 ont été générées par sa séquence en acides aminés et non par son activité immunologique.

Risques liés aux ADA anti-Relaxine-2

Les ADA induits contre la Rln2 constituent un risque non négligeable même s'ils ne sont généralement pas neutralisants et diminuent la clairance de la Rln2. Le premier risque relatif aux ADA anti-Rln2 est donc inhérent à leur activité *sustaining*, puisqu'ils augmentent la demi-vie de la Rln2 dans l'organisme. Si cet effet semble bénéfique à première vue, étant donné la très courte durée de vie de la Rln2 dans l'organisme, de tels ADA peuvent se révéler néfastes quant à son efficacité thérapeutique. En effet, une trop grande concentration en Rln2 induit une baisse d'expression du récepteur RXFP1, et par conséquent une diminution de l'activité biologique (Teerlink *et al.* 2009). Ainsi, les sujets développant des ADA peuvent avoir une concentration plasmatique en Rln2 plus grande plus longtemps que les sujets ADA négatifs, créant ainsi une différence de réponse au traitement entre les patients. La différence de demi-vie de la Rln2 peut aussi varier individuellement au sein des patients ADA positifs, rendant nécessaire un suivi et contrôle du niveau de la Rln2. La PK de la Rln2 recombinante doit être connue et maîtrisée afin de garantir une dose thérapeutique stable dans la durée du traitement, dans l'intérêt de la santé du patient et pour éviter un éventuel surcoût du traitement.

Le second risque que représentent ces ADA est la neutralisation de la Rln2 endogène. La plupart des ADA contre la Rln2 sont non-neutralisants, un grand nombre d'études cliniques, dont celle comprenant le plus de patients, n'ont pas effectué de tests de détection d'ADA. Il est

donc probable que des ADA neutralisants soient suffisamment rares pour n'être observés à très faible fréquence dans une cohorte suffisamment large. Le risque de neutralisation de la Rln2 endogène est faible mais reste probable, et il concerne directement la santé du patient car les ADA induits contre la forme recombinante pourraient avoir une réactivité croisée avec la Rln2 endogène. Si aucune autoimmunité contre la Rln2 n'a encore été observée chez l'Homme, les souris dont le gène pour la Relaxine a été éteint constituent un modèle de sclérodermie progressive (Samuel *et al.* 2005). Bien évidemment, la Rln2 possède des activités biologiques propres à chaque espèce, les résultats chez la souris ne sont donc pas directement transférables à l'Homme, mais ils montrent qu'une telle réaction envers la Rln2 peut avoir des conséquences néfastes, sous réserve d'induire des NADA. Chez l'Homme, un niveau anormalement bas de Rln2 est indirectement lié à des complications d'un lupus érythémateux disséminé (Perumal & Dhanasekaran 2014). Une réaction croisée autoimmune envers la Rln2 causée par des NADA est envisageable et pourrait avoir des effets similaires. L'introduction de modifications (mutation, modifications non-naturelles, *etc.*) dans la forme thérapeutique par rapport à la forme native pourrait néanmoins supprimer les épitopes T ou les cacher par exemple. Pour ces raisons, une meilleure compréhension de l'immunogénicité de la Rln2 est nécessaire et a été en partie acquise durant ces travaux.

Comparaison avec l'EPO et l'insuline

Les résultats obtenus durant cette thèse démontrent la présence de LT CD4⁺ spécifiques de la Rln2. Leur implication directe dans l'immunogénicité de cette dernière n'a cependant pas été avérée en évaluant leur fréquence chez des patients ayant développé des ADA spécifiques de la Rln2 par exemple. Durant la thèse, la possibilité d'étudier un tel panel de patients a été évoquée mais n'a pu aboutir, faute de temps et de moyens. Un nombre de 0,61 LT CD4⁺ par million de LT CD4⁺ circulants a été obtenu suite à un modèle *in vitro* humain de prédiction du potentiel immunogénique. Les cellules ainsi identifiées reconnaissent spécifiquement la Rln2, plus précisément les extrémités N-terminales des deux chaînes dans des proportions similaires. Ce résultat est très proche de celui obtenu avec le même modèle prédictif sur l'EPO (Delluc, Ravot, & Maillere 2010). Un nombre de 0,53 LT CD4⁺ par million de LT CD4⁺ circulants spécifique de l'EPO avait été calculé, dans une amplitude de réponse similaire elle aussi, mais la fréquence de donneurs répondeurs était presque deux fois plus petite (44% pour l'EPO contre 78% pour la Rln2). En plus d'un répertoire T naif comparable, les deux protéines ont en commun des conditions de traitements (voie d'administration et dose (Hymes *et al.* 2007)) et une expression par les CEM dans le thymus, mais dans des proportions encore non décrites (Pinto *et al.* 2013). Cependant, l'EPO et la Rln2 ont des immunogénicités très distinctes. L'EPO a induit des NADA chez moins de 1% des patients alors que la Rln2 induit des ADA non-neutralisants chez 40 à 90% selon les études (Kharagjitsingh *et al.* 2005). On peut expliquer ces différences par de nombreux facteurs distinctifs : expression physiologique (EPO à 90% dans les reins, Rln2 ubiquitaire), concentration plasmatique (EPO : 0,1 nM (Jelkmann 2011), Rln2 : 5 nM), poids moléculaire (EPO : 30 kDa, Rln2 : 6 kDa), glycosylations (l'EPO a trois chaînes glycosylées qui représentent 40% de sa masse moléculaire, la Rln2 n'en porte aucune), activité immunomodulatrice, *etc.* Ces paramètres peuvent influencer l'immunogénicité dans des proportions très variables, il serait donc réducteur de comparer ces deux protéines en se basant

uniquement sur leur répertoire T naïf dans le but de prédire leur immunogénicité, bien que ce potentiel représente un risque d'immunogénicité. La comparaison est toutefois intéressante car elle souligne la complexité des mécanismes et facteurs impliqués dans l'apparition d'ADA.

L'insuline partage 29% d'homologie de séquence avec la Rln2 en plus de la structure générale bicaténaire, une comparaison de potentiel immunogénique avec la Rln2 est aussi intéressante. Elle est aussi exprimée par les CEM thymiques, et des LTh et LTreg spécifiques circulent naturellement dans l'organisme puisqu'une déficience des seconds rend possible l'activation des premiers et le développement d'un diabète de type 1 avec des IgG anti-insuline (Fineberg *et al.* 2007). Cependant, l'insuline testée *in vitro* en parallèle de l'EPO n'a généré aucune lignée spécifique alors qu'une étude bien plus ancienne a démontré l'activation de LT par l'insuline chez des patients atteints de diabète de type 1 et des donneurs sains (Naquet *et al.* 1988). Dans cette étude, la réponse par les LTh a été détectée et obtenue avec des conditions de culture bien différentes (durée de culture raccourcie, LB et macrophages comme CPA, LTh et LTc cultivés communément, insuline à 44-88 μ M, milieu contenant du sérum et détection de la prolifération au lieu de la sécrétion d'IFN γ). La différence de concentration en insuline suggère que les LT détectés ont une avidité faible puisqu'une plus grande concentration est nécessaire à leur activation et pourrait expliquer la détection de cellules spécifiques dans un modèle *in vitro* et pas dans l'autre, d'autant plus que la durée du premier semble favoriser une réponse mémoire alors que celle du second favorise plutôt une réponse naïve. La difficulté à générer des lignées spécifiques de l'insuline dans notre modèle peut être aussi due à l'activité régulatrice de Treg ou un nombre trop restreint de précurseurs naïfs pour être détecté par ce test. Malgré une structure générale commune, la Rln2 et l'insuline ont un potentiel immunogénique et une immunogénicité très distinctes.

Avantages et limites du modèle de prédiction utilisé

Le nombre de cellules T spécifiques de la Rln2 étant théoriquement assez restreint, il nous a fallu procéder à une étape d'amplification. En effet, les lignées cellulaires générées contre la Rln2 contiennent des cellules non spécifiques potentiellement auto-activées. Afin de pouvoir dissocier le bruit de fond induit par les cellules auto-activées du signal issu des cellules spécifiques, plusieurs stimulations antigéniques ont été nécessaires. Cette étape peut aussi faire disparaître des cellules spécifiques, notamment à cause des conditions *in vitro* et de la longue durée de la culture. Le risque de perte de signal reste néanmoins supérieur au risque de voir apparaître un signal faussement positif, le nombre de lignées spécifiques est donc sous-estimé dans le pire des cas. Mais ce test reste néanmoins très robuste puisque l'étude de la Rln2 a été développée en deux phases d'expériences, une première comprenant 9 donneurs, une seconde en comprenant 14 et ayant permis l'identification des épitopes T. A l'issue de ces deux phases, un nombre de cellule spécifique par million identique au dixième près a été obtenu pour la Rln2, le pourcentage de donneurs répondeurs était semblable lui aussi.

L'évaluation du potentiel immunogénique de la Rln2 en parallèle d'analogues (résultats non publiés, disponibles à la suite des articles) a aussi permis de démontrer l'utilité de ce modèle. Des résultats différents ont été obtenus pour les analogues : un potentiel immunogénique augmenté et dans la gamme de réponse d'un vaccin, un potentiel semblable à

celui de la Rln2 et un potentiel à la limite du seuil de détection. Selon le type et la position des modifications de chaque analogue, un potentiel immunogène a ainsi été observé, permettant aux équipes de Sanofi R&D de valider ou non certaines modifications introduites dans les analogues. Ce modèle est donc extrêmement efficace pour comparer un nombre restreint de molécules analogues sur un modèle humain.

Les résultats obtenus pour la Rln2, l'EPO et l'insuline montrent que malgré la robustesse du modèle *in vitro* utilisé et sa supériorité par rapport aux autres modèles de prédiction, il ne permet pas de prédire à lui seul l'immunogénicité d'une PT. En effet, il évalue un potentiel d'immunogénicité en reproduisant en conditions *in vitro* les signaux de costimulation pouvant avoir lieu suite à la présentation d'une PT par une CPA à un LT. Aussi, les contextes immunologique et physiologique diffèrent grandement d'une pathologie à une autre, l'étude du répertoire T naïf chez des sujets sains constitue donc une approche intéressante mais ne peut prendre en compte l'aspect patient inhérent à application d'une PT. Une étude récente a identifié chez des sujets naïfs les épitopes T de deux mAbs ayant induit des ADA, deux tiers des épitopes identifiés ont été reconnus par des cellules issues de patients ayant développé des ADA contre ces mAbs (Hamze *et al.* 2017). Ces résultats montrent qu'il est souvent nécessaire de passer par l'étude du répertoire naïf de cellules T pour mieux comprendre l'immunogénicité, mais aussi à quel point la prédiction de l'immunogénicité représente un défi scientifique et technique. Les facteurs à prendre en compte pour arriver à prédire l'immunogénicité sont, d'une part, très nombreux et difficilement quantifiables et d'autre part, une standardisation des moyens d'analyse de l'immunogénicité (caractérisation des ADA, *etc.*) est nécessaire pour obtenir des résultats comparables d'une PT à une autre. En effet, les mesures d'ADA peuvent différer énormément d'une étude à une autre (fréquence des tests, sensibilité, classe et catégorie d'ADA recherchées, *etc.*) et ne permettent pas encore d'établir une valeur d'immunogénicité pouvant servir de base de comparaison entre plusieurs molécules. Ainsi, il est impossible d'établir une valeur d'immunogénicité clinique toutes PT confondues, ni même de valeur prédictive générale, quel que soit le modèle de prédiction utilisé. Les données sur l'immunogénicité des PT restent donc comparables au sein d'une pathologie seulement.

Dé-immunisation de la Relaxine-2

Suite à la caractérisation du répertoire de cellules T naïves de la Rln2, l'identification de ses épitopes T a été effectuée. Les résultats de cette étape rend possible la dé-immunisation de la Rln2 en modifiant les épitopes sans toucher aux résidus impliqués dans sa liaison au récepteur. En effet, le motif de liaison à son récepteur se situe entre le 13^{ème} et le 20^{ème} résidu de la chaîne β , et l'épitope porté par la chaîne β se situe entre le 4^{ème} et le 15^{ème} résidu, soit juste avant. Ainsi, il semble possible de modifier les résidus susceptibles d'être des résidus d'ancrage aux molécules HLA de classe II sans altérer la liaison au récepteur. Modifier la partie N-terminale de la chaîne α pourrait aussi s'avérer efficace puisque cette région a généré la moitié des lignées spécifiques. Une telle performance a par exemple été effectuée sur l'EPO. La diminution de l'affinité des épitopes T pour les molécules HLA de classe II a permis une baisse de l'immunogénicité (Tangri *et al.* 2005).

En conclusion, cette étude a permis d'évaluer précisément le répertoire de cellules T

naïves de la Rln2 chez l'Homme et d'identifier les motifs immunogènes. Ces informations permettent d'expliquer la diminution du potentiel immunogène des dérivés 5, 6, 7 et 8.

Rôle des modifications chimiques sur l'immunogénicité

Choix de la méthodologie

Le deuxième axe de cette thèse porte sur l'effet de modifications non-naturelles sur les mécanismes de l'immunogénicité de peptides thérapeutiques. Ces derniers sont souvent modifiés afin d'augmenter leur résistance aux protéases ou leur activité biologique. Six modifications utilisées couramment par Sanofi ont été retenues afin d'étudier leurs effets sur l'immunogénicité : acides aminés D (aaD), N-méthylation (Nm), C_α-méthylation (Cm), peptoides (Pep), réduction de la liaison peptidique (Rd) et acides aminés iso butyriques (Aib). La plupart d'entre elles augmentent la stabilité structurale ou métabolique et protègent le peptide des protéases. Afin d'étudier l'effet de ces modifications sur la reconnaissance par le système immunitaire, nous avons introduit une unique modification dans le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ (HA), issu d'une glycoprotéine du virus de la grippe (hémagglutinine A). Trois raisons ont valu le choix de cette séquence : immunité naturelle chez l'Homme, très bonne affinité avec plusieurs molécules HLA-DR et haute immunogénicité. Sur chacune des expériences que nous avons menées, le HA présente un signal fort dont la diminution est plus facilement observable que l'augmentation. Aussi, le choix d'une séquence fortement immunogène découle directement de l'objectif d'identifier des modifications non-naturelles capables de diminuer les propriétés immunogéniques. Un objectif inverse nous aurait dirigé à étudier une séquence faiblement immunogène.

Effets différents d'une modification à une autre

Ces travaux constituent une première dans l'étude systémique de l'introduction d'aaNN sur les mécanismes de reconnaissance et d'activation de cellules T dans une séquence peptidique chez l'Homme. En effet, quelques-unes des modifications étudiées l'ont été dans des publications anciennes, mais le plus souvent sur un modèle non humain ou partiellement. De même, le HA a servi plusieurs fois de modèle pour l'étude des interactions entre le peptide et les molécules HLA-DR et les TCR. En 1994, l'équipe de Hill étudie la liaison du HA et de peptides dérivés de sa séquence aux molécules HLA-DR1-4 (Hill *et al.* 1994). Ils dévoilent la grande importance de la P1-Y₃₀₈ pour la liaison du HA aux deux molécules ainsi que le peu d'impact sur l'affinité qu'induit le remplacement des autres résidus par une alanine. Aussi, ils montrent qu'un unique aaD diminue fortement la liaison aux deux molécules. Nos résultats ont confirmé ces observations et les ont étendus à d'autres molécules HLA-DR. En 2006, des analogues du HA contenant une alanine au niveau des résidus exposés au TCR (positions 2, 3, 5 et 8 du core) sont évalués pour leur capacité à lier la molécule HLA-DR1 et à activer des cellules T spécifiques du peptide natif (Li, Li & Li 2006). L'alanine permet alors d'inhiber l'activation des cellules T sans modifier l'affinité pour la molécule HLA. Nos résultats valident et complètent ces observations puisque seuls les aaD et les Rd rompent la liaison avec la molécule aux positions 2-3-5-8 et 2-8 du core, respectivement, tandis que les autres modifications ne diminuent que très peu l'affinité pour HLA-DR1 mais diminuent la

reconnaissance par les TCR à ces mêmes positions. On peut expliquer ces résultats d'un point de vue stérique. Pour les aaD, le transfert de la chaîne latérale de l'autre côté du carbone α , même aux positions exposées au TCR (positions 2-3-5-8 du core), a un effet très fort sur la liaison aux molécules HLA-DR1 sauf au niveau de la P6. Pour les Rd, il semblerait que le remplacement de l'oxygène par deux atomes d'hydrogène modifie la conformation de la chaîne principale et par conséquent la disposition des résidus d'ancrage précédents (P1 et P7) dans le sillon de liaison. En effet, ces deux poches jouent un rôle important dans la liaison des épitopes à la molécule HLA-DR1.

Plus généralement, on observe des différences d'effets d'une modification à une autre sur une même position à cause de nombreux facteurs : encombrement stérique, groupements chimiques, propriétés chimiques, conformation de la chaîne principale, orientation de la chaîne latérale, *etc.* Une analyse cristallographique de la structure du complexe analogue-molécule HLA apporterait des informations complémentaires et importantes sur le positionnement précis du peptide et des changements causés par chaque modification. Cependant, ce genre d'analyse nécessite des moyens importants, et le nombre d'analogues et de molécules HLA de classe II à tester deviendrait vite limitant.

Positions non-permissives et permissives

Au sein de la séquence du HA, la P1-Y₃₀₈ et la P4-Q₃₁₁ ont systématiquement induit un effet sur la reconnaissance par les TCR et/ou l'affinité pour les molécules HLA de classe II, on peut donc les qualifier de positions non-permissives. En 1995, une équipe étudie la substitution de certains résidus du HA sur plusieurs paramètres antigéniques. Le modèle consistait en la mise en culture de clones de lymphocytes T humains spécifiques du HA avec des fibroblastes murins exprimant la molécule HLA-DR1. La sécrétion de cytokines, notamment d'IFN γ , est mesurée d'un analogue à un autre ([Lamb et al. 1995](#)). Pour les analogues ayant une substitution de la P1-Y₃₀₈, l'isoleucine augmente légèrement la sécrétion d'IFN γ tandis que la valine et la sérine ne montrent pas de différence. Ces résultats montrent qu'une substitution de la tyrosine est possible sans complètement altérer la reconnaissance par le TCR, tandis que les aaNN ont fait perdre la reconnaissance, sans exception. Les travaux de Hill ont aussi soulevé ce point en remplaçant la tyrosine par d'autres acides aminés au sein d'un peptide dérivé du HA (phénylalanine et tryptophane), ces remplacements n'affectant pas la liaison aux molécules HLA-DR1 et DR4 ([Hill et al. 1994](#)). Cependant, une valine au niveau de la P1 affecte uniquement la liaison à la molécule HLA-DR4. Très récemment, une étude a validé l'ordre d'importance des poches d'ancrage pour la liaison du HA à la molécule HLA-DR1 en déterminant la densité d'électrons au niveau des liaisons hydrogène : P1 >> P9 > P4 > P6 > P7 ([Aray, Aguilera-García & Izquierdo 2018](#)). Malgré les différences de protocole existant entre ces études et la nôtre, on peut estimer que les aaNN ont un effet inhibiteur au niveau de la P1-Y₃₀₈ plus important que les acides aminés naturels.

Evidemment, les positions pour lesquelles des effets ont rarement été observés sont les régions flanquantes autour du core du peptide. Aussi, les positions associées aux poches P6, P7 et P9 constituent les positions pour lesquelles le moins d'effet a été observé au sein du core, toutes modifications confondues. En effet, du fait de leur ancrage dans le sillon de liaison, les résidus exposés au TCR semblaient plus enclins à avoir un effet réduit.

Utilité pour la prédiction de l'immunogénicité

Pour l'étude du potentiel d'induction de lignées de lymphocytes T, seuls les analogues contenant des aaD et des Aib restreints au core ont été choisis pour leurs effets sur l'antigénicité, l'affinité pour les molécules HLA-DR et leur corrélation entre les deux paramètres. Compte-tenu des moyens nécessaires à la mise en œuvre d'une telle étude (nombre de cellules disponibles, de donneurs, durée de culture, *etc.*), les autres analogues n'ont donc pas pu être évalués. Lors de cette dernière expérience, les aaD ont eu un effet négatif plus intense que les Aib sur la génération de lignées mais sur un nombre moins de positions. Aussi, une bonne corrélation entre l'affinité pour les molécules de présentation et la capacité d'induire des lignées spécifiques a été obtenue pour les deux modifications. Cette corrélation a permis d'évaluer un seuil minimal de perte d'affinité nécessaire à la perte de capacité d'induction. Cette capacité peut avoir un effet direct sur l'immunogénicité du peptide puisqu'une séquence dont la capacité d'induction *in vitro* est trop faible induira généralement peu d'anticorps *in vivo*. Ainsi, une affinité relative pour les molécules HLA de classe II supérieure à 1000 aurait systématiquement une faible capacité à générer des lignées de lymphocytes T par rapport à une séquence hautement immunogène. Pour une séquence modérément ou faiblement immunogène, une perte d'affinité plus faible semblerait logiquement nécessaire pour diminuer systématiquement cette même capacité.

Ces résultats fournissent de nombreuses données utiles pour les modèles de prédiction de l'immunogénicité, notamment grâce aux tests de liaison aux molécules HLA de classe II. En effet, il n'y avait à ce jour aucune donnée concernant l'impact de tels aaNN sur l'affinité pour les molécules de présentation, et les valeurs d'affinité relative peuvent être directement introduites dans des matrices de prédiction. Aussi, ces résultats nous permettent de proposer une stratégie pour diminuer l'immunogénicité d'un peptide : localiser les épitopes du peptide par une prédiction *in silico* ou de manière plus précise par des tests d'induction et d'amplification *in vitro*, identifier précisément les résidus d'ancrage associés aux poches en fonction des chaînes latérales, puis introduire un aaD à la place du résidu associé à la P1. Des tests d'affinité pour des molécules HLA peuvent s'avérer plus rapides et simples que les tests de prédiction *in vitro*, et une perte d'affinité d'au moins trois logarithmes pourrait être suffisante pour diminuer l'immunogénicité. Par la suite, des tests d'évaluation de l'activité biologique permettront rapidement de déterminer si la modification a un effet néfaste ou non. Enfin, comparativement à une substitution par un autre acide aminé naturel, l'aaD augmente la stabilité métabolique de la séquence et donc son efficacité thérapeutique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce projet, nous avons voulu mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'immunogénicité clinique de la Rln2 ainsi que l'influence d'acides aminés non-naturels sur les propriétés immunogéniques. Nous avons pu montrer qu'un nombre important de cellules T naïves spécifiques de la Rln2 circulaient chez la plupart des individus sains et que les aaD représentent un véritable atout pour minimiser l'immunogénicité d'un peptide tout en garantissant une demi-vie prolongée. L'immunogénicité et la stabilité métabolique peuvent donc être respectivement diminuée et augmentée simultanément par l'introduction d'un aaD au niveau des épitopes T. Il serait fort instructif d'introduire un aaD dans un autre peptide immunogène puis d'en étudier la capacité d'induction de lignées de cellules T afin de garantir l'effet généralisé de ce type de modification non-naturelle. Aussi, une étude de la reconnaissance par des lymphocytes B et anticorps spécifiques de la séquence native pourrait compléter les données sur la baisse d'immunogénicité. Enfin, l'évaluation de la capacité d'induction de lignées T appliquée aux autres modifications non-naturelles constituerait un enjeu intéressant.

LISTE DES ABBREVIATIONS

- AAA : queue poly-adénosine, succession de nombreux ribonucléotides de type adénosine à l'extrémité 3' des ARNm.
- aaD : acide aminé D, en configuration dextrogyre.
- aaL : acide aminé L, en configuration lévogyre.
- aaNN : acide aminé non-naturel.
- ADRB2 : récepteur $\beta 2$ adrénergique (*$\beta 2$ ADrenergic Receptor*).
- Ac : anticorps, molécule biologique impliquée dans l'immunité adaptative.
- ACTH : hormone adrénocorticotrope (*AdrenoCorticoTropic Hormone*).
- ADA : anticorps anti-drogue, dirigés contre une molécule thérapeutique (*Anti-Drug Antibodies*).
- ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*).
- ADN : acide désoxyribonucléique, support de l'information génétique.
- Ag : antigène, molécule pouvant être reconnue par des cellules ou molécules du système immunitaire adaptatif d'un organisme.
- Ag-HLA : complexe antigène-molécule de présentation.
- AHF : insuffisance cardiaque aigüe, maladie cardiovasculaire (*Acute Heart Failure*).
- aib : acide aminé isobutyrique.
- AIRE : facteur de transcription exprimé dans le noyau des CEM (*AutoImmune REgulator*).
- AHR : récepteur d'hydrocarbures d'aryle (*Aryl Hydrocarbon Receptor*).
- AMM : autorisation de mise sur le marché.
- AMPC : adénosine monophosphate cyclique, second messenger cellulaire (*Cyclic Adenosine MonoPhosphate*).
- AMPs : peptides antimicrobiens (*AntiMicrobial Peptides*).
- APR : régions des anticorps favorisant l'agrégation (*Aggregation Prone Regions*).
- AQP : aquaporines, classe de protéines membranaires qui forment des « pores » perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques.
- AR : arthrite rhumatoïde, maladie inflammatoire chronique qui affecte les articulations.
- Arg : arginine, acide aminé essentiel.
- ARN : acide ribonucléique, essentiel dans le transport du message génétique et la synthèse des protéines.
- ARNm : acide ribonucléique messenger, copie transitoire d'une portion de l'ADN correspondant à un ou plusieurs gènes.
- ATI : antigène thymo-indépendant.
- ATP : adénosine triphosphate, nucléotide formé à partir d'un nucléoside à un triphosphate.
- BAFF-R : récepteur au facteur activant des cellules B (*B-cell Activating Factor-Receptor*).
- BALB/c : souche de souris immunodéficientes (*Bagg ALBinos*).
- Bcl-6 : protéine associée au lymphome des cellules B de type 6 (*B-cell Lymphoma 6 protein*).
- BCR : récepteur des cellules B (*B-Cell Receptor*).
- BiP : protéine chaperon située dans la lumière du RE (*immunoglobulin Binding Protein*).
- C5 : facteur 5 du complément.
- CADA : ADA augmentant la clairance de la protéine cible (*Clearing Anti-Drug Antibodies*).
- CCL19 : chimiokine ligand 19 de type C-C attirant les LB et DC, se lie au CCR7.
- CCL21 : chimiokine ligand 21 de type C-C attirant les lymphocytes, se lie au CCR7.
- CCL25 : chimiokine ligand 19 de type C-C attirant les thymocytes, macrophages et DC, se lie au CCR9.
- CCP : compartiment de chargement du peptide aux molécules de présentation..
- CD1 : molécule apparentée au CMH de classe I.

CD3 : complexe protéique membranaire constitué de 4 chaînes différentes associé au TCR (T3).
 CD4 : corécepteur pour les molécules du CMH de classe II (T4).
 CD8 : corécepteur pour les molécules du CMH de classe I (T8).
 CD10 : métalloprotéase à zinc (endopeptidase neutre).
 CD11a : sous-unité α L de l'intégrine LFA-1, lie le CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) et CD50 (ICAM-3).
 CD18 : sous-unité β d'intégrine, s'associe à CD11a, b, c et d.
 CD19 : protéine exprimée à la surface des LB, maillon majeur du corécepteur du BCR.
 CD20 : glycoprotéine exprimée à la surface des LB.
 CD21 : récepteur pour le composant du complément C3d, le virus Epstein-Barr (CR2).
 CD23 : récepteur de faible affinité pour les IgE (Fc ϵ RII).
 CD27 : lie le CD70, peut fonctionner comme un costimulateur des LT et LB.
 CD28 : récepteur du signal de costimulation (signal 2) des LT naïfs (Tp44).
 CD32 : récepteur de faible affinité pour les Ig agrégées et complexes immuns (Fc γ RII).
 CD34 : ligand pour le CD62L (sélectine-L).
 CD38 : NAD glycohydrolase, augmente la prolifération des LB (T10).
 CD40 : récepteur pour le signal de costimulation des LB, lie CD154 (CD40L).
 CD43 : protéine de structure étendue pouvant être antiadhésive (Leucosialine).
 CD45 : tyrosine-phosphatase, augmente la signalisation via le TCR ou BCR (LCA).
 CD45RA : isoforme de CD45 contenant l'exon A.
 CD45RO : isoforme de CD45 contenant aucun des exons A, B ou C.
 CD52 : fonction inconnue, cible des anticorps utilisés pour éliminer les LT dans la moelle osseuse (CAMPATH-1).
 CD54 : molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1), fixe le complexe CD11/CD18 (LFA-1).
 CD56 : (NKH-1) isoforme de la molécule d'adhérence aux neurones (NCAM).
 CD58 : antigène 3 associé à la fonction leucocytaire (LFA-3), lie le CD2 (LFA-2).
 CD62L : molécule d'adhérence leucocytaire (LAM-1, Sélectine-L), lie CD34 et induit le roulement de l'endothélium.
 CD64 : (Fc γ RI) récepteur de haute affinité pour les IgG, induit la phagocytose, la capture de l'antigène et ADCC.
 CD79 α - β : composant hétérodimérique du BCR analogue à CD3, nécessaire à l'expression de surface et transduction de signal.
 CD80/86 : complexe costimulateur (B7.1/B7.2), ligand du CD28 et CD152.
 CD89 : récepteur aux IgA (Fc α R).
 CD123 : chaîne α du récepteur de l'IL-3 (IL-3R α).
 CD138 : protéoglycan héparan sulfate, lie le collagène de type I.
 CD152 : récepteur pour CD80/86, régulateur négatif pour l'activation des LT (CTLA-4).
 CD154 : ligand de CD40 (CD40L), inducteur de l'activation et prolifération des LB.
 CD191 : récepteur à chimiokine 1 de type C-C (CCR1).
 CD192 : récepteur à chimiokine 2 de type C-C (CCR2).
 CD193 : récepteur à chimiokine 3 de type C-C (CCR3).
 CD194 : récepteur à chimiokine 4 de type C-C (CCR4).
 CD195 : récepteur à chimiokine 5 de type C-C (CCR5).
 CD196 : récepteur à chimiokine 6 de type C-C (CCR6).
 CD197 : récepteur à chimiokine 7 de type C-C, médiateur probable des effets du virus Epstein-Barr sur les LB (CCR7).
 CD199 : récepteur à chimiokine 9 de type C-C (CCR9).
 CD205 : antigène lymphocytaire 75 (LY75), récepteur potentiel de capture des antigènes sur les DC.
 CD206 : récepteur du mannose sur les macrophages (MMR).

CD207 : protéine transmembranaire de type II, lectine de type C spécifique des cellules de Langerhans (Langerine).

CD209 : lectine de type C (DC-SIGN), se fixe à CD50 (ICAM-3).

CD284 : récepteur aux LPS de type Toll-like (TLR4).

CDR : régions hypervariables des anticorps responsables de la liaison spécifique à un antigène (*Complementary Determinant Region*).

CEA : Commissariat de l'énergie atomique (ou énergie alternatives).

CEC : cellules endothéliales corticales situées dans le thymus.

CEM : cellules endothéliales médullaires situées dans le thymus.

CFSE : carboxyfluorescéine succinimidyl ester, marqueur cellulaire fluorescent.

CG : centre germinatif, lieu de prolifération clonale des LB.

CHF : insuffisance cardiaque chronique, maladie cardiovasculaire (*Chronic Heart Failure*).

C_H : domaine constant de la chaîne lourde des anticorps (*Constant region of Heavy chain*).

CHO : lignées cellulaires issues d'ovaires de hamster chinois, modèle mammifère couramment utilisées pour produire des protéines thérapeutiques (*Chinese Hamster Ovary*).

C_L : domaine constant de la chaîne légère des anticorps (*Constant region of Light chain*).

CLIP : peptide issu de la chaîne invariante (Ii) associé au sillon de liaison du CMH de classe II, il y reste jusqu'à ce que le CMH soit complètement assemblé (*Class II-associated Invariant chain Peptide*).

CLP : progéniteur lymphocyte commun (*Common Lymphoid Progenitor*).

c-MAF : protéine proto-oncogène de fibrosarcome musculo-aponévrotique.

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

CMP : progéniteur myéloïde commun (Common Myeloid Progenitor).

COOH : groupe carboxyle.

COCH₃ : groupe acétyle.

COS : composé organique de synthèse.

CPA : cellule présentatrice d'antigène, cellules dendritiques, lymphocytes B et macrophages.

CpG : dinucléotide cytosine-phosphate-guanine.

CPP(s) : peptides pénétrant les cellules (*Cell-Penetrating Peptides*).

CRS : syndrome de libération cytokinique (*Cytokine Release Syndrome*).

CSH : cellules souches hématopoïétiques.

CXCL1 : chimiokine ligand 1 de type C-X-C, exprimée par les macrophages, neutrophiles et cellules épithéliales, attire les neutrophiles et se lie au CXCR2.

CXCL12 : chimiokine ligand 12 de type C-X-C, se lie au CXCR4 et CXCR7.

CXCL13 : chimiokine ligand 13 de type C-X-C, attire les LB et se lie au CXCR5.

CXCR4 : (CD184) récepteur du CXCL12.

CXCR5 : (CD185) récepteur du CXCL13.

DAMP : motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (*Damage-Associated Molecular Patterns*).

DC : cellules dendritiques (i, immatures, m, matures) (*Dendritic Cells*).

Dex : dexaméthasone, hormone glucocorticoïde de synthèse.

DM-DO : gènes et molécules responsables de l'apprêtement de l'antigène.

DN : thymocytes double négatifs CD4⁻/CD8⁻.

DR-DP-DQ : gènes et premières molécules du CMH de classe II.

DP : thymocytes double positifs CD4⁺/CD8⁺.

DS : dérèglements sanguins.

ECLA : test d'électrochimiluminescence (*ElectroChemiLuminescence-Assay*).

EdU : 5-éthynyl-2'-désoxyuridine, analogue marqueur de la thymidine.

ELISA : test de détection immuno-enzymatique (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

ELISpot : test de détection immunologique par taches colorées (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*).

EMA : agence européenne du médicament (*European Medicines Agency*).

EGFR : récepteur au facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor Receptor*).

EPO : érythropoïétine, facteur de croissance des hématies.

ET : endothéline, neuropeptide sécrété par l'endothélium vasculaire (*EndoThelin*).

ET-BR : récepteur à endothéline de type B (*EndoThelin Receptor Type B*).

EU : Etats-Unis d'Amérique.

Fab : fragment de liaison à l'antigène des anticorps (*antibody binding Fragment*).

Fas-L : ligand transmembranaire menant à l'apoptose (CD95L).

Fc : fragment cristallisable des anticorps (*crystallizing Fragment*).

FDA : administration américaine des aliments et des médicaments (*Food and Drug Administration*).

FGF : facteur de croissance des fibroblastes (*Fibroblast Growth Factor*).

FluoroSpot : test de détection immunologique par taches fluorescentes.

Fox : facteur de transcription, caractérisé par un domaine de liaison à l'ADN "Forkhead" (*Forkheax box*).

FR : sous-division de la région variable d'un anticorps (*Framework Regions*).

FSH : hormone folliculostimulante (*Follicle-Stimulating Hormone*).

FYN : tyrosine-kinase.

GATA : protéine de liaison aux séquences GATA.

G-CSF : facteur stimulant de colonies granulocytes (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*).

GF/H : hormones et facteurs de croissance thérapeutiques (*Growth Factor/Hormones*).

GM-CSF : facteur stimulant de colonies granulocytes et macrophages (*Granulocyte Macrophages-Colony Stimulating Factor*).

GMPC : guanosine monophosphate cyclique, nucléotide cyclique dérivé de la guanosine triphosphate (*Cyclic Guanosine Monophosphate*).

GnRH : hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (*Gonadotropin-Releasing Hormone*).

GPCR : récepteur membranaires couplés aux protéines G (*G Protein-Coupled Receptor*).

GTP : guanine triphosphate, coenzyme de transfert de groupements phosphate (*Guanosine-5'-TriPhosphate*).

GR : récepteur aux glucocorticoïdes (*Glucocorticoid Receptor*).

GRAM : technique de coloration basée sur les propriétés de la paroi bactérienne.

HC : chaîne lourde des anticorps (*Heavy Chain*).

HEV : veinules à haut endothélium (*High Endothelial Venules*).

HER2 : récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains (CD340) (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*).

HLA : antigène leucocytaire humain, ou CMH humain (*Human Leucocyte Antigen*).

HMSA : test de déplacement de mobilité homogène (*Homogeneous Mobility Shift Assay*).

iE-DAP : acide g-D-glutamyl-mésodiaminopimélique, acide aminé non-protéinogène.

Ig : immunoglobuline, ou anticorps.

IGFBP1 : protéine 1 liant le facteur de croissance pseudo-insulinique (*Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 1*).

IL-2 : interleukine induisant la prolifération des LT.

IL2RG : gène codant pour la chaîne commune γ du récepteur à l'IL-2.

IL-3 : interleukine activant l'action synergique dans l'hématopoïèse précoce.

IL-4 : interleukine activant les LB, la commutation IgE et la différenciation en des cellules T en Th2.

IL-5 : interleukine induisant la croissance et différenciation des éosinophiles.

IL-6 : interleukine induisant la croissance et différenciation des LB et LT.

IL-7 : interleukine induisant la croissance des cellules pré-B et pré-T.

IL-9 : interleukine augmentant l'activité des mastocytes, stimule les cellules Th2.

IL-10 : interleukine suppresseur puissant des fonctions macrophagiques.

IL-12 : interleukine activant les cellules et la différenciation des cellules T CD4 en Th1.

IL-13 : interleukine induisant la croissance et prolifération des LB, inhibe la production de cytokines inflammatoires par les macrophages et les cellules Th1.

IL-15 : interleukine stimulant la croissance de l'épithélium intestinal, des LT et NK et augmente la survie des LTc mémoires.

IL-17 : interleukine pro-inflammatoire, induit la production de cytokines par les épithéliums, endothéliums et fibroblastes.

IL-21 : interleukine induisant la prolifération des LB, LT et NK.

IL-22 : interleukine stimulant la production d'agents proinflammatoires.

IL-23 : interleukine induisant la prolifération des cellules T mémoires et augmente la sécrétion d'IFN γ .

IL-25 : interleukine favorisant la production de cytokines Th2.

IL-27 : interleukine induisant le facteur T-bet et l'expression de l'IL12R sur les cellules T.

IL-35 : interleukine suppresseur sécrétée par les LT régulateurs.

INSL : peptides pseudo-Insuline (*INSuline-Like peptides*).

IRF4 : facteur 4 régulateur de l'interféron (*Interferon-Regulator Factor 4*).

ITAM : motif d'activation d'immuno-récepteur à tyrosine (*Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif*).

IV : intraveineuse, voie d'administration par injection dans une veine.

JAR : lignées cellulaires de choriocarcinome placentaire humain.

kb : kilobase, unité de mesure représentant 1 000 paires de bases d'ADN bicaténaire ou d'ARN.

kDa : kilodalton, unité de masse des atomes représentant 1 000 unités Dalton (kilo Dalton).

KIR : glycoprotéines transmembranaires exprimées en surface des cellules NK et une minorité de LT, interagissent avec le CMH de classe I (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*).

LAT : protéines adaptatrices transmembranaires ligand pour l'activation des LT (*Linker for the Activation of T-cells*).

LB : lymphocytes B, cellules immunitaires de la réponse humorale.

LC : chaîne légère des anticorps (*Light Chain*).

Lck : tyrosine-kinases spécifiques des lymphocytes (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*).

LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*).

LCA : antigène commun des leucocytes (CD45) (*Leukocyte Common Antigen*).

LDL : lipoprotéine de basse densité (*Low-Density Lipoprotein*).

LDL-A : lipoprotéine de basse densité de classe A (*Low-Density Lipoprotein class A*).

LFA-1 : molécule d'adhésion cellulaire des lymphocytes (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*).

LGR : récepteur couplé aux protéines G contenant séquence répétitive riche en leucine (*Leucine-rich repeat containing G-protein coupled Receptor*).

LMP : gènes codant pour les protéases larges multifonctionnelles.

LPS : lipopolysaccharides, composants essentiels de la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

LRR : domaine de séquences répétitives riches en leucine (*Leucine-Rich Repeat*).

LT : lymphocytes T, cellules immunitaires dont la maturation se fait dans le thymus.

LT- α : lymphotoxine α , ancien nom du TNF β .

LTc : lymphocytes T cytotoxiques, cellules immunitaires de la réponse cellulaire (*T-cell Cytotoxic*).

LTh : lymphocytes T auxiliaires, cellules immunitaires initiateuses de réponse immunitaire (*T-cell Helper*).

KO : invalidation génique, inactivation totale d'un gène (*Knock-Out*).

mAb(s) : anticorps monoclonal (*monoclonal Antibody*).

MAMP : motifs moléculaires associés aux microbes (*Microbe-Associated Molecular Patterns*).

MAPK : protéine kinase mitogène activée, nécessaire à la mitose (*Mitogen-Activated Protein Kinases*).

MAPPS : analyse des peptides associés aux molécules HLA (*MHC-Associated Peptides Proteomics*).

MCP-1 : peptide-1 chimioattractant des monocytes (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*).

MDA : aldéhyde malonique, composé chimique marqueur du stress oxydant (*MalonDiAldehyde*).

MIA : maladies inflammatoires et autoimmunes.

MINCLE : Lectine de macrophage de type C (*Macrophage INducible C-type LEctin*).

MMP : métalloprotéinase de la matrice (*Matrix MetalloProteinase*).

MNM : maladies neurologiques et mentales.

MPA : acétate de médroxyprogestérone, forme synthétique de la progestérone (*MedroxyProgesterone Acetate*).

MPT : modifications post-traductionnelles de protéines et peptides synthétisée par des cellules.

MUC2 : épitope tumoral issue de la protéine mucine.

NADA : ADA neutralisant la protéine cible (*Neutralizing Anti-Drug Antibodies*).

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate-oxidase*).

Nb : nanobodies, anticorps à domaine unique.

NCAM : (CD56) glycoprotéine d'adhésion cellulaire exprimée en surface des neurones et cellules NK (*Neural Cell Adhesion Molecule*).

ND : non déterminé.

NFκB : facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire (*Nuclear Factor-kappa B*).

NH₂ : groupe amine primaire.

NK : cellules tueuses naturelles, lymphocytes de l'immunité innée.

NLR : récepteur de type NOD (*NOD-Like Receptor*).

NO : oxyde nitrique (*Nitric Oxide*).

NOD : souris non-obèse diabétique, souche utilisée comme modèle d'étude du diabète de type 1 (*Non-Obese Diabetic*).

NOD1-2 : protéines récepteurs 1-2 ayant une fonction de reconnaissance de motifs moléculaires (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1-2*).

NOS : oxyde nitrique synthase, enzyme de synthèse du NO (*Nitric Oxide Synthase*).

NS5 : protéine non structurale 5, impliquée dans la reproduction de l'ARN du virus de l'hépatite C (*Non Structural protein 5*).

PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*).

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

PD : pharmacodynamique, étude détaillée de l'interaction entre la substance active et sa cible.

PD-1 : récepteur de mort cellulaire programmée 1 (CD279), cible cellulaire antitumorale (*Programmed cell Death-1*).

PdF : protéine de fusion, protéine associée au Fc d'un anticorps.

PEG : polyéthylène glycol, polymère linéaire de composé de plusieurs monomères d'éthylène glycol.

Pep : peptide.

pH : potentiel hydrogène, mesure de l'activité chimique des protons en solution.

p-HLA : complexe peptide-molécule de présentation.

PI3K : enzyme phosphoinositide 3-kinase, joue un rôle dans la transduction de signal intervenant dans le métabolisme, l'angiogenèse et la cancérogenèse.

PIA : méthode d'analyse de liaison à l'antigène par changement de pH (*pH-shift anti-Idiotype Antigen-binding*).

PK : pharmacocinétique, étude du devenir d'une substance active contenue dans un médicament après son administration dans l'organisme (*PharmacoKinetics*).

PKC- θ : enzyme sérine/thréonine kinase exprimée par les cellules hématopoïétiques, dont à haut niveau chez les plaquettes et LT, joue un rôle de transduction de signal (*Protein Kinase C-theta*).

PLC- γ 1 : enzyme phosphoinositide phospholipase C, joue le rôle de transduction de signal.

PPT : protéines, peptides et toxines thérapeutiques.

PRF1 : gène codant pour les enzymes perforines.

PRKDC : gène codant pour l'enzyme de réparation de l'ADN lors de la formation des BCR et TCR.

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptors*).

pT : peptides thérapeutiques.

PT : protéines thérapeutiques.

pT_{reg} : lymphocytes T régulateurs inductibles en périphérie.

PSGL-1 : (CD162) ligand de haute affinité pour la glycoprotéine Sélectine-P, exprimé en surface des cellules myéloïdes et LT activés (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*).

PU.1 : protéine de liaison aux purines de type 1.

RA : acide rétinoïque (*Retinoic Acid*).

RAG : recombinaisons catalysant les recombinaisons génétiques lors de la formation des BCR et TCR (*Recombination Activating Gene*).

RE : réticulum endoplasmique, organite où sont synthétisées les protéines chez les eucaryotes.

Red : liaison peptidique réduite.

rF : facteur recombinant humain.

RI : retro-inverso, séquence dont l'ordre en acides aminés et les liaisons peptidiques sont inversées.

RICK : forme retro-inverso du peptide CADY-K (*retro-inverso CADY-K peptide*).

RIA : dosage radio-immunologique, test immunologique utilisant l'analyse radiochimique *in vitro* de composés radioactifs associés à des antigènes (*Radio-ImmunoAssay*).

RIG-I : gène I inductible à l'acide rétinoïque (*Retinoic acid-Inducible Gene I*).

Rln : peptide Relaxine.

RLN : gène codant pour un peptide Relaxine.

RLR : récepteur pseudo-RIG-I (*RIG-Like Receptor*).

ROR : récepteur orphelin associé au récepteur à l'acide rétinoïque.

ROS : espèces réactives à l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*).

RSS : séquences de signal de recombinaison (*Recombination Signal Sequences*).

RU : Royaume-Uni.

RXFP : récepteur aux peptides de la famille Relaxine (*Relaxin/insulin-like Family Peptide receptor*).

SADA : ADA diminuant la clairance de la protéine cible (*Sustaining Anti-Drug Antibodies*).

SALPR : récepteur aux peptides pseudo-somatostatine et angiotensine (*Somatostatin And Angiotensin-Like Peptide Receptor*).

SAP130 : enzyme sous-unité du complexe histone déacétylase.

SAR : relations structure-activité (*Structure-Activity Relationship*).

SC : sous-cutanée, voie d'administration par injection sous la peau.

SEP : sclérose en plaques, maladie neurodégénérative autoimmune.

SHP2 : enzyme tyrosine-phosphatase 2.

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise, symptôme d'une contamination par le VIH.

SLE : lupus systémique érythémateux, maladie systémique autoimmune pouvant affecter de nombreux organes (*Systemic Lupus Erythematosus*).

SMAC : complexes d'activation supramoléculaires (*Supramolecular Activating Complex*).

SNP : polymorphisme mononucléotidique (*Single-Nucleotide Polymorphism*).

SP : thymocytes simple positifs CD4⁻/CD8⁺ ou CD4⁺/CD8⁻.

SPR : résonance de surface plasmonique (*Surface Plasmon Resonance*).

S-S : pont disulfure.

SS : sclérose systémique, forme de sclérodermie.

STAT : protéine transmetteur de signal et activateur de transcription (*Signal Transducers and Activators of Transcription*).

TAP : protéines transporteurs associées au traitement de l'antigène (*Transporter associated with Antigen Processing*).

TBARs : substance Réactive à l'acide thiobarbiturique (*ThioBarbituric Acid-Reactive substance*).

T-bet : facteur T-box exprimé dans les cellules T.

TCR : récepteur des cellules T (*T-Cell Receptor*).

TdT : ADN polymérase exprimée dans les cellules immatures pré-B et pré-T (*Terminal deoxyribonucleotidyl Transferase*).

T_{FH} : lymphocytes T auxiliaires folliculaires (*T-cell Follicular Helper*).

TGF : facteur de croissance transformant, cytokine (*Transforming Growth Factor*).

TLR : récepteurs pseudo-Toll (*Toll Like Receptors*).

TLR4 : récepteur membranaire de macrophages et certains adipocytes.

TNF : facteur de nécrose tumorale, cytokine (*Tumour Necrosis Factor*).

TPO : thrombopoïétine, facteur de croissance des plaquettes.

Tr1 : lymphocytes T régulateurs de type 1.

TREC : courtes séquences d'ADN excisée en cercle durant l'arrangement des gènes du TCR (*T-cell Receptor Excision Circles*).

Treg : lymphocytes T régulateurs (i, inductibles, n, naturels, p, périphériques).

UV : rayons ultra-violets, rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible, mais plus longue que celle des rayons X.

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*).

V_H : domaine variable de la chaîne lourde des anticorps (*Variable region of Heavy chain*).

VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine, rétrovirus responsable du SIDA.

V_L : domaine variable de la chaîne légère des anticorps (*Variable region of Light chain*).

VP1 : protéine virale 1.

ZAP70 : protéine kinase de 70kDa associée aux chaînes ζ (Zeta-chain-Associated Protein kinase 70).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abitua, Philip Barron et al. 2015. "The Pre-Vertebrate Origins of Neurogenic Placodes." *Nature* 524(7566):462–65.
- Acosta-Rodriguez, Eva V. et al. 2007. "Surface Phenotype and Antigenic Specificity of Human Interleukin 17-Producing T Helper Memory Cells." *Nature Immunology* 8(6):639–46.
- Adham, I. M., E. Burkhardt, M. Benahmed, and W. Engel. 1993. "Cloning of a CDNA for a Novel Insulin-like Peptide of the Testicular Leydig Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 268(35):26668–72. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253799>).
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, and A. E. Mirsky. 1964. "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51:786–94. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14172992>).
- Anon. 2012. "Anti-Cancer Drug Fights Immune Reaction in Some Infants with Pompe Disease." *Duke University*. Retrieved December 7, 2017 (<https://medicalxpress.com/news/2012-10-anti-cancer-drug-immune-reaction-infants.html>).
- Anon. 1976. "New Nomenclature for the HLA System." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 116(2):573–74. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1249424>).
- Apostol, I. et al. 1997. "Incorporation of Norvaline at Leucine Positions in Recombinant Human Hemoglobin Expressed in Escherichia Coli." *The Journal of Biological Chemistry* 272(46):28980–88. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360970>).
- Aray, Yosslen, Ricardo Aguilera-García, and Daniel R. Izquierdo. 2018. "Exploring the Nature of the H-Bonds between the Human Class II MHC Protein, HLA-DR1 (DRB*0101) and the Influenza Virus Hemagglutinin Peptide, HA306-318, Using the Quantum Theory of Atoms in Molecules." *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 1–17. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29246090>).
- Ardavin, Carlos, Li Wu, Chung-Leung Li, and Ken Shortman. 1993. "Thymic Dendritic Cells and T Cells Develop Simultaneously in the Thymus from a Common Precursor Population." *Nature* 362(6422):761–63. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/362761a0>).
- Arnold, James N., Mark R. Wormald, Robert B. Sim, Pauline M. Rudd, and Raymond A. Dwek. 2007. "The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins." *Annual Review of Immunology* 25(1):21–50. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>).
- Ashton-Rickardt, Philip G. et al. 1994. "Evidence for a Differential Avidity Model of T Cell Selection in the Thymus." *Cell* 76(4):651–63.
- Attaf, Meriem, Eric Huseby, and Andrew K. Sewell. 2015. "Ab T Cell Receptors as Predictors of Health and Disease." *Cellular and Molecular Immunology* 12(4):391–99.
- Atzeni, Fabiola et al. 2005. "Autoimmunity and Anti-TNF-Alpha Agents." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1051:559–69. Retrieved

- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16126996>).
- Atzeni, Fabiola et al. 2013. "Different Effects of Biological Drugs in Rheumatoid Arthritis." *Autoimmunity Reviews* 12(5):575–79. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219774>).
- Bachmaier, Kurt, Sophie Toya, and Asrar B. Malik. 2014. "Therapeutic Administration of the Chemokine CXCL1/KC Abrogates Autoimmune Inflammatory Heart Disease." *PloS One* 9(2):e89647. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586934>).
- de Baey, A. and A. Lanzavecchia. 2000. "The Role of Aquaporins in Dendritic Cell Macropinocytosis." *The Journal of Experimental Medicine* 191(4):743–51. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1084/jem.191.4.743>).
- Bakema, Jantine E. and Marjolein van Egmond. 2011. "Immunoglobulin A: A next Generation of Therapeutic Antibodies?" *MAbs* 3(4):352–61. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21691145>).
- Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. "Dendritic Cells and the Control of Immunity." *Nature* 392(March):245–52.
- Bannas, Peter, Julia Hambach, and Friedrich Koch-Nolte. 2017. "Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics." *Frontiers in Immunology* 8(November):1603. Retrieved (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01603/full>).
- Banting, F. G., C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, and A. A. Fletcher. 1922. "Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus." *Canadian Medical Association Journal* 12(3):141–46. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20314060>).
- Baratin, Myriam et al. 2002. "Amino Acid Modifications in the Wild Type Sequence P53 232-240 Overcome the Poor Immunogenicity of This Self Tumour Epitope." *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 8(7):327–34. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148782>).
- Bartnes, K., K. Hannestad, G. Guichard, and J. P. Briand. 1997. "A Retro-Inverso Analog Mimics the Cognate Peptide Epitope of a CD4+ T Cell Clone." *European Journal of Immunology* 27(6):1387–91. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9209489>).
- Bastian, Max, José Manuel Lozano, Manuel Elkin Patarroyo, Gerd Pluschke, and Claudia A. Daubenberger. 2004. "Characterization of a Reduced Peptide Bond Analogue of a Promiscuous CD4 T Cell Epitope Derived from the Plasmodium Falciparum Malaria Vaccine Candidate Merozoite Surface Protein 1." *Molecular Immunology* 41(8):775–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234557>).
- Bathgate, R. A. D. et al. 2013. "Relaxin Family Peptides and Their Receptors." *Physiological Reviews* 93(1):405–80. Retrieved (<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00001.2012>).
- Bathgate, RA. 2006. "International Union of Pharmacology LVII: Recommendations for the Nomenclature of Receptors for Relaxin Family Peptides." *Pharmacological Reviews* 58(1):7–31.
- Bathgate, RAD, AJW Hsueh, and OD Sherwood. 1994. *Knobil and Neill's Physiology of*

Reproduction. Third Edit.

- Bathgate, Ross A. D. et al. 2002. "Human Relaxin Gene 3 (H3) and the Equivalent Mouse Relaxin (M3) Gene. Novel Members of the Relaxin Peptide Family." *The Journal of Biological Chemistry* 277(2):1148–57. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689565>).
- Batteux, F. 2012. *Polycopié National d'Immunologie*. Toulouse.
- Bell, R. J. et al. 1993. "A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Safety of Vaginal Recombinant Human Relaxin for Cervical Ripening." *Obstetrics and Gynecology* 82(3):328–33. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8355929>).
- van den Bemt, Bart J. F. et al. 2011. "Anti-Infliximab Antibodies Are Already Detectable in Most Patients with Rheumatoid Arthritis Halfway through an Infusion Cycle: An Open-Label Pharmacokinetic Cohort Study." *BMC Musculoskeletal Disorders* 12:12. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232150>).
- Ben-Yedidia, Tamar, Anne-Sophie Beignon, Charalambos D. Partidos, Sylviane Muller, and Ruth Arnon. 2002. "A Retro-Inverso Peptide Analogue of Influenza Virus Hemagglutinin B-Cell Epitope 91-108 Induces a Strong Mucosal and Systemic Immune Response and Confers Protection in Mice after Intranasal Immunization." *Molecular Immunology* 39(5–6):323–31. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220890>).
- Benkirane, N. et al. 1993. "Antigenicity and Immunogenicity of Modified Synthetic Peptides Containing D-Amino Acid Residues. Antibodies to a D-Enantiomer Do Recognize the Parent L-Hexapeptide and Reciprocally." *The Journal of Biological Chemistry* 268(35):26279–85. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253750>).
- Benkirane, N., G. Guichard, J. P. Briand, and S. Muller. 1996. "Exploration of Requirements for Peptidomimetic Immune Recognition. Antigenic and Immunogenic Properties of Reduced Peptide Bond Pseudopeptide Analogues of a Histone Hexapeptide." *The Journal of Biological Chemistry* 271(52):33218–24. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8969178>).
- Benkirane, N., G. Guichard, M. H. Van Regenmortel, J. P. Briand, and S. Muller. 1995. "Cross-Reactivity of Antibodies to Retro-Inverso Peptidomimetics with the Parent Protein Histone H3 and Chromatin Core Particle. Specificity and Kinetic Rate-Constant Measurements." *The Journal of Biological Chemistry* 270(20):11921–26. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744843>).
- Bhawani, Showkat Ahmad, Ahmad Husaini, Fasihuddin Badruddin Ahmad, and Mohd Razip Asaruddin. 2017. "Polymer Based Protein Therapeutics." *Current Protein & Peptide Science*. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28828988>).
- Bhowmik, Arijit, Malini Basu, and Mrinal K. Ghosh. 2017. "Design, Synthesis and Use of Peptoids in the Diagnosis and Treatment of Cancer." *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 9:101–8. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27814593>).
- Biron, Eric et al. 2008. "Improving Oral Bioavailability of Peptides by Multiple N-Methylation: Somatostatin Analogues." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 47(14):2595–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297660>).
- Blackburn, C. Clare and Nancy R. Manley. 2004. "Developing a New Paradigm for Thymus

- Organogenesis.” *Nature Reviews Immunology* 4(4):278–89. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1331>).
- Bochner, B. S. and L. M. Lichtenstein. 1991. “Anaphylaxis.” *The New England Journal of Medicine* 324(25):1785–90. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1789822>).
- Bond, Courtney P. et al. 2004. “Increased Expression of the Relaxin Receptor (LGR7) in Human Endometrium during the Secretory Phase of the Menstrual Cycle.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(7):3477–85.
- Bongers, J. et al. 1992. “Enzymatic Semisynthesis of a Superpotent Analog of Human Growth Hormone-Releasing Factor.” *Journal of Medicinal Chemistry* 35(21):3934–41. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1433202>).
- Bossus, M. et al. 1997. “Improved Detection of Human Antibodies to a Plasmodium Antigen Using a Peptide Modified with Aib Residues.” *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 3(1):47–53. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230470>).
- Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bousso. 2000. “Impact of Negative Selection on the T Cell Repertoire Reactive to a Self-Peptide: A Large Fraction of T Cell Clones Escapes Clonal Deletion.” *Immunity* 13(6):829–40. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163198>).
- Bozhinov, Angelina et al. 2012. “Advanced Glycation End Products Contribute to the Immunogenicity of IFN- β Pharmaceuticals.” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129(3):855–858.e6. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22154379>).
- Brack, Christine, Minoru Hiram, Rita Lenhard-schuller, and Susumu Tonegawa. 1978. “A Complete Immunoglobulin Gene Is Created by Somatic Recombination.” (September):1–14.
- Brehm, Michael A. et al. 2010. “Parameters for Establishing Humanized Mouse Models to Study Human Immunity: Analysis of Human Hematopoietic Stem Cell Engraftment in Three Immunodeficient Strains of Mice Bearing the IL2rgamma(Null) Mutation.” *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 135(1):84–98. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096637>).
- Brennan, J. E. et al. 1997. “Recombinant Human Relaxin as a Cervical Ripening Agent.” *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 104(7):775–80. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236640>).
- Briand, J. P. et al. 1997. “A Retro-Inverso Peptide Corresponding to the GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus Elicits High Levels of Long-Lasting Protective Neutralizing Antibodies.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(23):12545–50. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356486>).
- Briand, J. P., G. Guichard, H. Dumortier, and S. Muller. 1995. “Retro-Inverso Peptidomimetics as New Immunological Probes. Validation and Application to the Detection of Antibodies in Rheumatic Diseases.” *The Journal of Biological Chemistry* 270(35):20686–91. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657648>).
- Brinks, Vera et al. 2013. “Preclinical Models Used for Immunogenicity Prediction of

- Therapeutic Proteins.” *Pharmaceutical Research* 30(7):1719–28. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23649852>).
- Brinks, Vera, Wim Jiskoot, and Huub Schellekens. 2011. “Immunogenicity of Therapeutic Proteins: The Use of Animal Models.” *Pharmaceutical Research* 28(10):2379–85. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744171>).
- Den Broeder, A. A., M. C. W. Creemers, A. M. van Gestel, and P. L. C. M. van Riel. 2002. “Dose Titration Using the Disease Activity Score (DAS28) in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Anti-TNF-Alpha.” *Rheumatology (Oxford, England)* 41(6):638–42. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12048289>).
- Brown, J. H. et al. 1993. “Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1.” *Nature* 364(6432):33–39.
- van Brummelen, Emilie M. J., Willeke Ros, Gertjan Wolbink, Jos H. Beijnen, and Jan H. M. Schellens. 2016. “Antidrug Antibody Formation in Oncology: Clinical Relevance and Challenges.” *The Oncologist* 21(10):1260–68. Retrieved (<http://theoncologist.alphamedpress.org/lookup/doi/10.1634/theoncologist.2016-0061>).
- Brunet, Jean-François et al. 1987. “A New Member of the Immunoglobulin Superfamily—CTLA-4.” *Nature* 328(6127):267–70. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/328267a0>).
- Bubeck Wardenburg, Juliane et al. 1996. “Phosphorylation of SLP-76 by Kinase Is Required for T-Cell Receptor Function.” *The Journal of Biological Chemistry* (23):19641–44.
- Bullesbach, E. E. and C. Schwabe. 1995. “A Novel Leydig Cell cDNA-Derived Protein Is a Relaxin-like Factor.” *Journal of Biological Chemistry* 270(27):16011–15.
- Büllesbach, E. E. and C. Schwabe. 1994. “Functional Importance of the A Chain Loop in Relaxin and Insulin.” *The Journal of Biological Chemistry* 269(18):13124–28. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175738>).
- Büllesbach, E. E. and C. Schwabe. 2002. “The Primary Structure and the Disulfide Links of the Bovine Relaxin-like Factor (RLF).” *Biochemistry* 41(1):274–81.
- Büllesbach, Erika E. and Christian Schwabe. 2000. “The Relaxin Receptor-Binding Site Geometry Suggests a Novel Gripping Mode of Interaction.” *Journal of Biological Chemistry* 275(45):35276–80.
- Büllesbach, Erika E. and Christian Schwabe. 2005. “The Trap-like Relaxin-Binding Site of the Leucine-Rich G-Protein-Coupled Receptor 7.” *Journal of Biological Chemistry* 280(14):14051–56.
- Burkhart, B. M. et al. 1999. “Gramicidin D Conformation, Dynamics and Membrane Ion Transport.” *Biopolymers* 51(2):129–44. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397797>).
- Burnicka-Turek, Ozanna et al. 2009. “Inactivation of Insulin-like Factor 6 Disrupts the Progression of Spermatogenesis at Late Meiotic Prophase.” *Endocrinology* 150(9):4348–57.
- Burska, Agata N. et al. 2014. “Autoantibodies to Posttranslational Modifications in Rheumatoid

- Arthritis.” *Mediators of Inflammation* 2014:492873. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782594>).
- Buse, John B. et al. 2011. “Liraglutide Treatment Is Associated with a Low Frequency and Magnitude of Antibody Formation with No Apparent Impact on Glycemic Response or Increased Frequency of Adverse Events: Results from the Liraglutide Effect and Action in Diabetes (LEAD) Trials.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(6):1695–1702. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21450987>).
- Calbo, S. et al. 2000. “Antitumor Vaccination Using a Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I-Restricted Pseudopeptide with Reduced Peptide Bond.” *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 23(1):125–30. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10687145>).
- Carriero, Maria Vincenza et al. 2017. “Retro-Inverso Urokinase Receptor Antagonists for the Treatment of Metastatic Sarcomas.” *Scientific Reports* 7(1):1312. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28465589>).
- Carroll, Michael C., R. Duncan Campbell, David R. Bentley, and Rodney R. Porter. 1984. “A Molecular Map of the Human Major Histocompatibility Complex Class III Region Linking Complement Genes C4, C2 and Factor B.” *Nature* 307(5948):237–41.
- Carsetti, R., G. Köhler, and M. C. Lamers. 1995. “Transitional B Cells Are the Target of Negative Selection in the B Cell Compartment.” *Journal of Experimental Medicine* 181(6):2129–40. Retrieved (<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0029003671&doi=10.1084%2Fjem.181.6.2129&partnerID=40&md5=4a31e8209fb498447bd2c7f5a3c6adaf%5Cnhttp://jem.rupress.org/content/181/6/2129>).
- Casadevall, Nicole et al. 2002. “Pure Red-Cell Aplasia and Antierythropoietin Antibodies in Patients Treated with Recombinant Erythropoietin.” *The New England Journal of Medicine* 346(7):469–75. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844847>).
- Castelli, Florence A. et al. 2007. “Differential Capacity of T Cell Priming in Naive Donors of Promiscuous CD4+ T Cell Epitopes of HCV NS3 and Core Proteins.” *European Journal of Immunology* 37(6):1513–23. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492804>).
- Casten, G. G. and R. J. Boucek. 1958. “Use of Relaxin in the Treatment of Scleroderma.” *Journal of the American Medical Association* 166(4):319–24. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13491339>).
- Casten, G. G., H. R. Gilmore, F. E. Houghton, and S. S. Samuels. 1960. “A New Approach To the Management of Obliterative Peripheral Arterial Disease.” *Angiology* 11(5):408–14. Retrieved (<http://ang.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/000331976001100506>).
- Cayabyab, M., J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1994. “CD40 Preferentially Costimulates Activation of CD4+ T Lymphocytes.” *J.Immunol.* 152(0022–1767 (Print)):1523–31.
- Cederqvist, L. L., L. C. Ewool, and S. D. Litwin. 1977. “IgD and the Fetal Immune Response.” *Scandinavian Journal of Immunology* 6(8):821–25.
- Cernaro, Valeria et al. 2014. “Relaxin: New Pathophysiological Aspects and Pharmacological Perspectives for an Old Protein.” *Medicinal Research Reviews* 34(1):77–105. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401142>).

- Chang, Chia-Jung et al. 2017. "A Genome-Wide Association Study Identifies a Novel Susceptibility Locus for the Immunogenicity of Polyethylene Glycol." *Nature Communications* 8(1):522. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28900105>).
- Chassin, D., A. Laurent, J. L. Janneau, R. Berger, and D. Bellet. 1995. "Cloning of a New Member of the Insulin Gene Superfamily (INSL4) Expressed in Human Placenta." *Genomics* 29(2):465–70. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666396>).
- Chatenoud, L. et al. 1986. "Restriction of the Human in Vivo Immune Response against the Mouse Monoclonal Antibody OKT3." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 137(3):830–38. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3487589>).
- Chatenoud, L. et al. 1988. "T Lymphocyte Activation Induced in Vivo by the First Injection of OKT3 Monoclonal Antibodies." *Comptes Rendus de l Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de La Vie* 307(19):833–36. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3146414>).
- Chen, J. W., J. Frystyk, T. Lauritzen, and J. S. Christiansen. 2005. "Impact of Insulin Antibodies on Insulin Aspart Pharmacokinetics and Pharmacodynamics after 12-Week Treatment with Multiple Daily Injections of Biphasic Insulin Aspart 30 in Patients with Type 1 Diabetes." *European Journal of Endocrinology* 153(6):907–13. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322398>).
- Chen, Lei et al. 2017. "Relaxin Abrogates Renal Interstitial Fibrosis by Regulating Macrophage Polarization via Inhibition of Toll-like Receptor 4 Signaling." *Oncotarget* 8(13):21044–53.
- Chen, Xiaoying et al. 2013. "A Mathematical Model of the Effect of Immunogenicity on Therapeutic Protein Pharmacokinetics." *The AAPS Journal* 15(4):1141–54. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990500>).
- Chevaleyre, Claire et al. 2015. "The Tumor Antigen Cyclin B1 Hosts Multiple CD4 T Cell Epitopes Differently Recognized by Pre-Existing Naive and Memory Cells in Both Healthy and Cancer Donors." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195(4):1891–1901. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136431>).
- Chin, Joshua et al. 2013. "Direct One-Step Labeling of Cysteine Residues on Peptides with [11C]Methyl Triflate for the Synthesis of PET Radiopharmaceuticals." *Amino Acids* 45(5):1097–1108.
- Chung, Christine H. et al. 2008. "Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose-Alpha-1,3-Galactose." *The New England Journal of Medicine* 358(11):1109–17. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337601>).
- Conklin, D. et al. 1999. "Identification of INSL5, a New Member of the Insulin Superfamily." *Genomics* 60(1):50–56. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458910>).
- Cosimi, Benedict. 1987. "OKT3: First-Dose Safety and Success." *Nephron* 46(1):12–18. Retrieved (<http://www.karger.com/doi/10.1159/000184430>).
- Cottier, H., N. Odartcheko, G. Keiser, M. Hess, and R. D. Stoner. 1964. "Incorporation of Tritiated Nucleosides and Amino Acids into Lymphoid and Plasmacytoid Cells during Secondary Response to Tetanus Toxoid in Mice." *Annals of the New York Academy of Sciences* 113:612–26. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14120516>).

- Cotton, J., M. Hervé, S. Pouvelle, B. Maillère, and A. Ménez. 1998. "Pseudopeptide Ligands for MHC II-Restricted T Cells." *International Immunology* 10(2):159–66. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9533443>).
- Cresswell, P. 1994. "Assembly, Transport, and Function of MHC Class II Molecules." *Annual Review of Immunology* 12:259–93. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011283>).
- Cudic, Mare, Hildegund C. J. Ertl, and Laszlo Otvos. 2002. "Synthesis, Conformation and T-Helper Cell Stimulation of an O-Linked Glycopeptide Epitope Containing Extended Carbohydrate Side-Chains." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10(12):3859–70. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413838>).
- Dahlke, Marion et al. 2016. "Pharmacokinetics of Serelaxin in Patients with Severe Renal Impairment or End-Stage Renal Disease Requiring Hemodialysis: A Single-Dose, Open-Label, Parallel-Group Study." *Journal of Clinical Pharmacology* 56(4):474–83.
- Danner, D. and P. Leder. 1985. "Role of an RNA Cleavage/Poly(A) Addition Site in the Production of Membrane-Bound and Secreted IgM mRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(24):8658–62. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/reprint/82/24/8658%5Cnpapers3://publication/uuid/DBA25972-E972-460A-AA67-50B259EFAAC6>).
- Dardalhon, V., A. Awasthi, Kwon H, Galileos G, and W. Gao. 2008. "IL-4 Inhibits TGF- β -Induced Foxp3+ T Cells and, Together with TGF- β , Generates IL-9+IL-10+Foxp3– Effector T Cells." *Nat Immunol* 9(12):1347–55.
- Dausset, Jean and H. Brecy. 1957. "Identical Nature of the Leucocyte Antigens Detectable in Monozygotic Twins by Means of Immune Iso-Leuco-Agglutinins." *Nature* 180(4599):1430. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13493557>).
- Davis, Mark M. and Pamela J. Bjorkman. 1988. "T-Cell Antigen Receptor Genes and T-Cell Recognition." *Nature* 334(6181):395–402. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/334395a0>).
- Degos, L. and Jean Dausset. 1974. "Human Migrations and Linkage Disequilibrium OfHL-A System." P. 195 in *Immunogenetics*, edited by Springer-Verlag New York Inc. New York. Retrieved (<https://doi.org/10.1007/BF01564062>).
- Delluc, Stephanie, Gilles Ravot, and Bernard Maillere. 2011. "Quantitative Analysis of the CD4 T-Cell Repertoire Specific to Therapeutic Antibodies in Healthy Donors." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(6):2040–48. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368101>).
- Delluc, Stéphanie, Gilles Ravot, and Bernard Maillere. 2010. "Quantification of the Preexisting CD4 T-Cell Repertoire Specific for Human Erythropoietin Reveals Its Immunogenicity Potential." *Blood* 116(22):4542–45. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702780>).
- Derbinski, Jens, Antje Schulte, Bruno Kyewski, and Ludger Klein. 2001. "Promiscuous Gene Expression in Medullary Thymic Epithelial Cells Mirrors the Peripheral Self." *Journal of Immunology* 196(7):2915–22.
- Descotes, Jacques and Geneviève Choquet-Kastylevsky. 2001. "Gell and Coombs's

- Classification: Is It Still Valid?" *Toxicology* 158(1–2):43–49.
- Desiderio, Stephen V. et al. 1984. "Insertion of N Regions into Heavy-Chain Genes Is Correlated with Expression of Terminal Deoxytransferase in B Cells." *Nature* 311(5988):752–55.
- DGPSA Canada. 2016. *Ligne Directrice, Évaluation Au Stade Préclinique de La Sécurité Des Produits Pharmaceutiques Issus de La Biotechnologie ICH Thème S6(R1)*. Retrieved (<http://www.hc-sc.gc.ca/index-fra.php>).
- Dhar, Amlanjyoti et al. 2014. "Simultaneous Inhibition of Key Growth Pathways in Melanoma Cells and Tumor Regression by a Designed Bidentate Constrained Helical Peptide." *Biopolymers - Peptide Science Section* 102(4):344–58.
- Díez, Javier and Luis M. Ruilope. 2016. "Serelaxin for the Treatment of Acute Heart Failure: A Review with a Focus on End-Organ Protection." *European Heart Journal. Cardiovascular Pharmacotherapy* 2(2):119–30. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27418970><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27418970%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4853824%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27418970%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4853824%5Cnhttp://ehjcvp.oxf>).
- Dintzis, H. M., D. E. Symer, R. Z. Dintzis, L. E. Zawadzke, and J. M. Berg. 1993. "A Comparison of the Immunogenicity of a Pair of Enantiomeric Proteins." *Proteins* 16(3):306–8. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346194>).
- Donn, Steven M. 2005. "Lucinactant: A Novel Synthetic Surfactant for the Treatment of Respiratory Distress Syndrome." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 14(3):329–34. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833063>).
- Dröge, W. 1979. "Hypothesis on the Origin of the Strong Alloreactivity." *Immunobiology* 156(1–2):2–12. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/94305>).
- Dschietzig, T. et al. 2001. "The Pregnancy Hormone Relaxin Is a Player in Human Heart Failure." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(12):2187–95. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641245>).
- Dschietzig, Thomas, Sam Teichman, et al. 2009. "Intravenous Recombinant Human Relaxin in Compensated Heart Failure: A Safety, Tolerability, and Pharmacodynamic Trial." *Journal of Cardiac Failure* 15(3):182–90. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327619>).
- Dschietzig, Thomas, Cornelia Bartsch, Silja Wessler, Gert Baumann, and Karl Stangl. 2009. "Autoregulation of Human Relaxin-2 Gene Expression Critically Involves Relaxin and Glucocorticoid Receptor Binding to Glucocorticoid Response Half-Sites in the Relaxin-2 Promoter." *Regulatory Peptides* 155(1–3):163–73. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2009.03.001>).
- Duhen, Thomas, Rebekka Geiger, David Jarrossay, Antonio Lanzavecchia, and Federica Sallusto. 2009. "Production of Interleukin 22 but Not Interleukin 17 by a Subset of Human Skin-Homing Memory T Cells." *Nature Immunology* 10(8):857–63. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1767>).

- Dupont, B. 1989. "Nomenclature for Factors of the HLA System, 1987. Decisions of the Nomenclature Committee on Leukocyte Antigens, Which Met in New York on November 21-23, 1987." *Human Immunology* 26(1):3-14. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2506155>).
- Dustin, Michael L. et al. 1998. "A Novel Adaptor Protein Orchestrates Receptor Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts." *Cell* 94(5):667-77.
- Edelman, Gerald M. 1962. "On Structural and Functional Relations Between Antibodies and Proteins of the Gamma-System." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48(6):1035. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC220901/%5Cnpapers2://publication/uuid/47A4EEFC-0663-406C-8C55-75AB503645E8>).
- Edelman, Gerald M. 1970. "The Covalent Structure of a Human YG-Immunoglobulin. XI. Functional Implications." *Biochemistry* 9(16):3197-3205.
- Ericson, Mark D. et al. 2017. "Bench-Top to Clinical Therapies: A Review of Melanocortin Ligands from 1954 to 2016." *Biochimica et Biophysica Acta* 1863(10 Pt A):2414-35. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28363699>).
- Ettouati, L. et al. 1996. "Substitution of Peptide Bond 53-54 of HEL(52-61) with an Ethylene Bond Rather than Reduced Peptide Bond Is Tolerated by an MHC-II Restricted T Cell." *Peptide Research* 9(5):248-53. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000251>).
- Etzensperger, Ruth et al. 2017. "Identification of Lineage-Specifying Cytokines That Signal All CD8+-Cytotoxic-Lineage-Fate 'decisions' in the Thymus." *Nature Immunology* 18(11):1218-27. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28945245>).
- European Medicines Agency. 2017. *Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins*.
- European Medicines Agency. 2014. *Serelaxin Assessment Report*. Retrieved (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002817/WC500171911.pdf).
- Fazilleau, Nicolas, Linda Mark, Louise J. McHeyzer-Williams, and Michael G. McHeyzer-Williams. 2009. "Follicular Helper T Cells: Lineage and Location." *Immunity* 30(3):324-35. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19303387>).
- FDA, M. Blank, and TY McDowell. 2014. *FDA Briefing Document Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee Meeting*.
- Feng, Zhaoqianqi and Bing Xu. 2016. "Inspiration from the Mirror: D-Amino Acid Containing Peptides in Biomedical Approaches." *Biomolecular Concepts* 7(3):179-87. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159920>).
- Ferlin, Alberto, Massimo Menegazzo, Lisa Giancesello, Riccardo Selice, and Carlo Foresta. 2012. "Effect of Relaxin on Human Sperm Functions." *Journal of Andrology* 33(3):474-82. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903973>).
- Fernández, O. et al. 2001. "Study of Binding and Neutralising Antibodies to Interferon-Beta in Two Groups of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients." *Journal of Neurology*

- 248(5):383–88. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11437159>).
- Figueiredo, Kevin A., Alice L. Mui, Colleen C. Nelson, and Michael E. Cox. 2006. “Relaxin Stimulates Leukocyte Adhesion and Migration through a Relaxin Receptor LGR7-Dependent Mechanism.” *Journal of Biological Chemistry* 281(6):3030–39.
- Figueiredo, Kevin A., Jodie B. Palmer, Alice L. Mui, Colleen C. Nelson, and Michael E. Cox. 2005. “Demonstration of Upregulated H2 Relaxin mRNA Expression during Neuroendocrine Differentiation of LNCaP Prostate Cancer Cells and Production of Biologically Active Mammalian Recombinant 6 Histidine-Tagged H2 Relaxin.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1041:320–27. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956728>).
- Filippatos, Gerasimos et al. 2014. “Serelaxin in Acute Heart Failure Patients with Preserved Left Ventricular Ejection Fraction: Results from the RELAX-AHF Trial.” *European Heart Journal* 35(16):1041–50. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316514>).
- Fineberg, S. Edwin et al. 2007. “Immunological Responses to Exogenous Insulin.” *Endocrine Reviews* 28(6):625–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785428>).
- Fink, P. J. and M. J. Bevan. 1978. “H-2 Antigens of the Thymus Determine Lymphocyte Specificity.” *The Journal of Experimental Medicine* 148(3):766–75.
- Fischer, Peter, Alfio Comis, Margaret Tyler, and Merlin Howden. 2007. “Oral and Parenteral Immunization with Synthetic Retro-Inverso Peptides Induce Antibodies That Cross-React with Native Peptides and Parent Antigens.” *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 44(3):140–44. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17650581>).
- Fisher, Carol et al. 2002. “Is the Pregnancy Hormone Relaxin Also a Vasodilator Peptide Secreted by the Heart?” *Circulation* 106(3):292–95. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119241>).
- Flechner, S. M., R. H. Kerman, C. Van Buren, and B. D. Kahan. 1984. “Successful Transplantation of Cyclosporine-Treated Haploidentical Living-Related Renal Recipients without Blood Transfusions.” *Transplantation* 37(1):73–76. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6229913>).
- Food and Drug Administration. 2014. *Guidance for Industry, Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products*. Silver Spring. Retrieved (<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>).
- Forde, Éanna et al. 2016. “Differential In Vitro and In Vivo Toxicities of Antimicrobial Peptide Prodrugs for Potential Use in Cystic Fibrosis.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(5):2813–21. Retrieved (<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00157-16>).
- Freire, Teresa, Richard Lo-Man, Sylvie Bay, and Claude Leclerc. 2011. “Tn Glycosylation of the MUC6 Protein Modulates Its Immunogenicity and Promotes the Induction of Th17-Biased T Cell Responses.” *The Journal of Biological Chemistry* 286(10):7797–7811. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193402>).
- Fromme, B. et al. 2003. “A Novel Retro-Inverso Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Immunogen Elicits Antibodies That Neutralize the Activity of Native GnRH.” *Endocrinology* 144(7):3262–69. Retrieved

- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810583>).
- Fu, Wenxian and Weifeng Chen. 2004. "Roles of Chemokines in Thymopoiesis: Redundancy and Regulation." *Cellular & Molecular Immunology* 1(4):266–73. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225769>).
- Gamsjaeger, Roland et al. 2011. "Structural Basis and Specificity of Acetylated Transcription Factor GATA1 Recognition by BET Family Bromodomain Protein Brd3." *Molecular and Cellular Biology* 31(13):2632–40. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555453>).
- Garibay-Tupas, Jermelina L., Kristie J. Okazaki, Lily S. Tashima, Sandra Yamamoto, and Gillian D. Bryant-Greenwood. 2004. "Regulation of the Human Relaxin Genes H1 and H2 by Steroid Hormones." *Molecular and Cellular Endocrinology* 219(1–2):115–25.
- Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. "Cytokine-Driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory and Effector Memory CD4+ T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 194(12):1711–19. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12801802).
- Gentilucci, Luca, Rossella De Marco, and Lucia Cerisoli. 2010. "Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization." *Current Pharmaceutical Design* 16(28):3185–3203. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687878>).
- Gilliet, Michel and Yong-jun Liu. 2002. "Generation of Human CD8 T Regulatory Cells by CD40 Ligand – Activated Plasmacytoid Dendritic Cells." 195(6):0–9.
- Gimmi, C. D., G. J. Freeman, J. G. Gribben, G. Gray, and L. M. Nadler. 1993. "Human T-Cell Clonal Anergy Is Induced by Antigen Presentation in the Absence of B7 Costimulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(14):6586–90. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688125> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC46977>).
- Ginn, Claire, Hanieh Khalili, Rebecca Lever, and Steve Brocchini. 2014. "PEGylation and Its Impact on the Design of New Protein-Based Medicines." *Future Medicinal Chemistry* 6(16):1829–46. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407370>).
- Gokemeijer, Jochem, Vibha Jawa, and Shibani Mitra-Kaushik. 2017. "How Close Are We to Profiling Immunogenicity Risk Using In Silico Algorithms and In Vitro Methods?: An Industry Perspective." *The AAPS Journal* 19(6):1587–92. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28971356>).
- Goldhaber, S. Z. et al. 1993. "Alteplase versus Heparin in Acute Pulmonary Embolism: Randomised Trial Assessing Right-Ventricular Function and Pulmonary Perfusion." *Lancet (London, England)* 341(8844):507–11. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8094768>).
- Goodwin, D., P. Simerska, and I. Toth. 2012. "Peptides as Therapeutics with Enhanced Bioactivity." *Current Medicinal Chemistry* 19(26):4451–61. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22830348>).

- Goronzy, Jörg J. and Cornelia M. Weyand. 2005. "T Cell Development and Receptor Diversity during Aging." *Current Opinion in Immunology* 17(5):468–75. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098723>).
- Gorovits, Boris et al. 2016. "Pre-Existing Antibody: Biotherapeutic Modality-Based Review." *The AAPS Journal* 18(2):311–20.
- Gould, Hannah J. and Faruk Ramadani. 2015. "IgE Responses in Mouse and Man and the Persistence of IgE Memory." *Trends in Immunology* 36(1):40–48.
- de Groot, Anne S. and David W. Scott. 2007. "Immunogenicity of Protein Therapeutics." *Trends in Immunology* 28(11):482–90. Retrieved January 5, 2018 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964218>).
- Grosse, J. et al. 2014. "Insulin-like Peptide 5 Is an Orexigenic Gastrointestinal Hormone." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(30):11133–38. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1411413111>).
- de Grouchy, J. and C. Turleau. 1984. *Clinical Atlas of Human Chromosomes*. 2nd editio. edited by Wiley medical. Churchill Livingstone.
- Guichard, G. et al. 1994. "Antigenic Mimicry of Natural L-Peptides with Retro-Inverso-Peptidomimetics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(21):9765–69. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937888>).
- Guichard, G. et al. 1995. "Efficient Binding of Reduced Peptide Bond Pseudopeptides to Major Histocompatibility Complex Class I Molecule." *The Journal of Biological Chemistry* 270(44):26057–59. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592803>).
- Guidotti, Giulia, Liliana Brambilla, and Daniela Rossi. 2017. "Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics." *Trends in Pharmacological Sciences* 38(4):406–24. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>).
- Gurunath, R., T. K. Beena, P. R. Adiga, and P. Balaram. 1995. "Enhancing Peptide Antigenicity by Helix Stabilization." *FEBS Letters* 361(2–3):176–78. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535246>).
- de Haan, Ellen C. et al. 2002. "Major Histocompatibility Complex Class II Binding Characteristics of Peptoid-Peptide Hybrids." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10(6):1939–45. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937352>).
- Hall, L. R., J. H. Lass, E. Diaconu, E. R. Strine, and E. Pearlman. 1999. "An Essential Role for Antibody in Neutrophil and Eosinophil Recruitment to the Cornea: B Cell-Deficient (MicroMT) Mice Fail to Develop Th2-Dependent, Helminth-Mediated Keratitis." *J Immunol* 163(9):4970–75. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10528201%5Cnhttp://www.jimmunol.org/cgi/reprint/163/9/4970.pdf).
- Hamad, A. R. et al. 1998. "Potent T Cell Activation with Dimeric Peptide-Major Histocompatibility Complex Class II Ligand: The Role of CD4 Coreceptor." *The Journal of Experimental Medicine* 188(9):1633–40.
- Hamamoto, Kumiko, Yutaka Kida, Ye Zhang, Takashi Shimizu, and Koichi Kuwano. 2002. "Antimicrobial Activity and Stability to Proteolysis of Small Linear Cationic Peptides with

- D-Amino Acid Substitutions.” *Microbiology and Immunology* 46(11):741–49. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516770>).
- Hamze, Moustafa et al. 2017. “Characterization of CD4 T Cell Epitopes of Infliximab and Rituximab Identified from Healthy Donors.” *Frontiers in Immunology* 8:500. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529511>).
- Harpaz, Yahouda and Cyrus Chothia. 1994. “Many of the Immunoglobulin Superfamily Domains in Cell Adhesion Molecules and Surface Receptors Belong to a New Structural Set Which Is Close to That Containing Variable Domains.” *Journal of Molecular Biology* 238(4):528–39. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228368471312X>).
- Haugaard-Kedström, Linda M. et al. 2015. “Solution Structure, Aggregation Behavior, and Flexibility of Human Relaxin-2.” *ACS Chemical Biology* 10(3):891–900. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25547165>).
- Hausberger, Anna et al. 2016. “Identification of Low-Level Product-Related Variants in Filgrastim Products Presently Available in Highly Regulated Markets.” *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 30(3):233–42. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27026103>).
- Hermanson, Terhi, Charles L. Bennett, and Iain C. Macdougall. 2016. “Peginesatide for the Treatment of Anemia Due to Chronic Kidney Disease - an Unfulfilled Promise.” *Expert Opinion on Drug Safety* 15(10):1421–26. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27551882>).
- Hermeling, Suzanne, Wim Jiskoot, Daan Crommelin, Claus Bornaes, and Huub Schellekens. 2005. “Development of a Transgenic Mouse Model Immune Tolerant for Human Interferon Beta.” *Pharmaceutical Research* 22(6):847–51. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948027>).
- Hervé, M. et al. 1997. “On the Immunogenic Properties of Retro-Inverso Peptides. Total Retro-Inversion of T-Cell Epitopes Causes a Loss of Binding to MHC II Molecules.” *Molecular Immunology* 34(2):157–63. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188848>).
- Heys, S. D. et al. 1995. “A Phase III Study of Recombinant Interleukin-2, 5-Fluorouracil and Leucovorin versus 5-Fluorouracil and Leucovorin in Patients with Unresectable or Metastatic Colorectal Carcinoma.” *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 31A(1):19–25. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7695972>).
- Hida, Takayuki et al. 2006. “Chronic Intracerebroventricular Administration of Relaxin-3 Increases Body Weight in Rats.” *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 26(3):147–58. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777712>).
- Hill, C. M. et al. 1994. “Exploration of Requirements for Peptide Binding to HLA DRB1*0101 and DRB1*0401.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152(6):2890–98. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144889>).
- Hill, C. Mark et al. 1994. “Exploration of Requirements for Peptide Binding to HLA DRB1*0101 and DRB1*0401.” *Journal of Immunology* 152(6):2890–98. Retrieved (<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028316567&partnerID=tZOtx3y1>).

- Hisaw, Frederick L. 1926. "Experimental Relaxation of the Pubic Ligament of the Guinea Pig." *Proc Soc Exp Biol Med* 23(8):661–66. Retrieved (<https://doi.org/10.3181/00379727-23-3107>).
- Hombach, J., T. Tsubata, L. Leclercq, H. Stappert, and M. Reth. 1990. "Molecular Components of the B-Cell Antigen Receptor Complex of the IgM Class." *Nature* 343(6260):760–62. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2304550>).
- Hood, L., J. H. Campbell, and S. C. Elgin. 1975. "The Organization, Expression, and Evolution of Antibody Genes and Other Multigene Families." *Annual Review of Genetics* 9(1):305–53. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/813561>).
- Hörkkö, S. et al. 1996. "Antiphospholipid Antibodies Are Directed against Epitopes of Oxidized Phospholipids. Recognition of Cardiolipin by Monoclonal Antibodies to Epitopes of Oxidized Low Density Lipoprotein." *The Journal of Clinical Investigation* 98(3):815–25. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698874>).
- Hossain, Mohammed Akhter, Bryna Chow Suet Man, et al. 2011. "H3 Relaxin Demonstrates Antifibrotic Properties via the RXFP1 Receptor." *Biochemistry* 50(8):1368–75. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21229994>).
- Hossain, Mohammed Akhter et al. 2008. "The A-Chain of Human Relaxin Family Peptides Has Distinct Roles in the Binding and Activation of the Different Relaxin Family Peptide Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 283(25):17287–97.
- Hossain, Mohammed Akhter, K. Johan Rosengren, et al. 2011. "The Minimal Active Structure of Human Relaxin-2." *The Journal of Biological Chemistry* 286(43):37555–65. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878627>).
- Houba, V. and D. S. Rowe. 1973. "A Comparison of African and European Serum Levels of Immunoglobulin E." *Bulletin of the World Health Organization* 49(6):539–45.
- Hsieh, C. S. et al. 1993. "Development of TH1 CD4+ T Cells through IL-12 Produced by Listeria-Induced Macrophages." *Science (New York, N.Y.)* 260(5107):547–49. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8097338>).
- Hsu, S. Y. 2002. "Activation of Orphan Receptors by the Hormone Relaxin." *Science* 295(5555):671–74. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1065654>).
- Hsu, Sheau Yu Teddy. 2003. "New Insights into the Evolution of the Relaxin-LGR Signaling System." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 14(7):303–9. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946872>).
- Hu, Zicheng, Jessica N. Lancaster, Chayanit Sasiponganan, and Lauren I. R. Ehrlich. 2015. "CCR4 Promotes Medullary Entry and Thymocyte-Dendritic Cell Interactions Required for Central Tolerance." *The Journal of Experimental Medicine* 212(11):1947–65. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417005>).
- Hudson, P. et al. 1984. "Relaxin Gene Expression in Human Ovaries and the Predicted Structure of a Human Preprorelaxin by Analysis of cDNA Clones." *The EMBO Journal* 3(10):2333–39. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6548702>).
- Hudson, P. et al. 1983. "Structure of a Genomic Clone Encoding Biologically Active Human

- Relaxin.” *Nature* 301(5901):628–31. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6298628>).
- Hudson, P., J. Haley, M. Cronk, J. Shine, and H. Niall. 1981. “Molecular Cloning and Characterization of CDNA Sequences Coding for Rat Relaxin.” *Nature* 291(5811):127–31. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7231533>).
- Huppa, Johannes B. and Mark M. Davis. 2003. “T-Cell-Antigen Recognition and the Immunological Synapse.” *Nature Reviews Immunology* 3(12):973–83. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri1245>).
- Hymes, Jeffrey et al. 2007. “Dosing Patterns, Drug Costs, and Hematologic Outcome in Anemic Patients with Chronic Kidney Disease Switching from Darbepoetin Alfa to Epoetin Alfa.” *Current Medical Research and Opinion* 23(8):1931–37. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624232>).
- Iezzi, Giandomenica, Klaus Karjalainen, and Antonio Lanzavecchia. 1998. “The Duration of Antigenic Stimulation Determines the Fate of Naive and Effector T Cells.” *Immunity* 8(1):89–95.
- Ishizaka, K. and Teruko Ishizaka. 1971. “IgE and Reaginic Hypersensitivity.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 190(1):443–56. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4109645>).
- Ishizaka, Kimishige and Teruko Ishizaka. 1966. “Physicochemical Properties of Reaginic Antibody.” *Journal of Allergy* 37(3):169–85. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/0021-8707\(66\)90091-8](http://dx.doi.org/10.1016/0021-8707(66)90091-8)).
- Isturiz, Martin A., Maria M. Maria, and Jorge A. Manni. 1975. “Reaction of Human Lymphocytes with Aggregated IgG Columns. Effect on Antibody-Dependent Cytotoxicity and EAC Rosette Formation.” *Cellular Immunology* 16(1):82–91.
- Ivell, Richard, Alexander I. Agoulnik, and Ravinder Anand-Ivell. 2017. “Relaxin-like Peptides in Male Reproduction - a Human Perspective.” *British Journal of Pharmacology* 174(10):990–1001. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27933606>).
- Iwai, L. K. et al. 2001. “Retro-Inverso Peptide Analogues of Trypanosoma Cruzi B13 Protein Epitopes Fail to Be Recognized by Human Sera and Peripheral Blood Mononuclear Cells.” *Peptides* 22(6):853–60. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390013>).
- Jacob, J., G. Kelsoe, K. Rajewsky, and U. Weiss. 1991. “Intraclonal Generation of Antibody Mutants in Germinal Centres.” *Nature* 354(6352):389–92. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1956400>).
- Jacobs, B., M. Wuttke, C. Papewalis, J. Seissler, and M. Schott. 2008. “Dendritic Cell Subtypes and in Vitro Generation of Dendritic Cells.” *Hormone and Metabolic Research* 40(2):99–107.
- Jacobs, L., J. O’Malley, A. Freeman, J. Murawski, and R. Ekes. 1982. “Intrathecal Interferon in Multiple Sclerosis.” *Archives of Neurology* 39(10):609–15. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6751302>).
- Jankovic, J. and M. F. Brin. 1991. “Therapeutic Uses of Botulinum Toxin.” *The New England Journal of Medicine* 324(17):1186–94. Retrieved

- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2011163>).
- Jaton, J. C. and M. Sela. 1968. "Role of Optical Configuration in the Immunogenicity and Specificity of Synthetic Antigens Derived from Multichain Polyproline." *The Journal of Biological Chemistry* 243(21):5616–26. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5699055>).
- Jawa, Vibha et al. 2013. "T-Cell Dependent Immunogenicity of Protein Therapeutics: Preclinical Assessment and Mitigation." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 149(3):534–55. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263283>).
- Jefferis, Roy. 2016. "Posttranslational Modifications and the Immunogenicity of Biotherapeutics." *Journal of Immunology Research* 2016:5358272. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191002>).
- Jelkmann, Wolfgang. 2011. "Regulation of Erythropoietin Production." *The Journal of Physiology* 589(Pt 6):1251–58. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273483>).
- Jeyabalan, Arundhathi, Sanjeev G. Shroff, Jaqueline Novak, and Kirk P. Conrad. 2007. "The Vascular Actions of Relaxin." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 612:65–87. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18161482>).
- Johnson, M. R. et al. 1991. "Relaxin Levels in Ovum Donation Pregnancies." *Fertility and Sterility* 56(1):59–61. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065805>).
- Jordan, Martha S. et al. 2001. "Thymic Selection of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Induced by an Agonist Self-Peptide." *Nature Immunology* 2(4):301–6.
- June, Carl H., Jeffrey A. Bluestone, Lee M. Nadler, and Craig B. Thompson. 1994. "The B7 and CD28 Receptor Families." *Trends in Immunology* 15(7):321–31.
- Justesen, Sune, Mikkel Harndahl, Kasper Lamberth, Lise-Lotte B. Nielsen, and Søren Buus. 2009. "Functional Recombinant MHC Class II Molecules and High-Throughput Peptide-Binding Assays." *Immunome Research* 5:2. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19416502>).
- Kabat, E. A. and T. T. Wu. 1991. "Identical V Region Amino Acid Sequences and Segments of Sequences in Antibodies of Different Specificities. Relative Contributions of VH and VL Genes, Minigenes, and Complementarity-Determining Regions to Binding of Antibody-Combining Sites." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 147(5):1709–19.
- Kalafatis, M., M. D. Rand, R. J. Jenny, Y. H. Ehrlich, and K. G. Mann. 1993. "Phosphorylation of Factor Va and Factor VIIIa by Activated Platelets." *Blood* 81(3):704–19. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8427963>).
- Kaloff, Cornelia R. and Ingrid G. Haas. 1995. "Coordination of Immunoglobulin Chain Folding and Immunoglobulin Chain Assembly Is Essential for the Formation of Functional IgG." *Immunity* 2(6):629–37.
- Karve, Tejaswita M. and Amrita K. Cheema. 2011. "Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease." *Journal of Amino Acids* 2011:207691. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312457>).

- Kaufman, R. J. 1998. "Post-Translational Modifications Required for Coagulation Factor Secretion and Function." *Thrombosis and Haemostasis* 79(6):1068–79. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657426>).
- Kawamura, Kazuhiro et al. 2004. "Paracrine Regulation of Mammalian Oocyte Maturation and Male Germ Cell Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(19):7323–28. Retrieved (<http://www.pnas.org/content/101/19/7323.short>).
- Kern, András and Gillian D. Bryant-Greenwood. 2009. "Mechanisms of Relaxin Receptor (LGR7/RXFP1) Expression and Function." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1160:60–66.
- Khan, O. A. and S. S. Dhib-Jalbut. 1998. "Neutralizing Antibodies to Interferon Beta-1a and Interferon Beta-1b in MS Patients Are Cross-Reactive." *Neurology* 51(6):1698–1702. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855525>).
- Khanna, Dinesh et al. 2009. "Recombinant Human Relaxin in the Treatment of Systemic Sclerosis with Diffuse Cutaneous Involvement: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Arthritis and Rheumatism* 60(4):1102–11. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333948>).
- Kharagjitsingh, Aantje V et al. 2005. "Incidence of Recombinant Erythropoietin (EPO) Hyporesponse, EPO-Associated Antibodies, and Pure Red Cell Aplasia in Dialysis Patients." *Kidney International* 68(3):1215–22. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105053>).
- Kim, Cheol Joo, Eri Hara, Naoki Watabe, Isao Hara, and Shunsaku Kimura. 2017. "Modulation of Immunogenicity of Poly(Sarcosine) Displayed on Various Nanoparticle Surfaces Due to Different Physical Properties." *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 23(12):889–98. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29110375>).
- Kim, Min-Soo et al. 2007. "Comparative Analyses of Complex Formation and Binding Sites between Human Tumor Necrosis Factor-Alpha and Its Three Antagonists Elucidate Their Different Neutralizing Mechanisms." *Journal of Molecular Biology* 374(5):1374–88. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996896>).
- King, T. P. et al. 1994. "Structure-Immunogenicity Relationship of Melittin, Its Transposed Analogues, and D-Melittin." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153(3):1124–31. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027544>).
- Kirberg, J. et al. 1994. "Thymic Selection of CD8+ Single Positive Cells with a Class II Major Histocompatibility Complex-Restricted Receptor." *The Journal of Experimental Medicine* 180(1):25–34. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Klein, Ludger, Bruno Kyewski, Paul M. Allen, and Kristin A. Hogquist. 2014. "Positive and Negative Selection of the T Cell Repertoire: What Thymocytes See (and Don't See)." *Nature Reviews. Immunology* 14(6):377–91. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830344>).

- Kobalava, Zhanna et al. 2015. "Pharmacokinetics of Serelaxin in Patients with Hepatic Impairment: A Single-Dose, Open-Label, Parallel Group Study." *British Journal of Clinical Pharmacology* 79(6):937–45. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25511105>).
- Köhler, G. and C. Milstein. 1975. "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity." *Nature* 256(5517):495–97.
- Kong, Fan Kun, Chen Lo H. Chen, and Max D. Cooper. 1998. "Thymic Function Can Be Accurately Monitored by the Level of Recent T Cell Emigrants in the Circulation." *Immunity* 8(1):97–104.
- Kovalainen, Miia et al. 2015. "Novel Delivery Systems for Improving the Clinical Use of Peptides." *Pharmacological Reviews* 67(3):541–61. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26023145>).
- Kramer, Daniel. 2016. "Strategies to Assess the Neutralizing Capacity of ADAs Against Biopharmaceuticals." P. 10 in, edited by EBF - Focus Workshop. SANOFI R&D. Retrieved (<http://focus201609.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2016/10/11-Daniel-Kramer.pdf>).
- Krieckaert, Charlotte L., Michael T. Nurmohamed, and Gerrit Jan Wolbink. 2012. "Methotrexate Reduces Immunogenicity in Adalimumab Treated Rheumatoid Arthritis Patients in a Dose Dependent Manner." *Annals of the Rheumatic Diseases* 71(11):1914–15. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22586169>).
- Krikorian, Dimitrios, Eugenia Panou-Pomonis, Chryssa Voitharou, Constantinos Sakarellos, and Maria Sakarellos-Daitsiotis. 2005. "A Peptide Carrier with a Built-in Vaccine Adjuvant: Construction of Immunogenic Conjugates." *Bioconjugate Chemistry* 16(4):812–19. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16029022>).
- Krishna, Murli and Steven G. Nadler. 2016. "Immunogenicity to Biotherapeutics - The Role of Anti-Drug Immune Complexes." *Frontiers in Immunology* 7(FEB).
- Kroenke, Mark A. et al. 2017. "Clinical Immunogenicity of the D-Amino Acid Peptide Therapeutic Etelcalcetide: Method Development Challenges and Anti-Drug Antibody Clinical Impact Assessments." *Journal of Immunological Methods* 445:37–44. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28274835>).
- Kumagai, Jin et al. 2002. "INSL3/Leydig Insulin-like Peptide Activates the LGR8 Receptor Important in Testis Descent." *The Journal of Biological Chemistry* 277(35):31283–86. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114498>).
- Kumar, V. A., S. S. Wilson, S. I. Ayaz, and P. D. Levy. 2015. "Targeted Biological Therapies Reach the Heart: The Case of Serelaxin for Heart Failure." *Drugs of Today (Barcelona, Spain : 1998)* 51(10):591–97. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583301>).
- Kumita, Janet R., Chris J. Weston, Lin-P'ing Choo-Smith, G. Andrew Woolley, and Oliver S. Smart. 2003. "Prevention of Peptide Fibril Formation in an Aqueous Environment by Mutation of a Single Residue to Aib." *Biochemistry* 42(15):4492–98. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12693945>).
- Lalezari, Jacob P. et al. 2003. "Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor, for Drug-Resistant HIV

- Infection in North and South America.” *The New England Journal of Medicine* 348(22):2175–85. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12637625>).
- Lamb, J. R. et al. 1995. “The Effects of Changes at Peptide Residues Contacting MHC Class II T-Cell Receptor on Antigen Recognition and Human Th0 Cell Effector Function.” *Immunology* 85(3):447–54. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7558134>).
- Lamm, L. U. et al. 1974. “Assignment of the Major Histocompatibility Complex to Chromosome No. 6 in a Family with a Pericentric Inversion.” *Human Heredity* 24(3):273–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4435793>).
- Lamonica, Janine M., Christopher R. Vakoc, and Gerd A. Blobel. 2006. “Acetylation of GATA-1 Is Required for Chromatin Occupancy.” *Blood* 108(12):3736–38. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888089>).
- Lanzavecchia, Antonio. 1996. “Mechanisms of Antigen Uptake for Presentation.” *Current Opinion in Immunology* 8(3):348–54.
- Larhammar, Dan et al. 1982. “Alpha Chain of HLA-DR Transplantation Antigens Is a Member of the Same Protein Superfamily as the Immunoglobulins.” *Cell* 30(1):153–61.
- Laurent, A. et al. 1998. “Insulin-like 4 (INSL4) Gene Expression in Human Embryonic and Trophoblastic Tissues.” *Molecular Reproduction and Development* 51(2):123–29. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740319>).
- Lee, Sung-Joo E., Yuko Hori, Jay T. Groves, Michael L. Dustin, and Arup K. Chakraborty. 2002. “The Synapse Assembly Model.” *Trends in Immunology* 23(10):500–502. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297422>).
- LEEM. 2017. *LEEM, Bilan Économique Des Entreprises Du Médicament - Édition 2017*. 2017 Sep 01.
- Legoux, F. et al. 2010. “Impact of TCR Reactivity and HLA Phenotype on Naive CD8 T Cell Frequency in Humans.” *The Journal of Immunology* 184(12):6731–38. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1000295>).
- Lenschow, Deborah J., Theresa L. Walunas, and A. Jeffrey. 1996. “CD28 / B7 System of T Cell Costimulation.” *Annual Review of Immunology* 14:233–58.
- Levy, Y. et al. 1988. “Adenosine Deaminase Deficiency with Late Onset of Recurrent Infections: Response to Treatment with Polyethylene Glycol-Modified Adenosine Deaminase.” *The Journal of Pediatrics* 113(2):312–17. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3260944>).
- Li, Hao et al. 2016. “Roles of D-Amino Acids on the Bioactivity of Host Defense Peptides.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(7). Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376281>).
- Li, Hongliang et al. 2015. “Novel Retro-Inverso Peptide Inhibitor Reverses Angiotensin Receptor Autoantibody-Induced Hypertension in the Rabbit.” *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 65(4):793–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25691619>).
- Li, J. et al. 2001. “Thrombocytopenia Caused by the Development of Antibodies to Thrombopoietin.” *Blood* 98(12):3241–48. Retrieved

(<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.03.002>).

- Li, Na et al. 2010. "Blockade of CD28 by a Synthetical Peptoid Inhibits T-Cell Proliferation and Attenuates Graft-versus-Host Disease." *Cellular & Molecular Immunology* 7(2):133–42. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19479663>).
- Li, X., R. Li, and Z. Li. 2006. "Inhibitory Effects on HLA-DR1-Specific T-Cell Activation by Influenza Virus Haemagglutinin-Derived Peptides." *Tissue Antigens* 67(1):45–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16451200>).
- Lieschke, G. J. and A. W. Burgess. 1992. "Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (2)." *The New England Journal of Medicine* 327(2):99–106. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376442>).
- Link, Jenny et al. 2017. "Clinical Practice of Analysis of Anti-Drug Antibodies against Interferon Beta and Natalizumab in Multiple Sclerosis Patients in Europe: A Descriptive Study of Test Results." *PLoS One* 12(2):e0170395. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28170401>).
- Liston, Adrian, Sylvie Lesage, Judith Wilson, Leena Peltonen, and Christopher C. Goodnow. 2003. "Aire Regulates Negative Selection of Organ-Specific T Cells." *Nature Immunology* 4(4):350–54.
- Liu, Changlu et al. 2003. "Identification of Relaxin-3/INSL7 as an Endogenous Ligand for the Orphan G-Protein-Coupled Receptor GPCR135." *Journal of Biological Chemistry* 278(50):50754–64.
- Liu, Changlu et al. 2005. "Relaxin-3/Insulin-like Peptide 5 Chimeric Peptide, a Selective Ligand for G Protein-Coupled Receptor (GPCR)135 and GPCR142 over Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptor 7." *Molecular Pharmacology* 67(1):231–40. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15465925>).
- Liu, Hongcheng, Georgeen Gaza-Bulseco, Dinesh Faldu, Chris Chumsae, and Joanne Sun. 2008. "Heterogeneity of Monoclonal Antibodies." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(7):2426–47. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828757>).
- Liu, Juan, Cheng Qian, and Xuetao Cao. 2016. "Post-Translational Modification Control of Innate Immunity." *Immunity* 45(1):15–30. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27438764>).
- Liu, Liming. 2015. "Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104(6):1866–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25872915>).
- Lok, S. et al. 2000. "Identification of INSL6, a New Member of the Insulin Family That Is Expressed in the Testis of the Human and Rat." *Biology of Reproduction* 62(6):1593–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819760>).
- Londei, Marco, Jonathan R. Lamb, Gian Franco Bottazzo, and Marc Feldmann. 1984. "Epithelial Cells Expressing Aberrant MHC Class II Determinants Can Present Antigen to Cloned Human T Cells." *Nature* 312(5995):639–41.
- Lorenz, T. J., F. Macdonald, and M. M. Kitt. 1999. "Nonimmunogenicity of Eptifibatide, a

- Cyclic Heptapeptide Inhibitor of Platelet Glycoprotein IIb-IIIa.” *Clinical Therapeutics* 21(1):128–37. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090430>).
- Luckheeram, Rishi Vishal, Rui Zhou, Asha Devi Verma, and Bing Xia. 2012. “CD4 +T Cells: Differentiation and Functions.” *Clinical and Developmental Immunology* 2012.
- Lund, Ole et al. 2004. “Definition of Supertypes for HLA Molecules Using Clustering of Specificity Matrices.” *Immunogenetics* 55(12):797–810.
- Luyasu, S. et al. 2011. “[Anaphylactic Shock Due to Recombinant Human Insulin: Follow-up of a Desensitization Protocol by Basophil Activation Test].” *La Revue de Medecine Interne* 32(1):39–42. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.revmed.2010.10.350>).
- Ma, Jinfeng, Hai Huang, Zenggang Han, Changzheng Zhu, and Bin Yue. 2015. “RLN2 Is a Positive Regulator of AKT-2-Induced Gene Expression Required for Osteosarcoma Cells Invasion and Chemoresistance.” *BioMed Research International* 2015:147468. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26229955>).
- Macdougall, Iain C. et al. 2013. “Peginesatide for Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease Not Receiving Dialysis.” *The New England Journal of Medicine* 368(4):320–32. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343062>).
- Maillère, B., G. Mourier, J. Cotton, et al. 1995. “Probing Immunogenicity of a T Cell Epitope by L-Alanine and D-Amino Acid Scanning.” *Molecular Immunology* 32(14–15):1073–80. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8544857>).
- Maillère, B. and M. Hervé. 1997. “The Specificity of Antibodies Raised against a T Cell Peptide Is Influenced by Peptide Amidation.” *Molecular Immunology* 34(14):1003–9. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488051>).
- Maillère, B., G. Mourier, M. Hervé, and A. Ménez. 1995. “Fine Chemical Modifications at N- and C-Termini Enhance Peptide Presentation to T Cells by Increasing the Lifespan of Both Free and MHC-Complexed Peptides.” *Molecular Immunology* 32(17–18):1377–85. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8643107>).
- Maillère, Bernard, Stéphanie Delluc, and Gilles Ravot. 2012. “La Prédiction de l’immunogénicité Des Protéines Thérapeutiques.” 82–88.
- Maldonado, Roberto A., Darrell J. Irvine, Robert Schreiber, and Laurie H. Glimcher. 2004. “A Role for the Immunological Synapse in Lineage Commitment of CD4 Lymphocytes.” *Nature* 431(7008):527–32.
- Manjunath, N., M. Correa, M. Ardman, and B. Ardman. 1995. “CD43 KO T Cell Nature 1995.Pdf.” *Nature* 377:535.
- Marioni, Gino et al. 2016. “Relaxin-2 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma.” *The International Journal of Biological Markers* 31(3):e324-9. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27338642>).
- Marsh, JA and MD Kendall. 1996. *The Physiology of Immunity, Comparative Immunology*. New Editio. edited by CRC Press. Taylor & Francis.
- Matthews, Catherine B. et al. 2017. “Reexamining Opportunities for Therapeutic Protein Production in Eukaryotic Microorganisms.” *Biotechnology and Bioengineering*

114(11):2432–44.

- Matucci, A. et al. 2013. “Allergological in Vitro and in Vivo Evaluation of Patients with Hypersensitivity Reactions to Infliximab.” *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 43(6):659–64. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711128>).
- Matzinger, P. 1994. “Tolerance, Danger, and the Extended Family.” *Annual Review of Immunology* 12:991–1045. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011301>).
- Maurer, P. H. 1965. “Antigenicity of Polypeptides (Poly Alpha Alpha Amino Acids). 13. Immunological Studies with Synthetic Polymers Containing Only D- or D- and L-Alpha-Amino Acids.” *The Journal of Experimental Medicine* 121:339–49. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14271319>).
- Mazumder, Abhishek, Atanu Maiti, Koushik Roy, and Siddhartha Roy. 2012. “A Synthetic Peptide Mimic of λ -Cro Shows Sequence-Specific Binding in Vitro and in Vivo.” *ACS Chemical Biology* 7(6):1084–94. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480451>).
- McCluskey, James, Carmel Kanaan, and Mary Diviney. 2017. “Nomenclature and Serology of HLA Class I and Class II Alleles.” *Current Protocols in Immunology* 118:A.1S.1-A.1S.6. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28762487>).
- McGaughey, G. B. et al. 2003. “HIV-1 Vaccine Development: Constrained Peptide Immunogens Show Improved Binding to the Anti-HIV-1 Gp41 MAb.” *Biochemistry* 42(11):3214–23. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12641452>).
- McGorray, Susan P., Calogero Dolce, Susan Kramer, Dennis Stewart, and Timothy T. Wheeler. 2012. “A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial on the Effects of Recombinant Human Relaxin on Tooth Movement and Short-Term Stability.” *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 141(2):196–203. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.07.024>).
- McGowan, B. M. et al. 2008. “Relaxin-3 Stimulates the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295(2):E278-86. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492777>).
- Menegozzo, M., A. Ruffilli, and G. Sansone. 1973. “Distribution of an Idiotypic Determinant of Human Light Chains in the Immunoglobulins of Normal Individuals.” *Nature: New Biology* 242(116):84–86. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4121395>).
- Messitt, Timothy J., Frances Terry, Leonard Moise, William Martin, and Anne S. De Groot. 2011. “A Comparison of Two Methods for T Cell Epitope Mapping: ‘Cell Free’ in Vitro versus Immunoinformatics.” *Immunome Research* 7(2). Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346774>).
- Metra, Marco et al. 2013. “Effect of Serelaxin on Cardiac, Renal, and Hepatic Biomarkers in the Relaxin in Acute Heart Failure (RELAX-AHF) Development Program: Correlation with Outcomes.” *Journal of the American College of Cardiology* 61(2):196–206. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23273292>).
- de Meyts, Pierre. 2004. “Insulin and Its Receptor: Structure, Function and Evolution.” *BioEssays* 26(12):1351–62.

- Mézière, C. et al. 1997. “In Vivo T Helper Cell Response to Retro-Inverso Peptidomimetics.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159(7):3230–37. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317121>).
- Miller, R. A., A. R. Oseroff, P. T. Stratte, and R. Levy. 1983. “Monoclonal Antibody Therapeutic Trials in Seven Patients with T-Cell Lymphoma.” *Blood* 62(5):988–95. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6605169>).
- Mingari, M. C., A. Poggi, R. Bellomo, N. Pella, and L. Moretta. 1991. “Thymic Origin of Some Natural Killer Cells: Clonal Proliferation of Human CD3-16+ Cells from CD3-4-8-Thymocyte Precursors Requires the Presence of H9 Leukemic Cells.” *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 21(2):176–78. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840028>).
- Mok, Wendy W. K. and Yingfu Li. 2014. “Therapeutic Peptides: New Arsenal against Drug Resistant Pathogens.” *Current Pharmaceutical Design* 20(5):771–92. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23688084>).
- Mond, J. J., Q. Vos, A. Lees, and C. M. Snapper. 1995. “T Cell Independent Antigens.” *Current Opinion in Immunology* 7(3):349–54. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546399>).
- Monteiro, Renato C. and Jan G. J. van de Winkel. 2003. “I <sc>G</Sc> A F <sc>C</Sc> R <sc>ECEPTORS</Sc>.” *Annual Review of Immunology* 21(1):177–204. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141011>).
- Morimoto, C. et al. 1985. “The Isolation and Characterization of the Human Helper Inducer T Cell Subset.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 134(6):3762–69. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3157750>).
- Moritz, Bernd and Jan Olaf Stracke. 2017. “Assessment of Disulfide and Hinge Modifications in Monoclonal Antibodies.” *Electrophoresis* 38(6):769–85. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27982442>).
- Moussa, Ehab M. et al. 2016. “Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105(2):417–30. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26869409>).
- Murdaca, Giuseppe et al. 2016. “Immunogenicity of Infliximab and Adalimumab: What Is Its Role in Hypersensitivity and Modulation of Therapeutic Efficacy and Safety?” *Expert Opinion on Drug Safety* 15(1):43–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26559805>).
- Murphy, Kenneth et al. 2014. *Janeway’s Immunobiology*. 8th editio. edited by Garland Science. New York: Garland Science.
- Nair, Deepak T. et al. 2003. “Mimicry of Native Peptide Antigens by the Corresponding Retro-Inverso Analogs Is Dependent on Their Intrinsic Structure and Interaction Propensities.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170(3):1362–73. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538696>).
- Naquet, P. et al. 1988. “T Cell Autoreactivity to Insulin in Diabetic and Related Non-Diabetic Individuals.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 140(8):2569–78. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2451692>).

- Narhi, Linda O., Jeremy Schmit, Karoline Bechtold-Peters, and Deepak Sharma. 2012. "Classification of Protein Aggregates." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101(2):493–98. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21989781>).
- Nature. 1958. "1958 - Nature.Pdf." *Nature*, June 28, 1. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/1811767a0>).
- Nedjic, Jelena, Martin Aichinger, Jan Emmerich, Noboru Mizushima, and Ludger Klein. 2008. "Autophagy in Thymic Epithelium Shapes the T-Cell Repertoire and Is Essential for Tolerance." *Nature* 455(7211):396–400.
- Nef, S. and L. F. Parada. 1999. "Cryptorchidism in Mice Mutant for *Insl3*." *Nature Genetics* 22(3):295–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391220>).
- Nencini, Francesca et al. 2014. "Assays and Strategies for Immunogenicity Assessment of Biological Agents." *Drug Development Research* 75 Suppl 1:S4-6. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25381974>).
- Nishana, Mayilaadumveetil and Sathees C. Raghavan. 2012. "Role of Recombination Activating Genes in the Generation of Antigen Receptor Diversity and Beyond." *Immunology* 137(4):271–81.
- Nishimura, Michael I. et al. 1999. "MHC Class I-Restricted Recognition of a Melanoma Antigen by a Human CD4+ Tumor Infiltrating Lymphocyte." *Cancer Research* 59(24):6230–38.
- Norcross, M. A. 1984. "A Synaptic Basis for T-Lymphocyte Activation." *Annales de l'Institut Pasteur - Immunology* 135(2):113–34.
- Novartis. 2014. *Reasanz Briefing Document*. Retrieved (<https://www.pharmamedtechbi.com/~/media/Supporting Documents/The Pink Sheet DAILY/2014/March/32514 novartis briefing docs.pdf>).
- Oettinger, Marjorie A. 2004. "How to Keep V(D)J Recombination under Control." *Immunological Reviews* 200:165–81. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242404>).
- Oettinger, Marjorie A., David G. Schatz, Carolyn Gorka, and David Baltimore. 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 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2360047>).
- Osmond, D. G. 1986. "Population Dynamics of Bone Marrow B Lymphocytes." *Immunological Reviews* 93(93):103–24.
- Ota, Miho, Sumiko Yoshida, Masanori Nakata, Toshihiko Yada, and Hiroshi Kunugi. 2018. "The Effects of Adjunctive Intranasal Oxytocin in Patients with Schizophrenia." *Postgraduate Medicine* 130(1):122–28. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29105546>).
- Out, H. J., S. G. Driessen, B. M. Mannaerts, and H. J. Coelingh Bennink. 1997. "Recombinant Follicle-Stimulating Hormone (Follitropin Beta, Puregon) Yields Higher Pregnancy Rates in in Vitro Fertilization than Urinary Gonadotropins." *Fertility and Sterility* 68(1):138–42. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207599>).

- Owen, Judith, J. Punt, and S. Stanford. 2014. *Immunologie, Le Cours de Janis Kuby Avec Questions de Révision, Sciences de La Vie*. 7ème édit. Dunod.
- Palmer, Matthew T. and Casey T. Weaver. 2010. “Autoimmunity: Increasing Suspects in the CD4 + T Cell Lineup.” *Nature Immunology* 11(1):36–40. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1802>).
- Pan, S., T. Trejo, J. Hansen, M. Smart, and C. S. David. 1998. “HLA-DR4 (DRB1*0401) Transgenic Mice Expressing an Altered CD4-Binding Site: Specificity and Magnitude of DR4-Restricted T Cell Response.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161(6):2925–29. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743354>).
- Park, Jung-Hyun, Yun-Jung Lee, Kil Lyong Kim, and Eun-Wie Cho. 2003. “Selective Isolation and Identification of HLA-DR-Associated Naturally Processed and Presented Epitope Peptides.” *Immunological Investigations* 32(3):155–69. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12916706>).
- Patil, Nitin A. et al. 2017. “Relaxin Family Peptides: Structure–activity Relationship Studies.” *British Journal of Pharmacology* 174(10):950–61.
- Paul, C., A. Shimizu, H. Köhler, and F. W. Putnam. 1971. “Structure of the Hinge Region of the Mu Heavy Chain of Human IgM Immunoglobulins.” *Science (New York, N.Y.)* 172(3978):69–72. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4925937>).
- Paul, Sinu et al. 2013. “Evaluating the Immunogenicity of Protein Drugs by Applying in Vitro MHC Binding Data and the Immune Epitope Database and Analysis Resource.” *Clinical & Developmental Immunology* 2013:467852. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24222776>).
- Perovic, I. et al. 2009. “Allergenicity and Immunogenicity of the Major Mugwort Pollen Allergen Art v 1 Chemically Modified by Acetylation.” *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39(3):435–46. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19178539>).
- Perry, V. H. and S. Gordon. 1987. “Modulation of CD4 Antigen on Macrophages and Microglia in Rat Brain.” *The Journal of Experimental Medicine* 166(4):1138–43. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Perumal, Madhusoothanan Bhagavathi and Saranya Dhanasekaran. 2014. “Relaxin: A Missing Link in the Pathomechanisms of Systemic Lupus Erythematosus?” *Modern Rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 24(4):547–51. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251992>).
- PharmaCompass. 2017. *PharmaCompass 27 2016 Annual Report Compilation*. Retrieved (<https://www.pharmacompass.com/data-compilation/product-sales-data-from-annual-reports-of-major-pharmaceutical-companies-2016>).
- Piccinni, M. P. et al. 1999. “Relaxin Favors the Development of Activated Human T Cells into Th1-like Effectors.” *European Journal of Immunology* 29(7):2241–47. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10427987>).
- Pieper, Kathrin, Bodo Grimbacher, and Hermann Eibel. 2013. “B-Cell Biology and Development.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(4):959–71. Retrieved

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>).

- Pinkhasov, Julia et al. 2011. "Recombinant Plant-Expressed Tumour-Associated MUC1 Peptide Is Immunogenic and Capable of Breaking Tolerance in MUC1.Tg Mice." *Plant Biotechnology Journal* 9(9):991–1001. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740504>).
- Pinto, Sheena et al. 2013. "Overlapping Gene Coexpression Patterns in Human Medullary Thymic Epithelial Cells Generate Self-Antigen Diversity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(37):E3497-505. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23980163>).
- Pirowska, Magdalena M. et al. 2015. "Autoimmunogenicity during Anti-TNF Therapy in Patients with Psoriasis and Psoriatic Arthritis." *Postepy Dermatologii i Alergologii* 32(4):250–54. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26366147>).
- Ponikowski, Piotr et al. 2014. "A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Study to Assess Haemodynamic Effects of Serelaxin in Patients with Acute Heart Failure." *European Heart Journal* 35(7):431–41.
- Porcelli, S., Ct Morita, and Mb Brenner. 1992. "CD1b Restricts the Response of Human CD4-8- T Lymphocytes to a Microbial Antigen." *Nature* 360(6404):593–97. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281285>).
- Porter, R. R. and E. M. Press. 1962. "Immunochemistry." *Annual Review of Biochemistry* 31(2):625–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14488087>).
- Porter, Rodney R. 1973. "Structural Studies of Immunoglobulins." *Scandinavian Journal of Immunology* 34(4):382–88.
- Pot, Caroline et al. 2009. "Cutting Edge: IL-27 Induces the Transcription Factor c-Maf, Cytokine IL-21, and the Costimulatory Receptor ICOS That Coordinately Act Together to Promote Differentiation of IL-10-Producing Tr1 Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(2):797–801. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570826>).
- Prasad, B. V and P. Balaram. 1984. "The Stereochemistry of Peptides Containing Alpha-Aminoisobutyric Acid." *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 16(4):307–48. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6389004>).
- Quesnel, A. et al. 2001. "Synthesis and Antigenic Properties of Reduced Peptide Bond Analogues of an Immunodominant Epitope of the Melanoma MART-1 Protein." *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 7(3):157–65. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297352>).
- Rand, M. D., M. Kalafatis, and K. G. Mann. 1994. "Platelet Coagulation Factor Va: The Major Secretory Platelet Phosphoprotein." *Blood* 83(8):2180–90. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161784>).
- Rebello, P. R., Geoffrey Hale, P. J. Friend, S. P. Cobbold, and H. Waldmann. 1999. "Anti-Globulin Responses to Rat and Humanized CAMPATH-1 Monoclonal Antibody Used to Treat Transplant Rejection." *Transplantation* 68(9):1417–20. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573085>).

- Reddy, P. S. and R. B. Corley. 1998. "Assembly, Sorting, and Exit of Oligomeric Proteins from the Endoplasmic Reticulum." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 20(7):546–54.
- Ren, X. F., H. Zhao, X. C. Gong, L. N. Wang, and J. F. Ma. 2015. "RLN2 Regulates in Vitro Invasion and Viability of Osteosarcoma MG-63 Cells via S100A4/MMP-9 Signal." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19(6):1030–36. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855929>).
- Richards, David M. et al. 2015. "Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 136:175–205. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615097>).
- Richards, S. M., T. A. Olson, and J. M. McPherson. 1993. "Antibody Response in Patients with Gaucher Disease after Repeated Infusion with Macrophage-Targeted Glucocerebrosidase." *Blood* 82(5):1402–9. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364193>).
- Robey, Ellen et al. 1996. "An Activated Form of Notch Influences the Choice between CD4 and CD8 T Cell Lineages." *Cell* 87(3):483–92.
- Robinson, J. P., J. B. Picklesimer, and D. Puett. 1975. "Tetanus Toxin. The Effect of Chemical Modifications on Toxicity, Immunogenicity, and Conformation." *The Journal of Biological Chemistry* 250(18):7435–42. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/809435>).
- Romani, N. et al. 1989. "Presentation of Exogenous Protein Antigens by Dendritic Cells to T Cell Clones. Intact Protein Is Presented Best by Immature, Epidermal Langerhans Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 169(3):1169–78. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2189287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Rudelli, R. D., M. W. Ambler, and H. M. Wisniewski. 1984. "Morphology and Distribution of Alzheimer Neuritic (Senile) and Amyloid Plaques in Striatum and Diencephalon." *Acta Neuropathologica* 64(4):273–81. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6542292>).
- Rudolph, Markus G. and Ian A. Wilson. 2002. "The Specificity of TCR/PMHC Interaction." *Current Opinion in Immunology* 14(1):52–65.
- Ruffilli, A. and M. Menegozzo. 1975. "Quantitative Analysis of an Idiotypic Determinant of Light Chains of Normal Human IgG and IgM." *European Journal of Immunology* 5(1):73–74.
- Sagan, Sandrine, Philippe Karoyan, Olivier Lequin, Gérard Chassaing, and Solange Lavielle. 2004. "N- and Calpha-Methylation in Biologically Active Peptides: Synthesis, Structural and Functional Aspects." *Current Medicinal Chemistry* 11(21):2799–2822. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544477>).
- Sakano, Hitoshi, John H. Rogers, et al. 1979. "Domains and the Hinge Region of an Immunoglobulin Heavy Chain Are Encoded in Separate DNA Segments." *Nature* 277(5698):627–33.
- Sakano, Hitoshi, Konrad Hüppi, Günther Heinrich, and Susumu Tonegawa. 1979. "Sequences at

- the Somatic Recombination Sites of Immunoglobulin Light-Chain Genes.” *Nature* 280(5720):288–94.
- Sakano, Hitoshi, Richard Maki, Yoshikazu Kurosawa, William Roeder, and Susumu Tonegawa. 1980. “Two Types of Somatic Recombination Are Necessary for the Generation of Complete Immunoglobulin Heavy-Chain Genes.” *Nature* 286(5774):676–83.
- Sakarellos-Daitsiotis, M. et al. 1999. “Peptide Carriers: A Helicoid-Type Sequential Oligopeptide Carrier (SOC(n)) for Multiple Anchoring of Antigenic/Immunogenic Peptides.” *Methods (San Diego, Calif.)* 19(1):133–41. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10525449>).
- Salazar-Fontana, Laura I. et al. 2017. “Approaches to Mitigate the Unwanted Immunogenicity of Therapeutic Proteins during Drug Development.” *The AAPS Journal* 19(2):377–85. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28083796>).
- Samelson, L. E., J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1985. “Identification of the Components of the Murine T Cell Antigen Receptor Complex.” *Cell* 43(November):223–31.
- Samuel, Chrisan S. et al. 2005. “The Relaxin Gene Knockout Mouse: A Model of Progressive Scleroderma.” *The Journal of Investigative Dermatology* 125(4):692–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16185267>).
- Sant, Andrea J. et al. 2005. “The Relationship between Immunodominance, DM Editing, and the Kinetic Stability of MHC Class II:Peptide Complexes.” *Immunological Reviews* 207:261–78. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16181342>).
- Sato, Aaron K., Malini Viswanathan, Rachel B. Kent, and Clive R. Wood. 2006. “Therapeutic Peptides: Technological Advances Driving Peptides into Development.” *Current Opinion in Biotechnology* 17(6):638–42. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049837>).
- Sato, H. et al. 2015. “Characterization of Anti-P Monoclonal Antibodies Directed against the Ribosomal Protein-RNA Complex Antigen and Produced Using Murphy Roths Large Autoimmune-Prone Mice.” *Clinical and Experimental Immunology* 179(2):236–44. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25255895>).
- Sato, Naoki et al. 2017. “Evaluating the Efficacy, Safety, and Tolerability of Serelaxin When Added to Standard Therapy in Asian Patients With Acute Heart Failure: Design and Rationale of RELAX-AHF-ASIA Trial.” *Journal of Cardiac Failure* 23(1):63–71. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2016.10.016>).
- Sato, Naoki et al. 2015. “Multicenter, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Phase II Study of Serelaxin in Japanese Patients With Acute Heart Failure.” *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society* 79(6):1237–47.
- Satpathy, Ansuman T., Xiaodi Wu, Jörn C. Albring, and Kenneth M. Murphy. 2012. “Re(de)Finining the Dendritic Cell Lineage.” *Nature Immunology* 13(12):1145–54.
- Sauerborn, Melody, Vera Brinks, Wim Jiskoot, and Huub Schellekens. 2010. “Immunological Mechanism Underlying the Immune Response to Recombinant Human Protein Therapeutics.” *Trends in Pharmacological Sciences* 31(2):53–59. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963283>).

- Scagnolari, Carolina et al. 2002. "Neutralizing and Binding Antibodies to IFN-Beta: Relative Frequency in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients Treated with Different IFN-Beta Preparations." *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22(2):207–13. Retrieved (<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/107999002753536176>).
- Schaerli, P. et al. 2000. "CXC Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function." *The Journal of Experimental Medicine* 192(11):1553–62.
- Scharff, M. D. and R. Laskov. 1970. "Synthesis and Assembly of Immunoglobulin Polypeptide Chains." *Progress in Allergy* 14(1970):37–80. Retrieved (<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emc11&AN=0008238203%0Ahttp://elibrary.cf.ac.uk/sfx?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=0079-6034&isbn=&volume=14&issue=1970&spage=37&pages=37-80&date=1970&title=Progress+in+Allergy&ati>).
- Schatz, David G., Marjorie A. Oettinger, and David Baltimore. 1989. "The V(D)J Recombination Activating Gene, RAG-1." *Cell* 59(6):1035–48.
- Schellekens, Huub, Wim E. Hennink, and Vera Brinks. 2013. "The Immunogenicity of Polyethylene Glycol: Facts and Fiction." *Pharmaceutical Research* 30(7):1729–34. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673554>).
- Schiemann, B. 2001. "An Essential Role for BAFF in the Normal Development of B Cells Through a BCMA-Independent Pathway." *Science* 293(5537):2111–14. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1061964>).
- Schmid, S. L. and M. R. Jackson. 1994. "Immunology. Making Class II Presentable." *Nature* 369(6476):103–4. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8177315>).
- van Schouwenburg, Pauline A. et al. 2013. "Adalimumab Elicits a Restricted Anti-Idiotypic Antibody Response in Autoimmune Patients Resulting in Functional Neutralisation." *Annals of the Rheumatic Diseases* 72(1):104–9. Retrieved (<http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2012-201445>).
- Schur, P. H. 1987. "IgG Subclasses--a Review." *Annals of Allergy* 58(2):89–96, 99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3544971>).
- Schwabe, C. and J. K. McDonald. 1977. "Relaxin: A Disulfide Homolog of Insulin." *Science (New York, N.Y.)* 197(4306):914–15. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/887933>).
- Seah, P. P. et al. 1973. "Alternate-Pathway Complement Fixation by IgA in the Skin in Dermatitis Herpetiformis." *Lancet (London, England)* 2(7822):175–77. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4124252>).
- Seibold, J. R. et al. 1998. "Safety and Pharmacokinetics of Recombinant Human Relaxin in Systemic Sclerosis." *The Journal of Rheumatology* 25(2):302–7. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9489823>).
- Seibold, James R. et al. 2000. "Recombinant Human Relaxin in the Treatment of Scleroderma. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Annals of Internal Medicine* 132(11):871–79.

- Selvaraj, P. et al. 1987. "The T Lymphocyte Glycoprotein CD2 Binds the Cell Surface Ligand LFA-3." *Nature* 326(6111):400–403. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2951597>).
- Sette, A. et al. 1987. "Structural Characteristics of an Antigen Required for Its Interaction with Ia and Recognition by T Cells." *Nature* 328(6129):395–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3497349>).
- Shankar, G. et al. 2014. "Assessment and Reporting of the Clinical Immunogenicity of Therapeutic Proteins and Peptides—Harmonized Terminology and Tactical Recommendations." *The AAPS Journal* 16(4):658–73. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1208/s12248-014-9599-2>).
- Shen, Kuan-Yin et al. 2014. "Molecular Mechanisms of TLR2-Mediated Antigen Cross-Presentation in Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192(9):4233–41. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24683188>).
- Sherwood, O. David. 2004. "Relaxin's Physiological Roles and Other Diverse Actions." *Endocrine Reviews* 25(2):205–34.
- Sherwood, OD. 1994. "Relaxin." Pp. 861–1009 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Amsterdam: Elsevier.
- Shin, Haina and Akiko Iwasaki. 2013. "Tissue-Resident Memory T Cells." *Immunological Reviews* 255(1):165–81. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23947354>).
- Shulman, S., C. Riera, and C. Yantorno. 1968. "Studies on Organ Specificity XIX. Antigenic Specificity of Seminal Plasma and the Formation of Autoantibodies." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 100(3):682–88. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4966846>).
- Simon, M. 2009. "Les Lymphocytes T." Retrieved November 30, 2017 (<http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-lymphocytes-t.html>).
- Singer, Alfred. 2002. "New Perspectives on a Developmental Dilemma: The Kinetic Signaling Model and the Importance of Signal Duration for the CD4/CD8 Lineage Decision." *Current Opinion in Immunology* 14(2):207–15. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869894>).
- Skarlas, Theodore et al. 2011. "Influenza Virus H5N1 Hemagglutinin (HA) T-Cell Epitope Conjugates: Design, Synthesis and Immunogenicity." *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society* 17(3):226–32. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21308879>).
- Snell, G. D. 1968. "The H-2 Locus of the Mouse: Observations and Speculations Concerning Its Comparative Genetics and Its Polymorphism." *Folia Biologica* 14(5):335–58. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4881822>).
- Sokoya, Mofiyinfolu et al. 2017. "Expression of Immunoglobulin D Is Increased in Chronic Rhinosinusitis." *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 119(4):317–323.e1.
- Sommer, Frank, Magdalena Huber, Martin Röllinghoff, and Michael Lohoff. 1995. "CD44 Plays a Co-Stimulatory Role in Murine T Cell Activation: Ligation of CD44 Selectively Co-Stimulates IL-2 Production, but Not Proliferation in TCR-Stimulated Murine Th1

- Cells.” *International Immunology* 7(11):1779–86.
- Sozzani, S. et al. 1997. “Receptor Expression and Responsiveness of Human Dendritic Cells to a Defined Set of CC and CXC Chemokines.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159(4):1993–2000. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257866>).
- Spanel-Borowski, Katharina, Iris Schfer, Stephan Zimmermann, Wolfgang Engel, and Ibrahim M. Adham. 2001. “Increase in Final Stages of Follicular Atresia and Premature Decay of Corpora Lutea in Ins13-Deficient Mice.” *Molecular Reproduction and Development* 58(3):281–86.
- Spiegelberg, Hans L. 1989. “Biological Role of Different Antibody Classes.” *International Archives of Allergy and Immunology* 90(1):22–27. Retrieved (<http://www.karger.com/Article/Abstract/235071>
<http://www.karger.com/Article/FullText/235071%5Cnhttp://www.karger.com/Article/Abstract/235071%5Cnhttp://www.karger.com/Article/FullText/235071%5Cnhttp://www.karger.com/doi/10.1159/000235071>).
- Steinbrecher, U. P., M. Fisher, J. L. Witztum, and L. K. Curtiss. 1984. “Immunogenicity of Homologous Low Density Lipoprotein after Methylation, Ethylation, Acetylation, or Carbamylation: Generation of Antibodies Specific for Derivatized Lysine.” *Journal of Lipid Research* 25(10):1109–16. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6439810>).
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. 1973. “Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution.” *The Journal of Experimental Medicine* 137(5):1142–62. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4573839%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2139237>).
- Stern, L. J. et al. 1994. “Crystal Structure of the Human Class II MHC Protein HLA-DR1 Complexed with an Influenza Virus Peptide.” *Nature* 368(6468):215–21. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145819>).
- Stone, Tracy A. and Charles M. Deber. 2017. “Therapeutic Design of Peptide Modulators of Protein-Protein Interactions in Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1859(4):577–85. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.08.013>).
- Strand, James, Chi-Ting Huang, and Jin Xu. 2013. “Characterization of Fc-Fusion Protein Aggregates Derived from Extracellular Domain Disulfide Bond Rearrangements.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102(2):441–53. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242781>).
- Sturniolo, Tiziana et al. 1999. “Generation of Tissue-Specific and Promiscuous HLA Ligand Databases Using DNA Microarrays and Virtual HLA Class II Matrices.” *Nature Biotechnology* 17(6):555–61.
- Sudo, Satoko et al. 2003. “H3 Relaxin Is a Specific Ligand for LGR7 and Activates the Receptor by Interacting with Both the Ectodomain and the Exoloop 2.” *The Journal of Biological Chemistry* 278(10):7855–62. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506116>).

- Suntharalingam, Ganesh et al. 2006. "Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412." *The New England Journal of Medicine* 355(10):1018–28. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16908486>).
- Sze, D. M., K. M. Toellner, C. García de Vinuesa, D. R. Taylor, and I. C. MacLennan. 2000. "Intrinsic Constraint on Plasmablast Growth and Extrinsic Limits of Plasma Cell Survival." *The Journal of Experimental Medicine* 192(6):813–21.
- Tait, Brian D. 2011. "The Ever-Expanding List of HLA Alleles: Changing HLA Nomenclature and Its Relevance to Clinical Transplantation." *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)* 25(1):1–8. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030236>).
- Takaba, Hiroyuki et al. 2015. "Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance." *Cell* 163(4):975–87. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.013>).
- Takaba, Hiroyuki and Hiroshi Takayanagi. 2017. "The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus." *Trends in Immunology* 38(11):805–16. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.07.010>).
- Takeuchi, Osamu and Shizuo Akira. 2010. "Pattern Recognition Receptors and Inflammation." *Cell* 140(6):805–20. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872>).
- Tan, Y. Y., J. D. Wade, G. W. Tregear, and R. J. Summers. 1998. "Comparison of Relaxin Receptors in Rat Isolated Atria and Uterus by Use of Synthetic and Native Relaxin Analogues." *British Journal of Pharmacology* 123(4):762–70.
- Tangri, Shabnam et al. 2005. "Rationally Engineered Therapeutic Proteins with Reduced Immunogenicity." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174(6):3187–96. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749848>).
- Teerlink, John R. et al. 2016. "RELAX-REPEAT: A Multicenter, Prospective, Randomized, Double-Blind Study Evaluating the Safety and Tolerability of Repeat Doses of Serelaxin in Patients with Chronic Heart Failure." *Journal of Cardiac Failure* 22(8):S14–15. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1071916416301762>).
- Teerlink, John R. et al. 2009. "Relaxin for the Treatment of Patients with Acute Heart Failure (Pre-RELAX-AHF): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled, Parallel-Group, Dose-Finding Phase Iib Study." *The Lancet* 373(9673):1429–39. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60622-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60622-X)).
- Teerlink, John R. et al. 2013. "Serelaxin, Recombinant Human Relaxin-2, for Treatment of Acute Heart Failure (RELAX-AHF): A Randomised Placebo-Controlled Trial." *The Lancet* 381(9860):29–39. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61855-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61855-8)).
- Teerlink, John R. et al. 2017. "Serelaxin in Addition to Standard Therapy in Acute Heart Failure: Rationale and Design of the RELAX-AHF-2 Study." *European Journal of Heart Failure* 19(6):800–809.
- Teh, L. C. et al. 1987. "Methionine Oxidation in Human Growth Hormone and Human Chorionic Somatomammotropin. Effects on Receptor Binding and Biological Activities." *The Journal of Biological Chemistry* 262(14):6472–77. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3571265>).

- Tevz, Gregor et al. 2016. "Identification of a Novel Fusion Transcript between Human Relaxin-1 (RLN1) and Human Relaxin-2 (RLN2) in Prostate Cancer." *Molecular and Cellular Endocrinology* 420:159–68. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26499396>).
- Texier, C. et al. 2000. "HLA-DR Restricted Peptide Candidates for Bee Venom Immunotherapy." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164(6):3177–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706708>).
- Texier, Catherine et al. 2002. "Emerging Principles for the Design of Promiscuous HLA-DR-Restricted Peptides: An Example from the Major Bee Venom Allergen." *European Journal of Immunology* 32(12):3699–3707. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516563>).
- Thau, R. B. et al. 1988. "Failure of Gonadotropin Therapy Secondary to Chorionic Gonadotropin-Induced Antibodies." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 66(4):862–67. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3279065>).
- Thomas, M. L. 1989. "The Leukocyte Common Antigen Family." *Annual Review of Immunology* 7:339–69. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523715>).
- Turner, Lorenz et al. 2015. "The Molecular Basis for Development of Proinflammatory Autoantibodies to Progranulin." *Journal of Autoimmunity* 61:17–28. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26005049>).
- Tonegawa, Susumu. 1983. "Somatic Generation of Antibody Diversity." *Nature* 302(5909):575–81.
- Topp, Max S. et al. 2014. "Phase II Trial of the Anti-CD19 Bispecific T Cell-Engager Blinatumomab Shows Hematologic and Molecular Remissions in Patients with Relapsed or Refractory B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Clinical Oncology* 32(36):4134–40.
- Townsend, A. R. M. et al. 1986. "The Epitopes of Influenza Nucleoprotein Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes Can Be Defined with Short Synthetic Peptides." *Cell* 44(6):959–68.
- Trowsdale, J., J. Ragoussis, and R. D. Campbell. 1991. "Map of the Human MHC." *Immunology Today* 12(12):443–46. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1786080>).
- Tseng, L., H. H. Zhu, J. Mazella, H. Koistinen, and M. Seppälä. 1999. "Relaxin Stimulates Glycodelin mRNA and Protein Concentrations in Human Endometrial Glandular Epithelial Cells." *Molecular Human Reproduction* 5(4):372–75. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10321810>).
- Tugyi, Regina et al. 2005. "Partial D-Amino Acid Substitution: Improved Enzymatic Stability and Preserved Ab Recognition of a MUC2 Epitope Peptide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(2):413–18. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630090>).
- Ueda, Yoshihiro et al. 2012. "Mst1 Regulates Integrin-Dependent Thymocyte Trafficking and Antigen Recognition in the Thymus." *Nature Communications* 3:1098. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033074>).

- Unemori, Elaine. 2017. "Serelaxin in Clinical Development: Past, Present and Future." *British Journal of Pharmacology* 174(10):921–32. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1111/bph.13695>).
- Unemori, Elaine, Baha Sibai, and Sam L. Teichman. 2009. "Scientific Rationale and Design of a Phase I Safety Study of Relaxin in Women with Severe Preeclampsia." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1160(1):381–84. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2009.03838.x>).
- Usmani, Salman Sadullah et al. 2017. "THPdb: Database of FDA-Approved Peptide and Protein Therapeutics." *PloS One* 12(7):e0181748. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759605>).
- Vaissière, Anaïs et al. 2017. "A Retro-Inverso Cell-Penetrating Peptide for SiRNA Delivery." *Journal of Nanobiotechnology* 15(1):34. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28454579>).
- Vallé, A. et al. 1989. "Activation of Human B Lymphocytes through CD40 and Interleukin 4." *European Journal of Immunology* 19(8):1463–67. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476318>).
- Vandekerckhove, B. A., R. Namikawa, R. Bacchetta, and Maria Grazia Roncarolo. 1992. "Human Hematopoietic Cells and Thymic Epithelial Cells Induce Tolerance via Different Mechanisms in the SCID-Hu Mouse Thymus." *The Journal of Experimental Medicine* 175(4):1033–43. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1348080>).
- VanDyk, L. F., T. W. Wise, B. B. Moore, and K. Meek. 1996. "Immunoglobulin D-H Recombination Signal Sequence Targeting - Effect of D-H Coding and Flanking Regions and Recombination Partner." *J Immunol* 157(9):4005–15.
- Vidarsson, Gestur, Gillian Dekkers, and Theo Rispens. 2014. "IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions." *Frontiers in Immunology* 5(OCT):1–17.
- Vinall, R. L. et al. 2006. "The R273H P53 Mutation Can Facilitate the Androgen-Independent Growth of LNCaP by a Mechanism That Involves H2 Relaxin and Its Cognate Receptor LGR7." *Oncogene* 25(14):2082–93. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434975>).
- Vinall, Ruth L. et al. 2011. "Dual Blockade of PKA and NF-KB Inhibits H2 Relaxin-Mediated Castrate-Resistant Growth of Prostate Cancer Sublines and Induces Apoptosis." *Hormones & Cancer* 2(4):224–38. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789713>).
- Virella, Gabriel and Maria F. Lopes-Virella. 2008. "Atherogenesis and the Humoral Immune Response to Modified Lipoproteins." *Atherosclerosis* 200(2):239–46. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18513726>).
- Vlad, Anda M. et al. 2002. "Complex Carbohydrates Are Not Removed during Processing of Glycoproteins by Dendritic Cells: Processing of Tumor Antigen MUC1 Glycopeptides for Presentation to Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 196(11):1435–46. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461079>).
- Vogel, Wendy H. 2010. "Infusion Reactions: Diagnosis, Assessment, and Management."

- Clinical Journal of Oncology Nursing* 14(2):E10-21. Retrieved December 28, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350882>).
- Voors, Adriaan A. et al. 2014. “Renal Hemodynamic Effects of Serelaxin in Patients with Chronic Heart Failure a Randomized, Placebo-Controlled Study.” *Circulation: Heart Failure* 7(6):994–1002.
- Wadman, M. 2006. “London’s Disastrous Drug Trial Has Serious Side Effects for Research.” *Nature* 440(7083):388–89. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16554763).
- Walsh, Gary. 2014. “Biopharmaceutical Benchmarks 2014.” *Nature Biotechnology* 32(10):992–1000. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/nbt.3040>).
- Walter, W., M. Loos, and M. J. Maeurer. 1999. “Differential Expression of Alternative H2-M Isoforms in B Cells, Dendritic Cells and Macrophages by Proinflammatory Cytokines.” *Molecular Immunology* 36(11–12):733–43. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593512>).
- Wang, F., C. Y. Huang, and O. Kanagawa. 1998. “Rapid Deletion of Rearranged T Cell Antigen Receptor (TCR) Valpha-Jalpha Segment by Secondary Rearrangement in the Thymus: Role of Continuous Rearrangement of TCR Alpha Chain Gene and Positive Selection in the T Cell Repertoire Formation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(20):11834–39. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Wang, Peng et al. 2008. “A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach.” *PLoS Computational Biology* 4(4):e1000048. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18389056>).
- Wang, Xiaoling, Satish K. Singh, and Sandeep Kumar. 2010. “Potential Aggregation-Prone Regions in Complementarity-Determining Regions of Antibodies and Their Contribution towards Antigen Recognition: A Computational Analysis.” *Pharmaceutical Research* 27(8):1512–29. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20422267>).
- Wang, Yow-Ming C. et al. 2016. “Evaluating and Reporting the Immunogenicity Impacts for Biological Products--a Clinical Pharmacology Perspective.” *The AAPS Journal* 18(2):395–403. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4779104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Wei, Xiaoli et al. 2014. “Retro-Inverso Isomer of Angiopep-2: A Stable d-Peptide Ligand Inspires Brain-Targeted Drug Delivery.” *Molecular Pharmaceutics* 11(10):3261–68. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673510>).
- Weigert, M., L. Gatmaitan, E. Loh, J. Schilling, and L. Hood. 1978. “Rearrangement of Genetic Information May Produce Immunoglobulin Diversity.” *Nature* 276(5690):785–90.
- Weinges, K., M. Ehrhardt, and F. Enzmann. 1981. “Comparison of Biosynthetic Human Insulin and Pork Insulin in the Gerritzen Test.” *Diabetes Care* 4(2):180–82. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7011722>).

- Weisbart, Richard H. et al. 2012. "A Cell-Penetrating Bispecific Antibody for Therapeutic Regulation of Intracellular Targets." *Molecular Cancer Therapeutics* 11(10):2169–73. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863609>).
- Weiss, Gerson et al. 2016. "Recombinant Human Relaxin versus Placebo for Cervical Ripening: A Double-Blind Randomised Trial in Pregnant Women Scheduled for Induction of Labour." *BMC Pregnancy and Childbirth* 16:260. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596360>).
- Van Der Westhuizen, E. T., R. J. Summers, M. L. Halls, R. A. D. Bathgate, and P. M. Sexton. 2007. "Relaxin Receptors--New Drug Targets for Multiple Disease States." *Current Drug Targets* 8(1):91–104. Retrieved (<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-4501&volume=8&issue=1&spage=91>).
- Wilkinson, Tracey N. et al. 2005. "Evolution of the Relaxin-like Peptide Family." *BMC Evolutionary Biology* 5(1):14.
- Wolf, Paula R. et al. 1998. "The Phenotype of H-2M-Deficient Mice Is Dependent on the MHC Class II Molecules Expressed." *European Journal of Immunology* 28(9):2605–18.
- Woloschak, G. E. and C. J. Krco. 1987. "Regulation of Kappa/Lambda Immunoglobulin Light Chain Expression in Normal Murine Lymphocytes." *Molecular Immunology* 24(7):751–57. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3116408>).
- Wu, Li and Yong Jun Liu. 2007. "Development of Dendritic-Cell Lineages." *Immunity* 26(6):741–50.
- Xia, Wei et al. 2016. "Engineering a Highly Active Thermophilic β -Glucosidase to Enhance Its PH Stability and Saccharification Performance." *Biotechnology for Biofuels* 9:147. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27446236>).
- Xie, Zuoxu et al. 2015. "Retro-Inverso Bradykinin Opens the Door of Blood-Brain Tumor Barrier for Nanocarriers in Glioma Treatment." *Cancer Letters* 369(1):144–51. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26282786>).
- Yin, Liusong, Xiaoying Chen, Paolo Vicini, Bonita Rup, and Timothy P. Hickling. 2015. "Therapeutic Outcomes, Assessments, Risk Factors and Mitigation Efforts of Immunogenicity of Therapeutic Protein Products." *Cellular Immunology* 295(2):118–26. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25880103>).
- Zavala-Ruiz, Zarixia et al. 2003. "Exploration of the P6/P7 Region of the Peptide-Binding Site of the Human Class II Major Histocompatibility Complex Protein HLA-DR1." *The Journal of Biological Chemistry* 278(45):44904–12. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952957>).
- Zhang, Lianming, Keiko Udaka, Hiroshi Mamitsuka, and Shanfeng Zhu. 2012. "Toward More Accurate Pan-Specific MHC-Peptide Binding Prediction: A Review of Current Methods and Tools." *Briefings in Bioinformatics* 13(3):350–64.
- Zheng, Wei-ping. 1997. "The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells." *Cell* 89:587–96.
- Zhong, Xiaotian and Jill F. Wright. 2013. "Biological Insights into Therapeutic Protein

Modifications throughout Trafficking and Their Biopharmaceutical Applications.” *International Journal of Cell Biology* 2013:273086. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690780>).

Zinkernagel, R. M. 1978. “Thymus and Lymphohemopoietic Cells: Their Role in T Cell Maturation in Selection of T Cells; H-2 Restrictions-Specificity and in H-2 Linked Ir Gene Control.” *Immunol.Rev.* *Immunological Reviews* 42:224.

Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty. 1975. “H-2 Compatability Requirement for T-Cell-Mediated Lysis of Target Cells Infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus. Different Cytotoxic T-Cell Specificities Are Associated with Structures Coded for in H-2K or H-2D;” *The Journal of Experimental Medicine* 141(6):1427–36. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13493557>).

Zuckermann, Ronald N., M. Kerr H. Janice, Stephen B. Kent, and H. Moos. Walter. 1992. “Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-Substituted Glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis.” *J. Am. Chem.* 114(26):10646–47.

Titre : Etude de la réponse des lymphocytes T spécifiques de l'hormone humaine H₂-relaxine et de modifications non-naturelles : perspectives pour la réduction de l'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques.

Mots clés : Immunogénicité, Peptides thérapeutiques, Modifications non-naturelles.

Résumé : Ce projet a accompagné le développement pré-clinique de l'hormone humaine Relaxine-2 (Rln2) ayant induit des anticorps durant des essais cliniques, il est axée autour de 2 problématiques : (1) comprendre son immunogénicité, (2) étudier l'impact de modifications chimiques sur l'immunogénicité afin d'augmenter sa stabilité.

Compte tenu du rôle des lymphocytes T CD4 dans les réponses immunitaires, la fréquence de cellules T spécifiques de la Rln2 dans un large panel de donneurs sains a été estimée et a permis d'expliquer le développement d'anticorps anti-Rln2. La cartographie des épitopes T a ensuite identifié les zones portant son immunogénicité.

Puis, 6 modifications chimiques (acide aminé D, acide aminé isobutyrique, peptoïde, N-méthylation,

C-méthylation et réduction de la liaison peptidique) utilisées pour augmenter la demi-vie ont été introduites à la plupart des positions d'un peptide hautement immunogène. La reconnaissance par des cellules T, la liaison aux molécules de présentation et la capacité à induire des lymphocytes T CD4 ont été étudiées pour les peptides analogues modifiés. La plupart des modifications se sont révélées être très efficaces pour minimiser les propriétés immunogéniques.

Ce projet de thèse se situe donc à la croisée des chemins entre l'acquisition de connaissances nouvelles en immunologie et leur application dans des processus de conception et de gestion des risques de peptides thérapeutiques.

Title: Study of the response of human hormone H₂-relaxin-specific T-cells and non-natural modifications: perspectives for the reduction of the immunogenicity of therapeutic proteins and peptides.

Keywords: Immunogenicity, Therapeutic peptides, Non-natural modifications.

Abstract: This project has accompanied the pre-clinical development of the human hormone Relaxin-2 (Rln2) that induced antibodies during clinical trials, it focuses on two issues: (1) to understand its immunogenicity, (2) to study the impact of unnatural modifications on immunogenicity to increase its stability.

Given the role of CD4 T-cells in immune responses, the frequency of Rln2-specific T-cells in a large panel of healthy donors was estimated, and explained the development of anti-Rln2 antibodies. The T epitope mapping then identified the areas responsible for its immunogenicity.

Then, 6 unnatural modifications (D amino acid,

amino isobutyric acid, peptoid, N-methylation, C-methylation & reduced peptide bond) used to increase the half-life were introduced at most positions of a highly immunogenic peptide. T-cell recognition, binding to HLA molecules and the ability to induce CD4 T-cells were studied for modified analog peptides. Most of the modifications were very effective in minimizing immunogenic properties.

This thesis project is at the crossroads between the acquisition of new knowledge in immunology and its application in the process of design & risk management of therapeutic peptides.