

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNÉE 2009 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1202

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 19/10/2012

par

Céline ORTEGA

**Ingénierie de fragments d'anticorps pour l'imagerie *in vivo*
de cancers de la sphère génitale**

Directeur de thèse : Didier BOQUET DOCTEUR (CEA iBiTec-S - Saclay)

Composition du jury :

Président du jury : Philippe BILLIALD PROFESSEUR (IFR 141 - Châtenay-Malabry)

Rapporteurs : Daniel BATY DOCTEUR (UMR7258 - Marseilles)
Etienne WEISS PROFESSEUR (UMR 7242 - Strasbourg)

Examineurs : Isabelle NAVARRO-TEULON DOCTEUR (INSERM U896 - Montpellier)
Séverine PADIOLLEAU-LEFEVRE DOCTEUR (UMR 6022 - Compiègne)

Remerciements

Cette thèse a été réalisée dans le Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS) au sein du Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI) du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives. L'ensemble des travaux ont été soutenus par le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur au moyen d'une bourse ministérielle de l'école doctorale « Innovation Thérapeutique » de l'université Paris-Sud, ainsi que par le SPI.

J'adresse mes premiers remerciements au Dr Didier Boquet, mon Directeur de thèse. Tout d'abord, un grand merci pour m'avoir fait confiance et confié ce projet de thèse à l'issue de mon stage de fin d'études. Je te suis particulièrement reconnaissante pour toutes les connaissances scientifiques et techniques que tu m'as apportées tout au long de cette thèse. Je te remercie également pour ta grande disponibilité, tes conseils et surtout tes encouragements dans les moments de doute. Enfin, merci pour ta sympathie et ton indulgence envers les espagnols malgré toutes ces victoires faces aux français...

Je remercie par ailleurs les membres de mon jury, le Dr Daniel Baty et le Pr Etienne Weiss, rapporteurs de cette thèse, qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail. Je remercie également les docteurs Isabelle Navarro-Teulon et Séverine Padiolleau-Lefèvre, avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger au cours de ces années de thèse et qui ont eu la gentillesse d'être examinatrices. Enfin, un grand merci au Pr Philippe Billiald qui a accepté d'apporter son expertise des diabodies pour l'étude de mon travail et la présidence du jury.

De plus, je tiens à remercier le Dr Frédéric Ducancel de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci d'avoir apporté un cadre scientifique de qualité et une convivialité hors pair au LIAS. Un merci particulier pour ton hospitalité un certain 8 décembre 2010 !!

Je remercie les membres de l'équipe ARTIC, en particulier le Pr Jean-Yves Couraud, Amaury Herbet et Narciso Costa, pour leur contribution à l'avancée de ce travail de thèse, pour leur aide, leurs conseils et toute leur sympathie.

Je remercie d'autre part chaleureusement tous les autres membres du LIAS : Alex, pour sa gentillesse et tous les potins discutés, Michel, pour les sympathiques cours d'immuno et de rugby, Jean-Claude pour son humour décalé, Anne, pour ses conseils en cytométrie et sa sympathie. Un merci particulier à Delphine ma colloc de bureau, pour ses conseils en chimie (et en orthographe !), pour sa gentillesse (malgré mes arrivées grincheuses après des heures de bouchons) et sa bonne humeur au quotidien.

Je n'oublie pas les « Bio-meriens », merci à Bruno, pour sa grande gentillesse et ses encouragements à 18h, et Guillaume, pour ses nombreux conseils informatiques et toute sa sympathie.

Je remercie également les « ex-LIAS » : Bertrand, Fabienne, Adeline, Yves, Nicolas, Stéphane, pour leurs conseils et leur gentillesse. Un grand merci en particulier à Marie et Sophie, mes « petites stagiaires » (enfin, bien plus grandes que moi !) qui ont participé à l'amélioration de nos connaissances sur les diabodies.

De plus, je remercie mes divers collaborateurs. Tous mes remerciements aux docteurs Eric Doris et Edmond Gravel, pour leurs conseils dans les couplages chimiques. Je tiens à remercier également le Dr François Fenailles pour son aide précieuse en spectrométrie de masse et toute sa gentillesse.

Par ailleurs, je remercie le Dr Christophe Créminon, chef du SPI, et son service administratif (Sandrine, Laurie et Stéphane Nano) pour les très bonnes conditions de travail dont j'ai bénéficié.

Je remercie également le docteur et enseignante Claude Cabot, avec qui j'ai découvert la didactique au cours de ma mission doctorale. Un grand merci pour les nombreux rappels de physique très pédagogiques et pour les bons moments culturels passés ensemble.

Pour finir, je ne remercierai jamais assez ma famille, Maman, Papa, Teddy, sans oublier « mí Lulu » sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui ! J'ai également une pensée particulière pour mes grands-parents, mémère Lulu, pour tout ton soutien au quotidien et nos rituels porte-bonheur, et pépère Ortega, pour qui je m'attache à honorer le nom. Enfin, merci à toi, mon p'tit homme, mon futur mari, merci pour cet équilibre d'hier, d'aujourd'hui et de demain...

Sommaire

1. Introduction	11
1.1 Les anticorps thérapeutiques et diagnostiques : état de l'art	11
1.1.1 Les anticorps thérapeutiques	11
1.1.2 Les anticorps en imagerie	19
1.1.3 Les anticorps, aspect économique	22
1.2 Vers une médecine personnalisée	24
1.2.1 Le cancer, un challenge diagnostique et thérapeutique sociétal	24
1.2.2 Les anticorps pour le théranostic	24
1.2.3 Les enjeux de la médecine personnalisée	25
1.3 L'imagerie pour le diagnostic <i>in vivo</i>	27
1.3.1 Différentes techniques d'imagerie	28
1.3.2 Les techniques de couplage d'une protéine	36
1.4 Les formats d'anticorps et dérivés adaptés au diagnostic <i>in vivo</i>	41
1.4.1 Les différents formats d'anticorps	41
1.4.2 Les alternatives aux anticorps	45
1.4.3 Quel format le mieux adapté à l'imagerie quantitative ?	48
1.4.4 L'expression de biomolécules dans <i>E. coli</i>	50
1.5 Les tumeurs ovariennes et expression du récepteur de l'hormone anti-müllérienne	55
1.5.1 L'axe AMH	55
1.5.2 L'axe AMH en cancérologie	58
1.5.3 Un anticorps dirigé contre le récepteur de l'AMH de type II : l'anticorps 12G4	60
2. Objectif de la thèse	65
3. Procédures expérimentales	67
3.1 La construction moléculaire des fragments d'anticorps	67
3.1.1 Le clonage des régions variables	67
3.1.2 La construction des plasmides	69
3.2 L'expression, purification et renaturation des diabodies	72
3.2.1 L'expression des diabodies	72
3.2.2 La production des diabodies sous forme de corps d'inclusion	72
3.2.3 La purification des diabodies	74
3.2.4 La renaturation des diabodies purifiés	76
3.3 La caractérisation des diabodies	76
3.3.1 La caractérisation quantitative	76
3.3.2 La caractérisation qualitative	78
3.4 Le marquage du diabody	80
3.4.1 La stratégie de couplage	80
3.4.2 La reconnaissance du récepteur AMHRII par le diabody	82
4. Résultats et Discussions	84
4.1 La preuve du concept : le diabody SHA31	84
4.1.1 L'expression et renaturation des diabodies SHA31	84
4.1.2 L'optimisation générale du protocole de renaturation	88
4.1.3 L'étude de la conformation des diabodies	90
4.1.4 L'étude de la reconnaissance de la protéine PrP par SHA31Dd	92
4.1.5 La conclusion et discussions sur la production d'un diabody	93
4.2 Le développement d'un modèle relevant en cancérologie : le diabody 12G4	95
4.2.1 Les constructions moléculaires	95
4.2.2 La production du diabody 12G4	101
4.2.3 Le marquage du diabody 12G4	114
4.2.4 Les modèles animaux pour l'imagerie	131

5. Conclusions générales et Perspectives	133
6. Bibliographie.....	137
7. Annexe	153

Abreviations et symboles

¹¹¹ In	Indium-111	FcR	Récepteur Fc
¹²³ I	Iode-123	FDA	Food and Drug Administration
¹²⁴ I	Iode-124	Fm	Fragment monomérique
¹²⁵ I	Iode-125	FR	Framework
¹⁷⁷ Lu	Lutetium-177	HAT	Hypoxanthine-Aminoptérine-Thymidine
¹⁸ F	Fluor-18	HCl-Gnd	Chlorure de guanidine
¹⁸ F	FDG Fluoro-déoxyglucose	HGPRT	Hypoxanthine-Guanidine Phosphoribosyl Transferase
⁶⁴ Cu	Cuivre-64	Ig	Immunoglobuline
⁶⁴ Ga	Gallium-64	IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
⁶⁸ Ga	Gallium-68	kDa	kiloDalton
⁷⁶ Br	Brome-76	L_B	Lymphocyte B
⁸⁹ Zr	Zirconium-89	MIS	Müllerian inhibiting substance (Substance inhibitrice müllérienne)
^{94m} Tc	Technétium-94m	NEM	N-ethylmaleimide
^{99m} Tc	Technétium-99m	o/d	over day (1 jour)
a.a	acides aminés	o/n	over night (1 nuit)
AChE	Acétylcholine estérase	o/we	over week end (2 jours + 3 nuits)
AcM	Anticorps monoclonal	pAMHRII	peptide épitopique AMHRII
AMHRII-h	AMHRII humain	pAMHRII-biot	peptide épitopique AMHRII biotinylé
AMHRII-m	AMHRII murin	Redox	oxido-réducteur
AMM	autorisation de mise sur le marché	RIS	radio-immuno-scintigraphie
ANDc	ADN complémentaires	scFv	single chain fragment variable
ARNm	ARNmessaging	SEC	Size Exclusion Chromatographie
BAD	Biotin Acceptor Domain	SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
CDR	Complementary Determining Regions	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
CH	Domaine constant de la chaîne lourde	TEP	photon induced electron transfert
CL	Domaine constant de la chaîne légère	TEP	Positron Emission Tomography
CT	Computed Tomography	TMB	Tetramethylbenzidine
Dd	Diabody dimérique	VH	Domaine variable de la chaîne lourde
Dd*	Diabody dimérique couple à un fluorochrome	VL	Domaine variable de la chaîne légère
Df	Desferrioxamine B		
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay		
Fc	Fragment cristallisable		

Liste des figures

Figure 1 : Prix Nobel en Physiologie de médecine de 1984.....	12
Figure 2 : Structure d'une immunoglobuline et de ses divers fragments.....	13
Figure 3 : Différentes générations d'anticorps thérapeutiques : anticorps murins, chimériques, humanisés et humains.....	16
Figure 4 : (A) Classification pharmacologique des 130 biomédicaments commercialisés en France (B) Classification par aires thérapeutiques des anticorps monoclonaux commercialisés en France.....	22
Figure 5 : Chiffre d'affaire total des biomédicaments.....	23
Figure 6 : Représentation schématique des facteurs associés dans le développement et le succès d'une imagerie en oncologie, médiée par les anticorps.....	27
Figure 7 : Principe de la résonance magnétique.....	28
Figure 8 : Représentation schématique de l'imagerie nucléaire SPECT.....	30
Figure 9 : Représentation schématique de l'imagerie nucléaire TEP.....	31
Figure 10 : Diagramme de Jabłoński.....	34
Figure 11 : Principe du diagnostic ciblé au moyen de biomarqueur dans le cadre de différentes techniques d'imagerie.....	36
Figure 12 : Réaction de couplage du ¹⁸ F au déoxyglucose via la voie nucléophile.....	37
Figure 13 : Représentation schématique du couplage d'une biomolécule <i>via</i> l'agent chélateur DOTA.....	38
Figure 14 : Schématisation des différentes réactions de couplage du 89Zr à un anticorps <i>via</i> l'agent chélatant la desferrioxamine B	38
Figure 15 : Représentation schématique des différents formats d'anticorps.....	41
Figure 16 : Représentation schématique des multimères de scFv.....	43
Figure 17 : Représentation de la structure d'un affibody.....	45
Figure 18 : Représentation des modules protéiques et de la structure 3D typique d'un ligand DARPin.....	46
Figure 19 : Principe de la synthèse protéique dans les cellules procaryotes.....	51
Figure 20 : Principe du rétablissement de protéines fonctionnelles à partir de corps d'inclusion.....	54
Figure 21 : Modèle de l'AMH active (dimère C-terminal).....	55
Figure 22 : Modélisation moléculaire tri-dimensionnelle du récepteur AMHRII.....	56
Figure 23 : Représentation schématique des voies génitales primitives indifférenciées.....	57
Figure 24 : Schéma de la régulation hormonale sur la croissance des follicules.....	57
Figure 25 : Alignements des séquences protéiques du récepteurs AMHRII humain et murin.....	60
Figure 26 : Modélisation vue du haut du domaine extracellulaire de AMHRII-h.....	61
Figure 27 : Etude de l'effet apoptotique <i>in vitro</i> de l'anticorps 12G4.....	61
Figure 28 : Etude de l'effet antiprolifératif des tumeurs <i>in vivo</i> de l'anticorps 12G4.....	62
Figure 29 : Schéma du protocole d'extraction de l'ARN total <i>via</i> GenElute™ Mammalian Total RNA kit.....	67
Figure 30 : Schéma du principe de la Race-PCR.....	68
Figure 31 : Représentation schématique des protéines exprimées dans pSPI4 (haut) et pSPI4-biot (bas).....	70
Figure 32 : Schéma du principe de construction des fragments d'anticorps.....	71
Figure 33 : Vecteur d'expression SPI 4.0.....	71
Figure 34 : Principe du système d'induction dans E. coli BL21 (DE3).....	72
Figure 35 : Représentation schématique du protocole de production de fragments monomériques.....	73
Figure 36 : Schéma de l'interaction mise en jeu lors de la purification sur colonne Ni ²⁺	74
Figure 37 : Système Biologic LP.....	75
Figure 38 : Etapes du dosage BCA.....	77
Figure 39 : Schématisation du test d'immunoanalyse.....	79
Figure 40 : Principe du couplage d'un fluorochrome sur un thiol au moyen d'un maléimide.....	81
Figure 41 : Principes du couplage d'un fluorochrome sur une amine.....	81
Figure 42 : Purification de l'extrait protéique total issu de la resolubilisation des corps d'inclusion contenant par exemple de fragment VL-VH.....	85
Figure 43 : Résultats relatifs de l'immunoanalyse du Dd SHA31 VL-VH.....	86
Figure 44 : Résultats relatifs de l'immunoanalyse du Dd SHA31 VH-VL.....	86
Figure 45 : Représentation schématique des différents formats possibles de Dd.....	87
Figure 46 : Comparaison de la fonctionnalité des différents formats de SHA31Dd.....	88
Figure 47 : Etude de l'agrégation du diabody VL-VH au cours de la renaturation à pH 8 ou pH 10.....	89
Figure 48 : Etude par immuno-analyse de la fonctionnalité du diabody VL-VH renaturé à pH 8 ou pH 10.....	89

Figure 49 : Etude par immuno-analyse de la fonctionnalité du diabody VL-VH renaturé avec un premier contact à l'arginine de durée variable.....	90
Figure 50 : Gel SDS-PAGE après différents traitements du DdSHA31.....	91
Figure 51 : Western Blot, localisation du DdSHA31 avec l'anticorps primaire anti-tag HA.....	91
Figure 52 : Etude en cytométrie en flux de la fixation du diabody SHA31 aux cellules N2a surexprimant la PrP.....	93
Figure 53 : Exemple de l'alignement <i>via</i> MultAlin de 11 séquences d'ADNc issus du clonage de la région variable légère de l'anticorps 12G4.....	95
Figure 54 : Alignement <i>via</i> MultAlin entre les séquences d'ADNc VL (A) et VH (B) de l'anticorps 12G4 obtenues au laboratoire (VL-CO et VH-CO) et par l'équipe de Montpellier (VL-IRCM et VH-IRCM).....	96
Figure 55 : Alignement <i>via</i> MultAlin entre les séquences protéiques VL (A) et VH (B) de l'anticorps 12G4 obtenu au laboratoire (VL-CO et VH-CO) et par l'équipe de Montpellier (VL-IRCM et VH-IRCM).....	96
Figure 56 : Séquence du scFv 12G4 (839 pb).....	98
Figure 57 : Séquence du diabody 12G4 (763 pb).....	99
Figure 58 : Gels d'agaroses 1% pour le suivi des constructions moléculaires.....	100
Figure 59 : Purification du fragment monomérique 12G4 par IMAC.....	102
Figure 60 : Tableau et courbe de calibration de la colonne d'exclusion de taille Hiload 26/60 Superdex 200 dans des conditions dénaturantes (6M HCl-Gnd).....	102
Figure 61 : Purification du fragment monomérique 12G4 par SEC.....	103
Figure 62 : Reconnaissance du peptide pAMHR11-biot par l'anticorps monoclonal.....	104
Figure 63 : Reconnaissance du peptide pAMHR11-biot par le 12G4Dd.....	105
Figure 64 : Analyse de la fonctionnalité par test "ELISA 12G4Dd" des diabodies 12G4 renaturés dans différentes conditions.....	107
Figure 65 : Etude en cytométrie en flux de la fixation des différents formats d'anticorps 12G4 aux cellules tumorale COV434 surexprimant le récepteur AMHR11.....	109
Figure 66 : Analyse du diabody 12G4 après renaturation.....	110
Figure 67 : Purification du 12G4Dd après renaturation.....	111
Figure 68 : Résumé du processus complet d'expression, purification et renaturation du diabody 12G4.....	112
Figure 69 : Etude en cytométrie en flux des différents diab-SH après marquage NSH (A), LSH (B) et CSH (C) se fixant aux cellules murines de neuroblastome (N2a).....	116
Figure 70 : Histogramme représentant les intensités de fluorescence moyenne (MFI) mesurées en cytométrie en flux lors de l'étude de la fixation aux cellules N2a du diabody SHA31 CSH marqué dans différentes conditions.....	117
Figure 71 : Etude en cytométrie en flux des différents diabodies après marquage : NSH (A) et CSH (B) se fixant aux cellules murines de neuroblastome (N2a).....	118
Figure 72 : Etude en cytométrie en flux de la fixation aux cellules murines de neuroblastome (N2a) des diabodies SHA31 marqué sur les amines en tampon urée.....	120
Figure 73 : Analyse en MALDI-TOF de l'efficacité de couplage du FITC sur le peptide C-diab dans différents milieux réactionnels.....	123
Figure 74 : Représentation schématique du couplage des diabodies sur support solide.....	125
Figure 75 : Profil d'élution, <i>via</i> le Biologic-LP, lors de l'immobilisation des anticorps 12G4 sur protéine L.....	126
Figure 76 : Profil d'élution, <i>via</i> le Biologic-LP, lors de l'immobilisation des 12G4Dd par IMAC.....	127
Figure 77 : Profil d'élution, <i>via</i> le Biologic-LP, lors de la purification et du couplage sur phase solide, <i>via</i> une colonne de nickel, du 12G4Fm.....	128
Figure 78 : Etude préliminaire en cytométrie en flux des diabodies 12G4 marqués sur phase solide IMAC puis renaturés..	128
Figure 79 : Souris nude xénotreffées <i>via</i> des lignées tumorales ovariennes COV434-AMHR11.....	132

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les anticorps diagnostiques utilisés en l'imagerie clinique aux Etats-Unis ou en Europe.....	20
Tableau 2 : Les radionucléotides émetteurs de positons utilisés en imagerie TEP.....	36
Tableau 3 : Tableau comparatif des différents formats d'anticorps et leur adaptation à l'imagerie <i>in vivo</i>	47
Tableau 4 : Expression du récepteur AMHRII dans des tissus gynécologiques bénins et malins.....	58
Tableau 5 : Synthèse du protocole de renaturation des fragments d'anticorps.....	76
Tableau 6 : Description des amorces utilisées pour l'assemblage VL-VH constituant le scFv 12G4.....	98
Tableau 7 : Description des amorces utilisées pour l'assemblage VL-VH constituant le diabody 12G4.....	99
Tableau 8 : Résumé des différentes conditions de renaturation.....	106
Tableau 9 : Résumé des différentes conditions de couplage du FITC au peptide CK2.....	122

Préambule

Aujourd'hui, le cancer est devenu la première cause de mortalité à travers le monde. L'organisation mondiale de la santé estime que cette maladie pourrait faire 84 millions de morts entre 2005 et 2015. De plus, le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter. Selon Globocan 2008, la première base de données mondiale sur le cancer, le monde comptera plus de 13 millions de décès annuels par cancer en 2030, contre 7,6 millions en 2008, soit une hausse de 72% en 22 ans. Dans le même temps, la France subit le même fléau, avec en 2011, environ 147 500 décès par cancer et 365 000 nouveaux patients diagnostiqués, soit 1 000 nouveaux cas par jour.

Heureusement, grâce aux moyens importants mis en œuvre pour faire reculer cette maladie à travers le monde, le pronostic de certains cancers s'est considérablement amélioré avec l'arrivée, entre autres, des anticorps thérapeutiques. Ces biomédicaments présentent une spécificité importante pour leur cible et leur capacité à mobiliser le système immunitaire rend compte, en grande partie, de leur efficacité thérapeutique.

Devant l'émergence de ces nouveaux médicaments (à ce jour, plusieurs centaines de molécules en essai clinique) va se poser le problème de la prescription du bon traitement (anticorps thérapeutique) pour le patient. En effet, disposer de nouveaux traceurs spécifiques de ces biomarqueurs permettra de mieux suivre leur expression au cours de l'évolution de la tumeur et de mieux caractériser ainsi l'hétérogénéité des cellules cancéreuses. De plus, de disposer d'approches diagnostiques pour caractériser les biomarqueurs présents à la surface des tumeurs des patients permettra d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique à employer. Avec cette médecine personnalisée, le principe d'adapter la thérapie au diagnostic a pris le nom de « théranostic ».

Dans ce contexte, l'imagerie *in vivo*, devient une approche incontournable pour i) établir un diagnostic, ii) valider les biomarqueurs présents à la surface de la tumeur, iii) suivre l'efficacité du traitement administré sur l'évolution tumorale. Parmi les différentes technologies d'imagerie actuelles, la tomographie à émissions de positons (TEP) reste la seule imagerie quantitative chez l'homme répondant aux conditions du théranostic. Ainsi, face aux nouveaux besoins de l'imagerie moléculaire *in vivo*, il convient de développer de nouveaux traceurs pour l'imagerie TEP.

Si les anticorps monoclonaux sont des molécules efficaces en thérapie en revanche, ils sont inadaptés au diagnostic *in vivo* en raison de leur caractéristique pharmacocinétique. En effet, les anticorps entiers sont maintenus dans la circulation plusieurs jours, générant de ce fait un bruit de fond important du réseau vasculaire empêchant l'obtention rapide d'une image de qualité. Néanmoins, avec l'évolution de l'ingénierie moléculaire, différents formats d'anticorps se présentent comme des sondes adaptées pour le diagnostic *in vivo* des tumeurs.

L'objectif de ma thèse répond à cette évolution avec l'ingénierie et le marquage d'un anticorps recombinant particulièrement adapté à l'imagerie TEP utilisant le fluor 18 (^{18}F -TEP) : le diabody. Ce fragment est la plus petite molécule bivalente pénétrant facilement les tissus jusqu'à sa cible et rapidement éliminer de l'organisme. Le diabody permet ainsi, quelques heures après l'injection, l'obtention du meilleur rapport signal tumoral sur bruit de fond (Cai et al. 2007).

Sur le modèle du récepteur de l'hormone antimüllérienne (AMH), marqueur de certains cancers de la sphère génitale (Bakkum-Gamez et al., 2007), l'équipe du Pr Pelegrin a développé un anticorps monoclonal 12G4 dirigé contre l'AMHRII. Grâce à une collaboration avec cette équipe, mon projet de thèse a reposé principalement sur le développement du diabody 12G4.

Mon manuscrit décrit donc les procédés employés ainsi que les résultats obtenus au cours de ces 3 années de thèses. Ce travail a abouti à la mise en œuvre de méthodes d'expression et de renaturation originales de fragments diabodies qui améliorent considérablement le rendement de production, atteignant ainsi plusieurs dizaines de milligrammes de protéines par litre de culture bactérienne. Cette première partie de résultats a donné lieu à un article scientifique (en ligne depuis aout 2012). De plus, les différentes stratégies de couplage chimique du diabody exposées ici, nous permettent d'envisager le développement de ces nouvelles protéines pour l'imagerie *in vivo* ce qui fera l'objet d'un second article. Avant d'aborder la partie résultats, l'introduction établit le contexte scientifique général de ce projet de recherche suivi de la description du modèle utilisé : l'axe AMH.

1 Introduction

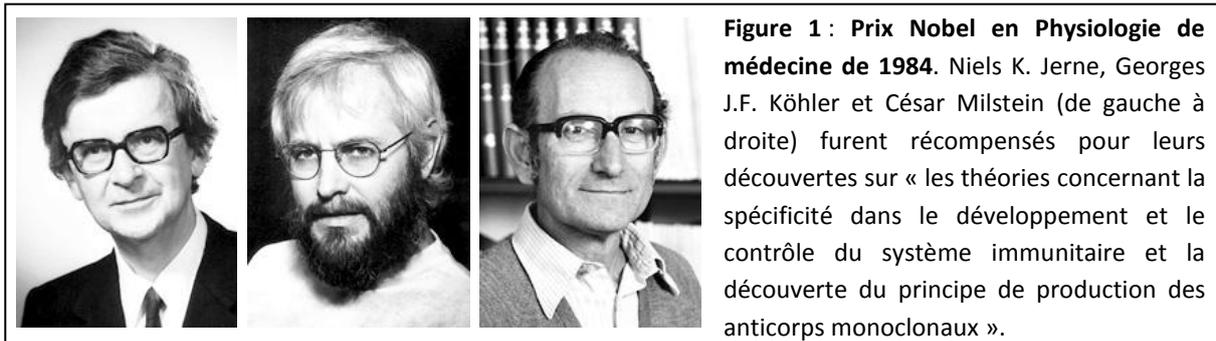
1.1 Les anticorps thérapeutiques et diagnostiques : état de l'art

1.1.1 Les anticorps thérapeutiques

Un biomédicament est défini comme « *tout médicament dont la substance est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle* » (article L. 5 121-1 modifié du code de la santé publique Française). Ces médicaments biologiques représentent une part croissante dans l'innovation thérapeutique, avec en particulier, l'essor des anticorps thérapeutiques.

1.1.1.1 Un peu d'histoire

Il y a déjà plus d'un siècle, en 1890 exactement, Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato découvrirent que l'état d'immunité, conféré par l'injection d'une faible dose de toxine diphtérique, pouvait être transmis à des individus naïfs par transfert de sérum (publication des travaux de (Behring and Kitasato, 1965). C'est ainsi que naissait la sérothérapie initiant une révolution médicale, celle des anticorps thérapeutiques. Par la suite, l'activité neutralisante des antisera fut rapidement attribuée aux anticorps, un terme initialement utilisé par Paul Ehrlich en 1891 pour désigner les gamma globulines du sérum, dont la structure fut élucidée partiellement en 1950 par Rodney Porter (Porter, 1950). Dans le même temps, en 1948, Astrid Fagreaus identifia les cellules B spécialisées, les plasmocytes, comme productrices *in vivo* des anticorps (Fagreaus, 1948). Ensuite, se sont succédées différentes avancées techniques, en particulier des travaux de Georges Barski sur la production de cellules hybrides, de Michael Potter sur l'établissement de lignées myélomateuses murines *in vitro*, de Yoshio Okada sur la fusion cellulaire par le virus de Sendai et de John Littlefield sur les cellules comportant des déficiences enzymatiques (Barski et al., 1960; Okada, 1962; Potter and Boyce, 1962; Littlefield, 1964). Ainsi, en 1975, avec la combinaison de ces nouvelles techniques, César Milstein et Georges Köhler (Figure 1) réussirent à développer une méthode permettant la production des anticorps *in vitro* à partir d'un hybridome résultant de la fusion entre un lymphocyte B (L_B) murin et un myélome de la même espèce (Köhler and Milstein, 1975).

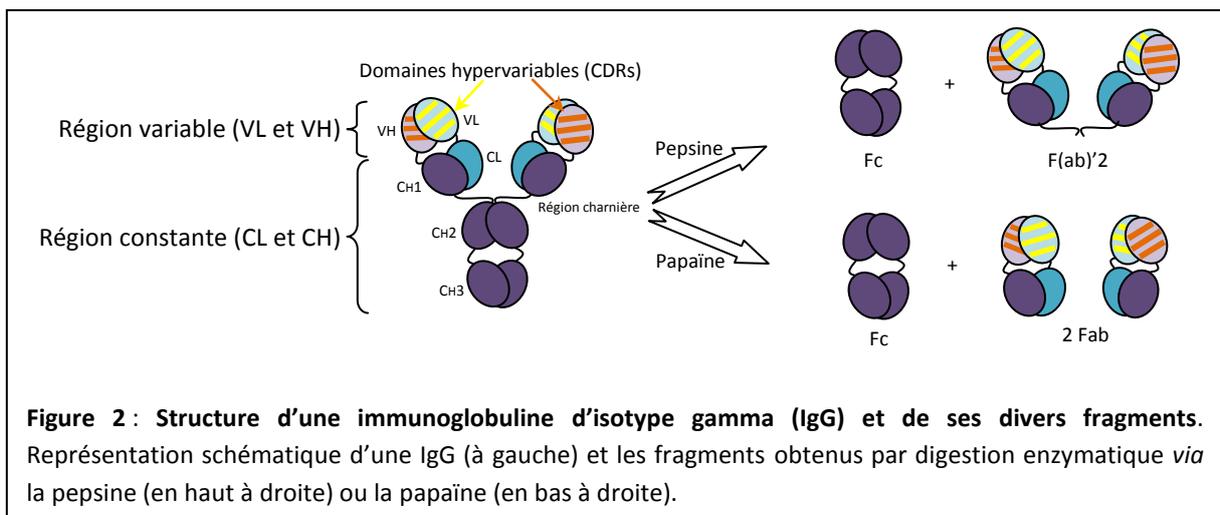


Ce sont des lymphocytes B provenant de souris immunisées qui sont fusionnés avec un myélome murin déficient en une enzyme nécessaire à la biosynthèse des nucléotides, l'HGPRT (Hypoxanthine-Guanidine Phosphoribosyl Transferase). Cette déficience enzymatique permet de sélectionner les cellules hybrides (ou hybridomes) en ajoutant au milieu de culture un agent de sélection : l'aminoptérine. En effet, celle-ci bloque la seule voie de biosynthèse des nucléotides disponible aux cellules myélomateuses non fusionnées, entraînant alors leur mort et ainsi la sélection par complémentarité génique des hybridomes issus de la fusion avec les lymphocytes B qui, eux, possèdent l'HGPRT fonctionnelle. Les lymphocytes B vont, quant à eux, disparaître après quelques jours car ils sont incapables de se multiplier *in vitro*. Les hybridomes ainsi sélectionnés ont : 1) la capacité de se multiplier indéfiniment *via* leur partie myélome, 2) la capacité de sécréter des anticorps avec leur origine lymphocyte B. Des étapes supplémentaires sont nécessaires pour isoler les clones d'hybridomes. Chaque clone cellulaire hybride isolé produit des anticorps tous identiques que l'on appelle monoclonaux (AcM), par opposition aux anticorps polyclonaux constitués d'un mélange d'anticorps avec des spécificités variées.

La découverte de Köhler et Milstein a permis de développer l'utilisation des anticorps monoclonaux en recherche et dans le domaine médical pour le diagnostic *in vitro* et pour la thérapie de diverses pathologies. Ainsi, en 1986, le premier anticorps monoclonal thérapeutique murin a été accepté par la FDA (Food and Drug Administration). Cet anticorps, le muromonab (Orthoclone OKT3™), est dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T et s'est révélé efficace pour limiter les réactions inflammatoires à l'origine du rejet lors de la transplantation d'organe (Cosimi et al., 1981). Néanmoins, le développement de nouveaux anticorps thérapeutiques murins a depuis été limité en raison des effets secondaires tels que des réactions d'hypersensibilité importantes pouvant parfois aller jusqu'au choc anaphylactique. En effet, une utilisation chronique d'anticorps murins chez l'homme induit le déclenchement de réaction immunitaire chez l'hôte avec la production d'anticorps humain anti-souris (Schroff et al., 1985). La connaissance approfondie de la structure des anticorps a permis de comprendre pourquoi des anticorps murins sont inadaptés pour la thérapie chez l'homme et de dégager des pistes pour faire évoluer cette première génération d'anticorps.

1.1.1.2 La structure protéique des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la super famille des immunoglobulines (Ig). Toutes les protéines de cette famille possèdent au moins un motif commun structural, le « domaine immunoglobuline ». Cette région d'une centaine d'acides aminés (a.a) possède une structure secondaire caractéristique constituée de deux feuillets bêta antiparallèles superposés à la manière d'un sandwich. Cette structure est stabilisée par des liaisons faibles entre a.a hydrophobes et par des ponts disulfures formés entre résidus cystéine très conservés (Williams and Barclay, 1988). Chaque anticorps est formé de : deux chaînes lourdes (H pour Heavy) et deux chaînes légères (L pour Light) identiques deux à deux et reliées par des ponts disulfures. Classiquement, chaque chaîne lourde présente 3 domaines constants (nommé CH1, CH2, CH3) et 1 domaine variable VH, pour une masse totale de 50 kDa ; chaque chaîne légère comprend un domaine constant CL et un domaine variable VL avec une masse totale de 25 kDa. Ainsi un anticorps entier monomérique, composé de ses 4 chaînes, présente une masse moyenne de 150 kDa. La combinaison des quatre chaînes peptidiques aboutit à une structure tridimensionnelle caractéristique en forme de « Y » (Figure 2, (Schroeder and Cavacini, 2010)).



Au sein de chaque partie variable VH et VL, on distingue 3 régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Regions) de 5 à 15 a.a formant des boucles entre des régions charpentes ou FR (Framework). Les CDR des VL et des VH forment une zone particulière où se trouve généralement le paratope, région de l'anticorps responsable de la liaison à une zone spécifique de l'antigène ciblée nommée : épitope (Novotný et al., 1983). En effet, le paratope est constitué des régions hypervariables, qui, avec leurs séquences très peu conservées, confèrent localement une organisation spatiale spécifique à chaque anticorps. Ainsi, un anticorps dispose de 2 sites de liaisons à l'antigène, un à l'extrémité de chaque bras.

Par ailleurs, la partie constante se caractérise par une séquence en a.a proche d'un anticorps à l'autre, avec tout de même des différences qui permettent de distinguer différentes classes appelées isotypes : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Certains isotypes, les IgM et IgE, possèdent un quatrième domaine constant (CH4) impliqué dans la dimérisation des chaînes lourdes. A la différence de la région variable, la région constante n'est pas ou peu impliquée dans la reconnaissance de l'antigène. Cependant, sa présence est essentielle pour assurer les fonctions effectrices des anticorps dans les réponses immunitaires. En particulier, au moyen d'une région communément appelée fragment Fc (pour fragment cristallisable), les Ig interagissent avec différents partenaires du système immunitaire tels que : le système du complément, ou encore des cellules de l'immunité innée (macrophages, granulocytes, cellules naturel killer...) qui tous présentent des récepteurs spécifiques au Fc (FcR). Il existe un ou plusieurs récepteurs Fc spécifiques des différents isotypes des immunoglobulines. Les FcR sont eux même membres de la superfamille des immunoglobulines. La majorité des récepteurs Fc est formée d'un complexe moléculaire dont la nature diffère selon la spécificité du récepteur et également selon le type cellulaire qui l'exprime. Ainsi leurs fonctions sont variables telles que l'endocytose et la phagocytose permettant l'élimination de complexe immuns et facilitants la présentation antigénique, ou bien l'exocytose de vésicules contenant des médiateurs chimiques impliqués dans l'inflammation ou la cytotoxicité, ou encore, la modulation de l'activation cellulaire. Un récepteur particulier est impliqué dans le transport des IgG maternelles à travers le placenta et l'épithélium intestinal néonatal, le récepteur Fc néonatal (FcγRn). Dans la période post-natale, les récepteurs FcγRn sont également exprimés dans l'endothélium et dans de nombreux tissus épithéliaux, où ils protègent les Ig plasmatiques du catabolisme. Les FcγRn lient les IgG circulantes, suivi de l'endocytose du complexe IgG-récepteur sous une forme qui protège les anticorps de la dégradation intracellulaire, les Ig sont ensuite relibérées dans la circulation. Ce processus répété d'endocytose suivi du recyclage dans le sang rend compte de la longue demi-vie systémique des anticorps (Suzuki et al., 2010).

D'autre part, les anticorps peuvent être caractérisés par différents fragments obtenus par clivage enzymatique à la papaïne ou à la pepsine (Figure 2). La papaïne dissocie les bras du « Y » et permet d'obtenir 2 types de fragments différents : 2 Fab (Fragment having the antigen binding site) et le Fc. La pepsine digère l'anticorps au dessous du pont disulfure de la région charnière, séparant ainsi le Fc et un fragment F(ab)₂ qui conserve les 2 paratopes.

Un anticorps, glycoprotéine complexe, présente lui-même un comportement en tant qu'antigène en possédant différents déterminants antigéniques (van Loghem and Litwin, 1972). Il en existe trois types : déterminants isotypiques, allotypiques et idiotypiques.

Les déterminants isotypiques sont spécifiques d'une espèce moléculaire pour une espèce animale donnée. Ainsi chez l'homme, les cinq grandes classes (IgG, IgA, IgM, IgE et IgD) ont été organisées selon la nature des déterminants isotypiques localisés sur la région constante des différentes chaînes lourdes nommées respectivement gamma, alpha, mu, epsilon et delta. D'autres isotopes des CH caractérisent les sous classes d'anticorps. C'est le cas pour les IgG, qui présentent quatre sous-classes chez l'homme : $\gamma 1$, 2, 3 et 4, et pour les IgA, pour lesquelles on trouve deux sous-classe, $\alpha 1$ et 2. Il existe également des déterminants isotypiques sur les chaînes légères qui se répartissent ainsi en deux groupes : kappa et lambda. Sur un même anticorps, les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères sont identiques en termes de classe et sous-classe.

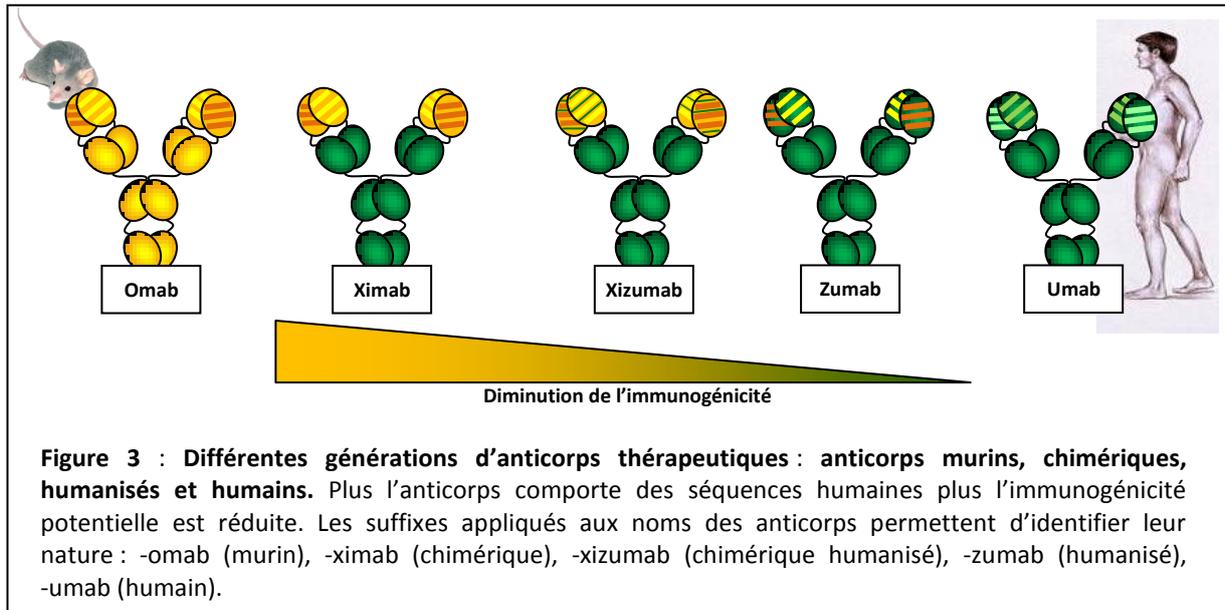
Les déterminants allotypiques correspondent aux polymorphismes des gènes codant pour les anticorps d'une même espèce (Zelaschi et al., 1983). En effet, au sein d'une population, certains individus présentent des allèles différents pour certains gènes codant les immunoglobulines, générant ainsi des variants allotypiques. Ce polymorphisme existe pour les chaînes gamma, alpha et kappa, notés respectivement Gm, Am et Km.

Enfin, les déterminants idiotypiques permettent de regrouper les anticorps ayant des spécificités antigéniques similaires. Ces déterminants sont localisés dans les régions variables, à proximité des sites du paratope et sont spécifiques à chaque individu (Geha, 1981).

L'ensemble des déterminants antigéniques des anticorps sont responsables des réponses anti-anticorps : anti-isotypes entre les espèces, anti-allotypes au sein d'une même espèce mais entre différents groupes allotypiques et anti-idiotype entre les individus.

1.1.1.3 Les différentes générations d'anticorps thérapeutiques

En raison essentiellement des réactions anti-isotypes, les anticorps thérapeutiques murins utilisés chez l'homme entraînent de nombreux effets secondaires (des réactions d'hypersensibilité allant jusqu'au choc anaphylactique). Il a donc été indispensable de développer rapidement de nouveaux types d'anticorps plus proche des anticorps humains pour pallier à ces problèmes. Les avancées technologiques en biologie moléculaire en particulier l'ADN recombinant et l'ingénierie des protéines ont permis de générer successivement des anticorps chimériques, humanisés puis totalement humains. Ainsi les anticorps monoclonaux ont pu connaître un nouvel essor en thérapie (figure 3, (Carter, 2006; Chames et al., 2009).



1.1.1.3.1 Les anticorps murins

Les anticorps thérapeutiques murins sont aujourd'hui les moins nombreux sur le marché en raison des nombreux effets secondaires qu'ils déclenchent (Hwang and Foote, 2005). Ils sont néanmoins utilisés en cas d'échec des autres traitements. Pour limiter les réactions immunitaires anti-souris chez l'homme, les anticorps murins peuvent être utilisés sous forme de fragments exempts de la région Fc. De plus, pour des applications en cancérologie, les anticorps murins peuvent être couplés à des toxines ou des radioisotopes afin d'améliorer leur toxicité vis-à-vis des cellules tumorales et ainsi limiter les doses et la répétition des injections (Ibritumomab, Tositumomab). Dans certaines indications ne nécessitant pas de traitement chronique (e.g. imagerie *in vivo*, neutralisation de toxines), l'utilisation d'anticorps ou de fragments d'origine murine peut se révéler avantageuse pour leur facilité d'obtention comparée aux autres formats décrits plus loin.

1.1.1.3.2 Les anticorps recombinants chimériques et humains

Dans les années 80-90, les progrès en biologie moléculaire ont permis de cloner les ADN complémentaires (ADNc) codant les immunoglobulines. Ainsi, à partir d'un hybridome exprimant un anticorps monoclonal le clonage des ADNc codant la chaîne lourde et la chaîne légère peut donner accès à la séquence exacte de l'anticorps considéré, en particulier la séquence de ses régions variables et hypervariables (Orlandi et al., 1989). Ces nouveaux outils ouvrent un large champ de possibilités avec l'ingénierie moléculaire. D'une part, l'anticorps recombinant peut être produit par diverses lignées cellulaires ce qui évite ainsi les problèmes d'instabilité des hybridomes. D'autre part,

il devient possible de greffer les régions variables responsables de la spécificité sur d'autres régions constantes d'immunoglobulines (changement d'espèce et d'isotype).

Dès 1984, des anticorps chimériques sont obtenus en combinant des parties variables murines avec des parties constantes humaines (Boulianne et al., 1984; Morrison et al., 1984). Ces formats chimériques comportent environ 75% de séquences humaines et un fragment Fc totalement humain. Cette construction permet de diminuer considérablement l'immunogénicité chez l'homme et assure une bonne interaction de l'anticorps avec les FcRs humains, améliorant ainsi la demi-vie et les fonctions effectrices. En 1994, l'abciximab (Réopro™) fut le premier anticorps chimérique mis sur le marché. Depuis, 7 anticorps chimériques ont été approuvés dont un en 2011, le Brintuximab vedotin (Adcetris™), qui, conjugué à une toxine (l'auristatine), est indiqué pour le traitement des lymphomes. Malgré la proportion réduite de séquences murines, ces anticorps induisent encore des réactions immunitaires de type HACA (Human Anti-Chimeric Antibodies), responsables d'effets indésirables chez les patients.

D'autres anticorps dits humanisés, ne présentent que 10% de séquences murines, ont alors vu le jour dès 1986 (Jones et al., 1986). Ces anticorps peuvent être construits *via* le greffage des régions hypervariables murines sur un squelette d'anticorps humain (CDR grafting). L'humanisation des anticorps est un processus complexe dont la réussite n'est pas garantie. En effet l'orientation des CDRs, et par conséquent la structure tridimensionnelle du paratope, dépend en grande partie de la structure des régions charpentes. C'est pourquoi, le simple greffage des CDRs murins sur un anticorps humain conduit souvent à des paratopes de mauvaise affinité et de faible spécificité pour la cible. Par conséquent, des modifications supplémentaires comme des mutations ponctuelles dans les CDRs ou le transfert d'une ou plusieurs régions FR murines, sont souvent nécessaires pour restaurer l'affinité et la spécificité des anticorps humanisés par rapport à leurs analogues murins (Wu et al., 1999). Une seconde stratégie d'humanisation, nommée : resurfacing, consiste à tout d'abord produire un anticorps chimérique puis à muter certains acides aminés localisés en surface dans les régions FR murines, lui donnant ainsi un profil « plus humain » (Roguska et al., 1994). Actuellement, les anticorps humanisés sont la classe d'anticorps la plus développée sur le marché avec 14 molécules et leur tolérance est généralement satisfaisante.

1.1.1.3.3 Les anticorps recombinants humains

Toujours dans le but d'éviter les réactions d'hypersensibilité observées avec les immunoglobulines contenant encore des fragments murins, des anticorps totalement humains ont été développés. Plusieurs méthodologies ont été mises au point : une approche cellulaire à partir de lymphocytes B humains, une approche combinatoire avec la création de banques de régions

variables d'anticorps et une approche génétique avec des souris transgéniques possédant les gènes codant les immunoglobulines humaines.

La première stratégie utilisée, l'approche cellulaire, fut de transposer la technique des hybridomes de Milstein et Köhler à des cellules humaines avec la fusion entre un lymphocyte B humain et un myélome. A la différence du modèle souris, des complications sont apparues pour isoler les L_B et stabiliser les hybrides humains.

L'obtention de L_B humains dirigé contre la cible d'intérêt est un exercice compliqué. Tout d'abord, pour isoler des anticorps contre des pathogènes, face à certains antigènes très virulents ou rares (anthrax, peste, HIV, ricine...), l'immunisation est évidemment impossible. Dans les cas d'autres antigènes non virulents l'immunisation est aussi interdite pour des raisons éthiques. Or, un L_B, non activé au préalable, se révèle difficile à isoler. De la même façon, l'obtention de lymphocytes B dirigés contre des protéines humaines est difficile en raison des mécanismes de tolérance éliminant ou inactivant une grande partie des L_B auto-réactifs. Bien souvent, seules les personnes, présentant des anticorps neutralisants contre des agents infectieux ou une pathologie, sont prélevées pour isoler des lymphocytes B. Dans ce contexte, il est difficile d'isoler des L_B issus d'une réponse ancienne, en revanche on recherche plus particulièrement les lymphocytes B mémoires (Lanzavecchia et al., 2007).

D'autre part, initialement, le développement des hybridomes était décevant avec seulement quelques rares succès de clonage requérant l'immortalisation très inefficace *via* le virus d'Epstein-Barr (EBV). Les progrès récents dans la compréhension moléculaire des mécanismes d'activation polyclonale des L_B ont permis d'augmenter significativement l'efficacité de l'immortalisation à la fois des cellules naïves et des cellules mémoires. Cette nouvelle approche pourrait donc permettre dans un futur proche de disposer de collections d'anticorps monoclonaux humains de haute affinité aux caractéristiques originales (Guillot-Chene et al., 2009).

La seconde stratégie pour produire des anticorps humains repose sur l'expression de banques combinatoires de fragments d'anticorps à la surface de micro-organisme, on parle du phage display (Hoogenboom, 2005). Cette technique nécessite la constitution d'une banque résultant de l'association au hasard des régions variables (VL et VH), issues de LB de donneurs naïfs ou immunisés (Schirrmann et al., 2011). Chaque combinaison VL/VH est exprimée à la surface d'un phage filamenteux, leur capacité à lier l'antigène est ensuite testée *in vitro*. Les phages sélectionnés pour leur forte affinité avec la cible sont ensuite clonés, les fragments VL et VH séquencés sont réassemblés par voie recombinante pour reconstituer une IgG totalement humaine. Grâce à cette technique de phage display, initialement décrite en 1990, Le premier anticorps humain, l'adalimumab (Humira™), a été commercialisé en 2002. Depuis, un second anticorps humain

sélectionné par phage display a été autorisé en 2011 (Belimumab/Benlystat™) et d'autres sont actuellement en essais cliniques (Thie et al., 2008).

Sur le principe du phage display, le développement d'anticorps dirigés contre des cibles intracellulaires, des banques combinatoires de fragments d'anticorps sont exprimés dans le cytoplasme bactérien, ces nouveaux formats recombinants sont ainsi appelés intrabodies.

Tout les autres anticorps humains sur le marché, ou actuellement utilisés en clinique, proviennent de l'immunisation de souris génétiquement modifiées. Chez ces souris les gènes codant les immunoglobulines murines sont substitués par les gènes codant les Ig humaines (Lonberg, 2005). Après l'immunisation de ces souris transgéniques, l'obtention d'anticorps humains se fait simplement par la technique classique des hybridomes, avec la fusion d'un L_B murin, mais qui exprime un anticorps humain, et un myélome. Ainsi 7 anticorps humains issus de souris transgéniques sont actuellement sur le marché : Denosumab et Panitumumab (Amgen), Golimumab et Ustekinumab (Centocor), Canakinumab (Novartis), Ofatumumab (Genmab), Ipilimumab (Bristol-Myers Squibb).

Malgré les limitations et les difficultés rencontrées avec chacune des méthodes disponibles, les anticorps humains représentent une part importante des essais cliniques et pourraient devenir la classe prédominante d'anticorps sur le marché dans un futur proche (Nelson et al., 2010).

1.1.2 Les anticorps en imagerie

Dès le début des années 1970, l'utilisation d'anticorps polyclonaux, marqués avec des radio-isotopes, a été étudiée afin de localiser par imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux. Avec l'arrivée des anticorps monoclonaux et le développement de dispositifs d'imagerie à détection gamma, ces recherches ont été étendues au diagnostic de tumeurs chez l'homme. Plusieurs anticorps ou fragments d'anticorps ont ainsi été développés pour la radio-immunoscintigraphie (RIS). Cette approche permet d'évaluer l'efficacité d'immunociblage d'un anticorps, sa demi-vie dans l'organisme et d'obtenir des données de dosimétrie. L'intérêt principal est toutefois de détecter des tissus métastatiques difficilement identifiables par d'autres approches (Baty and Chames, 2006).

1.1.2.1 Les anticorps diagnostiques pour l'imagerie

De nos jours, on compte sur le marché deux anticorps entiers et quatre fragments d'anticorps, tous d'origine murine (tableau 1). Parmi ces six molécules, quatre sont utilisées pour la détection de cellules tumorales. Ces anticorps ont été couplés à des radionucléotides émetteur de rayon gamma, le technétium-99m (^{99m}Tc), l'indium 111 (^{111}In). Ces rayonnements sont localisés au moyen d'une caméra-SPECT, abréviation pour Single Photon Emission Computed Tomography (en français, Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP)).

Les anticorps diagnostiques les plus anciens, encore sur le marché, datent de 1996. Cette année là, quatre fragments d'anticorps et une IgG entière ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats-unis et/ou en Europe. L'imciromab (**Myoscint**®), un fragment ^{111}In -Fab se fixant à la myosine, est utilisé pour le diagnostic des nécroses du myocarde (Sarda et al., 2001) et Le sulesomab (**Leukoscan**®), un fragment Fab' couplé au ^{99m}Tc , est indiqué pour la localiser une infection ou une inflammation des os pour des suspicions d'ostéomyélite (Ivančević et al., 2002). Les trois anticorps suivant sont impliqués dans le diagnostic de cancers. L'arcitumomab (**CEA-Scan**®), un fragment Fab' marqué au ^{99m}Tc , reconnaît l'antigène carcynoembryonnaire (CEA) et est utilisé pour le diagnostic des récurrences de cancers colorectaux (Behr et al., 1995; Erb and Nabi, 2000). Un autre fragment, le nofetumomab (**Verluma**®), est un ^{99m}Tc -Fab utilisé pour le diagnostic des cancers du poumon à petites cellules (Straka et al., 2000). Enfin, le capromab (**Prostascint**®), une ^{111}In -IgG, diagnostique les récurrences des cancers prostatiques en se liant à l'antigène membranaire PSMA (prostate specific membrane antigen) (Murphy et al., 2000). Après cette année faste, on s'attendait à l'essor des anticorps diagnostiques. Hors depuis, seuls un nouvel anticorps monoclonal est apparu sur le marché, ^{111}In -Ibritumomab (**Zevalin**®) indiqués pour le diagnostic des lymphomes non-Hodgkinien (Culy and Lamb, 2000; Krasner and Joyce, 2001).

Tableau 1 : Les anticorps diagnostiques utilisés en l'imagerie clinique aux Etats-Unis ou en Europe

Nom générique (nom commercial)	Fournisseur	Anticorps (isotype), Format	Cible, Indication	radioélément	Date d'acceptation par FDA (EMA)
Arcitumomab (CEA-Scan)	Immunomedics	IMMU-4 (IgG1 de souris), Fab'	CEA, Carcinome colorectal, du sein, et poumon à petites cellules	^{99m}Tc	Juin 1996 (1996, retiré en 2005)
Imciromab pentetate (Myoscint)	Centocor	R11D10 (IgG2a de souris), Fab'	Myosin, Nécrose du myocarde	^{111}In	Juillet 1996
Nofetumomab merpentan (Verluma)	Boehringer Ingelheim	NR-LU-10 (IgG2b de souris), Fab	Glycoprotéine (40-kDa), Carcinome du poumon à petites cellules et non à petites cellules	^{99m}Tc	Aout 1996
Capromab pentetide (ProstaScint)	Cytogen	7E11-C5.3 (IgG1 de souris), anticorps monoclonal	Glycoprotéine (100-kDa), Carcinome de prostate	^{111}In	Octobre 1996
Sulesomab (LeukoScan)	Immunomedics GmbH	IMMU-MN3 (IgG de souris), Fab'	NCA-90, ostéomyélite	^{99m}Tc	(Février 1996)
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)	Spectrum Pharms	2B8 (IgG1 de souris), anticorps monoclonal	CD20, Lymphome non- Hodgkinien	^{111}In	Février 2002 (janvier 2004)

L'immuno-imagerie *in vivo* permet donc de détecter précocement des récives plusieurs mois avant les examens morphologiques. Néanmoins, sa sensibilité dépend plus de la densité en antigène tumoral ciblé par l'anticorps que de la taille des lésions. Ainsi, la RIS se révèle être une méthode de diagnostic intéressante, complémentaire des examens conventionnels, principalement pour le diagnostic des récives ou de métastases de certains cancers (Chatal et al., 1992).

Pour autant cette première génération d'anticorps diagnostiques a été peu étendue par la suite.

1.1.2.2 Les limites des anticorps diagnostiques

Malgré un principe séduisant et l'existence de nombreux AcM, le développement de la RIS s'est heurté à plusieurs facteurs limitants (Chatal et al., 1992; de Bie et al., 1992). Le principal problème est lié à la faible accessibilité des antigènes tumoraux aux anticorps et ce pour plusieurs raisons : 1) les tumeurs expriment de manière hétérogène les antigènes ciblés, 2) leur vascularisation est anarchique et 3) la grande taille des anticorps limite leur infiltration dans la tumeur.

D'autre part, cette technique est responsable pour différentes causes de signal non spécifique (anticorps circulants fixés ou non à l'antigène, radioactivité libérée à partir de l'anticorps marqué dans la circulation, fixation non spécifique de certains agents chélatant en particulier au niveau hépatique, rénale ou encore médullaire) ce qui conduit à de faibles contrastes entre le tissu sain et le tissu pathologique, sauf dans le cas de récives de grandes tailles.

De plus, la RIS n'est jamais utilisée en première intention mais seulement dans le cas de récives et lorsque les résultats des examens classiques (scanner, échographie) sont douteux. Cependant, ces molécules seraient fort utiles si l'on augmentait leur sensibilité.

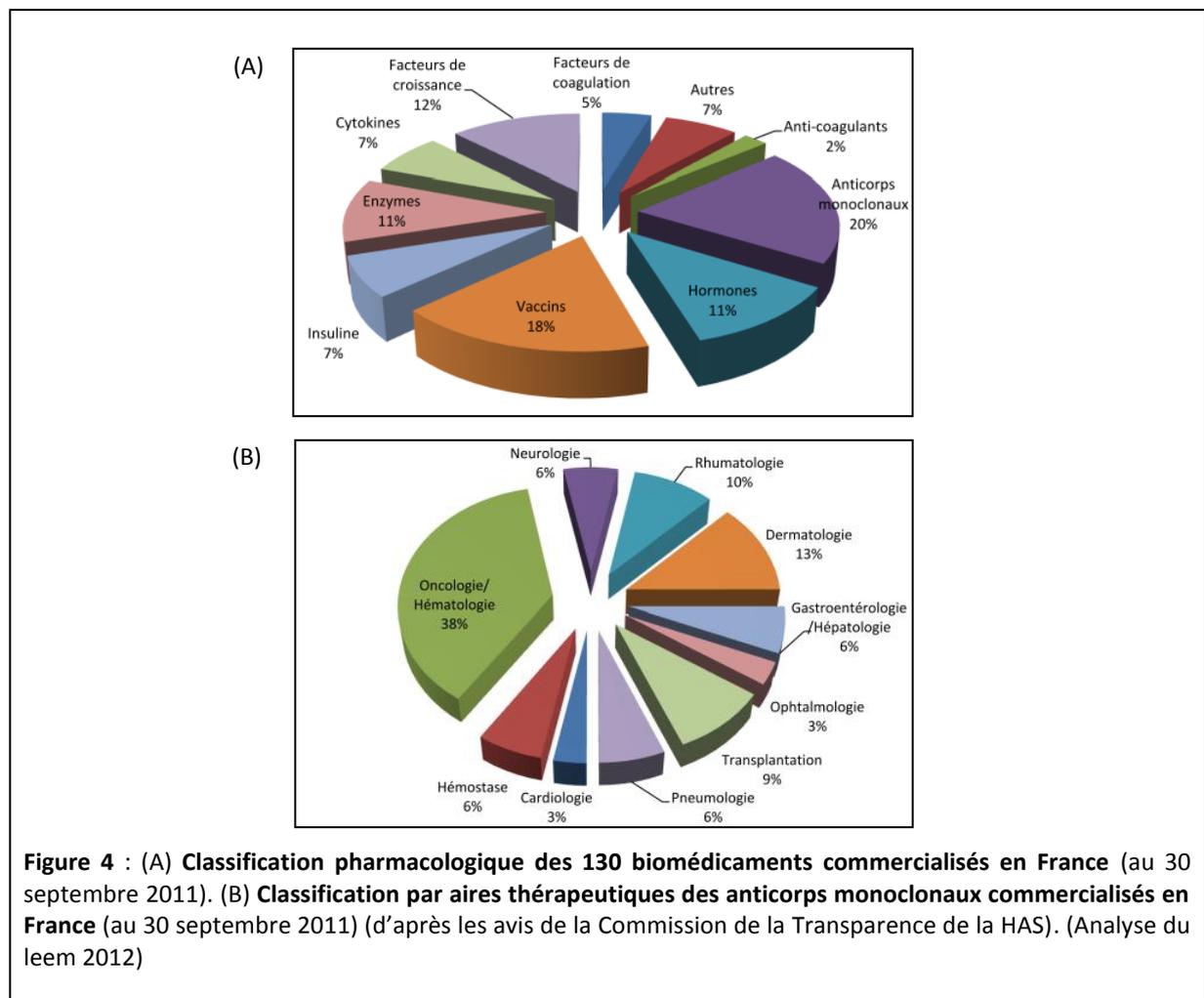
Par ailleurs, les coûts de développement des anticorps pour l'imagerie étant proches de ceux des anticorps thérapeutiques, il est probable que les firmes pharmaceutiques préfèrent investir sur les produits thérapeutiques dont le marché est très nettement supérieur (Baty and Chames, 2006).

Ainsi, en raison d'une utilisation minimale, plusieurs des anticorps diagnostiques ont depuis, été retirés du marché pour des raisons commerciales et remplacés par un marqueur non spécifique des cellules tumorales, le Fluoro-déoxyglucose (¹⁸FDG) (Goldsmith and Signore, 2010).

1.1.3 Les anticorps, aspect économique

1.1.3.1 Le marché des anticorps thérapeutiques

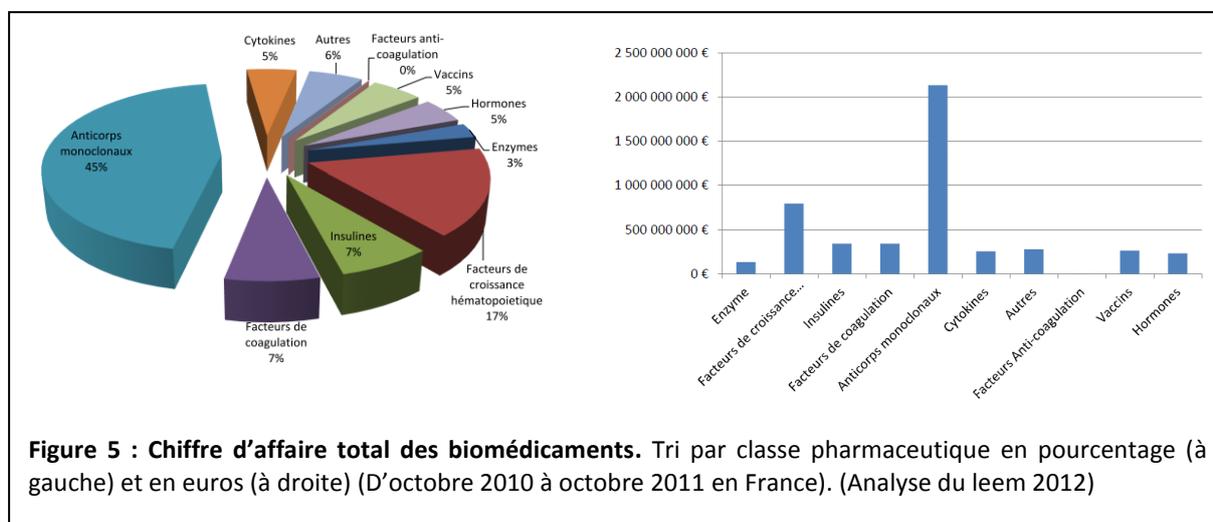
Depuis 10 ans, la proportion des anticorps thérapeutiques dans le marché des biomédicaments ne cesse d'augmenter (Chames et al., 2009; Scott et al., 2012). En 2011, ces molécules biologiques représentent la classe majoritaire à hauteur de 20 % en France (figure 4). Les anticorps monoclonaux déjà commercialisés et ceux en développement ciblent une multitude d'aires thérapeutiques dont 40% environ trouvent leur indication en oncologie/hématologie (figure 4, ((Analyse du leem, 2012))).



1.1.3.2 Un marché rentable

Depuis les dix dernières années, le produit de la vente des biomédicaments au niveau international ne cesse d'augmenter atteignant près de 130 billion de dollars. En France, les anticorps monoclonaux restent la classe largement majoritaire des biomédicaments avec 45% du chiffre d'affaire total soit plus de 2 milliards d'euros pour les 12 mois considérés entre 2010 et 2011 (Figure

(Analyse du leem, 2012)). Aujourd'hui, parmi la trentaine d'anticorps mis sur le marché, six produits se partagent près de 90 % du marché mondial, avec des ventes supérieures à 40 milliards de dollars en 2010 : Enbrel (Pfizer), Rituxan, Avastin et Herceptine (Roche), Remicade (J&J) et Humira (Abbott).



En raison de la croissance rapide de leurs ventes, les anticorps monoclonaux constituent aujourd'hui un potentiel important de nouvelles molécules thérapeutiques vers lequel s'orientent tous les grands groupes pharmaceutiques. Cet engouement n'est pas pour faiblir puisqu'on estime que la moitié des molécules les plus vendues en 2014 seront des biomédicaments, composés en majeure partie d'anticorps monoclonaux. D'autant plus que les prévisions annoncent une progression de 1,1% du marché pharmaceutique en général, contre un taux de croissance annuel de 10,3 % pour les anticorps monoclonaux ce qui représenterait un bénéfice de plus de 55 milliards de dollars en 2014 (Ducruet, 2010).

Malgré le coût élevé d'un traitement avec des anticorps thérapeutiques (plusieurs dizaines de milliers d'euros par an par patient pour le traitement de cancer (exemple du Trastuzumab dans le traitement adjuvant du cancer du sein : environ 50 000 \$/an (Programme de gestion thérapeutique des médicaments, 2005)), ces molécules deviennent incontournables en raison de leur efficacité, et ce dans des domaines où il y a de réels besoins non satisfaits, comme la cancérologie ou les maladies inflammatoires invalidantes. Pour autant, l'utilisation des anticorps thérapeutiques fait l'objet d'importantes discussions au sein des organismes de santé public (Mano, 2006; Neyt et al., 2006). L'intérêt commun pour les patients et les finances de santé public, est l'utilisation d'un traitement adapté à chaque patient avec une validation rapide de l'efficacité de la stratégie thérapeutique employée. On se dirige ainsi vers une médecine personnalisée.

1.2 Vers une médecine personnalisée

1.2.1 Le cancer, un challenge diagnostique et thérapeutique sociétal

Au début du 21^{ème} siècle, le cancer est devenu la première cause de mortalité dans le monde. En 2008, 12,7 millions de nouveaux cas de cancers étaient diagnostiqués, et le nombre de décès était de 7,6 millions (Centre international de Recherche sur le Cancer, 2010). Ces chiffres ne cessent d'augmenter et on estime 12 millions de décès par an d'ici 2030. Heureusement, le nombre de personnes soignées augmente également avec le développement de nouveaux traitements.

De par leur agressivité, les cellules cancéreuses croissent rapidement au sein de l'organe dont elles sont issues, puis, elles envahissent les tissus adjacents avant de se développer à travers l'organisme sous forme de métastases. L'enjeu repose donc sur un diagnostic précoce des tumeurs primitives. La détection durant les étapes initiales de la maladie est d'une importance cruciale sur le pronostic de survie, comme l'estime l'organisation mondiale de la santé, plus de 30% des patients souffrant d'un cancer aurait pu être soignés si le diagnostic avait eu lieu plus tôt.

Par ailleurs, l'hétérogénéité des cancers ajoute une difficulté supplémentaire sur le choix et l'efficacité du traitement. L'hétérogénéité moléculaire existe entre les cancers de même type, entre la tumeur primitive et ses métastases, et même entre les cellules qui constituent la masse tumorale. Cette multitude de phénotypes au sein même d'une tumeur favorise l'échappement des cellules tumorales. L'idée d'éradiquer toutes cellules tumorales avec une monothérapie devient illusoire. La diversité moléculaire, combinée à la sélection des cellules cancéreuses présentant un phénotype résistant au traitement, sont des défis de taille à surmonter pour rendre efficace la thérapie des cancers (Sumer and Gao, 2008).

1.2.2 Les anticorps pour le théranostic

Aujourd'hui, le principe d'adapter la thérapie au diagnostic a pris le nom de « Théranostic » (Pene et al., 2009; Seaman et al., 2010). Ce nouveau concept est particulièrement intéressant en oncologie en raison de la grande hétérogénéité des cancers. En effet, la caractérisation approfondie d'une tumeur donnée devient indispensable pour employer une approche thérapeutique efficace. Ainsi, la découverte de nouveaux biomarqueurs cancéreux a permis la mise au point de biothérapies ciblées. En raison de leur pouvoir spécifique et affiné, les anticorps sont apparus comme des molécules de choix pour cette nouvelle approche thérapeutique. La première méthode, est

l'utilisation d'anticorps thérapeutiques couplés à un élément cytotoxique adressés spécifiquement aux cellules tumorales en visant les biomarqueurs membranaires. Aujourd'hui une centaine d'anticorps thérapeutiques sont en études cliniques pour des indications en cancérologie.

D'autre part, avec l'évolution de la biologie moléculaire ouvrant la voie au clonage de fragments anticorps, des formats recombinants ont été développés comme anticorps intracellulaire, les intrabodies, visant des marqueurs exprimés dans les cellules. Dans cette approche, les intrabodies sont produits par les cellules tumorales après transfections de l'ADNc correspondant et sont alors capables d'inactiver les protéines intracellulaires ciblées dans le but de bloquer la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose (Moutel and Perez, 2009; Desplancq et al., 2011).

Néanmoins, avec l'arrivée des nouveaux anticorps thérapeutiques sur le marché, il reste à développer de nouveaux outils diagnostiques qui permettront d'identifier les biomarqueurs et ainsi, déterminer le meilleur traitement à employer.

Les anticorps, de par leur spécificité, peuvent être utilisés en thérapie et en diagnostic ce qui en fait des candidats prometteurs pour le théranostic. Aujourd'hui, l'importance des anticorps monoclonaux pour les thérapies anti-cancéreuses ne présente aucun doute. Pour ce qui est du diagnostic, la possibilité d'ingénierie des anticorps ouvre de nouvelles perspectives d'utilisation. On peut ainsi envisager la mise au point de nouvelles molécules issues de chaque anticorps thérapeutique pour une application diagnostique efficace.

1.2.3 Les enjeux de la médecine personnalisée

Le théranostic oncologique, conduit à un traitement adapté des tumeurs chez un patient donné. Cette nouvelle médecine dite personnalisée nécessite l'identification des biomarqueurs ciblés par ce biomédicament et le développement d'outils diagnostiques pour l'identification de ces biomarqueurs. De plus, ces nouvelles approches diagnostiques permettraient un suivi du patient en termes d'efficacité thérapeutique, de posologie et de quantification de la régression tumorale (Seaman et al., 2010).

La médecine personnalisée est d'un intérêt majeur pour les patients mais également sur un plan économique. Au vu des conditions sociaux-économiques actuelles, les dépenses des organismes de santé publique deviennent limitées. Or, les thérapies anticancéreuses sont extrêmement coûteuses. Si l'on prend l'exemple des États-Unis, pendant les 3 décennies passées, les dépenses totales pour les traitements contre le cancer ont plus que quadruplé, atteignant 125 milliards de \$ en 2010. Avant 2020, elles pourraient augmenter de 66 %, atteignant 207 milliards de \$. De multiples

facteurs conduisent à cette situation économique difficile : la population vieillissante prédisposée à développer des cancers, la longévité des patients atteints d'un cancer augmente et nécessite des thérapies prolongées augmentant de ce fait le coût des traitements estimé (40 000 € ou plus par an et par patient) (Malakoff, 2011). Les organismes de santé publique sont donc vigilants, et encouragent les médecins à ne prescrire aux patients que des traitements efficaces. Dans ce nouveau contexte, il devient nécessaire de développer de nouvelles approches diagnostiques qui permettront de définir le traitement optimal.

L'imagerie *in vivo* des tumeurs est un domaine de recherche en plein essor. Elle joue un rôle essentiel dans l'étude du fonctionnement des organes, en mode physiologique ou pathologique. L'imagerie fonctionnelle, qui permet de voir le fonctionnement d'un organe, est devenue l'approche privilégiée pour aborder les enjeux complexes, comme le diagnostic tumoral mais aussi le suivi *in vivo* non invasif de l'efficacité des traitements utilisés.

1.3 L'imagerie pour le diagnostic *in vivo*

La plus ancienne technique d'imagerie médicale est la radiographie par rayons X. En effet, en 1895 W.C. Röntgen, physicien allemand découvreur des rayons X, réalise la première radiographie, celle de la main de sa femme. En plus de la radiographie « classique », le développement de capteurs à rayons X à base de semi-conducteurs et l'arrivée de l'informatique dans les années 1970 ont permis le développement de la tomodensitométrie, plus couramment appelée CT-scanner (CT : Computed Tomography). Les scanners permettent, après reconstruction, de réaliser des vues en coupe ou des vues en trois dimensions. Ces techniques sont aujourd'hui couramment utilisées en première intention préventive. Néanmoins, malgré un excellent contraste entre les os et les tissus mous, le contraste de ces techniques entre les différents tissus mous est faible et rend en particulier difficile la localisation précise de tumeurs au sein de ces tissus (Goutayer, 2008).

Avec l'évolution technologique, de nouveaux systèmes d'imageries *in vivo* ont permis de mieux visualiser les tumeurs. Les plus connus sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'imagerie nucléaire. Mais il existe également les ultrasons, la bioluminescence et l'imagerie fluorescente.

Le succès d'un diagnostic par imagerie dépend de l'association de trois éléments principaux : la cible, la sonde et la technique d'imagerie proprement dite (figure 6). Leur combinaison optimale permet ainsi d'obtenir un fort signal de contraste par rapport au tissu normal (Kaur et al., 2012).

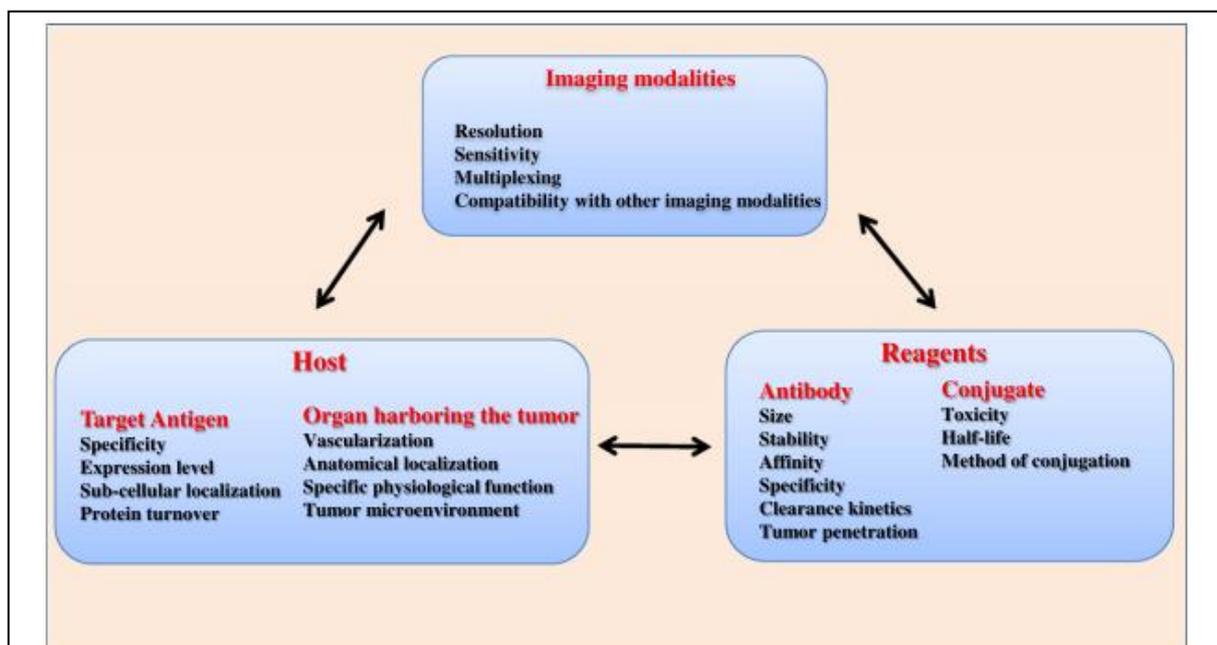
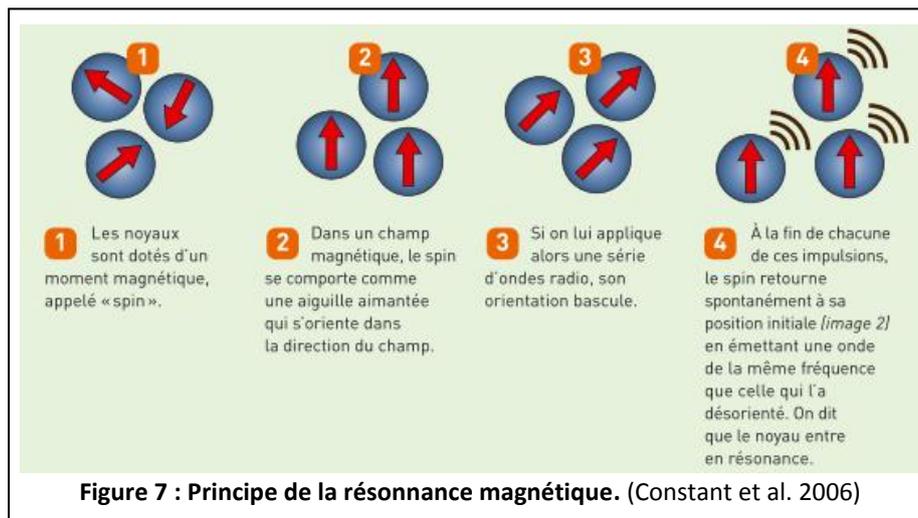


Figure 6 : Représentation schématique des facteurs associés dans le développement et le succès d'une imagerie en oncologie, médiée par les anticorps. L'efficacité du diagnostic par imagerie est dictée par une interaction entre : les modalités de la technique d'imagerie (imaging modalities), les propriétés du tracer (Reagents) et la nature et localisation de l'antigène ciblé (Host). (Kaur et al. 2012)

1.3.1 Différentes techniques d'imagerie

1.3.1.1 Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM), dépend de la propriété de résonance magnétique des noyaux d'hydrogène présents dans les molécules d'eau (H_2O) qui constituent 80 % du corps. Chaque noyau présente un moment magnétique propre, appelé spin. Sous l'action d'un champ magnétique, tous les spins s'orientent dans la direction du champ. Lorsque des ondes radio sont appliquées, l'orientation des spins bascule provisoirement, puis ils retournent à leur position initiale. Lors du retour à l'équilibre des spins après l'excitation, les noyaux émettent une onde de même fréquence que celle qui les a désorientés, ils entrent donc en résonance (figure 7). Ainsi, lors d'une IRM, sous l'action d'un fort champ magnétique et d'une excitation électromagnétique, les noyaux d'hydrogènes de l'eau dans différents éléments de volumes donnés émettent des signaux dont l'intensité dépend de la concentration de l'eau dans chaque élément de volume considéré (voxel).



Pour réaliser les images en 3D, les signaux des noyaux en résonance sont localisés à partir d'un encodage spatial de la région à étudier. Le traitement numérique fournit une carte de la répartition de l'eau dans l'organisme pour ainsi visualiser les organes et suivre leur activité (Constant et al., 2006). Le contraste entre deux voxels dépend des temps de relaxation des spins nucléaires qui diffèrent. Il est donc possible d'observer des altérations des tissus, telles que des tumeurs, grâce aux différences de densité et du temps de relaxation de spins nucléaires de l'eau. Néanmoins, en IRM, l'intensité du signal est souvent insuffisante pour permettre d'observer une différence convenable entre les parties saines ou affectées de l'organisme. Cela mène à l'utilisation d'agents de contraste qui accroissent la vitesse de relaxation des noyaux afin d'augmenter l'intensité des signaux (Borel,

2001). Les agents de contraste paramagnétiques dits « positifs », apparaissent en clair en IRM, le plus courant est le gadolinium (Gd). Tandis que les agents de contraste « négatifs », représentent des zones sombres en IRM ; ils sont constitués de particules super paramagnétiques formées d'un cœur d'oxyde de fer recouvert de polymères tels que le dextran ou le poly-éthylène glycol (Kaur et al., 2012).

Parmi les différentes techniques d'imagerie actuelle, l'IRM présente la plus grande résolution spatiale (25-100 μ m), permettant ainsi une définition anatomique exceptionnelle. L'imagerie par résonance magnétique est utilisée aujourd'hui dans la détection de cancer, l'aide à la biopsie et le contrôle visuel de la réponse à la thérapie. Cependant, la durée d'acquisition en IRM est relativement longue mais c'est surtout son coût très important qui limite son utilisation (Fass, 2008).

1.3.1.2 Imagerie nucléaire

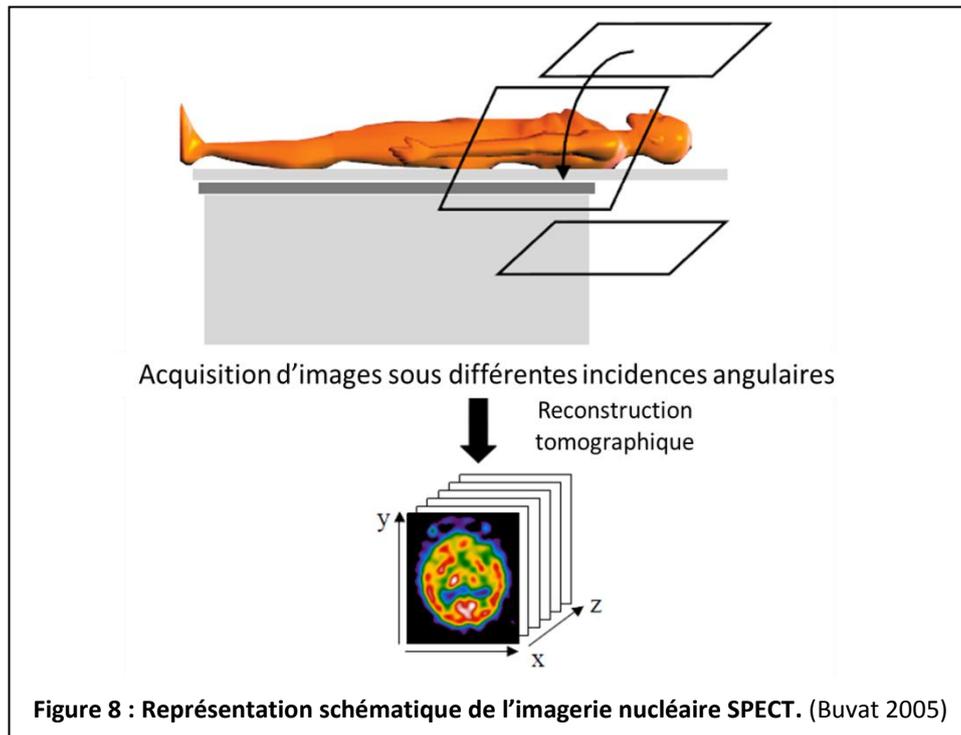
Depuis plus de trois décennies, l'imagerie nucléaire est utilisée pour le diagnostic non invasif des cancers. En particulier, dans le cadre de la médecine personnalisée des patients, l'imagerie nucléaire est grandement impliquée en oncologie en termes de classification de nouveaux malades, de planification de traitement et de prédiction de la réponse à la thérapie. Ensuite, ces techniques permettent une évaluation quantitative de l'efficacité du traitement. Enfin, elles sont adaptées au suivi continu pour le diagnostic précoce d'éventuelles récurrences grâce aux rares effets secondaires et aux faibles doses absorbées de radiation (Fass, 2008).

L'imagerie nucléaire est divisée en deux classes : La tomographie par émission monophotonique (TEMP, ou single photon emission computed tomography, SPECT) et l'imagerie à émission de positons (positron emission tomography, TEP).

1.3.1.2.1 Imagerie SPECT

SPECT repose sur la reconstruction de la distribution des traceurs radioactifs qui émettent des photons gamma à l'intérieur de l'organisme. Parmi les différents radioisotopes émetteurs de rayons gamma (technetium-99m (^{99m}Tc), indium-111 (^{111}In), iode-123 (^{123}I), iode-125 (^{125}I), gallium-67 (^{67}Ga) et lutetium-177 (^{177}Lu)), le ^{99m}Tc et le ^{111}In sont les plus communément utilisés en SPECT.

L'émission de photons gamma étant isotrope, on place un collimateur devant la caméra pour sélectionner la direction entrante des photons et la gamma caméra tourne autour du patient pour obtenir différentes projections et reconstituer ainsi l'image 3D (figure 8).



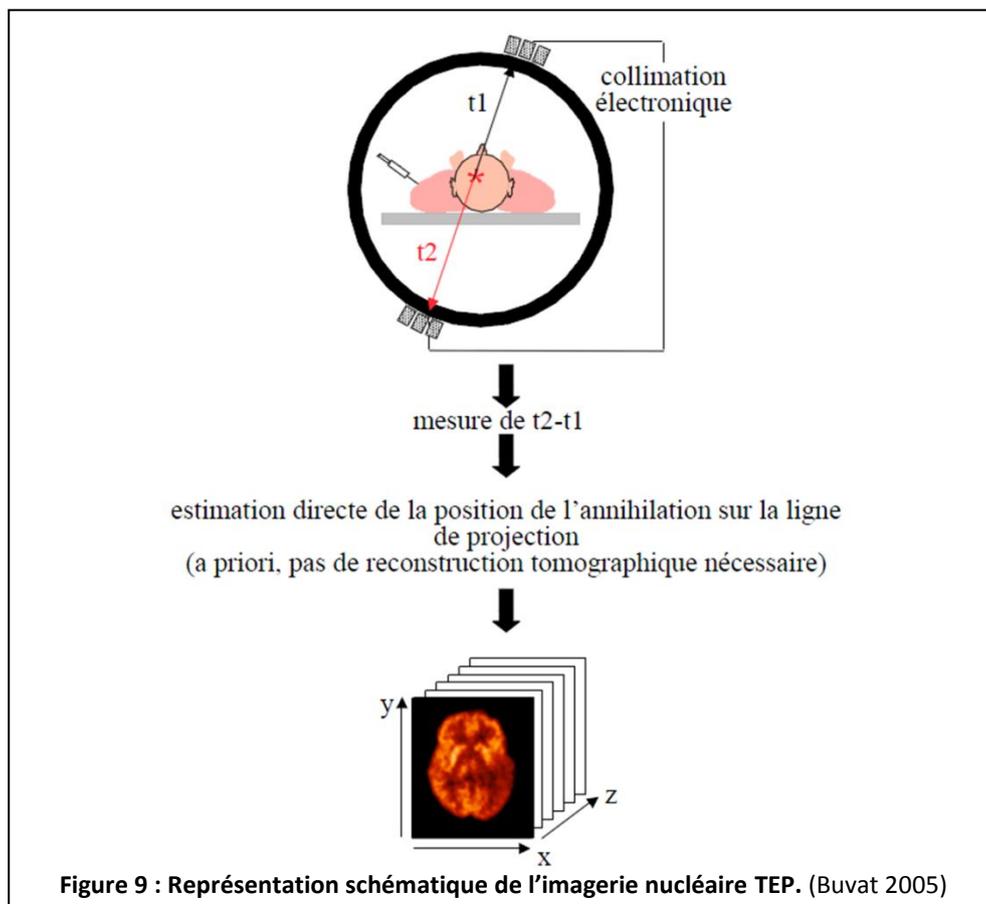
Cette technique a trouvé quelques applications dans la médecine nucléaire conventionnelle en raison de sa capacité à enlever les structures superficielles qui peuvent obscurcir l'anomalie dans l'image, permettant ainsi l'amélioration du contraste. Toutefois, la qualité de la reconstruction 3D dépend de la qualité des images. Or les images de gamma camera sont très peu précises. Cette faible sensibilité dépend en particulier de la dispersion des photons, l'atténuation des rayons par le milieu et des artefacts intrinsèques du collimateur qui dégradent les images (Driol, 2008). L'ensemble de ces défauts rendait difficile la quantification exacte de la radioactivité dans un volume de tissu donné. Pourtant les progrès techniques de reconstruction 3D des images SPECT, en particulier les méthodes de reconstruction d'image par itération, ont amélioré la quantification de la concentration radioactive. L'utilisation de l'imagerie SPECT quantitative en clinique devient envisageable mais demande encore quelques progrès (Ritt et al., 2011).

En revanche, depuis plusieurs années maintenant, l'imagerie TEP permet la quantification de la radioactivité au sein de l'organisme humain (Boellaard, 2009).

1.3.1.2.2 Imagerie TEP

L'imagerie TEP, ou TEP-scan, basé sur les travaux pionnier de Ter-Pogossian, est la technique d'imagerie médicale la plus récente. Contrairement au SPECT, le radioisotope employé n'émet pas directement un photon, mais un positon (électron positif). Un positon, après un court trajet à partir de son point d'émission, libère son énergie cinétique et se désintègre avec un électron (négatif) en

émettant deux photons d'annihilation de 511KeV à 180° l'un de l'autre. Ces photons sont alors captés en coïncidence par deux détecteurs opposés. Quand une coïncidence est détectée, le système détermine la ligne traversant le patient qui connecte les deux détecteurs, cette ligne est appelée ligne de réponse. L'ensemble des projections de la distribution de l'émission ne s'obtient plus en tournant la caméra mais en captant suffisamment de lignes de réponse. Ainsi la détection électronique de la direction des photons améliore la sensibilité du système. Les avancées technologiques permettent aujourd'hui d'estimer la zone du point de l'émission des photons avec la mesure de la différence des temps de vol des deux photons (Driol, 2008).



Différents radioisotopes peuvent être utilisés en TEP tels que ^{124}I , ^{64}Cu , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , yttrium-86 (^{86}Y), brome-76 (^{76}Br) et zirconium-89 (^{89}Zr), le plus classiquement employé reste le Fluor-18 (^{18}F). Sa courte demi vie (110 min), en fait un traceur parfaitement adapté à l'imagerie *in vivo* : l'acquisition devant avoir lieu quelques heures après l'injection, le diagnostic est réalisé dans la journée et limitant ainsi les procédures de radioprotectons du patient.

Aujourd'hui, la sonde couramment employée pour le diagnostic et le suivi des tumeurs est un analogue du glucose, le deoxyglucose, couplé au ^{18}F (^{18}F FDG). En effet, les cellules tumorales présentent une particularité du métabolisme cellulaire conduisant à une hyperconsommation du

glucose et incorporent préférentiellement le ^{18}F FDG. Ce composé, transformé en ^{18}F FDG-6-phosphate par une hexokinase, n'est pas métabolisé par les cellules. La radioactivité reste donc piégée et s'accumule dans les cellules cibles. Ainsi l'imagerie ^{18}F FDG-TEP permet de visualiser et quantifier l'activité métabolique cellulaire dans les tissus consommateurs de glucose, en particulier les tissus tumoraux. Cependant, les résultats doivent être analysés avec précaution en raison du taux variable de glucose incorporé entre les patients mais aussi entre les tissus sains et malins. Le FDG n'est évidemment pas adapté à l'étude des tumeurs touchant les organes grand consommateur de glucose comme le cerveau, le cœur et le rein. De plus, la consommation du ^{18}F FDG est augmentée dans des régions inflammatoires ce qui peut mener à des faux positifs. Il devient donc nécessaire pour surmonter les limites du ^{18}F FDG de développer de nouveaux outils diagnostiques, en particulier des sondes spécifiques de biomarqueurs tumoraux.

1.3.1.2.3 Comparaison SPECT et TEP pour le théranostic

Le principal avantage de l'imagerie TEP en comparaison au SPECT est sa grande sensibilité permettant une détection de ces traceurs à faible concentration (10^{-1} pM). En ce qui concerne la résolution spatiale de ces techniques, celle du SPECT tend à s'améliorer avec le développement de méthode compensant la réponse dégradée du système collimateur-détecteur. Néanmoins les efforts de recherche, surtout portés sur l'amélioration de la résolution en TEP, permettent déjà une imagerie TEP de haute résolution spatiale (de l'ordre du millimètre). Enfin, le troisième paramètre important dans l'imagerie nucléaire est la résolution temporelle qui informe sur les changements de biodistribution du traceur dans l'organisme traduisant ainsi les processus physiologiques au cours du temps. Tout comme la résolution spatiale, la résolution temporelle dépend des algorithmes de reconstruction mais également de la sensibilité du système d'imagerie. En ce sens, la TEP présente un avantage sur le SPECT pour les études dynamiques. En résumé, dans l'imagerie nucléaire, la TEP se révèle être la méthode de choix en termes de sensibilité et de suivi de l'évolution de la cible.

Néanmoins, l'imagerie nucléaire repose sur l'utilisation de radioéléments qui ne sont pas sans risque sur la santé ce qui en fait une technique lourde à utiliser en termes de mesures de sécurité. Par ailleurs, l'imagerie nucléaire nécessite l'injection de radiopharmaceutiques qui doivent être synthétisés juste avant l'analyse du fait de leur courte durée de vie. Cette dépendance en atomes radioactifs difficiles à produire, ajoute des contraintes de temps et de coût. Face à ces multiples inconvénients, une nouvelle technique émerge, l'imagerie par fluorescence.

1.3.1.3 *Imagerie par fluorescence*

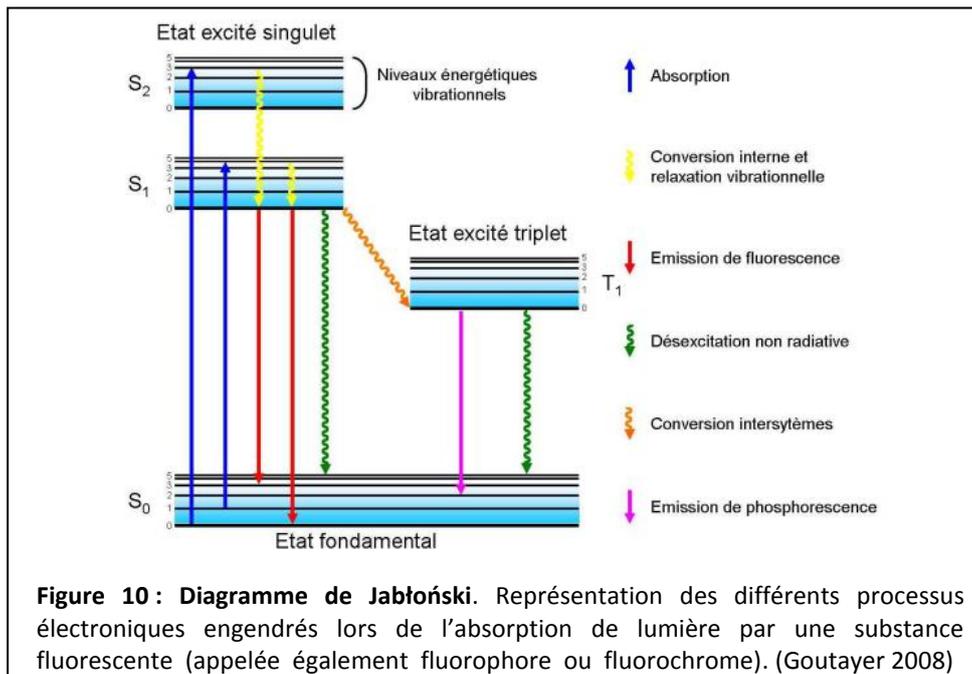
L'imagerie par fluorescence appartient à la catégorie d'imagerie optique qui repose sur la détection de lumière émise. La technique de fluorescence consiste à éclairer (« exciter ») une molécule dans une longueur d'onde spécifique, proche de l'absorption maximale. Spontanément, la molécule revient ensuite de son état excité à son niveau d'énergie stable en émettant un ou plusieurs photons d'une longueur d'onde spécifique (figure 10).

En imagerie de fluorescence, les longueurs d'ondes émises peuvent être issues de molécules naturelles ou artificielles. D'ailleurs, la plupart des tissus animaux recèlent d'éléments fluorescents (des fluorochromes endogènes). Dans le principe, il est donc possible, après une excitation lumineuse unique, de discriminer les fréquences de la lumière émise par tel ou tel structure. Cependant, la plupart des fluorochromes biologiques présentent un pic d'excitation dans l'UV ou le bleu. Or, à ces longueurs d'onde, la pénétration de la lumière dans les tissus est extrêmement limitée (quelques centaines de μm). Bien souvent, on force le phénomène, en administrant des sondes artificielles : des fluorochromes exogènes sont alors couplés à des molécules ayant une affinité spécifique pour un tissu ciblé. On utilise donc des fluorochromes dont le pic d'excitation est situé dans le proche infra-rouge qui permet une plus grande pénétration des tissus. Néanmoins, ces signaux fluorescents sont capables de traverser une profondeur tissulaire limite de 1 à 2 cm (Mordon, 2006). L'imagerie par fluorescence voit donc son utilisation réduite au « diagnostic de surface » mais pas seulement externe (peau et intra-opératoire), elle est également efficace pour les méthodes d'exploration interne (endoscopie, bronchoscopie, colposcopie (Collinet et al., 2009)).

L'excitation lumineuse choisie pour déclencher la réaction d'un fluorophore spécifique conduit toujours à une fluorescence « parasite » des autres fluorochromes du tissu.

Dans la plupart des cas, on tente d'éliminer cet effet parasite par une discrimination spectrale. Cela demande l'identification préalable des différences de spectres d'autofluorescence entre un tissu sain et un tissu tumoral (exemples : (Gillenwater et al., 1998; Lam et al., 2000).

On peut également traiter l'information lumineuse par une discrimination temporelle. Dès que l'excitation lumineuse cesse, la fluorescence s'éteint progressivement, selon une constante de temps variable en fonction des molécules. Or, la plupart des fluorochromes exogènes ont un temps de relaxation 3 à 5 fois plus long que les fluorochromes endogènes. Il suffit donc d'attendre un laps de temps avant d'ouvrir l'obturateur de la caméra : les fluorescences endogènes seront éteintes et seuls les rayonnements exogènes, émettant le signal d'intérêt, seront détectés (Mordon, 2006).



En raison des propriétés intrinsèques des fluorochromes, l'imagerie par fluorescence permet un diagnostic « activable ». Les sondes peuvent être conçues de façon à émettre un signal uniquement après adressage à sa cible ce qui augmente la sensibilité et la spécificité du diagnostic. La fluorescence est initialement éteinte selon trois méthodes : 1) par transfert d'énergie par résonance de type Forster (FRET), 2) par formation d'homo-dimer, deux premières stratégies basées sur le principe d'annihilation de la fluorescence entre deux fluorochromes proches dans l'espace, et 3) par transfert d'électron induit par un photon (photon induced electron transfert, TEP), qui repose sur un changement d'excitation d'un électron au sein d'un seul fluorophore. Ainsi, les sondes n'émettent aucune fluorescence jusqu'à leur adressage à la cible. Il existe alors deux approches d'activation, la première, par clivage enzymatique spécifique de la région ciblée. Dans la seconde stratégie, la sonde est activée après internalisation dans la cellule cible par dégradation lysosomale. Ainsi, la fluorescence est émise uniquement dans la région ciblée ce qui diminue considérablement de bruit de fond (Kobayashi and Choyke, 2011).

Finalement, l'imagerie par fluorescence présente de nombreux intérêts : elle allie une bonne sensibilité, des agents de contraste stables et activables et elle ne dépend pas de radiations ionisantes. Cette technique est également peu onéreuse à l'achat et au fonctionnement, ce qui en fait un système d'imagerie moléculaire de choix pour le « diagnostic de surface ».

1.3.1.4 Imagerie multimodale

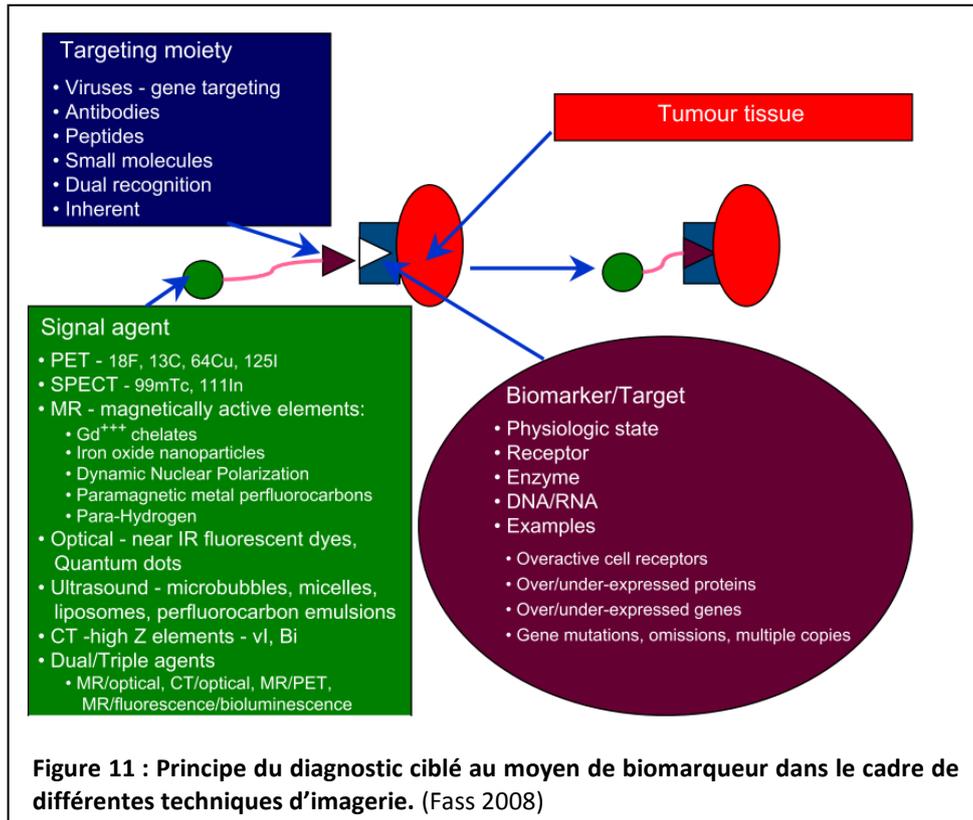
Les avancées technologiques font apparaître une nouvelle imagerie dite multimodale, combinant généralement l'imagerie nucléaire et une autre technique.

Il existe notamment la TEP/CT, la TEP fournit une information fonctionnelle (par exemple, la captation du glucose par des cellules tumorales) tandis que le CT scanner apporte l'information anatomique et morphologique correspondante. Le patient bénéficie, avec un seul passage de tout le corps au travers d'un appareillage, de deux imageries complémentaires acquises dans les mêmes conditions. Le système SPECT/CT se multiplie également, mais il ne connaît pas le succès de la TEP/CT en raison de son utilisation limitée à quelques indications et ce pour un coût relativement élevé. La technique TEP/CT connaît donc une grande réussite en oncologie et remplace progressivement l'imagerie TEP seule (Rahmim and Zaidi, 2008).

Par ailleurs, la haute résolution peut être apportée par l'IRM qui, contrairement au CT, n'expose pas le patient à des radiations ionisantes. L'association TEP/IRM se présente donc comme une alternative intéressante. Ainsi, les recherches actuelles sont orientées dans le développement de nouveaux systèmes de pointe qui combinent TEP/IRM apportant la grande résolution anatomique de l'IRM et la quantification de la TEP (Pichler et al., 2008; Chen and Kinahan, 2010).

Dans l'engouement pour l'imagerie multimodale, de nouvelles combinaisons apparaissent comme la TEP/fluor ou SPECT/fluor. Ainsi l'association de l'imagerie nucléaire avec cette technique optique dans la même sonde ou la même expérience présente un grand potentiel : elle permet une image du corps entier, à très haute résolution, informant sur l'environnement local de la sonde, ayant ainsi des avantages évident en clinique et en recherche (Thorp-Greenwood and Coogan, 2011).

Pour toutes ces techniques d'imagerie, qu'elle soit radioactive, magnétique ou encore optique, les sondes actuellement utilisées manquent de spécificité. Avec la tendance croissante vers l'avancement du concept de médecine personnalisée, il y a un réel besoin de développer des stratégies et les outils qui peuvent être utilisés pour le diagnostic individualisé qui permettra un traitement adapté. Pour un diagnostic ciblé, le traceur doit être associé à une molécule ciblant la tumeur telle que les anticorps, les peptides, les petits ligands ou encore des copolymères synthétiques (figure 11).



Dans le cas de biomarqueurs protéiques, les molécules le plus souvent utilisées pour le diagnostic des cancers sont les anticorps ou leurs dérivés en raison de leur grande spécificité.

1.3.2 Les techniques de couplage d'une protéine

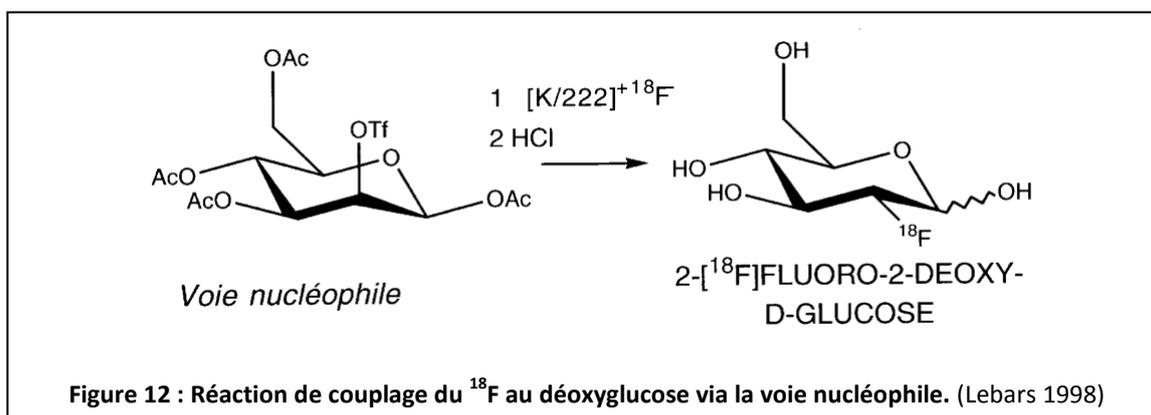
L'utilisation d'anticorps, entiers ou recombinants, en imagerie TEP, nécessite leur marquage par un radioisotope (tableau 2). La chimie de couplage est optimisée pour lier efficacement le traceur à la biomolécule avec comme objectif de ne pas altérer sa fonctionnalité.

Tableau 2 : Les radionucléotides émetteurs de positons utilisés en imagerie TEP. (Wu 2009)

Radionuclide	Half-life	Positron yield
^{68}Ga	68 min	89%
^{18}F	109 min	97%
^{64}Cu	12.7 h	18%
^{86}Y	14.7 h	17.5%
^{76}Br	16.0 h	55%
^{89}Zr	78.4	22.7%
^{124}I	100.2 h	23%

1.3.2.1 Couplage par substitution

Aujourd'hui, la méthode classique de marquage de la sonde de référence en imagerie TEP, le ^{18}F FDG, repose sur une substitution nucléophile. En absence d'eau (les fonctions OH^- s'incorporeraient alors de préférence au fluor, à l'état de traces), le triflate (Tf) est substitué par le ^{18}F sur le précurseur tétraacétyl mannose triflate protégé. Lors de la déprotection, les groupements acétyl (Ac) sont remplacés par des hydroxydes on obtient alors le ^{18}F FDG (figure 12, (Lebars, 1998)).



Le principe de substitution est également utilisé dans le cadre de la radioionisation des protéines qui permet de coupler le radioélément ^{124}I aux résidus aromatiques (tyrosine et histidine) d'une protéine (Bailey, 1996; Chopra, 2011).

Néanmoins, les réactions de substitution peuvent nécessiter des conditions drastiques pour les biomolécules, ainsi d'autres stratégies ont été développées.

1.3.2.2 Couplage sur les amines

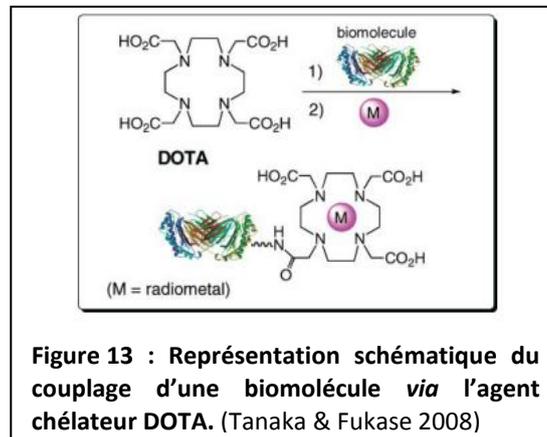
Une autre approche de marquage radioactif est la liaison du traceur à une amine primaire d'une protéine.

La méthode directe consiste à fonctionnaliser le radioélément lui-même avec un groupement réagissant sur les amines généralement un succinimidyl. Ainsi pour la liaison du ^{18}F à un anticorps des molécules ont été développées telles que le N-succinimidyl-4- ^{18}F -fluorobenzoate (18F-SFB) ou encore le N-succinimidyl-8-(4-[^{18}F]fluorobenzylamino) (Garg et al., 1992; Vaidyanathan and Zalutsky, 1994).

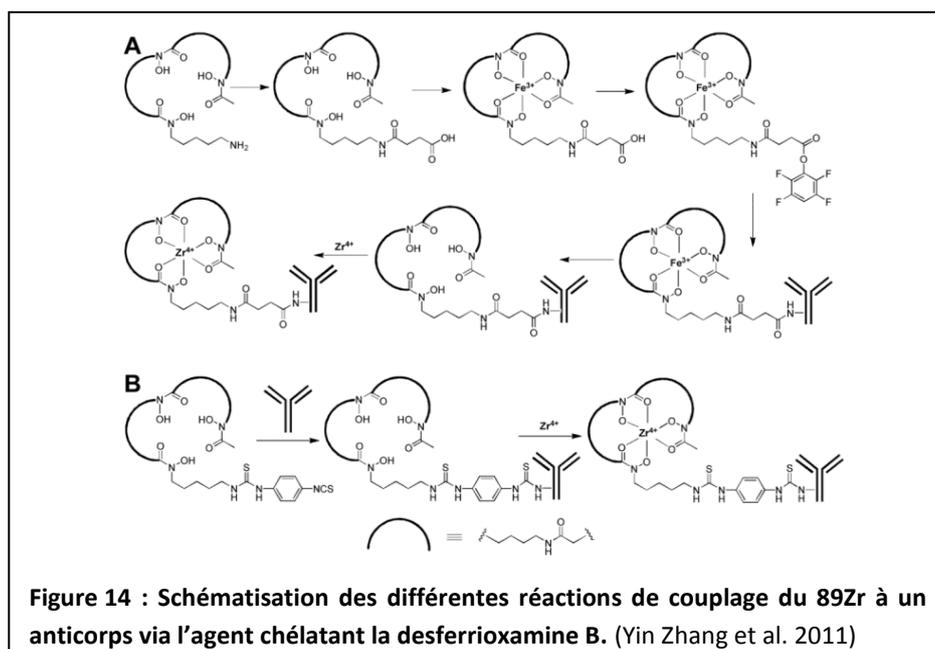
D'autre part, le marquage radioactif peut faire intervenir un agent chélatant qui, fixé par liaison covalente à la protéine, interagit avec le radiométal.

Parmi les chélateurs, le DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclodécane-1,4,7,10-tetraacetic acid) est identifié comme le ligand le plus favorable pour l'imagerie TEP, en raison de sa compatibilité avec une multitude de radioéléments et sa haute stabilité (figure 13). En comparaison avec d'autre chélateurs

comme l'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ou le DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), la cinétique et la stabilité thermodynamique du complexe chélateur-radioélément, suit généralement l'ordre DOTA > DTPA > EDTA. Dans cette méthode, c'est l'agent chélatant qui est fonctionnalisé (Tanaka and Fukase, 2008). Le chélateur DOTA est souvent utilisées pour le marquage des radioéléments ^{68}Ga et ^{64}Cu en imagerie TEP et le ^{111}In pour la SPECT (exemples : (Eder et al., 2010; Leung, 2012; Malmberg et al., 2012).



En ce qui concerne le couplage du radioélément ^{89}Zr , l'agent chélatant de référence est la desferrioxamine B (Df) (figure 14A). Malgré le succès de cette stratégie, ce couplage demande 6 étapes, ce qui en fait une procédure compliquée et longue. Récemment, un nouveau chélateur dérivé de la Df, a été rapporté pour simplifier le marquage (2 étapes) du ^{89}Zr : p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine B (Df-Bz-NCS) (figure 14B). Le couplage de Df-Bz-NCS aux anticorps est très efficace et le faible ratio chélateur sur anticorps est de 1,5 ce qui peut éviter le changement de la pharmacocinétique et l'immunoréactivité de l'anticorps (Zhang et al., 2011).



Récemment, plusieurs ligands Df réagissant avec une fonction thiol ont été développés pour marquer l'anticorps sur une cystéine. Le groupe amine de Df est acétylé par des produits chimiques divers pour obtenir des réactifs aux thiols tels que le bromoacetyl-desferrioxamine (Df-Bac), iodoacetyl-desferrioxamine (Df-Iac) et maleimidocyclohexyl-desferrioxamine (Df-Chx-Mal) (Zhang et al., 2011).

Ces systèmes de couplage aux amines sont relativement efficaces, mais restent variables d'une séquence protéique à l'autre. Les fonctions amines sur un anticorps sont nombreuses, mais certaines présentes dans les régions variables sont essentielles à l'interaction antigène-anticorps, leur couplages au radioisotope peut alors perturber l'immunoréactivité de l'anticorps. C'est pourquoi, il est intéressant de mettre au point des couplages localisés.

L'ingénierie des fragments d'anticorps permet lors de la construction moléculaire l'ajout de régions spécifiques qui permettront un couplage orienté du radiotracer à la protéine.

1.3.2.3 Couplage sur les thiols

Un anticorps monoclonal possède naturellement plusieurs dizaines de cystéines, sites potentiels de couplage *via* la fonction thiol libérée après une étape de réduction. Or l'état oxydé des cystéines est important avec la formation de ponts disulfures qui participent au maintien de la structure tridimensionnelle de l'anticorps. Afin d'empêcher la perte de la structure de la protéine et par conséquent son activité biologique, des procédures de réduction douce ont été mises au point permettant de contrôler le nombre de cystéines réduites (Rhodes, 1991; Dias et al., 2011). Les groupements sulfhydryles (-SH) ainsi formés sont en particulier connus pour réagir directement avec l'ion métallique technétium (Garron et al., 1991; Tesic et al., 1995). Pour ce qui est des fragments d'anticorps, bien souvent réduits aux régions variables, toutes les cystéines présentes sont essentielles dans la stabilité de la molécule. Donc une nouvelle cystéine doit être ajoutée pour créer un site de marquage qui ne perturbera pas l'immunoréactivité du fragment (George et al., 1995)(Verhaar et al., 1996).

La stratégie de couplage sur les thiols est particulièrement intéressante pour les affibodies qui ne possèdent pas de cystéine dans leur séquence. Ainsi par ingénierie moléculaire, l'ajout d'une cystéine permet de créer un site unique de marquage (Kramer-Marek et al., 2008).

Dans certaines applications, la présence d'une cystéine supplémentaire et la sensibilité des ponts disulfures à la réduction peuvent être une limitation pour la fonctionnalité du fragment. Ainsi, de nouvelles approches de marquages localisés ont été développées.

1.3.2.4 *Couplage sur tag*

Bien souvent, les fragments d'anticorps recombinants présentent une étiquette protéique (appelée tag en anglais), importante pour leur purification, telles que les tag HA, His ou encore myc. Ces séquences particulières peuvent être le lieu d'un marquage spécifique. Une méthode repose sur l'utilisation du tag-His pour le couplage d'un radioélément au moyen d'un tricarbonyl ($^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$) (Gainkam et al., 2008).

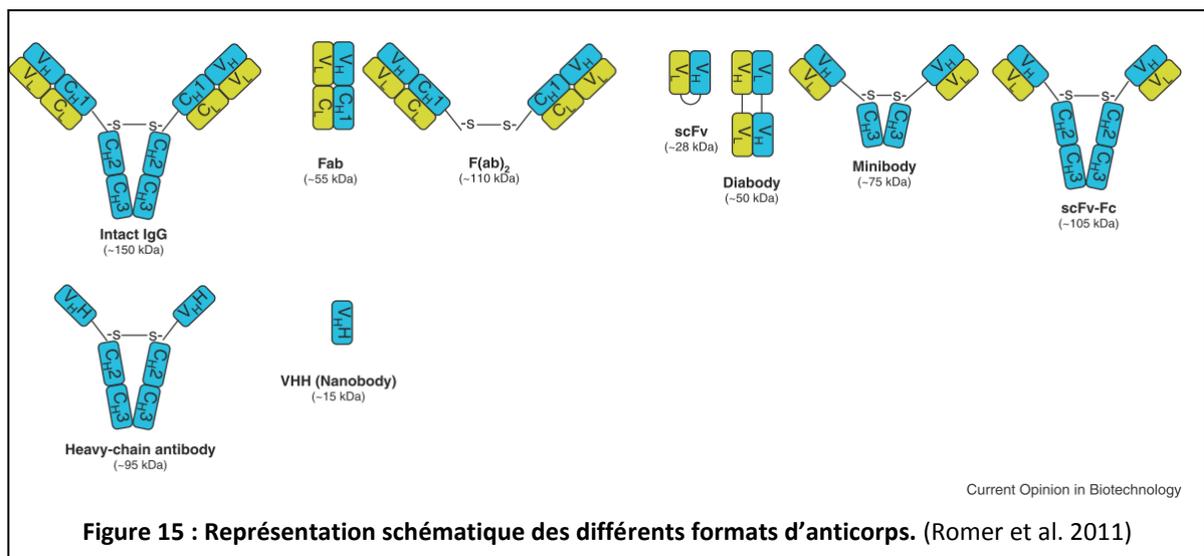
Une autre catégorie de tag sont les résidus artificiels présentant des fonctions de réactions spécifiques, absentes de la séquence protéique naturelle. Azide-, arylhalide-, alkyne- ou des acides aminés contenant un alkene- peuvent être incorporés génétiquement dans des protéines. Ils seront alors le site de transformations diverses locales (Chalker et al., 2011).

La description de stratégies de couplage décrites ci-dessus n'est pas une liste exhaustive des possibilités de marquage des anticorps. Il n'existe pas de traceurs ou de méthodes de couplage de références en raison de la grande variabilité des séquences de ces protéines en particulier sur les formats recombinants.

1.4 Les formats d'anticorps et dérivés adaptés au diagnostic *in vivo*

Les anticorps monoclonaux ont longtemps été considérés comme des candidats intéressants en thérapie et diagnostic ciblés grâce à leur capacité d'adressage *via* leur grande spécificité. Mais il faudra attendre les avancées en ingénierie protéique et en biologie moléculaire, pour que les anticorps monoclonaux connaissent l'essor escompté, en particulier en thérapie. L'inconvénient majeur des anticorps monoclonaux pour le diagnostic *in vivo* est leur pharmacocinétique. En effet, les anticorps entiers sont maintenus dans la circulation plusieurs jours, ce qui entraîne un bruit de fond important empêchant l'obtention d'une image de qualité (sans bruit de fond) le jour de l'injection (Kelloff et al., 2005). Des études ont montrés que la clairance systémique des formats d'anticorps est inversement proportionnelle à leur taille : plus le fragment est de petite taille, plus vite il sera éliminé de la circulation (Rosebrough et al., 1988).

Ainsi, suite à l'émergence de l'ingénierie moléculaire et l'obtention de différents formats d'anticorps, de nouvelles sondes spécifiques pour le diagnostic *in vivo* de tumeur ont été développées (figure 15).



1.4.1 Les différents formats d'anticorps

1.4.1.1 Obtention par voie enzymatique

1.4.1.1.1 Les Fab'2 et Fab

Les formats Fab (55 kDa) et F(ab')₂ (110 kDa), produits par voie enzymatique (figure 2), ont été les premiers fragments d'anticorps utilisés pour le diagnostic *in vivo* des tumeurs. De par leur taille, leur clairance systémique est réduite à une dizaine d'heures et le format Fab est rapidement

éliminé par filtration glomérulaire (seuil à environ 60 kDa). Ainsi différents fragments Fab ont été développés, le premier datant de 1995, l'arcitumomab couplé au ^{99m}Tc (CEA-Scan®), dirigé contre l'antigène carcynoembryonnaire (CEA) dans le diagnostic de cancer colorectaux. Aujourd'hui trois des cinq anticorps diagnostiques autorisés sur le marché sont des Fab. Néanmoins, l'inconvénient de ce format est sa monovalence (un seul paratope) ce qui diminue son affinité totale (avidité) et donc réduit sa fixation dans les tumeurs (Alt et al., 2010).

Par ailleurs, l'avancée de la biologie moléculaire a permis l'ingénierie de fragments d'anticorps de tailles et valences variables.

1.4.1.2 Obtention par ingénierie moléculaire

1.4.1.2.1 Le single chain variable Fragment (scFv)

Le scFv est constitué de la région variable légère (VL) et la région variable lourde VH reliées par un lien peptidique de 12 à 25 acides aminés, avec généralement des résidus glycine et serine qui apportent une flexibilité et une résistance aux protéases. Ce fragment, de 25 et 30 kDa, représente un sixième de la taille d'un anticorps entier (figure 15). Le scFv conserve la même spécificité et affinité que l'anticorps monoclonal dont il est issu, mais reste un fragment monovalent. Le développement de scFv pour l'imagerie *in vivo* n'a finalement jamais dépassé le stade de la recherche (Milenic et al., 1991; Pietersz et al., 1998; Colcher et al., 1999). En effet, les limitations de ce format sont son manque d'affinité et sa courte demi-vie systémique inférieure à 1 h (c'est-à-dire la durée pour diminuer de moitié sa concentration plasmatique). Par conséquent, le scFv s'accumule difficilement au sein des tumeurs ce qui empêche l'obtention d'image *in vivo* exploitable (Holliger and Hudson, 2005).

A partir du format scFv, deux stratégies ont été développées pour produire des fragments d'anticorps dont la pharmacocinétique est mieux adaptée à l'imagerie *in vivo* : 1) des chimères scFv-région constante et 2) des multimères de scFv.

1.4.1.2.2 Les chimères scFv-région constante : scFv-CH3 et scFv-Fc

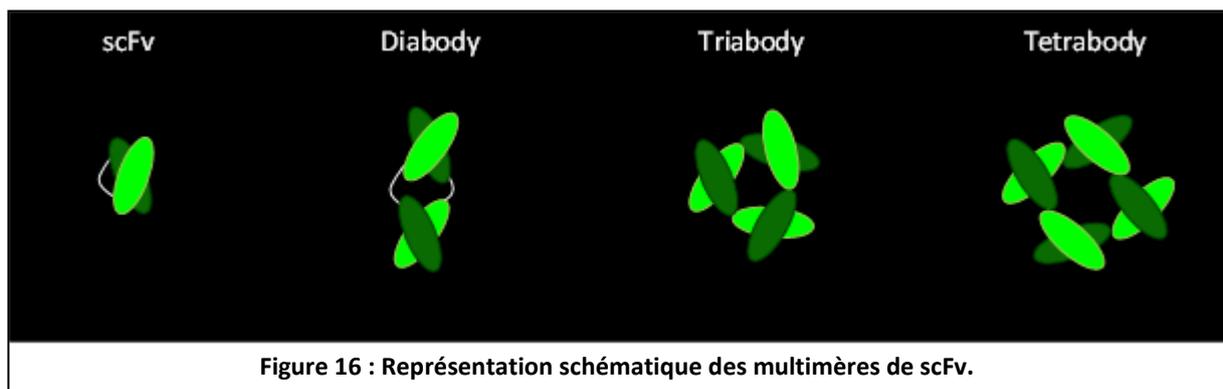
Le scFv-CH3, également appelé minibody, est un fragment dimérique de 75 kDa issu de l'ingénierie moléculaire. Il est formé de deux monomères de type VL-lien-VH-charnière-CH3. La région VL-lien-VH correspond à un fragment scFv et les deux monomères sont reliés *via* une région constante, le troisième domaine constant d'une immunoglobuline humaine (figure 15). *In vivo*, malgré la présence du CH3, ce format d'anticorps présente une pharmacocinétique plus favorable

que l'anticorps entier, avec une clairance systémique plus courte, un adressage à la tumeur plus rapide et un bruit de fond dans les tissus sains bien inférieure (Hu et al., 1996; Wu and Yazaki, 2000; Yazaki et al., 2001)

Une autre chimère développée est le scFv-Fc, où le fragment scFv (VL-lien-VH) est lié à une région Fc entière, soit les domaines constants CH2 et CH3 d'une immunoglobuline humaine (figure 15). Contrairement aux minibodies, ces fragments d'anticorps, de 105 kDa, se comportent de la même façon que les anticorps entiers en termes de persistance dans la circulation et de pénétration de tumeur. Le ralentissement de la clairance systémique s'explique par l'interaction de la région constante avec les récepteurs Fc des cellules sanguines et surtout le recyclage via les récepteur FcγRn ce qui fait du scFv-Fc un fragment inadapté à l'imagerie *in vivo* (Slavin-Chiorini et al., 1995; Xu et al., 2000)

1.4.1.2.3 Les multimères de scFv : diabody, triabody, tetrabody

Comme décrit précédemment, le scFv est l'unité fonctionnelle la plus petite parmi les différents formats d'anticorps. Une molécule scFv avec un lien inférieur à 12 résidus manque de flexibilité, il est alors impossible que le VL interagisse avec le VH pour reconstituer un domaine fonctionnel. Ainsi avec un lien constitué de 3 à 12 résidus, le scFv s'associe avec une seconde molécule pour former un dimer bivalent : le diabody. La réduction de la longueur du linker au-dessous de trois résidus peut forcer l'association en trimer formant un triabody ou en tétramères, le tetrabody (figure 16 (Guo and Cai, 2003)(Hudson and Kortt, 1999).



Ces multimères de scFv sont significativement plus grands que le monomère : 50 kDa le diabody, 75 kDa le triabody et 100 kDa le tetrabody, ce qui leur confère un avantage pour des applications *in vivo*. Leur clairance systémique est intermédiaire entre celle du scFv trop courte, et celle d'un anticorps entier trop longue pour l'imagerie *in vivo*. Néanmoins, cet avantage de taille est modéré par leur capacité à pénétrer les tumeurs, puisque l'infiltration *via* le réseau vasculaire dans la

tumeur est inversement proportionnelle à la taille de la molécule. D'autre part, la multivalence de ces fragments leur apporte un avantage inéluctable face aux formats monovalents tels que le Fab ou le scFv. Leur grande avidité favorise une fixation importante aux cellules ciblées. Cette propriété fait intervenir la notion de flexibilité entre les paratopes. Elle est essentielle pour la fixation croisée c'est-à-dire la liaison à deux ou plusieurs antigènes à la surface d'une cellule ou entre les cellules (Lawrence et al., 1998). La flexibilité, dépendant de la taille du lien entre VL et VH, est évidemment plus importante dans le diabody que dans le triabody. Cela explique l'absence de fixation croisée aux récepteurs cibles du format triabody lors d'études *in vivo* (Hudson and Kortt, 1999).

L'ensemble des formats décrits jusqu'à présent repose sur la structure d'un anticorps classique, avec la reconstitution d'un paratope, l'association VL et VH. Mais dans les années 90, l'équipe de Hammers a découvert dans le sérum de chameaux une forme particulière d'anticorps dépourvue de chaîne légère. La région variable est donc réduite à une région variable lourde que l'on nomme VHH. De plus, la région constante de ces protéines originales, appelées anticorps-chaîne lourde, est également dénuée du domaine constant CH1 (figure 15, (Hamers-Casterman et al., 1993). Ces formes particulières d'anticorps sont présentes chez toutes les espèces de camélidés et ont été également identifiées chez les poissons cartilagineux (Greenberg et al., 1995).

Ces découvertes ont donc ouvert de nouvelles perspectives dans le développement de fragments d'anticorps.

1.4.1.2.4 Nanobody (VHH)

Des travaux d'ingénierie moléculaire ont permis la production de petits formats (15 kDa) constitués uniquement d'une région variable VHH, ces fragments sont appelés les nanobodies (Chames and Baty, 2009). Ces protéines qui présentent une haute affinité pour leur cible, se révèlent être de bons candidats pour le diagnostic *in vivo* des cancers. En effet, ils sont facilement et spécifiquement adressés dans les tumeurs et sont par ailleurs rapidement éliminés du sang par filtration rénale (demi-vie inférieure à 1h). Ainsi, 3h après l'injection de ce type de traceur, le ratio signal sur bruit de fond est important et permet de localiser *in vivo* les tumeurs ciblées (Huang et al., 2008). Malgré la contrainte technique d'obtention de ces anticorps-chaîne lourde par l'immunisation d'espèces atypiques (camélidés et poissons cartilagineux), plusieurs nanobodies sont actuellement en étude préclinique pour le diagnostic *in vivo* de différents cancers (Romer et al., 2011).

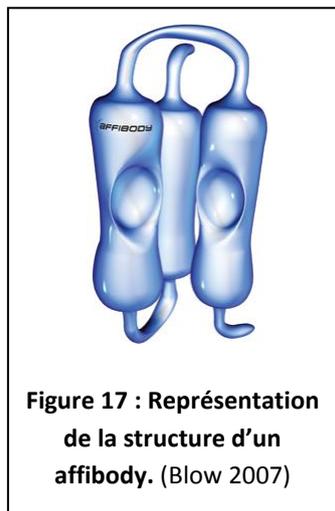
Au-delà de l'ingénierie des anticorps, la biologie moléculaire a permis également le développement de nouvelles classes de protéines pour le diagnostic *in vivo*.

1.4.2 Les alternatives aux anticorps

Cette nouvelle génération de sonde pour l'imagerie *in vivo* repose sur des squelettes protéiques, qui ne ressemblent à aucun anticorps conventionnel ni à un peptide classique, auxquels une fonction de liaison est ajoutée par recombinaison moléculaire. Ces systèmes ont été développés contre différentes cibles. Pendant de nombreuses années, plusieurs structures protéiques ont été proposées. On distingue aujourd'hui différents systèmes tels que les adnectins et les anticalins, mais les deux exemples le plus étudiés sont les affibodies et les DARPins (Gebauer and Skerra, 2009).

1.4.2.1 Affibody

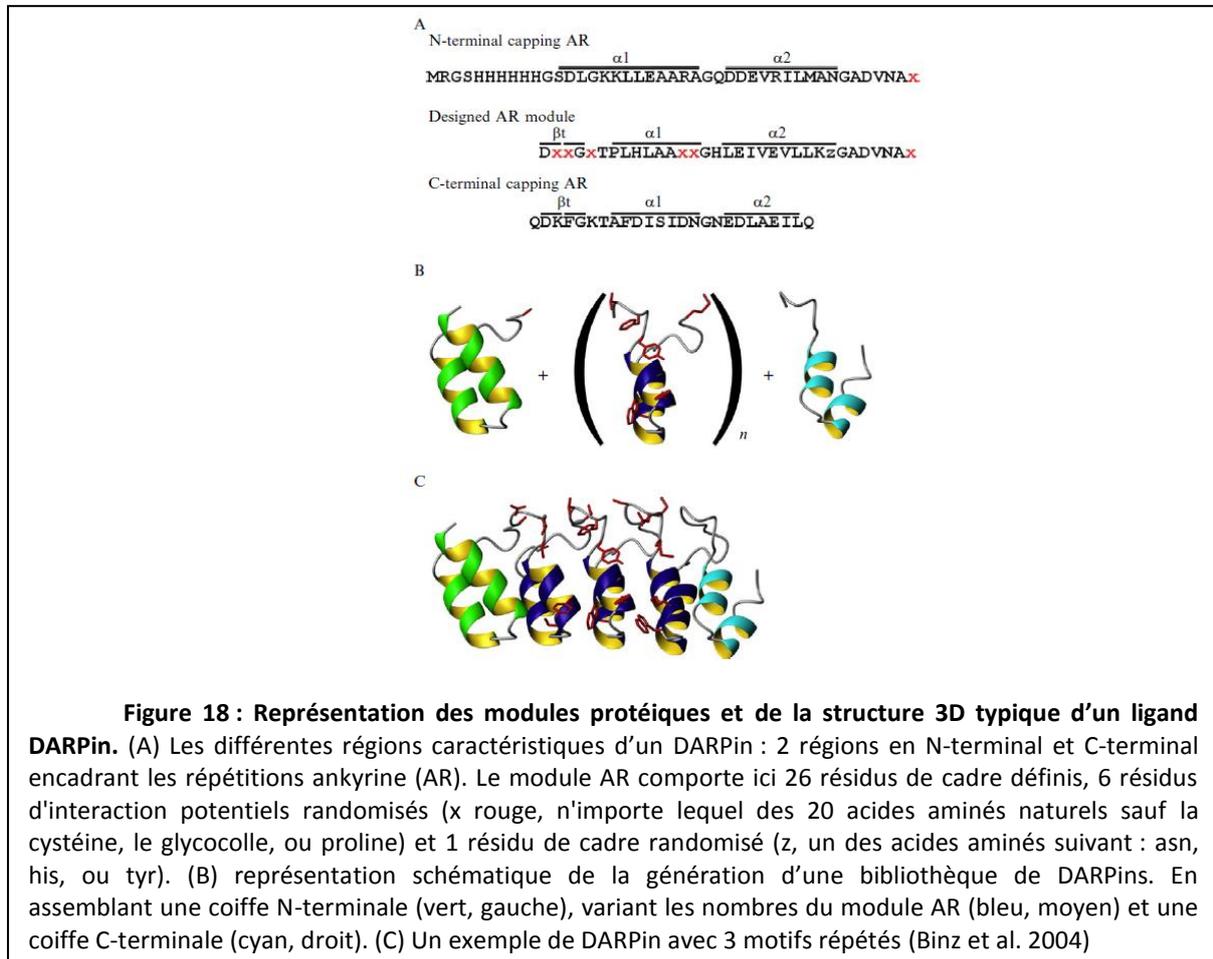
L'affibody est une structure dérivée de la protéine A, la protéine de surface de la bactérie *Staphylococcus aureus* qui a la propriété de lier les immunoglobulines. Ce petit ligand de 7 kDa est formé de trois hélices qui possèdent une excellente propriété de liaison à une multitude de cibles (figure 17, (Blow, 2007)). Ce domaine est constitué de 58 acides aminés, dont 13 sont randomisés générant ainsi une bibliothèque d'affibodies présentant des spécificités de liaison variables. Des études ont démontré le potentiel de ces ligands comme sonde de diagnostic *in vivo* des tumeurs. En effet, 2h après l'injection d'affibodies spécifiques d'un biomarqueur tumoral, une image permet de localiser la masse cancéreuse avec un fort contraste (Baum et al., 2010). Le format affibody se révèle être un outil de diagnostic *in vivo* prometteur, dont certains modèles sont actuellement en étude clinique ou préclinique.



1.4.2.2 DARPins

Le ligand DARPins pour « Designed Ankyrin Répétition proteins » est une protéine possédant une répétition du motif ankyrine (figure 18, (Li et al., 2006)). Chaque répétition, d'environ 33 résidus

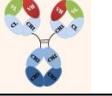
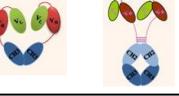
d'acides aminés, forme une unité structurale composée d'un tour β suivi par deux helices α antiparallèles. Classiquement, les domaines ankyrines sont répétés quatre à six fois et empilés les uns sur les autres, menant à une structure droitière de solénoïde avec un cœur hydrophobe continu et une grande surface au contact du solvant.



Des DARPins visant spécifiquement un biomarqueur tumoral ont été produits et se sont révélés efficaces tant dans le diagnostic *in vitro* que dans le ciblage de tumeur *in vivo* (Tamaskovic et al., 2012). Ces molécules possèdent une grande variabilité en termes de taille, par multimérisation ou Pegylation, et d'affinité, par mutation ponctuelle. Ainsi, des travaux d'optimisation de ces deux paramètres permettent d'identifier la meilleure combinaison taille-affinité pour chaque cas étudié (Zahnd et al., 2010).

Le choix du format optimal pour l'imagerie *in vivo* dépend donc d'un compromis entre clairance, avidité et pénétration de la tumeur permettant d'obtenir une image avec le meilleur rapport signal sur bruit de fond.

Tableau 3 : Tableau comparatif des différents formats d'anticorps et leur adaptation à l'imagerie *in vivo* (TEP et SPECT) (Romer et al., 2011; Kaur et al., 2012)

Format	Anticorps entier	Fab	Fab'2	scFv	Diabody	Minibody ou scFv-Fc	Autres	
								
Taille (kDa)	150	55	110	25	50	75-105	15	7-30
Demi-vie	>24h (Fujimori et al., 1989)	<10h (Fujimori et al., 1989)	<10h (Fujimori et al., 1989)	<1h (Holliger and Hudson, 2005)	0,5-7h (McCabe et al., 2011)	>24h (Girgis et al., 2011)	30-60 min (Huang et al., 2008)	Très variable (min-jours) (Lee et al., 2008; Zielinski et al., 2012)
Application clinique	Approuvés par la FDA : Prostascint : anti-glycoprotéin 40kDa Zevalin : anti-CD20 3 chimériques et 1 humanisé en clinique : -anti-CEA -anti-carbonic anhydrase -anti-CD44 -anti-HER2 10 en préclinique : 7 murins -2 anti-PSMA -2 anti-VEGFR-2 / VEGFR-3 -anti-VCAM -anti-CD33/Prominin -anti-LYVE-1 (<i>IgG de rat</i>) 3 humanisés -anti-PSMA -2 anti-EGFR	Approuvés par la FDA (EMA) : Myoscint : anti-myosine CEA-Scan : anti-CEA Verluma : anti-glycoprotéin 100kDa (LeukoScan : anti-NCA-90)			1 en clinique : -Bispécifique anti-CD19 et anti-CD3 5 en préclinique : -anti-EpCAM -anti-EDB-FN -anti-CEA -anti-HER2 -anti-CD20	4 en préclinique : -anti-CD20 -anti-PSCA (Prostate Stem Cell Antigen) -anti-CEA -anti-HER2	4 en préclinique : -Anti-IGFBP-7 -Anti-EGFR -Anti-CEA -Anti-cellules dendritiques	1 en clinique : -Affibody anti-HER2 2 en préclinique : -Affibody anti-EGFR -DARPIn anti-HER2
Avantages	• Grande spécificité et sensibilité pour son antigène	• Adressage rapide • Pénétration des tumeurs efficace • Clairance systémique rapide • Faible bruit de fond • Délais pour l'imagerie : 2-5h post-injection • Peu immunogène	• Pénétration des tumeurs efficace • Clairance systémique rapide • Faible bruit de fond • Peu immunogène • Délais pour l'imagerie : 4-5h post-injection	• Adressage rapide • Pénétration des tumeurs efficace • Clairance systémique rapide • Faible bruit de fond • Délais pour l'imagerie : 1h post-injection • Très peu immunogène	• Adressage rapide • Pénétration des tumeurs efficace • Bivalent → grande avidité • Longue rétention dans la tumeur • Clairance systémique rapide • Faible bruit de fond • Très peu immunogène • Délais pour l'imagerie : 4-5h post-injection	• Bivalent → grande avidité • Longue rétention dans la tumeur	• Adressage rapide • Pénétration des tumeurs efficace • Clairance systémique rapide • Faible bruit de fond • Très peu immunogène • Délais pour l'imagerie : 1-3h post-injection	• Adressage rapide • Pénétration des tumeurs efficace • Clairance systémique rapide • Faible bruit de fond • Très peu immunogène • Délais pour l'imagerie : 1-2h post-injection
Inconvénients	• Long temps de circulation • Fort bruit de fond • Réponse immunitaire anti-souris • Délais pour l'imagerie : plusieurs jours post-injection • Cout important	• Faible avidité → mauvaise rétention dans les tumeurs • Très faible temps de circulation (filtration glomérulaire) • importante rétention rénale → toxicité	• toxicité rénale	• Faible avidité → mauvaise rétention dans les tumeurs • Très faible temps de circulation (filtration glomérulaire) • toxicité rénale et hépatique	• toxicité rénale	• Long temps de circulation • Fort bruit de fond • Réponse immunitaire anti-souris • Délais post-injection pour l'imagerie très variable : de 18h (certains minibodies) à plusieurs jours (certains scFv-Fc)	• Faible avidité → mauvaise rétention dans les tumeurs • Très faible temps de circulation (filtration glomérulaire) • toxicité rénale	• Très faible temps de circulation (filtration glomérulaire) • toxicité rénale

CEA (CarcinoEmbryonic Antigen) ; EDB-FN (Extra domain B-Fibronectine) ; EGFR (Epidermal growth Factor Receptor) ; EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) ; IGFBP-7 (Insuline like growth factor- binding protein 7) ; LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) ; PSMA (Prostate-specific membrane antigen) ; VCAM (vascular cell adhesion molecule) ; VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor).

1.4.3 Quel format le mieux adapté à l'imagerie quantitative ?

Comme décrit précédemment, l'unique technique d'imagerie quantitative chez l'homme est l'imagerie nucléaire. Les applications cliniques actuelles reposent plus particulièrement sur l'imagerie TEP. Cette étude s'intéresse donc uniquement à l'utilisation de nouvelles sondes radiomarquées.

1.4.3.1 Le meilleur format pour l'imagerie quantitative

1.4.3.1.1 L'anticorps entier et ses alternatives

Nous savons à présent que la pharmacocinétique d'un anticorps entier radiomarqué n'est pas adaptée pour un diagnostic *in vivo*. En effet sa longue circulation systémique, qui est néanmoins un atout pour les applications thérapeutiques, pose des problèmes de temps et de radioprotection. En effet, dans l'intérêt du patient, l'imagerie doit être une technique de diagnostic rapide capable de fournir des éléments de réponse dans la journée. De plus, lors de l'utilisation d'anticorps radiomarqués, l'image est réalisée quelques jours après l'injection, ce qui demande donc d'employer des radioéléments à période relativement longue, les plus employés pour l'imagerie SPECT sont le ^{99m}Tc (période de 6 h) et le ^{111}In (période de 67 h), pour la TEP, sont utilisés le ^{124}I (période de 100,2 h), le ^{89}Zr (période de 78,4 h) et plus rarement le ^{64}Cu (période de 12,7 h). L'utilisation de telles molécules ajoute des contraintes de surveillance visant à empêcher ou à réduire les effets nocifs directs ou indirects des rayonnements ionisants produits sur les personnes, y compris sur l'environnement.

En ce qui concerne les problèmes de radioprotection, des équipes ont développé des stratégies originales de diagnostics en deux ou trois temps *via* les anticorps entiers (Goldenberg et al., 2006). Il a été mis au point des anticorps bispécifiques non marqués possédant un paratope spécifique de l'antigène et un paratope se liant à un traceur. Schématiquement, le diagnostic se fait séquentiellement avec une première injection de l'anticorps bispécifique qui s'adresse à sa cible. Dans un deuxième temps, le traceur, porteur de la radioactivité, est injecté suivi, après quelques heures, de l'image *in vivo*. Différents traceurs sont possibles, soit le radioélément seul, généralement le ^{18}F ou le ^{68}Ga qui présentent une demi-vie courte, respectivement 110min et 68min, (Schuhmacher et al., 2001; Schoffelen et al., 2010), ou bien un haptène couplé au radioélément (Barbet et al., 1998). Sur le même principe, certains développent des anticorps biotinylés qui sont ensuite localisés *in vivo*, directement avec l'injection d'une sonde streptavidine-traceur ou indirectement avec une première injection d'avidin suivi d'une sonde biotine-traceur (Artemov et al., 2003; Zhu et al., 2008). L'avantage de cette dernière stratégie est la possibilité d'injecter des sondes streptavidine ou biotin

couplées à différentes familles de traceurs, un radioélément et un agent magnétique par exemple, favorisant ainsi l'imagerie multimodale.

Par ailleurs avec la biologie moléculaire et l'optimisation protéique, on pourrait obtenir des anticorps entiers permettant une image dans la journée. En effet la longue rétention systémique des anticorps est essentiellement due à ses interactions *via* les récepteurs Fc. La clairance des anticorps entier ou des fragments porteurs de la région Fc (chimère scFv-Fc et minibody) peut être ajustée en modifiant l'interaction FcR et région Fc. Ainsi des jeux sur l'isotype ou encore des mutations ponctuelles dans le Fc permettent de diminuer l'interaction pour le FcR et par conséquent augmenter la clairance systémique des anticorps (Kenanova et al., 2005; Olafsen et al., 2009).

Malgré le développement de ces différentes alternatives, les limites de pénétration des tumeurs ne font pas de l'anticorps entier le modèle de choix pour l'imagerie *in vivo*.

1.4.3.1.2 Le fragment d'anticorps optimal pour l'imagerie TEP est...

Pour faire d'un fragment d'anticorps une sonde efficace pour l'imagerie *in vivo*, la demi-vie biologique de la protéine et la demi-vie physique de l'isotope doivent impérativement être coordonnées. Actuellement le radioélément intéressant pour l'imagerie TEP est le ^{18}F . Sa demi-vie de 110 min est le meilleur compromis pour obtenir un signal suffisant quelques heures après sa synthèse en tenant compte du temps de couplage à la molécule d'adressage et de leur purification. Le ^{18}F doit donc être associé à un fragment qui se lie rapidement à sa cible. Par exemple, il fait peu de sens d'employer un anticorps entier (dont la demi-vie, $t_{1/2}$ = 7-14 jours) couplé au ^{18}F . Lorsque son adressage, sa distribution et sa clairance seront optimaux, l'ensemble des radioisotopes seront inactifs (Wu 2009).

Initialement, le petit fragment scFv a suscité un vif intérêt puisque sa production est facile et peu coûteuse par voie bactérienne. Malheureusement, comme déjà décrit précédemment, ce fragment est très rapidement éliminé et sa monovalence limite sa fixation dans la tumeur. Afin de ralentir sa clairance systémique, des scFv ont été couplés à des polymères PEG ou fusionnés à une protéine, l'albumine de sérum humain (Yazaki et al., 2008). Ces deux stratégies permettent d'augmenter la demi-vie de circulation de ce fragment et ainsi favoriser sa liaison à sa cible. Néanmoins l'absence d'avidité du scFv diminue sa rétention au sein des tumeurs.

Les fragments intermédiaires supérieurs à 80 kDa, tels que les minibodies ou encore les grands multimères de scFv, présentent une clairance systémique plus courte qu'un anticorps entier, mais ne passent pas la filtration glomérulaire. Cela entraîne un bruit de fond résiduel diminuant le contraste.

Pour obtenir une image le jour de l'injection de la sonde, les fragments d'anticorps doivent être supérieurs à la limite de filtration rénale, mais diffuser rapidement vers leur cible afin de disparaître rapidement du système circulatoire favorisant ainsi un ratio élevé, signal dans la tumeur sur bruit de fond, obtenu dans le temps le plus court. Ainsi, une étude comparative de la pharmacocinétique de différents fragments couplés au ^{18}F a démontré que le format optimal pour l'imagerie TEP est le fragment diabody. Il permet d'obtenir le meilleur rapport marquage tumoral sur bruit de fond 4h après injection *in vivo* (Cai et al., 2007; Eder et al., 2010; Olafsen et al., 2012).

1.4.3.1.3 Qu'en est-il des formats alternatifs...

Les formats originaux, qu'ils s'agissent des nanobodies ou des ligands différents des anticorps, semblent bien adaptés à l'imagerie *in vivo* rapide. Plusieurs modèles de nanobodies sont aujourd'hui en étude préclinique pour le diagnostic *in vivo* de tumeurs. Ces fragments de taille minimale sont en particulier développés pour l'imagerie de tumeurs cérébrales (Iqbal et al., 2010). Par ailleurs, les molécules alternatives aux anticorps connaissent également une réussite dans l'imagerie *in vivo* (Baum et al., 2010; Miao et al., 2010; Zahnd et al., 2010).

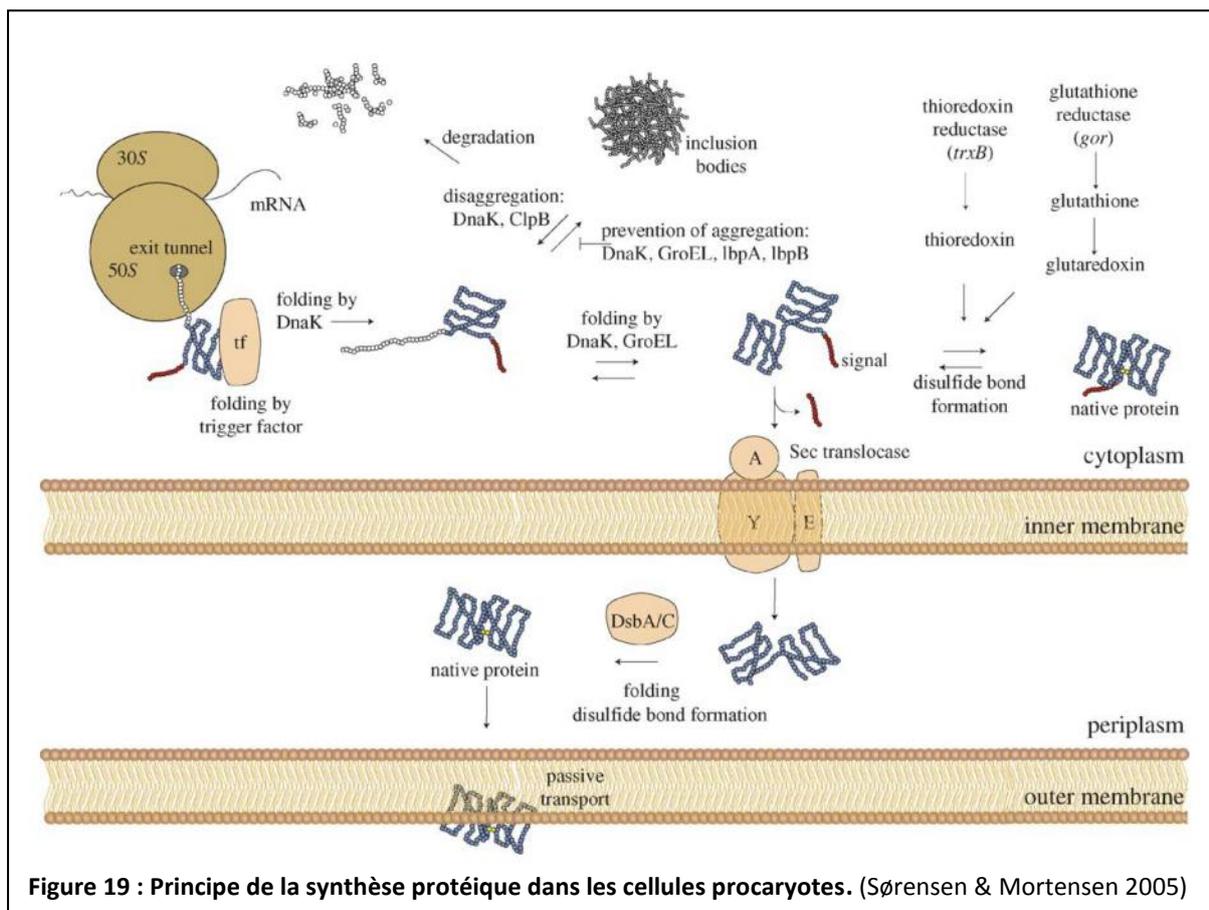
Cependant, dans le cadre de la médecine personnalisée, il est préférable de disposer d'outils diagnostiques ayant la même spécificité et affinité que les anticorps thérapeutiques utilisés. Ainsi l'ingénierie de fragments, en particulier de diabody, semble être une stratégie de choix dans le développement de sondes *in vivo* issus d'anticorps relevant en thérapeutique.

1.4.4 L'expression de biomolécules dans *E. coli*

Parallèlement aux systèmes d'expression eucaryote, l'expression chez les procaryotes, classiquement *via Escherichia coli* (*E. coli*), est une stratégie majeure pour la production de protéines recombinantes tant dans la recherche que dans l'industrie biotechnologique (Andersen and Reilly, 2004). En effet, 30% des biomolécules approuvées de 2006 à 2010, sont produites dans *E. coli* (Walsh, 2010).

La production de protéines à haut rendement nécessite un grand travail de mise au point. Il existe peu d'outils prédictifs pour définir l'hôte optimale, le système d'expression et des conditions d'expression. Dans le cas de protéines recombinantes qui ne nécessitent pas de modification post-traductionnelle, *E. coli* est souvent le premier système d'expression de choix. En effet l'expression procaryote favorise la surproduction et la purification d'une protéine recombinante bien souvent plus rapides, moins chères et plus faciles que dans les autres organismes (Berkmen, 2012).

Dans le domaine des anticorps recombinants entier, l'expression à partir des cellules eucaryotes est la règle mais reste très coûteux. Pour répondre aux besoins sociaux-économiques actuels, on se doit de proposer des molécules à visée diagnostic à faible coût. Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc choisi d'orienter la recherche sur des fragments produits par voie procaryote. Les protéines recombinantes produites dans *E. coli* peuvent en principe être adressées en trois sites différents à savoir le cytoplasme, le périplasma ou dans le milieu extracellulaire (figure 19). Les avantages et les inconvénients dépendent du compartiment cellulaire où la protéine est localisée. Ces possibilités s'offraient donc à nous.



1.4.4.1 Expression périplasmique

Les protéines recombinantes peuvent être synthétisées dans le cytoplasme puis exportées dans le périplasma. Le transport transmembranaire est normalement médié par la présence d'un peptide signal en N-terminal qui oriente la protéine vers un complexe de transporteurs à la membrane (figure 19).

Dans *E. coli*, la formation de ponts disulfures, qui stabilisent la structure tridimensionnelle des fragments d'anticorps, est catalysée uniquement dans le périplasma par le système enzymatique

Dsb (Rietsch and Beckwith, 1998). Ainsi l'expression périplasmique est essentielle pour l'obtention de fragments d'anticorps renaturés avec des ponts disulfures indispensables pour restituer la fonctionnalité. De plus, la production périplasmique simplifie le processus de purification, en effet le périplasma peut être récolté seul, par choc osmotique, limitant ainsi les contaminants cytoplasmiques.

Le processus aboutissant à des protéines fonctionnelles dans le périplasma d'*E. coli* peut être optimisé par l'activité de protéines jouant un rôle de chaperonnes augmentant ainsi sa solubilité et son rendement périplasmique (Pan et al., 2003; Miot and Betton, 2004).

Cependant, la sécrétion d'une protéine recombinante dans le périplasma n'est pas sans problème. Le passage transmembranaire est transporteur dépendant ce qui limite donc le rendement de protéines sécrétées. De plus, la formation de ponts disulfures est complexe et peut aboutir à la formation de ponts incorrects et aboutir à de faible rendement de fragments d'anticorps fonctionnels (Berkmen, 2012)(de Marco, 2009).

1.4.4.2 Sécrétion extracellulaire

Il n'existe pas de cheminements spécifiques pour la translocation des protéines à travers la membrane extérieure. Le passage des protéines se fait pas diffusion passive du périplasma vers le milieu extracellulaire. Ce transport peut être stimulé par la fragilisation externe ou interne des composants membranaires de *E. coli*. Cette déstabilisation structurelle peut être réalisée de l'intérieur de la cellule, par des protéines de lyse, ou par perméabilisation provenant de l'extérieur de la cellule, de nature mécanique, enzymatique ou chimique (Shokri et al., 2003). Ainsi, la présence de protéines d'intérêt dans le milieu de culture, est souvent due à une fuite de la protéine normalement exprimée dans le périplasma (Miksch et al., 2008). Cette stratégie de sécrétion encore mal connue et souvent non contrôlée est rarement utilisée pour la production de protéines recombinantes à haut rendement.

1.4.4.3 Expression cytoplasmique

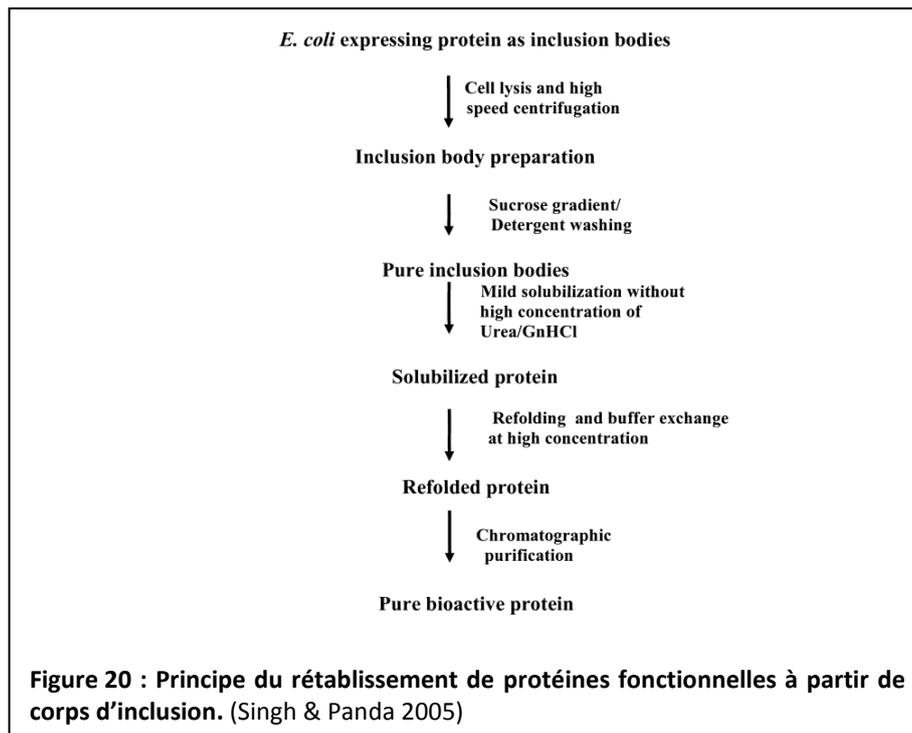
L'expression cytoplasmique est la stratégie de choix favorisant des rendements de production importants.

Naturellement dans le cytoplasme, la formation de ponts disulfures est impossible en raison des molécules thioredoxine et glutaredoxine maintenues réduites en présence de leur réductase respective (thioredoxin reductase et glutathione reductase). Néanmoins, certaines souches ont été modifiées, avec une perturbation des gènes *trxB* et *gor* codant les deux réductases (le *trxB* : Novagen AD494 et *trxB/gor* : Novagen Origami). Dans ce cas, les ponts disulfures peuvent se former dans le

cytoplasme par réaction de réduction de la thioredoxine et la glutaredoxine (Bessette et al., 1999; Lehmann et al., 2003).

Cependant, l'expression de grande quantité de protéines recombinantes dans *E. coli*, avec ou sans pont disulfure, aboutit souvent à l'accumulation sous forme d'agrégats insolubles dans le cytoplasme de la bactérie appelés corps d'inclusion. Les principaux points forts associés à la formation de corps d'inclusion sont (i) le niveau d'expression très élevé de protéines pouvant représenter plus de 30 % des protéines cellulaires, (ii) l'isolement facile des corps d'inclusion des cellules en raison des différences de taille et de densité en comparaison aux autres protéines considérées comme contaminants cellulaires, (iii) l'homogénéité de la protéine d'intérêt dans des corps d'inclusion ce qui réduit le nombre d'étapes de purification et (iv) la dégradation moindre de la protéine exprimée, en particulier *via* la résistance à l'attaque protéolytique par les protéases cellulaires. En raison de ces nombreux avantages, des protéines recombinantes exprimées sous forme de corps d'inclusion dans *E. coli* sont largement utilisés pour la production commerciale de protéines (Singh and Panda, 2005).

Néanmoins, dans les corps d'inclusion, les protéines sont exemptes d'activité biologique et nécessitent une solubilisation élaborée, suivie d'une renaturation et d'étapes de purification pour se voir restituer leur fonctionnalité (figure 20, (Rudolph and Lillie, 1996; Vallejo and Rinas, 2004)). En général, les corps d'inclusion sont solubilisés au moyen d'agents dénaturants à haute concentration comme l'urée ou le chlorure de guanidium, en présence d'un agent de réduction tel que le β -mercaptoéthanol (Clark, 1998; Tsumoto et al., 2003)). Après solubilisation, les protéines recombinantes sont alors repliées par diminution progressive de l'agent dénaturant favorisant ainsi les interactions entre les régions hydrophobes. La structure est par ailleurs stabilisée avec un oxydant qui permet la formation de ponts disulfures (Fischer et al., 1993). La transformation des protéines agrégées en protéines solubles et fonctionnelles reste cependant le défi majeur de l'expression cytoplasmique.



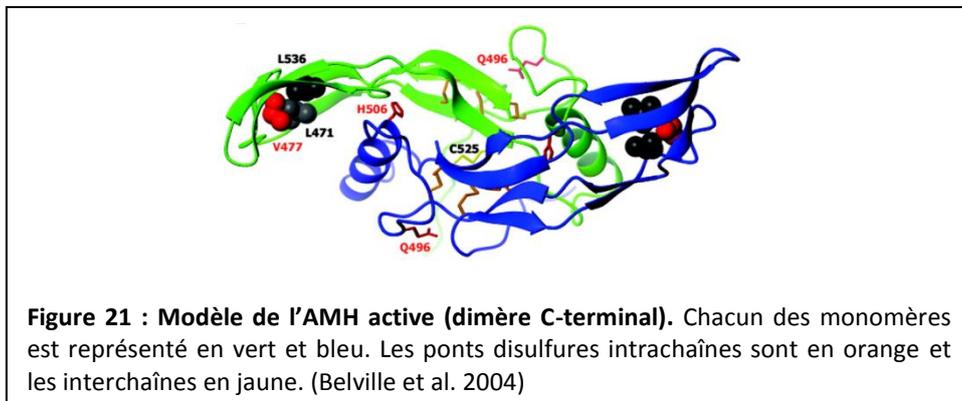
En conséquence de l'utilisation constamment croissante des anticorps recombinants, un effort de recherche significatif a été consacré pour optimiser leur production dans des bactéries. Selon leurs applications, les équipes de recherche ont recours principalement aux deux voies de production précédemment décrite. Certaines utilisent l'expression périplasmique qui permet de produire de faibles quantités d'anticorps recombinants mais sous forme fonctionnelle (Hudson and Kortt, 1999; Aubrey et al., 2003; di Tommaso et al., 2012), ce rendement peut cependant être amélioré en fusionnant le fragment d'anticorps à une chaperonne (Zhang et al., 2003; Padiolleau-Lefèvre et al., 2006). Ou bien, la voie cytoplasmique est employée sous deux approches : avec une expression dans des souches modifiées à cytoplasme oxydatif (Martineau et al., 1998; Venturi et al., 2002), ou une production sous forme de corps d'inclusion avec l'effort porté sur le processus de repliement (Asano et al. 2002; Tsumoto et al. 2003; Padiolleau-Lefevre et al. 2007; (Kudou et al., 2011).

1.5 Les tumeurs ovariennes et expression du récepteur de l'hormone anti-müllérienne

1.5.1 L'axe AMH

1.5.1.1 L'AMH et ses récepteurs : structure et fonction

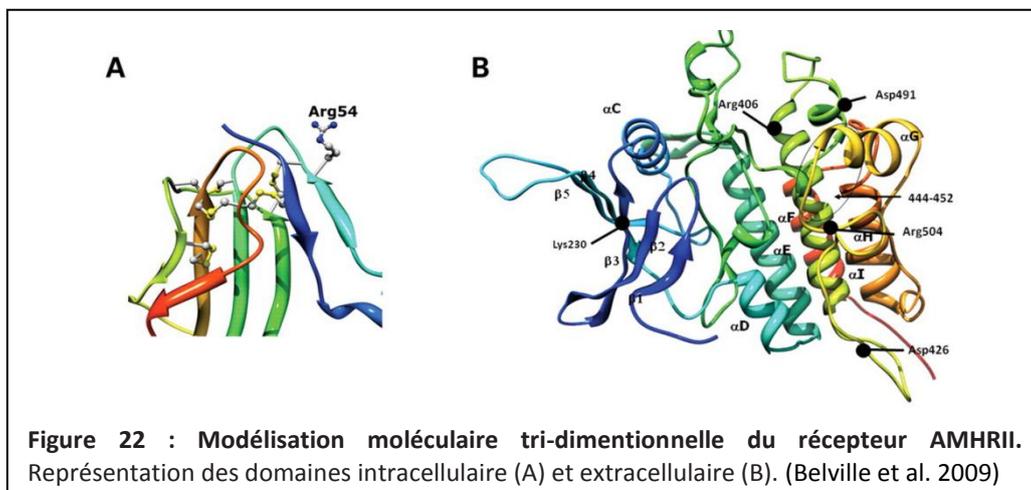
L'hormone anti-müllérienne (AMH), également appelée substance inhibitrice müllérienne (MIS pour Müllerian Inhibiting Substance), appartient à la superfamille du transforming growth factor- β (TGF- β) qui comprend de nombreux facteurs agissant sur la croissance et la différenciation cellulaire. L'AMH est une glycoprotéine homodimérique dont les deux chaînes sont reliées par des ponts disulfure. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur qui nécessite un clivage protéique près de l'extrémité C-terminal pour acquérir une activité biologique (figure 21). L'AMH, dimère non clivée, a une masse de 140 kDa, seul le fragment C-terminal de 25 kDa est biologiquement actif. Le site cellulaire où se produit le clivage protéolytique de la protéine est controversé soit dans la cellule productrice, soit au niveau des organes cibles (Rey et al., 2003).



Les ligands, membres de la famille du TGF- β , transduisent leur signal par l'intermédiaire de deux types de récepteurs. Le récepteur primaire, dit récepteur de type II (AMHRII ou MISIIR), est une sérine/thréonine kinase à un seul domaine transmembranaire capable de lier son ligand, mais par elle-même, elle ne peut transmettre le signal biologique. Pour ce faire, AMHRII doit recruter et activer une deuxième sérine/thréonine kinase, le récepteur de type I (AMHRI ou MISIR), qui à son tour active une protéine effectrice cytoplasmique.

Seul le récepteur de type II a été cloné dans le rat (Baarends et al., 1994), le lapin (di Clemente et al. 1994), la souris (Mishina et al., 1996) et l'homme (Imbeaud et al., 1995). Il contient 11 exons, en particulier les exons 1 à 3 qui codent le domaine extracellulaire, composé de 127 acides

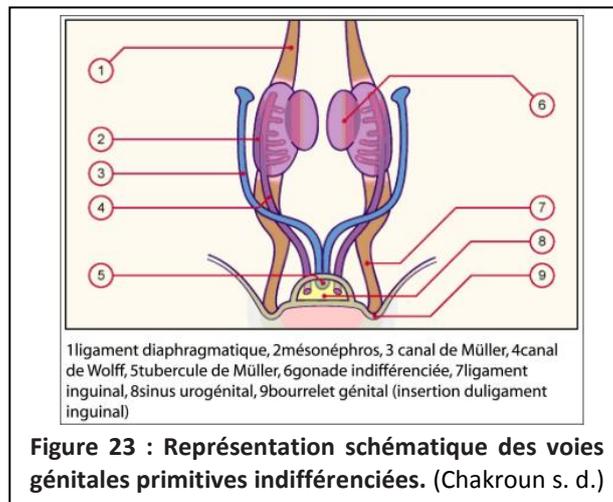
aminés dans le récepteur humain, et l'exon 2 qui semble important dans la liaison à l'AMH (figure 22). Classiquement, il s'exprime dans les tissus naturels cibles, soit dans le mésenchyme autour du canal de Müller, dans les cellules de Sertoli et de Leydig et dans les cellules de la granulosa. En ce qui concerne le récepteur à l'AMH de type I, son identité reste encore controversée. Plusieurs études suggèrent que deux récepteurs : le récepteur de type I à l'activine A (Acvr1 ou Alk2) et le récepteur de type IA aux protéines morphogéniques osseuses (Bmpr1a ou Alk3) sont impliqués dans la transduction du signal AMH vers l'apoptose (Orvis et al., 2008) alors que le récepteur de type IB aux protéines morphogéniques osseuses (Bmpr1b ou Alk6) aurait un effet inhibiteur compétitif, favorisant donc la prolifération cellulaire (Belville et al., 2005).



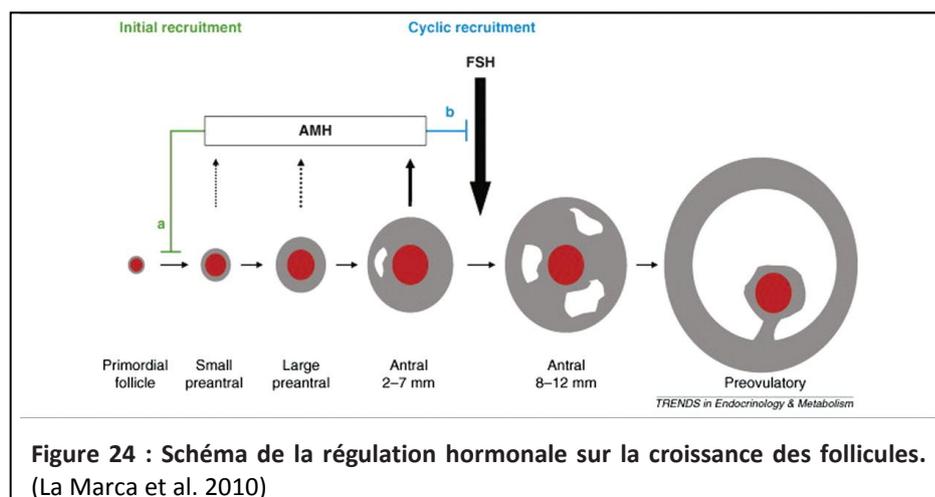
1.5.1.2 Rôle physiologique de l'hormone anti-müllérienne

Chez l'homme, l'hormone anti-müllérienne est impliquée au stade embryonnaire dans la différenciation sexuelle. Ce processus programmé génétiquement, a lieu entre la 3^{ème} et la 12^{ème} semaine de l'embryon. Il porte successivement sur les gonades, les voies génitales internes puis les organes génitaux externes. Le sexe est déterminé par les chromosomes sexuels (X et Y) des gamètes lors de la fécondation. La présence d'un chromosome Y induit le développement de gonades masculines (les testicules) alors que son absence entraîne la formation de gonades féminines (les ovaires). La différenciation dans le sexe masculin interne dépend des hormones androgènes testiculaires (testostérone). Un défaut de synthèse d'androgènes aboutit à un défaut de masculinisation du fœtus. Deux phénomènes marquent la différenciation des voies génitales masculines : (1) le développement et la différenciation des canaux de Wolff et (2) la régression des canaux de Müller (figure 23). La testostérone produite par les cellules de Leydig dans les testicules fœtaux induit le déploiement des canaux de Wolff dès la 8^{ème} semaine. Les canaux de Müller eux,

régressent chez le garçon entre la 8^{ème} et la 11^{ème} semaine sous l'action de l'hormone AMH, secrétée dans les cordons séminifères par les cellules de Sertoli (Chakroun, n.d.).



Chez la femme, l'AMH est une hormone produite uniquement après la naissance et en faible quantité par les cellules granuleuses au début du développement des follicules ovariens immatures appelées follicules antraux (figure 24). Dans l'ovaire, l'AMH régule le recrutement du follicule primordial et la sensibilité à l'hormone folliculo-stimulante (FSH) des follicules en croissance sur un mode inhibiteur. Une femme naît avec approximativement un million d'ovules et au cours de sa vie reproductive son nombre d'ovules diminuera par attrition et par ovulation. La diminution du nombre de ces follicules antraux provoque une chute du taux d'hormone anti-müllérienne dans le sérum sanguin. Ainsi, le dosage de l'AMH dans le sang est une méthode intéressante dans l'estimation du nombre résiduel d'ovules (van Houten et al., 2010) ; (Zec et al., 2011).



1.5.2 L'axe AMH en cancérologie

1.5.2.1 Les tumeurs ovariennes

Les cancers ovariens appartiennent aux dix types de cancers le plus fréquents, selon l'Institut Curie, 230 000 femmes sont diagnostiquées d'un cancer de l'ovaire tous les ans dans le monde. En raison d'un diagnostic souvent tardif, jusqu'à 70 % d'entre elles décèdent dans les cinq ans après le dépistage. Ce qui fait des tumeurs ovariennes la cinquième cause de mortalité liée à un cancer chez la femme (Inca, 2011; Siegel et al., 2012).

Le cancer des ovaires comprend un groupe hétérogène de tumeurs de trois types majeurs : épithélial, mésenchymateux et des cordons sexuels, et germinale. Les cancers des ovaires humains les plus communs sont issus de l'épithélium coelomique. L'histologie de ces tumeurs ressemble aux structures müllériennes fœtales qui se forment dans l'embryon par invagination de l'épithélium coelomique et qui régressent dans l'embryon masculin sous l'influence de l'AMH. Cela a mené à s'interroger sur la sensibilité des cancers ovariens à cette hormone médiée par la présence du récepteur AMHRII (Masiakos et al., 1999). Il a ainsi été démontré que le récepteur AMHRII est surexprimé à la surface des multiples lignées tumorales ovariennes malignes humaines : des tumeurs épithéliales (séreuses, mucineuses, à cellules claires ou encore carcinome endométrioïde), des tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels (de la granulosa et à cellules de Sertoli et de Leydig) et aussi certaines tumeurs germinales (dysgerminomes) (Song et al., 2009). Cette observation s'étend à la sphère génitale en raison de la surexpression de l'AMHRII dans de nombreuses lignées tumorales utérines (tableau 4, (Masiakos et al., 1999; Bakkum-Gamez et al., 2008; Song et al., 2009).

Tableau 4 : Expression du récepteur AMHRII dans des tissus gynécologiques bénins et malins. (Bakkum-Gamez et al. 2008)

Tissue	MISIR expression	p value
Ovarian cancer (all EOCs)	125/182 (69%)	0.008 ^{a, b}
Serous	22/29 (76%)	0.002 ^{a, b}
Clear cell	10/25 (40%)	0.14 ^{a, b}
Endometrioid	17/31 (55%)	0.011 ^{a, b}
Mucinous	3/3 (100%)	0.018 ^{a, b}
Benign ovarian epithelium	0/5 (0%)	–
Dysgerminoma	17/22 (77%)	<0.001 ^{c, d}
Benign ovarian stroma	3/24 (12.5%)	–
Endometrial cancer (all histologies)	82/109 (75%)	<0.001 ^{c, e}
Benign endometrium	39/139 (28%)	–
Proliferative	11/68 (17%)	<0.001 ^{c, f}
Secretory	16/47 (34%)	<0.001 ^{c, f}
Atrophic	12/24 (50%)	0.018 ^{c, f}
Uterine malignant mixed Müllerian tumor	30/51 (59%)	<0.001 ^{c, g}
Leiomyosarcoma	15/29 (52%)	0.004 ^{a, g}
Endometrial stromal sarcoma	4/18 (22%)	0.27 ^{a, g}
Benign myometrium	0/11 (0%)	–

Histologic subtype was available for 88 of the 182 EOCs.

^a Fisher's exact test.

^b Chi square.

^c Compared to benign ovarian epithelium.

^d Compared to benign ovarian stroma.

^e Compared to overall benign endometrium.

^f Compared to endometrial cancer.

^g Compared to benign myometrium.

Les études comparatives entre les lignées bénignes, les lignées à la limite de la malignité et les lignées malignes, ont mis en évidence que l'expression du récepteur AMHRII est signe de la gravité des tumeurs. L'ensemble de ces résultats font de l'AMHRII un nouveau biomarqueur intéressant des cellules tumorales de la sphère génitale.

Par ailleurs, en se référant à l'effet apoptotique et inhibiteur de croissance de l'AMH sur les canaux de müller au stade embryonnaire, cette hormone s'est révélée efficace contre la prolifération des cellules tumorales qui expriment ses récepteurs (Donahoe et al., 1979; Masiakos et al., 1999; Ha et al., 2000; Stephen et al., 2002).

En effet, quel que soit la cellule ciblée, l'AMH en se liant à son récepteur de type II induit la phosphorylation de AMHRI. Ainsi activé, AMHRI déclenche une cascade de signalisation provoquant l'apoptose ou l'arrêt de la prolifération de la cible. Différentes voies de signalisation peuvent être impliquées telles que la voie intracellulaire Smad ou celle du complexe β -catenin/LEF-1 (Lymphoid Enhancer factor-1). D'autres études suggèrent que l'AMH limite la croissance cellulaire par des chemins de signalisation différents impliquant l'inhibiteur de kinase dépendant de cyclines (CDKI) ou le facteur nucléaire - κ B (NF κ B) (Song et al., 2009).

Ces données ont ainsi permis d'envisager l'axe AMH comme nouvelle approche thérapeutique contre les cellules de tumeurs génitales porteuses du biomarqueur AMHRII.

D'autre part, d'autres tissus exprimant ce récepteur ont été identifiés. AMHRII a été localisé dans les tissus sains de la glande mammaire et de la prostate, mais également à la surface de certaines lignées tumorales issues de ces mêmes organes. Ces observations ouvrent de nouvelles voies d'applications anti-tumorales de l'hormone anti-müllérienne et ses récepteurs (Hoshiya, Gupta, Kawakubo, et al., 2003; Hoshiya, Gupta, Segev, et al., 2003; Gupta et al., 2004).

Au vu de l'enjeu de l'axe AMH en cancérologie, de nouveaux outils de diagnostic et de thérapie deviennent nécessaire. Ainsi l'équipe immunociblage et radiobiologie en oncologie de l'institut de recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM) a développé un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur AMHRII (Brevet : EP 1 918 304).

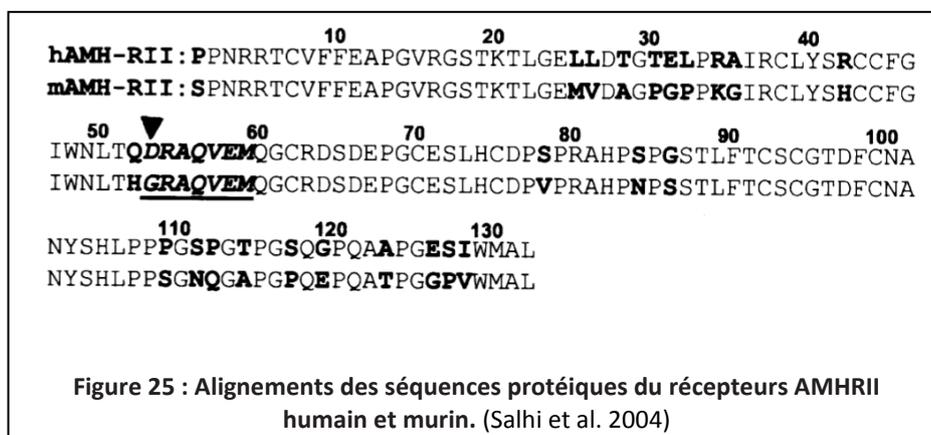
1.5.3 Un anticorps dirigé contre le récepteur de l'AMH de type II : l'anticorps 12G4

1.5.3.1 « La naissance » de l'anticorps 12G4

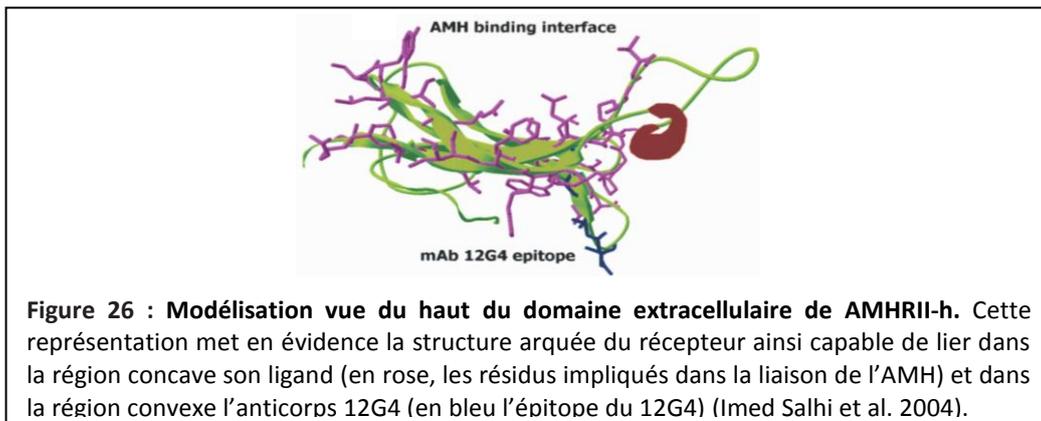
Afin de produire des anticorps dirigés contre le biomarqueur AMHRII, une campagne d'immunisation de souris BALB/c a été mise au point avec comme antigène, le domaine extracellulaire recombinant du récepteur AMHRII humain (AMHRII-h). Quelques jours après la quatrième immunisation, la souris a été sacrifiée, et ses cellules spléniques fusionnées aux cellules de myélome murin (P3-X63-Ag.8.653) pour produire des hybridomes (technique de Milstein et Köhler). Les clones sécrétant d'anticorps d'intérêts ont alors été sélectionnés *via* un test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) de reconnaissance spécifique de AMHRII-h et non du récepteur AMHRII murin (AMHRII-m). Ainsi un seul hybridome a été retenu, sécrétant des anticorps monoclonaux appelés 12G4 (Salhi et al., 2004).

1.5.3.2 Les caractéristiques de l'anticorps monoclonal 12G4

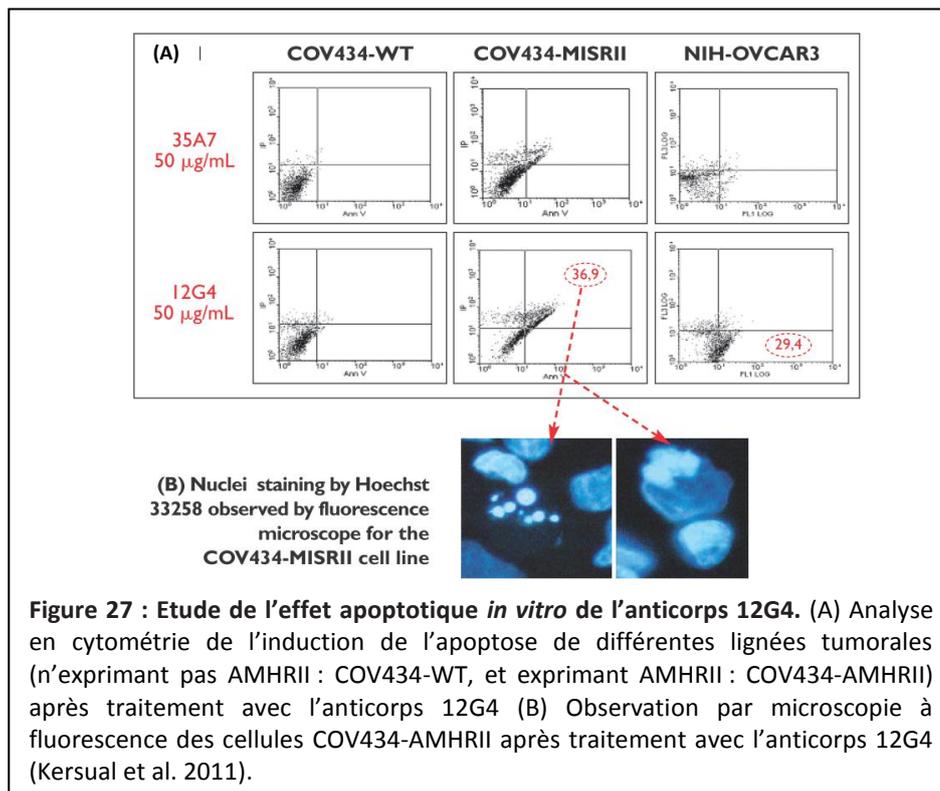
L'anticorps 12G4 est une immunoglobuline murine de type IgG1-kappa. Ses paramètres cinétiques, définis par la technologie Biacore, révèlent une grande affinité de l'anticorps pour AMHRII-h avec une constante de dissociation sub-nanomolaire (0,86 nM). La spécificité d'espèce de l'anticorps 12G4 a été confirmée *in vitro* par western blot et *ex-vivo* par cytométrie en flux, le 12G4 est capable de lier uniquement le récepteur humain. Par ailleurs, un peptide épitopique linéaire a été identifié par la technique d'épitope mapping, dont la séquence minimum est : DRAQVEM. L'alignement entre les séquences de AMHRII-h et AMHRII-m montre un seul résidu différent en position 53 avec un acide aspartique (D) chez l'homme et une glycine (G) chez la souris. Cette distinction explique donc la spécificité d'espèce de l'anticorps 12G4 (figure 25) (Salhi et al., 2004).

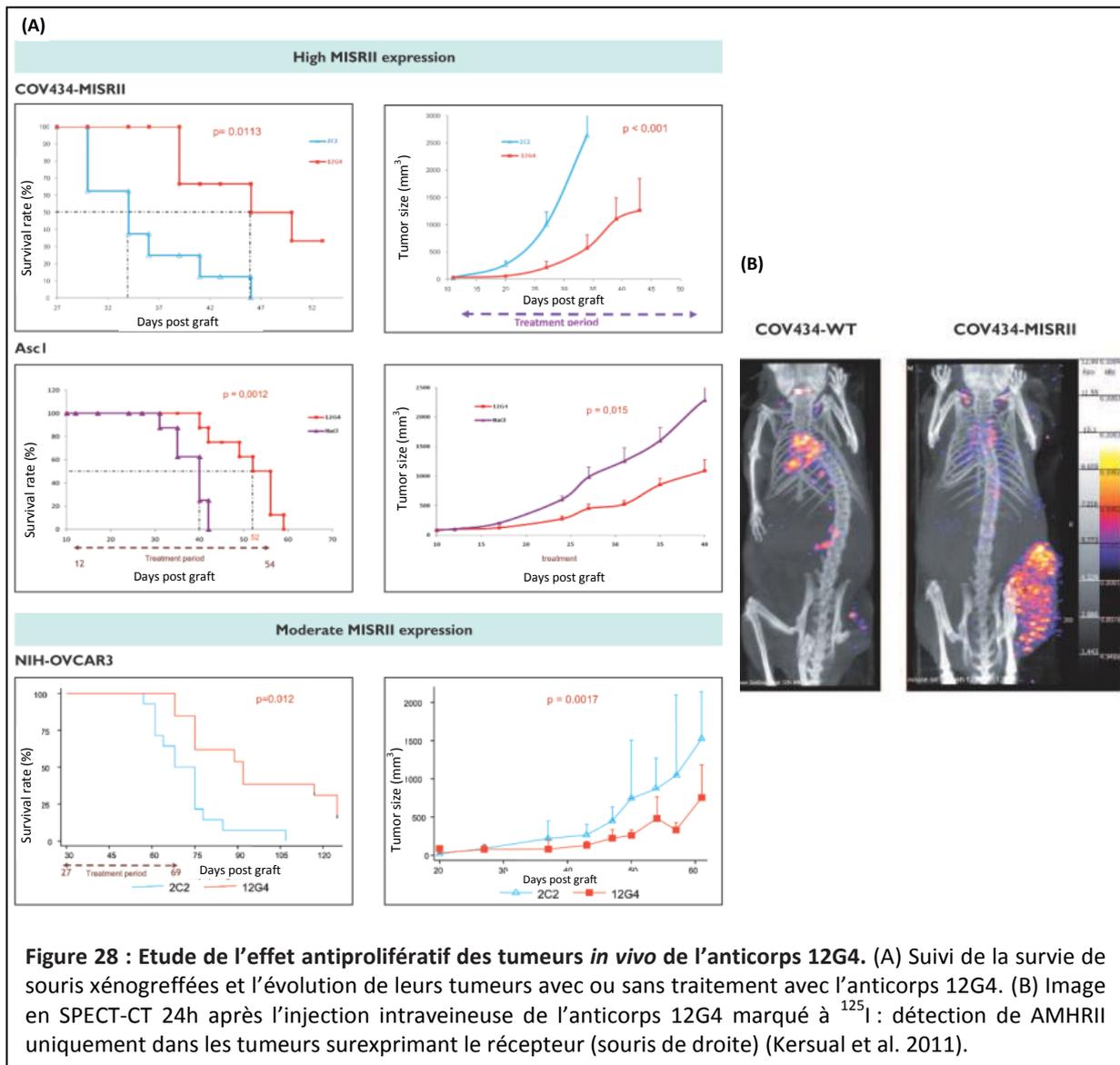


D'autre part, l'épitope du 12G4 est distinct des quatre sites de liaison de l'AMH à son récepteur, et aucun effet de compétition n'a été observé entre l'anticorps et le ligand sur AMHRII (figure 26) (Salhi et al., 2004).



Enfin, l'anticorps 12G4 présente des propriétés anti-tumorales très intéressantes. Le traitement *ex-vivo* de différentes lignées tumorales exprimant AMHRII-h avec l'anticorps 12G4 induit leur apoptose. Ce phénomène a été mis en évidence par certaines modifications phénotypiques (condensation de la chromatine et apparition de corps apoptotiques) et un évènement caractéristique : la phosphatidylserine (PS), composant membranaire normalement exposé au milieu intracellulaire mais qui se retrouve à l'extérieure dès l'entrée en apoptose d'une cellule (étudié en cytométrie en flux par la fixation de l'annexine V à la PS) (figure 27). De plus, l'anticorps 12G4 étudié *in vivo* se fixe spécifiquement sur les tumeurs exprimant AMHRII, et ralentie significativement la progression tumorale (figure 28, (Kersual et al., 2011)).





Au vu de ces multiples propriétés, le développement d'un anticorps humanisé dérivé du 12G4 a été initié ce qui représente une nouvelle approche thérapeutique prometteuse dans le cadre des cancers exprimant le récepteur AMHRII.

1.5.3.3 Les applications thérapeutiques et diagnostiques

Le diagnostic des cancers ovariens est souvent tardif car cette pathologie reste asymptomatique au début de son développement. La plupart des patients sont diagnostiqués quand des symptômes du développement tardif apparaissent comme la douleur abdominale, la distension abdominale en raison d'ascites, ou encore des complications urologiques. Or, la thérapie actuelle, au moyen de chimiothérapie comme cisplatine, carboplatine, paclitaxel (Taxol), topotecan, se révèle

efficace mais à des stades précoces de la maladie. Ces traitements qui ont souvent lieu à des stades avancés de la tumeur, ne permettent un taux de survie à 5 ans que de 25% pour les femmes diagnostiquées au stade tumorale III ou IV (Song et al., 2009).

Ainsi, il est bon d'entreprendre la recherche de nouvelles modalités diagnostiques et thérapeutiques qui pourraient d'une part favoriser un diagnostic précoce et d'autre part améliorer l'effet de la chimiothérapie existante avec moins de toxicité et un ciblage plus spécifique. L'axe AMH et ses récepteurs deviennent alors une stratégie de choix.

1.5.3.3.1 La thérapie : l'anticorps versus le ligand naturel

De nombreux exemples présentent l'AMH comme un inhibiteur de croissance des cellules tumorales exprimant le récepteur AMHRII. Néanmoins, les doutes subsistent sur le rôle possible de l'AMH dans la pathogénie des tumeurs ovariennes. En effet, on considère l'hormone comme un inhibiteur puissant de la prolifération cellulaire de certaines tumeurs ovariennes. Or, le haut niveau d'AMH trouvé dans le sérum des patientes atteintes de ces tumeurs, est un contraste avec la progression de la maladie (La Marca and Volpe, 2007). Ces observations pourraient s'expliquer par une liaison de l'AMH à son récepteur à la surface des cellules tumorales, mais sans transduction du signal inhibiteur. Dans ce sens, certaines lignées exprimant AMHRII sont insensibles à l'AMH en raison d'une déficience d'un intermédiaire dans la voie de signalisation (Masiakos et al., 1999).

Dans l'axe AMH, une seconde alternative thérapeutique est l'anticorps humanisé dérivé du 12G4 actuellement en développement par le Laboratoire du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) en collaboration avec l'IRCM. Plusieurs anticorps ont été mis au point par CDR-grafting et des étapes de maturation ont permis d'isoler l'anticorps 3C23K ayant une affinité (5 nM) et spécificité (épitope D⁵³RAQVEM) comparables à l'anticorps 12G4. De plus, le système d'expression a été optimisé pour varier le profil de glycosylation de l'anticorps qui est important dans le recrutement des cellules effectrices du système immunitaire. L'anticorps ainsi développé révèle une activité anti-tumorale efficace. Les études *in vitro* démontrent l'effet apoptotique et anti-prolifératif ainsi qu'une activité cytotoxique médiée par l'anticorps 3C23K sur les diverses lignées tumorales testées. Les applications *in vivo* du 3C23K mettent en évidence l'inhibition de la croissance tumorale induit par le recrutement de certaines cellules immunitaires effectrices *via* leur région Fc et par phagocytose au moyen des macrophages (Jacquet et al., 2011, 2012). L'anticorps 3C23K se présente comme nouveau candidat pour la thérapie ciblée des cancers ovariens et potentiellement de tous types de tumeurs exprimant AMHRII (utérus, seins ou prostate).

Les anticorps anti-AMHRII 3C23K et 12G4 peuvent avoir des applications au-delà de la thérapie. Actuellement le format murin est utilisé dans le développement de stratégies d'aide à l'acte chirurgical et de diagnostic.

1.5.3.3.2 Aide à l'acte chirurgical

Après la chirurgie radio-immuno-guidée (RIDC), une nouvelle société, SurgiMab, développe une technique innovante d'immuno-imagerie médicale et d'aide à l'acte chirurgical en temps réel : l'immuno-photodétection (IPD). Cette technique allie la spécificité des anticorps à la sensibilité de la détection par fluorescence : le conjugué anticorps-fluorochrome développé par SurgiMab, sélectif des tumeurs, est injecté au patient. Quarante-huit heures après l'injection, le chirurgien opère le patient et retire la tumeur primaire et les tumeurs visibles à l'œil nu. Le champ opératoire est ensuite éclairé avec la sonde de SurgiMab ce qui permet de visualiser la fluorescence induite. Les nodules de petites tailles, invisibles même à l'œil exercé du chirurgien, s'illuminent et peuvent être enlevés. Dans le cadre d'un partenariat avec SurgiMab, le modèle de l'anticorps 12G4 couplé à un fluorochrome est mis au point pour guider la chirurgie des tumeurs exprimant le récepteur AMHRII.

1.5.3.3.3 Diagnostic *in vivo*

L'efficacité thérapeutique de l'anticorps humanisé dérivé du 12G4 est vraie uniquement pour les tumeurs exprimant le biomarqueur AMHRII. Il devient donc très important de développer des outils de diagnostic *in vivo* spécifiques qui pourraient, de manière non invasive, spécifier la présence du récepteur AMHRII et ainsi guider rapidement la thérapie vers l'axe AMH. Cette approche théranostique s'inscrit parfaitement dans l'esprit de la médecine personnalisée.

Ainsi, en collaboration avec l'IRCM, notre laboratoire d'ingénierie des anticorps pour la santé (LIAS), s'est intéressé au développement de fragments d'anticorps adaptés au diagnostic *in vivo* des tumeurs AMHRII positives. Les applications d'imagerie quantitative *in vivo* actuelles ont orienté notre travail sur le format optimal pour l'imagerie TEP, le diabody.

2 Objectif de la thèse

Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés représentent la classe d'agents thérapeutiques qui connaît la plus rapide croissance sur le marché. Plusieurs centaines de ces biomédicaments prometteurs sont actuellement évalués dans de nombreux essais cliniques (Beck et al., 2010). Ces nouveaux traitements ont radicalement amélioré le pronostic de plusieurs pathologies, en particulier le cancer qui est la première cause de mortalité dans le monde. Néanmoins, le coût élevé des anticorps en fait une charge financière significative pour les organismes de santé publique. Par conséquent, un défi important est de développer de nouvelles méthodes qui permettront d'une part d'optimiser le choix du traitement et d'autre part de vérifier l'efficacité de la thérapie pour chaque patient en terme, par exemple, de régression tumorale.

Aujourd'hui, l'approche privilégiée pour le suivi non invasif de l'évolution des tumeurs est l'imagerie *in vivo* quantitative. Jusqu'à présent, la stratégie de choix est l'utilisation du traceur ^{18}F FDG en imagerie TEP dont le réseau de distribution s'est développé à travers le monde entier. Le ^{18}F FDG, dérivé du glucose, est métabolisé par toutes cellules consommatrices de glucose, dont les cellules cancéreuses, ce qui limite parfois l'évaluation des masses tumorales. L'assimilation non spécifique du ^{18}F FDG dans certains organes avec une importante activité métabolique, comme le cerveau, peut aboutir à des résultats faux-positifs ou un fort bruit de fond, empêchant alors la détection des tumeurs.

Par ailleurs, en cancérologie différents biomarqueurs tumoraux ont été identifiés comme cibles thérapeutiques. Il s'agit donc de développer de nouveaux outils de diagnostics qui démontreront la présence ou non de ces marqueurs et par conséquent la pertinence du traitement à engager. De plus, l'imagerie *in vivo* serait aussi très intéressante pour les laboratoires pharmaceutiques qui développent de nouveaux anticorps thérapeutiques. Le diagnostic et le suivi *in vivo* permettrait 1) d'identifier les médicaments les plus efficaces et 2) de démontrer la spécificité et l'efficacité du candidat médicament anti-tumoral aux cours des différentes étapes d'essais cliniques.

Pour des applications thérapeutiques, les anticorps monoclonaux sont classiquement indiqués en raison de leurs propriétés pharmacocinétiques et leur capacité à recruter le système immunitaire (Ward and Ghetie, 1995; Abès and Teillaud, 2011). Ces caractéristiques qui sont des avantages en thérapie deviennent des inconvénients pour l'imagerie. Le long maintien dans le système circulatoire des anticorps entiers radiomarqués est responsable d'un fort bruit de fond dans le sang et les tissus sains. L'incompatibilité des anticorps est d'autant plus vraie pour l'imagerie *in vivo* TEP dont le radioisotope de référence actuel est le ^{18}F . Ce dernier présente de nombreux

avantages en termes de disponibilité, de rendement de positons (près de 100% pour le ^{18}F comparé à 23% pour le ^{124}I) et de demi-vie (110min) ce qui en fait un traceur adapté à l'utilisation clinique de routine. Néanmoins ce radioélément impose un diagnostic *in vivo* rapide après l'injection dans l'organisme impossible avec les anticorps entiers (demi-vie : plusieurs jours). En revanche, des fragments d'anticorps ayant une masse moléculaire intermédiaire et dépourvu de la région Fc, présentent une pharmacocinétique adaptée aux contraintes de l'imagerie TEP avec le ^{18}F . Des travaux de référence (Cai et al., 2007) ont ainsi démontré que le meilleur format est le fragment diabody, couplé au ^{18}F , il est le plus petit anticorps bivalent qui pénètre facilement les tissus jusqu'à sa cible, se lie efficacement à l'antigène *via* sa valence et présente une clairance systémique rapide. Ainsi, le diabody permet l'obtention d'une image TEP optimale une à deux heures après l'injection.

Dans ce contexte, notre laboratoire a entrepris le développement de diabodies pour des applications de diagnostic *in vivo*. Afin de proposer ces nouveaux outils à faible coût, notre équipe a choisi d'utiliser une stratégie originale de production procaryote par voie cytoplasmique. La preuve du concept a été réalisée sur un modèle bien connu au laboratoire, celui de la protéine prion (PrP), avec la production du diabody SHA31 dirigé contre la protéine membranaire PrP. Dans un deuxième temps, en collaboration avec l'équipe du Pr Pèlerin de l'IRCM, nous avons développé le diabody 12G4, issu de l'anticorps monoclonal 12G4 (Salhi et al., 2004) dirigé contre le biomarqueur de certaines tumeurs, en particulier ovarienne, le récepteur à l'AMH de type II (AMHR II).

L'objectif initial de ces travaux de thèse était donc de prouver notre capacité à produire des formats diabodies fonctionnels sur le modèle prion. La démonstration faite, nous nous sommes intéressés au modèle 12G4 relevant en cancérologie. Cette étude a commencé par les constructions moléculaires de différents fragments d'anticorps 12G4. Ensuite, cette thèse a été axée sur la production procaryote par voie cytoplasmique du format diabody. De plus, différentes stratégies de couplage des anticorps ont été testées en vue de les suivre *in vivo*. Enfin, des modèles d'animaux xénotransgénés ont été développés pour appliquer nos diabodies dans le diagnostic *in vivo* des tumeurs en collaboration avec le service d'imagerie du SHFJ d'Orsay.

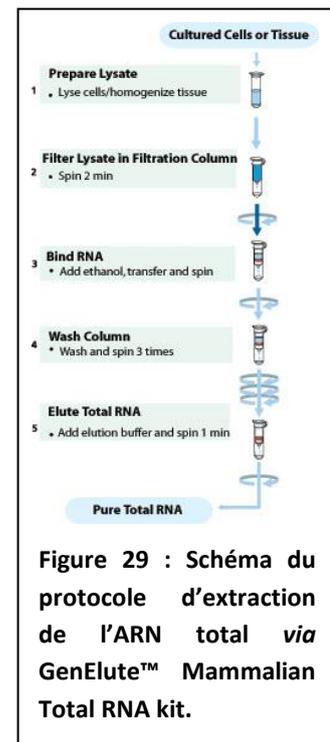
3 Procédures expérimentales

3.1 La construction moléculaire des fragments d'anticorps

3.1.1 Le clonage des régions variables

Pour la formation de diabody les seules régions d'intérêt sur l'anticorps sont les régions variables légère (VL) et lourde (VH). La construction de fragment d'anticorps commence donc par une étape de clonage des ADNc codant les régions variables.

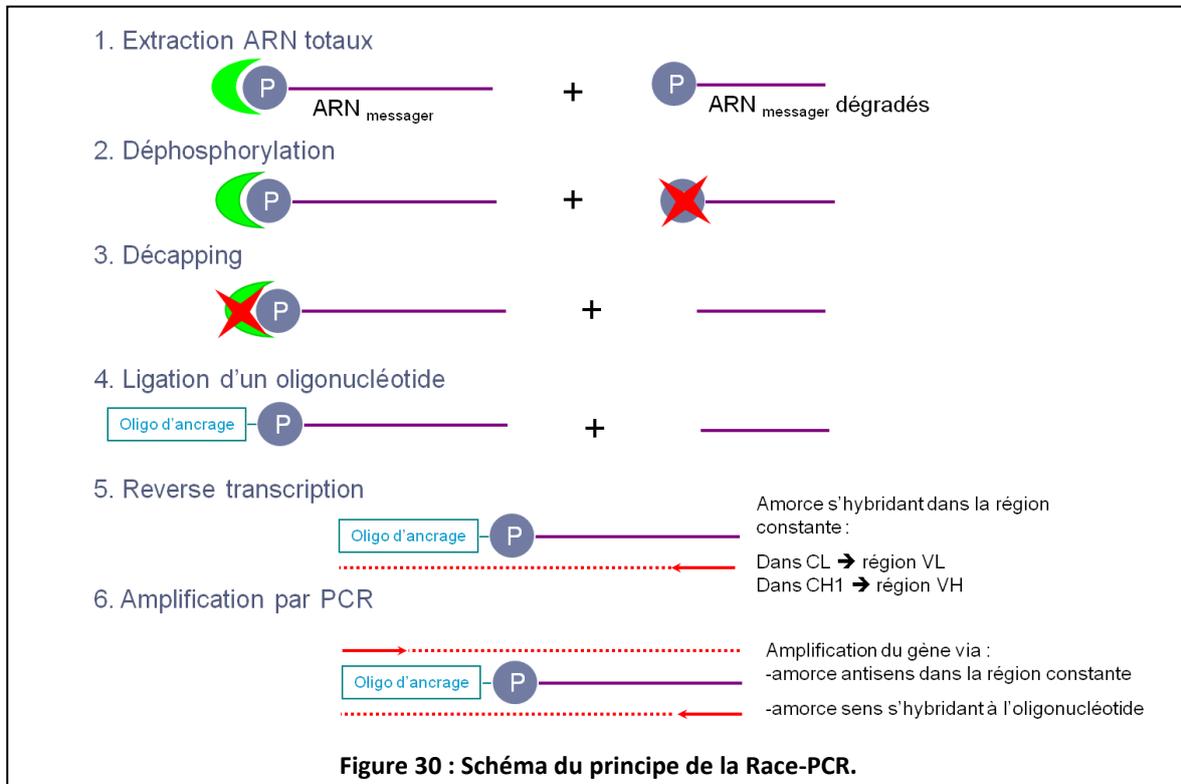
Les anticorps disponibles au laboratoire, 12G4 et SHA31, sont tous deux produits par des hybridomes. Pour rappel, un hybridome est le résultat de la fusion entre un clone de lymphocyte B synthétisant un anticorps particulier et une cellule de myélome. Les myélomes choisis (P3X63Ag8.653 et NS1), en plus d'apporter l'immortalité à l'hybridome, présentent l'avantage de ne pas exprimer d'immunoglobuline (Kearney et al., 1979). La première étape consiste donc à extraire le mélange d'ARN total des hybridomes qui contiendra les ARNm des chaînes légères et lourdes de l'anticorps d'intérêt. Pour cela, nous avons utilisé le kit de purification d'ARN total de mammifère (GenElute™ Mammalian Total RNA kit, Sigma). Ce système combine la technologie des membranes de silice dans un format de micro-colonne centrifugeable et la méthode d'éluion pour préparer de l'ARN total de grande qualité. Les échantillons cellulaires sont lysés et homogénéisés dans un tampon contenant la guanidine thiocyanate et le 2-mercaptoethanol pour extraire l'ARN et inactiver les RNases. Le lysat est alors centrifugé sur une colonne de filtration pour éliminer les débris cellulaires et cisailer l'ADN. Le filtrat est ensuite déposé sur une colonne de silice à haute capacité pour lier l'ARN total, suivi de trois lavages puis de l'éluion. Ainsi jusqu'à 150 µg d'ARN total sont récupérés, directement utilisables pour la suite du clonage.



3.1.1.1 Race-PCR : Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction

La Race-PCR est une variante de la reverse transcription suivi de la polymérisation en chaîne (RT-PCR). Cette technique est employée dans le cas où les régions amplifiées ne sont pas

parfaitement connue. Elle repose sur l'isolement des extrémités 3' ou 5' du messager d'intérêt afin de déterminer la séquence d'initiation ou de terminaison de la traduction. La Race-PCR est particulièrement bien adaptée au clonage des régions variables des anticorps qui présentent une grande variabilité de séquences (figure 30) (Essono et al., 2010).



3.1.1.1.1 Préparation des ARN

Parmi l'ARN total extrait, les ARNm intègres se distinguent des ARNm dégradés par la présence d'une coiffe protégeant la phosphorylation de l'extrémité 5'. Afin d'éliminer les contaminations avec des ARNm dégradés, le phosphate alors accessible en 5', est éliminé *via* une phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase, CIP), incubation 1h à 50°C. Ensuite les ARNm intègres sont déprotégés par élimination de la coiffe au moyen de l'enzyme TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) pendant 1h à 37°C. Après précipitation au phénol-chloroforme, les ARNm déphosphorylés et déprotégés sont repris en eau et ajoutés à l'oligonucléotide lyophilisé (GeneRacer™RNA Oligo). Le mélange est alors chauffé à 65°C pendant 5min pour dissocier les structures secondaires d'ARN. Après un passage de quelques minutes dans la glace, le mélange ARNm et oligonucléotides est incubé 1h à 37°C en présence d'une ligase (T4 RNA ligase). Ainsi l'ensemble des ARNm intègres, portant un phosphate en 5' dépourvu de coiffe, se retrouvent liés à un oligonucléotide en 5'. Cet échantillon d'ARN préparés (déphosphorylés, déprotégés puis ligués à un oligonucléotide) peut alors être utilisé pour la réverse transcription.

3.1.1.1.2 RT-PCR (figure 30)

Seuls les ARNm codant les chaînes protéiques de l'anticorps sont rétro-transcrit *via* l'enzyme Cloned Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (Cloned AMV RT), au moyen d'une des deux amorces antisens s'hybridant dans une région codant la région constante de l'anticorps, soit légère (CL) soit lourde (CH). Les ADN complémentaires ainsi obtenus sont amplifiés par PCR en utilisant l'enzyme AccuTaq™ polymérase en présence de la même amorce antisens et d'une amorce sens qui s'hybride à l'oligonucléotide.

Les produits de PCR sont ensuite purifiés sur gel puis sous-clonés dans un vecteur de séquençage (TOPO® vector). Des bactéries *E. coli* sont alors transformées par choc thermique puis étalées sur boîte. Une réaction de clonage dans TOPO efficace peut produire plusieurs centaines de colonies, parmi lesquelles une dizaine sont isolées et cultivées individuellement. A partir de chaque culture, les plasmides extraits par minipréparation d'ADN, sont alors envoyés au séquençage.

3.1.2 La construction des plasmides

Les séquences vérifiées par séquençage, les gènes des régions variables peuvent être assemblés pour coder un fragment d'anticorps recombinant.

3.1.2.1 Préparation du plasmide d'expression

Nous disposons au laboratoire du vecteur pSPI 4.0 issu d'un plasmide commercial pET 9c (Novagen) permettant l'expression d'anticorps recombinants dans le cytoplasme bactérien.

Il est composé par :

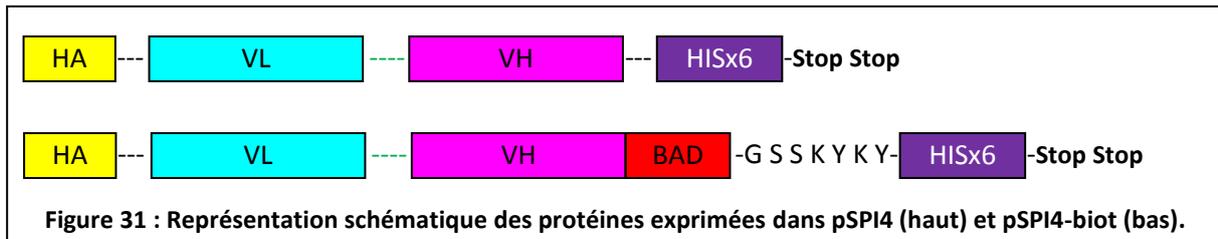
- le promoteur T7
- l'origine de répllication ColE1
- le gène responsable de la résistance à la kanamycine

Les modifications portent sur :

- l'insertion de l'ADN codant l'étiquette HA (ou tag HA) en N-terminal des protéines recombinantes qui correspond à l'épitope de l'hémagglutinine
- l'insertion de l'ADN codant l'étiquette poly-His (x6) (ou tag His) en C-terminal des protéines recombinantes
- le sous clonage orienté des ADNc codant pour les anticorps recombinants (scFv, diabody,...) grâce aux sites *Sfi* I (Krebber et al., 1997)

Deux vecteurs sont disponibles au laboratoire (figure 31):

- le pSPI4 qui présente le double tag, HA en N-terminal et His en C-terminal.
- le pSPI4-biot qui présente une région codant la séquence spécifique de biotinylation (Biotin Acceptor Domain (BAD)) (Schatz, 1993) : GGLNDIFEAQKIEWH, suivi du tag His comme décrit dans certains travaux (Cloutier et al., 2000). Cette construction a été utilisée pour un couplage *via* un conjugué streptavidine.



Ces vecteurs sont ouverts par digestion avec l'enzyme de restriction Sfi I incubée à 50°C de 3h à toute une nuit. Afin d'éviter que les vecteurs se referment, ils sont déphosphorylés *via* la phosphatase CIP pendant 1h à 37°C. Les vecteurs prêts à accueillir un insert sont conservés à 4°C durant l'assemblage VL-VH.

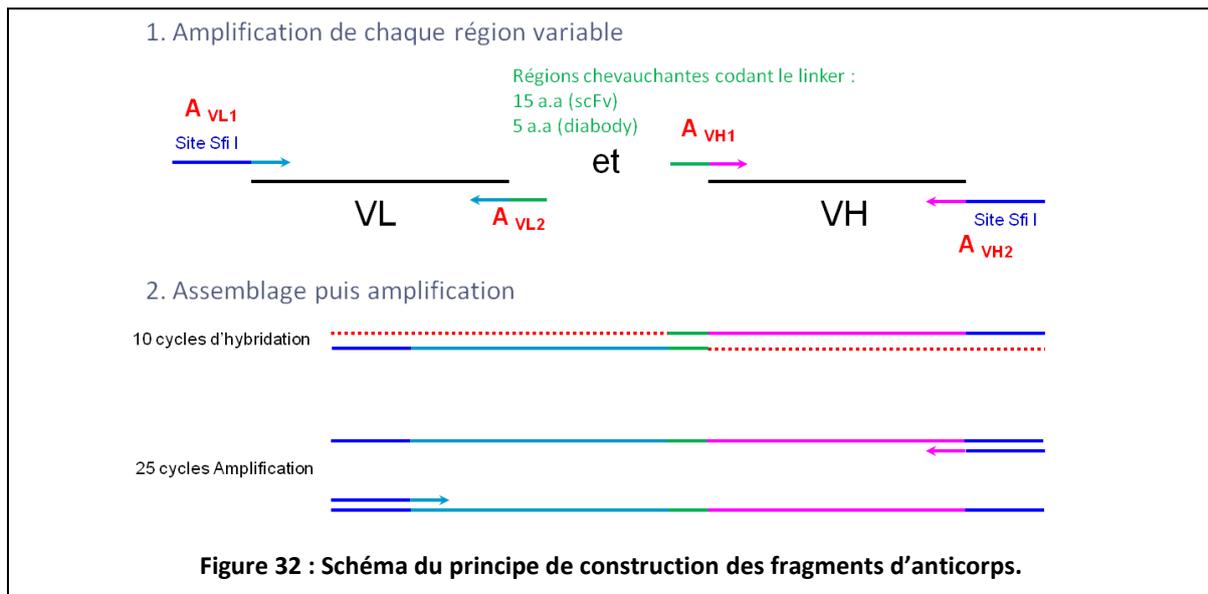
3.1.2.2 Assemblage VL-VH

Les fragments d'anticorps de type scFv et diabody sont constitués des régions variables légère et lourde et se distinguent par la taille du peptide de liaison entre VL et VH : 20 résidus pour le scFv et 5 pour le diabody.

Tout d'abord, les gènes VL et VH sont amplifiés au moyen de deux amorces chacun (figure 32):

- A_{VL1} : constitué d'un site Sfi I et du début de la région 5' du gène VL
- A_{VL2} : constitué de la fin de la région 3' du gène VL et de la région codant le lien
- A_{VH1} : constitué de la région codant le lien et le début de la région 5' du gène VH
- A_{VH2} : constitué de la fin de la région 3' du gène VH suivi d'un site Sfi I

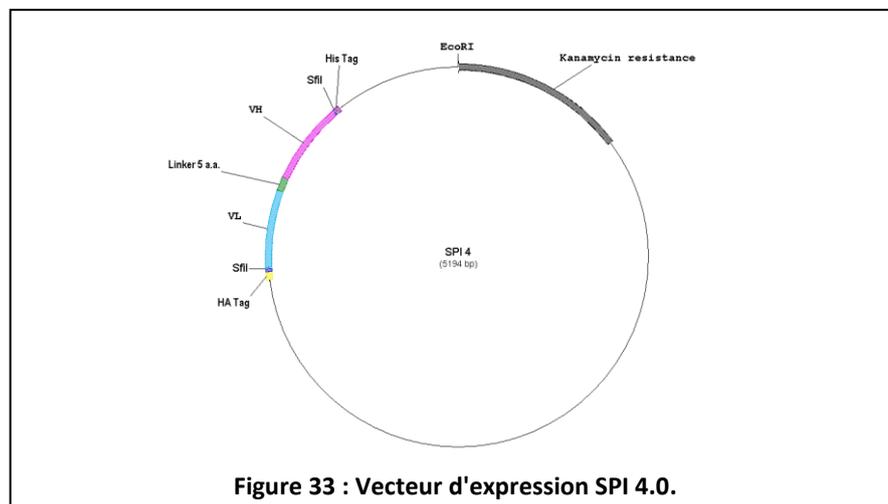
Ensuite, l'assemblage VL-VH dépend d'une hybridation entre la région 3' de VL et 5' de VH apportée par les amorces A_{VL2} et A_{VH1} chevauchantes formant ainsi la région de liaison. Une série de 10 cycles hybridation-élongation avec l'AccuTaq™ polymérase (30s d'hybridation à 60°C suivi d'une élongation à 68°C durant 1min) entraîne la formation du fragment : Sfi I-VL-lien-VH-Sfi I. Ce fragment est alors amplifié par PCR en présence des amorces A_{VL1} et A_{VH2} .



Pour être insérés dans l'un des plasmides d'expression, le fragment construit est digéré par l'enzyme Sfi I durant 1h à 50°C.

3.1.2.3 Ligation

Les différentes constructions VL-VH sont donc insérées *via* les sites Sfi I dans les deux plasmides pSPI4 et pSPI4-biot avec un rapport plasmide/insert de 1/3 avec l'intervention de la ligase NEB 1h à 20°C (figure 33) (Krebber et al., 1997).

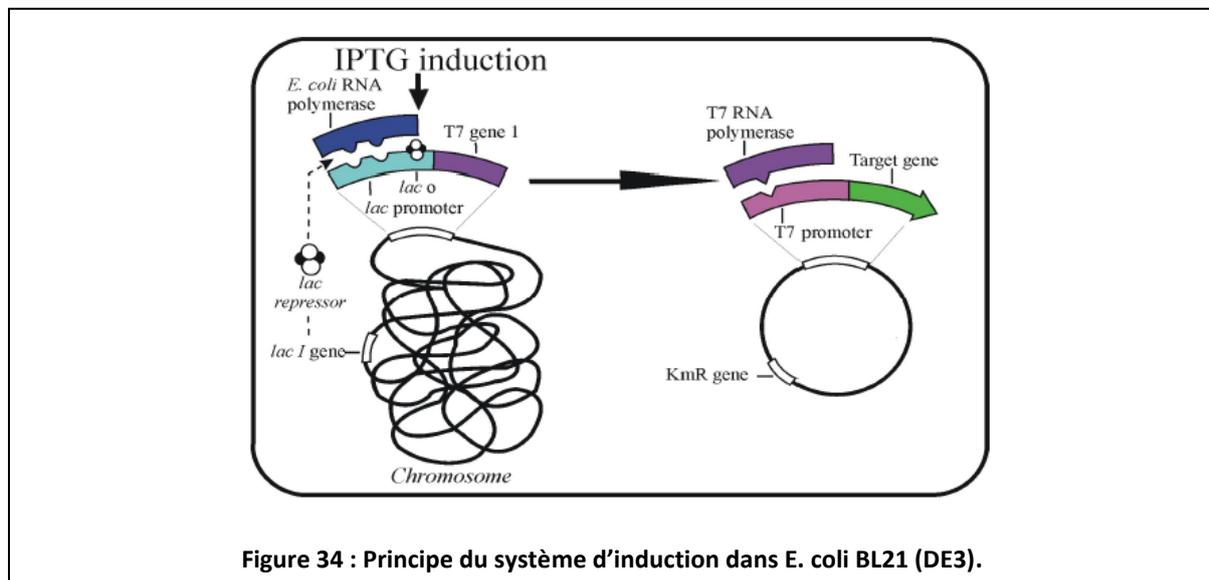


Des bactéries *E. coli* sont alors transformées par choc thermique avec le vecteur contenant l'insert. De nombreuses colonies sont isolées parmi lesquelles une dizaine sont isolées et cultivées individuellement. A partir de chaque culture, les plasmides extraits par minipréparation d'ADN, sont alors envoyés au séquençage.

3.2 L'expression, purification et renaturation des diabodies

3.2.1 L'expression des diabodies

Les vecteurs recombinants sont utilisés pour transformer une souche particulière : *E. coli* BL21 (DE3). Cette souche dérivée de BL21 a intégré au niveau chromosomique la séquence DE3 du phage λ qui contient le gène codant l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lac*. Ainsi, l'ajout d'IPTG à la culture bactérienne induit l'expression de cette polymérase qui reconnaît ensuite spécifiquement le promoteur T7 localisé sur le vecteur pSPI4 et transcrit le gène d'intérêt (figure 34).



Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3), transformées par choc thermique ou électrique, expriment massivement les protéines qui en s'accumulant dans le cytoplasme s'agrègent sous forme de corps d'inclusion. A ce stade, le produit d'expression de l'insert est donc un scFv dénaturé agrégé que l'on appellera fragment monomérique (Fm). En réalité, le format diabody dimérique (Dm) fonctionnel n'apparaîtra qu'au cours de la renaturation.

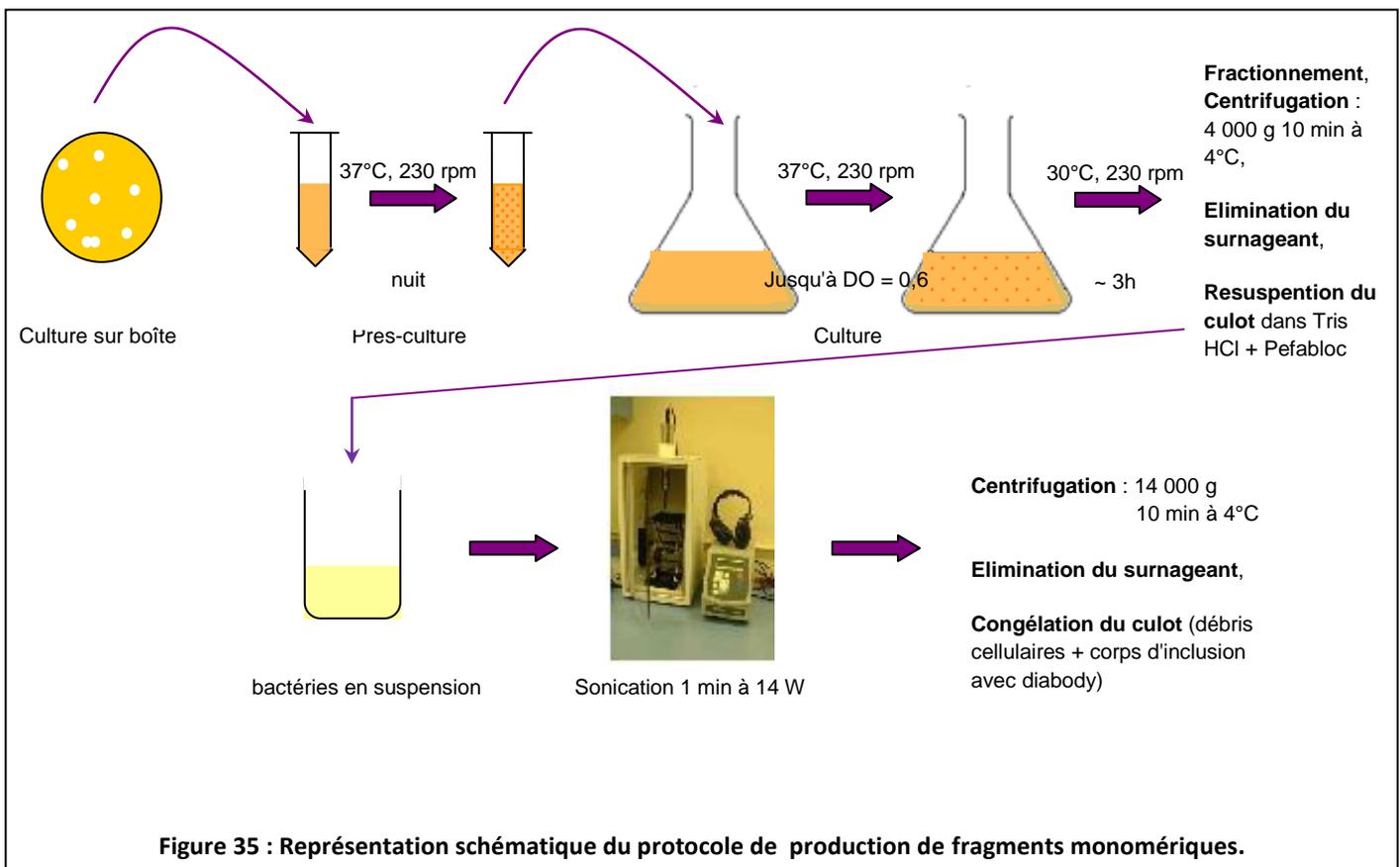
3.2.2 La production des diabodies sous forme de corps d'inclusion

A partir d'un clone BL21 (DE3) transformé avec le vecteur pSPI4 ou pSPI4-biot, la production du fragment recombinant se déroule en 3 jours.

Le premier jour, les clones sont étalés sur gélose LB agar/kanamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et mis en culture à 37°C toute la nuit. Une colonie isolée sur la boîte est utilisée le second jour pour

ensemencer, une pré-culture de 50 mL (LB/Kanamycine (50 µg/mL)), qui sera incubée toute la nuit à 37°C sous agitation à 230 rotations par minute (rpm). Enfin le troisième jour, un litre de milieu de culture LB/kanamycine (50 µg/mL), au préalable préchauffé, est ensemencé avec 20 mL de pré-culture et incubé à 37°C et 230 rpm. Après 2h de culture, La croissance bactérienne est contrôlée en mesurant la turbidité *via* l'absorbance à 600 nm. Lorsque la DO atteint près de 0,6, les bactéries sont au milieu de la phase exponentielle, l'expression du fragment d'anticorps est alors induite *via* l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM durant 3h sous agitation à 230 rpm et à 30°C.

La culture bactérienne est ensuite divisée en 4 aliquots de 250 mL qui sont centrifugés à 4 000g durant 10 minutes à 4°C. Les surnageants éliminés, les culots cellulaires sont resuspendus dans 25 mL de tampon Tris HCl 0,1 M pH 8 avec un inhibiteur de protéase, le Pefabloc. Puis, chaque aliquot cellulaire est soniqué durant 1 minute à 14 Watts permettant l'éclatement des membranes. Enfin, après centrifugation à 14 000 g, 10 minutes à 4°C, les surnageants sont éliminés et les culots, composés de corps d'inclusion contenant des agrégats de Fm et les débris cellulaires, sont congelés à -20°C (figure 35).



3.2.3 La purification des diabodies

3.2.3.1 Solubilisation des corps d'inclusion

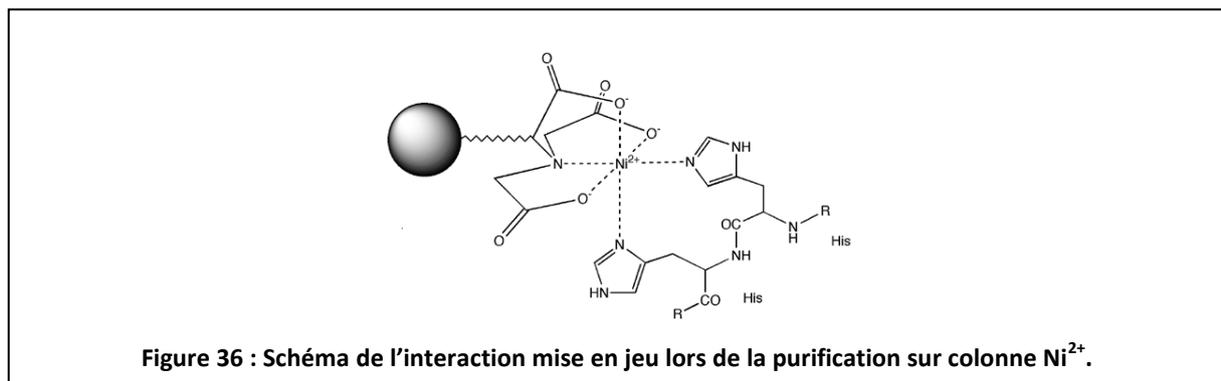
Chaque culot contenant les corps d'inclusion sont alors décongelés et resuspendus 1h à 37°C dans 25 mL de solution appelée dénaturante. Ce tampon contient deux éléments essentiels :

- Un agent chaotropique qui permet la solubilisation des corps d'inclusion et participe à la dénaturation des protéines libérées, on utilise l'urée à 8 M ou le chlorure de guanidine (HCl-Gnd) à 6M.
- Un agent réducteur qui favorise également la dénaturation des protéines en réduisant les ponts disulfures tels que le β -mercaptoéthanol (10 mM) ou le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (5mM).

L'aliquot est ensuite soniqué pendant 30 secondes à 14W afin de fragmenter l'ADN resuspendu. Ensuite, une centrifugation à 14 000 g pendant 30 min à 20°C sépare le culot, avec les débris cellulaires et les éventuels corps d'inclusion insolubles, du surnageant contenant les protéines dénaturées en suspension dont les fragments monomériques.

3.2.3.2 Purification par chromatographie d'affinité : IMAC

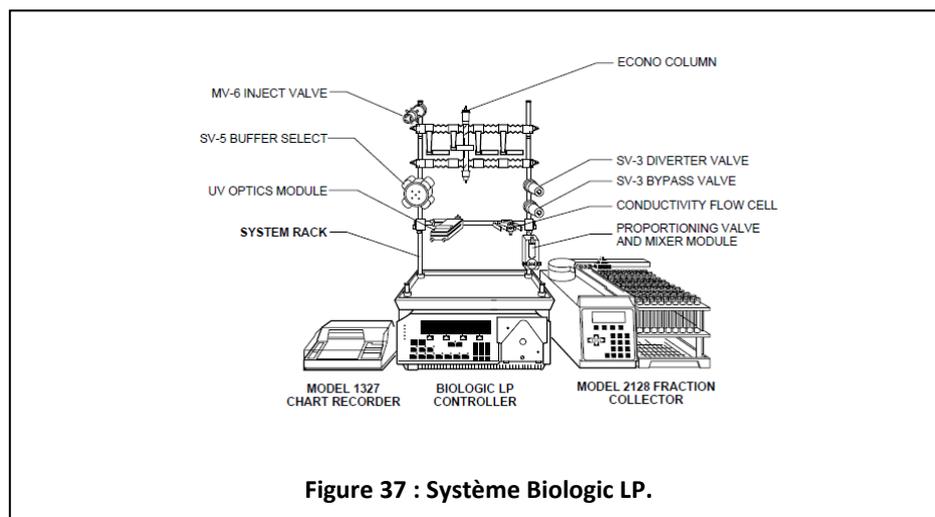
Le principe de cette chromatographie de type IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) repose sur l'interaction de l'ion Ni^{2+} avec le noyau imidazole des histidines (figure 36). Lors du passage de l'extrait protéique total sur la colonne séquestrant les ions Ni^{2+} (colonne HisTrap HP, GE Healthcare), les diabodies sont retenus spécifiquement *via* leur queue poly-histidine. Ce tag étant localisé dans la région C-terminal, cette purification permet d'isoler uniquement les diabodies intègres.



La colonne est montée en série dans le système de chromatographie basse pression Biologic LP de la société BioRad (figure 37). Dans un premier temps, la colonne, conservée en éthanol 20%,

est lavée avec 10 mL d'eau distillée. Ensuite elle est équilibrée avec 10 mL de solution dénaturante contenant 0,02 M d'imidazole afin de créer une force compétitive avec des protéines contaminantes porteuses de régions riches en histidine. Ensuite, l'extrait protéique est chargé sur la colonne à 0,5 mL/min et la fraction non retenue est récupérée (Flow through 1). Après un nouveau lavage de la colonne avec la solution dénaturante, les protéines retenues sont décrochées par compétition *via* une solution d'élution contenant une concentration importante d'imidazole (0,2 M).

Le Biologic LP mesure en direct la DO à 280 nm et la conductivité de l'échantillon facilitant le suivi de la purification. Ainsi, lors de l'élution, les fractions riches en diabodies sont identifiées avec l'apparition d'un pic d'absorbance à 280 nm.



3.2.3.3 Purification par chromatographie d'exclusion de taille

Après une première purification par affinité, l'échantillon est fractionné par chromatographie d'exclusion de taille (ou size exclusion chromatography : SEC). La colonne Hiload Superdex 200 (GE Healthcare), composée d'agarose et de dextran, constitue un tamis moléculaire séparant ainsi les protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. Suivant leur taille, les molécules éluées pénètrent plus ou moins dans les pores de la phase stationnaire. Ainsi, les petites molécules sont d'avantage ralenties que les grosses, d'où un temps de rétention inversement proportionnel à leur taille. Cette colonne préparative permet de purifier entre 3 et 12mL d'échantillon et séparer les protéines comprises entre 10^3 et 10^5 Da. La calibration de la colonne avec un mélange protéique défini, permet de rapporter le temps d'élution à une taille moléculaire. Cette colonne d'exclusion stérique, utilisée dans un système moyenne pression tel qu'un AKTA purifier, isole précisément la fraction de fragment monomérique.

3.2.4 La renaturation des diabodies purifiés

La renaturation des diabodies (soit, l'association de 2 fragments monomériques (Fm) formant un dimère fonctionnel (Dd)) repose sur un protocole de référence mis au point sur des fragments de type scFv (tableau 5, (Tsumoto et al., 1998, 2003)). Le repliement sous forme de diabodies s'effectue *via* une succession de dialyses avec trois paramètres essentiels : d'une part la décroissance progressive de la concentration en agent chaotrope, d'autre part l'ajout d'un agent dispersant, l'arginine, qui limite l'agrégation des protéines, enfin un potentiel oxido-réducteur (redox) (gluthation réduit/oxydé (7,5mM/0,75mM)) qui stabilise le passage des groupements SH des cystéines vers une forme oxydée, favorisant la formation de ponts disulfures thermodynamiquement stables. Chaque dialyse est réalisée dans un bain de 2 litres à 4°C, au moyen d'une membrane (sous forme de cassette ou de boudin) dont le seuil de coupure est bien inférieur à la protéine d'intérêt, soit 3 500 MWCO.

Tableau 5 : Synthèse du protocole de renaturation des fragments d'anticorps					
	1 ^{ère} dialyse : o/n	2 ^{ème} dialyse o/d	3 ^{ème} dialyse o/n	4 ^{ème} dialyse o/d	5 ^{ème} dialyse o/n
Fragment monomérique en sortie de colonne SEC et équilibré à 10-15 µM	Tris-HCL 0,1M Agent chaotrope 4M Arginine (0,4M)	Tris-HCL 0,1M Agent chaotrope 2M Arginine (0,4M)	Tris-HCL 0,1M Agent chaotrope 1M Arginine (0,4M) gluthation réduit/oxydé (7,5mM/0,75mM)	Tris-HCL 0,1M Agent chaotrope 0,5M Arginine (0,4M) gluthation réduit/oxydé (7,5mM/0,75mM)	Tris-HCL 0,1M Agent chaotrope 0M Arginine (0,4M)

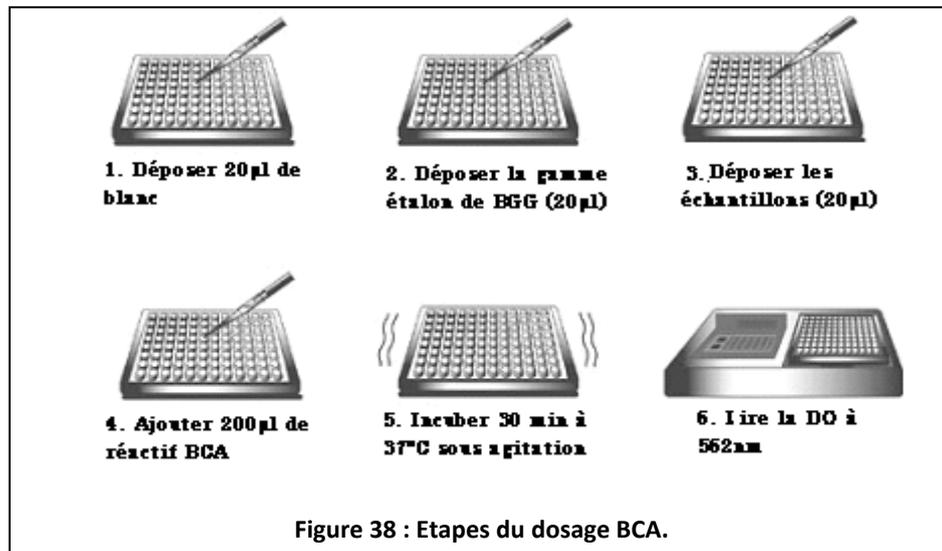
3.3 La caractérisation des diabodies

3.3.1 La caractérisation quantitative

3.3.1.1 Dosage BCA

Le dosage colorimétrique de l'acide bicinchoninique (BCA), permet une détection et une quantification en protéine totale (Smith et al., 1985). Cette méthode repose sur la réduction du Cu²⁺ en Cu¹⁺ par les protéines au moyen des liaisons peptidiques et de certains acides aminés : cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine (Wiechelman et al., 1988). Le cation cuivre Cu¹⁺ est détecté par réaction colorimétrique très sensible et sélective en utilisant un réactif contenant l'acide bicinchoninique. La réaction de coloration violette résultant de ce test est induite par la chélation de deux molécules de BCA avec un ion Cuivre. Ce complexe soluble dans l'eau produit une forte absorbance à 562nm qui varie de façon quasiment linéaire avec l'augmentation en concentration

protéique dans un intervalle de 20 à 2 000 $\mu\text{g/mL}$. Lors du dosage, des solutions de BSA de concentrations connues sont utilisées comme gamme étalon pour définir la concentration protéique de nos échantillons (figure 38).



3.3.1.2 Electrophorèse en SDS-PAGE

L'électrophorèse des protéines en présence de sodium dodécylsulfate (SDS) sur gel de polyacrylamide (Page), permet de séparer les molécules selon leur masse moléculaire et ainsi identifier qualitativement et quantitativement la composition des échantillons.

Le SDS est un détergent anionique qui tapisse les protéines formant des micelles tous chargées négativement avec la même densité de charge (rapport charge sur le rayon hydrodynamique). Sous l'action d'un champ électrique, les protéines migrent différenciellement en fonction de leur taille à travers les mailles du réseau polyacrylamide. Les protéines sont ensuite visualisées par coloration au bleu de coomassie. Chaque migration est standardisée au moyen d'un marqueur protéique contenant des protéines ou des peptides de tailles et concentrations connues. Il permet d'établir deux rapports entre : taille et migration ; densité de bande et concentration. Ces grandeurs peuvent donc être définies pour chaque échantillon après numérisation du gel et analyse *via* un logiciel informatique tel que Image J.

Différentes analyses sont possibles sur un même gel de polyacrylamide :

- Etude de la forme native de l'échantillon, l'échantillon est donc non dénaturé et non réduit
- Etude de la forme intermédiaire, l'échantillon est dénaturé par chauffage et non réduit
- Etude de la forme linéaire, l'échantillon est alors dénaturé par chauffage et réduit en présence de β -mercaptoéthanol

Les échantillons sont dilués au demi avec du tampon de charge, le « bleu Laemmli » 2X réducteur ou non, et sont, selon l'état désiré (natifs ou dénaturés), chauffés à 95°C durant 10 min.

La migration a lieu dans un tampon Tris-HCl 25mM, pH 8.3, glycine 192mM, SDS 0,1%. Les protéines sont d'abord concentrées sur un premier gel (le gel de concentration), puis séparées sur un deuxième gel (gel de séparation). L'électrophorèse est réalisée à courant constant : 150V durant 1h. Le gel est ensuite lavé 3 fois 10 minutes dans de l'eau déminéralisée puis coloré dans du bleu de coomassie pendant au minimum 2 heures, suivi de trois lavages.

3.3.2 La caractérisation qualitative

3.3.2.1 Analyse par chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion de taille permet l'étude de l'échantillon dans sa conformation native. Cette étude repose sur le même principe que la purification SEC. Les colonnes analytiques sont la Superdex 75 10/300 GL et la Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) qui apportent une grande résolution de fractionnement et ce sur des volumes d'échantillon réduits (entre 25 et 500µL).

3.3.2.2 Western Blot

Le Western Blot est un outil de caractérisation complémentaire au SDS-PAGE qui permet une identification spécifique des protéines d'intérêts.

Après une première étape de séparation par électrophorèse, les protéines contenues dans le gel d'acrylamide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sous l'effet d'un courant électrique. La saturation toute une nuit de la membrane avec du PBS 1X contenant 2% de BSA bloque tous les sites inoccupés. Les diabodies fixés irréversiblement sur la membrane sont ensuite visualisés par réaction anticorps-antigène. Tout d'abord, l'anticorps primaire de souris anti-tag HA (10µg/mL dilué au 5000^{ème}) se lie spécifiquement aux protéines tagguées. Après trois lavages de la membrane (PBS 1X et Tween 0,1%), l'anticorps primaire est reconnu par l'anticorps secondaire chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (dilué comme conseillé par le fournisseur au 50 000^{ème}). Enfin après trois nouveaux lavages, la révélation a lieu par réaction chromogénique *via* le diaminobenzidine (DAB) qui, oxydé en présence de peroxyde d'hydrogène, produit un précipité coloré sous l'action de la peroxydase localisée sur la membrane au niveau de la protéine cible.

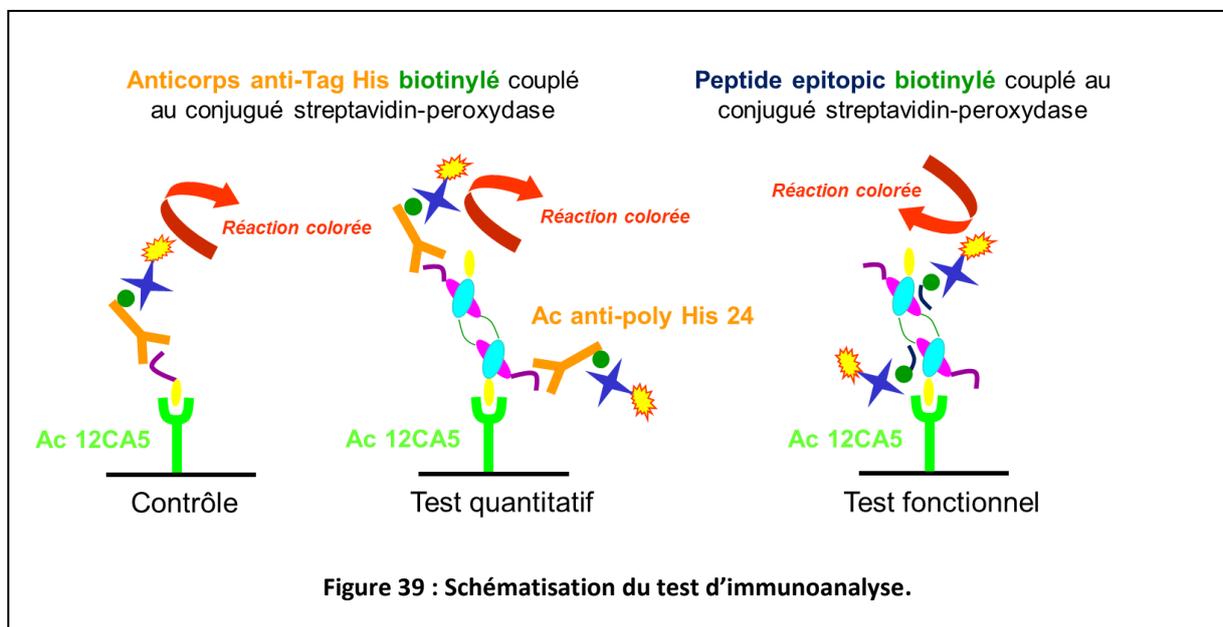
3.3.2.3 Immunoanalyse

Ce test permet une quantification relative et une étude de la fonctionnalité des diabodies renaturés (figure 39, inspiré de Boquet et al., 2000).

Les plaques de 96 puits sont tapissées d'anticorps 12CA5 (10µg/mL) qui reconnaît le tag HA situé à l'extrémité N-terminal du diabody. Une gamme de dilution de diabodies renaturés, de dix en dix en commençant au centième jusqu'au cent millième, est déposée en dupliquettes. Après lavage des plaques, la quantité et la fonctionnalité des diabodies sont mis en évidence par l'ajout de 2 traceurs différents :

- pour le test quantitatif (total) : L'anticorps Poly-His 24 biotinylé, dirigé contre le Tag-His localisé en C-terminal des diabodies. Un contrôle positif est réalisé avec une gamme de peptide HA-His (50 ; 25 ; 12,5 ; et 6,25 ng/mL) également révélée *via* l'anticorps Poly-His 24.
- pour le test qualitatif (fonctionnel) : Le peptide antigénique biotinylé, mime l'épitope de la protéine cible auquel se fixe l'anticorps recombinant.

La présence de ces traceurs est ensuite révélée par colorimétrie en présence d'un conjugué streptavidine-peroxydase et l'ajout du substrat tetraméthylbenzidine (TMB). Après 30 min d'incubation, la réaction colorimétrique est stoppée au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 1M. La formation d'un produit jaune est détectée par absorbance à 450nm.



3.4 Le marquage du diabody

3.4.1 La stratégie de couplage

La fonctionnalité des fragments d'anticorps renaturés peut être testée *ex-vivo* (par cytométrie) ou *in vivo* (par imagerie de fluorescence chez le petit animal). Ces fragments doivent donc être liés à des fluorochromes pour être localisés.

3.4.1.1 Marquage indirect

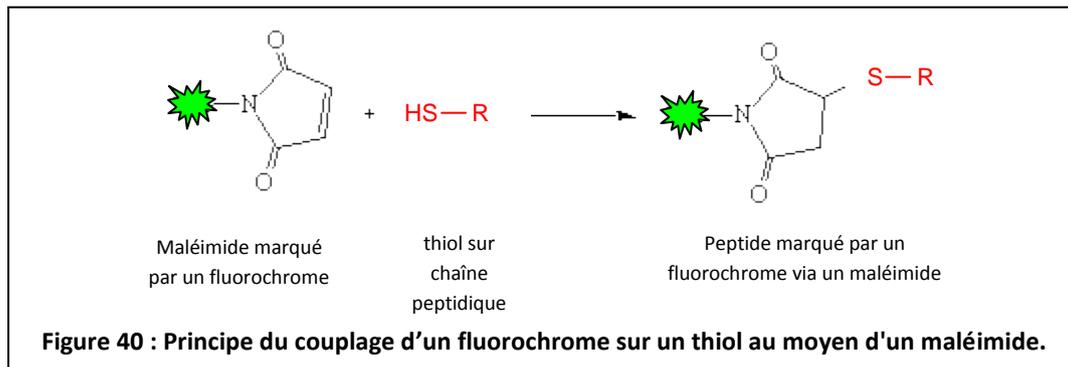
Les anticorps recombinants peuvent être marqués à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dirigé contre l'une de ses étiquettes protéiques. Pour ce faire, un anticorps monoclonal anti-tag HA associé à la fluoresceine (Anti-HA-FITC antibody, Sigma) est utilisé pour révéler les fragments d'anticorps en cytométrie en flux.

3.4.1.2 Marquage direct

Afin de transformer nos fragments d'anticorps en traceurs *in vivo*, différentes techniques de couplage ont été étudiées. Les stratégies développées ici reposent sur des molécules fluorescentes en vue de faire de l'imagerie de fluorescence. Ces méthodes devront donc être transposées et adaptées aux molécules radioactives pour une finalité d'imagerie-TEP.

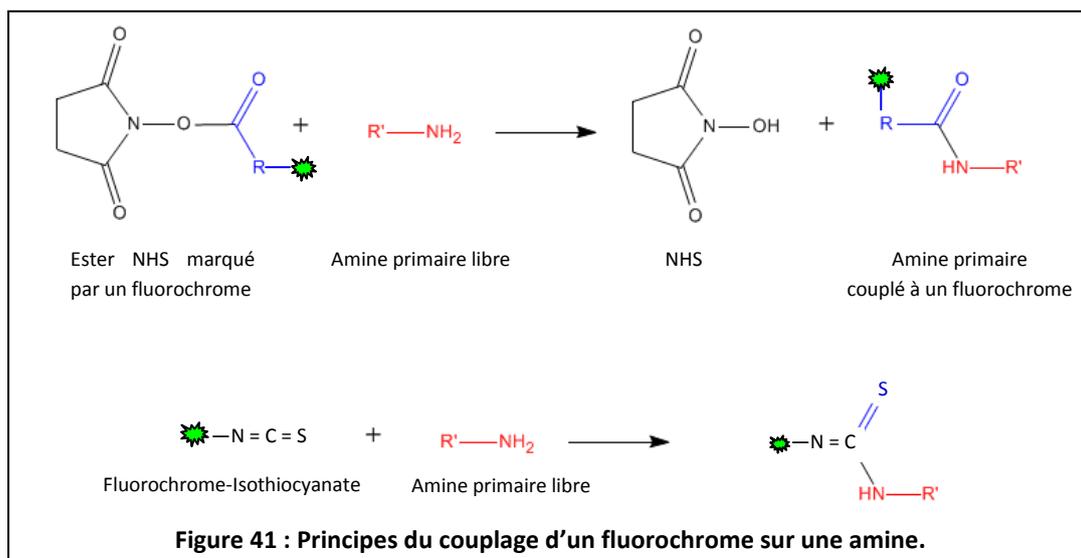
3.4.1.2.1 Couplage sur thiol

Les groupements thiol (SH), uniquement présents dans une protéine *via* ses résidus cystéine, peuvent réagir avec un maléimide associé à un fluorochrome. Pour cette stratégie de couplage, trois nouvelles constructions ont été préparées avec l'ajout d'un codon codant une cystéine : en N-terminal le diabody sera appelé NSH, dans le lien entre VL et VH ce sera le diabody LSH et en C-terminal formant le diabody CSH. L'ajout de ces cystéines a pour but d'apporter un nouveau groupement thiol (SH) qui sera ciblé pour le couplage, en évitant ainsi de réagir avec l'un des 8 autres naturellement présents qui sont essentiels dans la stabilité structurelle du diabody (figure 40).



3.4.1.2.2 Couplage sur amine

La stratégie de marquage du diabody sur les amines primaires repose sur l'utilisation d'un ester N-hydroxysuccinimide (NHS) ou d'un groupement isothiocyanate (N=C=S), marqué par un fluorochrome, permettant la formation d'une liaison covalente sur les amines primaires accessibles du diabody (figure 41). Il s'agit donc d'un marquage non ciblé, mais localisé tout le long du diabody en particulier au niveau N-terminal et sur les amines primaires des lysines.



3.4.1.2.3 Sur BAD

Cette technique de couplage dépend de la grande affinité de la streptavidine pour la biotine. Ainsi, un fragment d'anticorps biotinylé pourra être marqué au moyen d'un conjugué streptavidine-fluorochrome. Cette stratégie a donné lieu à la construction du vecteur pSPI4-biot, caractérisé par la présence d'une séquence codant le domaine BAD (Biotin Acceptor Domain). Cette région, localisée en amont du tag His, sera le lieu spécifique de biotinylation et par conséquent le lieu de couplage du fluorochrome. Deux méthodes de biotinylation sont possibles : *in vivo* pendant l'expression bactérienne ou *in vitro* via la biotine holoenzyme synthétase : BirA.

3.4.2 La reconnaissance du récepteur AMHRII par le diabody

3.4.2.1 Culture cellulaire

Des tests sur cellules ont été réalisés pour étudier la reconnaissance des anticorps recombinants sur le récepteur AMHRII dans sa conformation native. Nous disposons de deux lignées cellulaires fournies par l'IRCM. Il s'agit de lignées tumorales ovariennes, établie à partir d'une tumeur solide humaine de la granulosa : les COV434 « wild type » (WT) et les COV434-AMHRII dérivées de la lignée WT transfectée avec un plasmide contenant l'ADN complémentaire de l'AMHRII. Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'antibiotique (penicilline/streptomycine). Pour la culture des COV434-AMHRII, la généticine est ajoutée au milieu (3,33µg/mL) afin d'assurer une pression de sélection maintenant le plasmide pour l'expression du récepteur AMHRII.

3.4.2.2 Cytométrie en flux

Cette technique est à mi-chemin entre les tests de fonctionnalité *in vitro* et l'imagerie *in vivo*, on parlera d'analyse ex-vivo. Les études en cytométrie en flux permettent de vérifier que dans un contexte cellulaire, l'anticorps recombinant est capable de se fixer à son antigène, dans notre cas le récepteur AMHRII.

Cette technologie consiste à mesurer l'intensité relative de fluorescence des cellules exprimant l'antigène, ici les COV434-AMHRII, seules ou préincubées avec le diabody marqué directement ou indirectement. Des expériences de compétition peuvent être réalisées en pré-incubant le diabody en présence du peptide épitopique (pAMHRII).

Ainsi, les cellules décollées et lavées en PBS, sont tout d'abord saturées pendant 30 min en présence de PBS contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 0,1% et du sérum normal de chèvre (SNC) à 5%. Ensuite les cellules sont incubées 1h avec les divers échantillons de diabody (2µM) en présence de compétiteur ou non. Lorsque le diabody n'est pas directement marqué, il est révélé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, ici l'anticorps monoclonal anti-tag HA couplé au FITC. Cet anticorps est dilué au millième (soit 1µg/mL final) dans la solution de saturation (PBS-BSA-SNC) et incubé 1h avec les cellules. Durant toute l'expérience, les cellules sont maintenues à 4°C afin d'éviter l'internalisation du récepteur ciblé.

Ces résultats sont comparés à ceux obtenus avec le contrôle positif : l'anticorps entier. Sur le même principe que les diabodies, l'anticorps est incubé sur les cellules COV434-AMHRII, puis révélé avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG, Lifetechnologies).

La fluorescence est mesurée sur 1 000 cellules, analysées une à une à l'aide d'un cytomètre en flux, le FACS Calibur (BD Bioscience). L'évolution de la moyenne géométrique de la fluorescence apporte une indication sur la présence ou non de diabodies à la surface des cellules.

4 Résultats et Discussions

4.1 La preuve du concept : le diabody SHA31

En s'appuyant sur les savoir-faire du laboratoire en termes de clonage, d'expression cytoplasmique et de renaturation protéique (Padiolleau-Lefevre et al., 2007), la production d'un diabody a été développée et optimisée sur un modèle ciblant la protéine du prion, la PrP. Notre choix s'est porté sur la PrP en raison de sa localisation extracellulaire et de son ancrage à la membrane cellulaire, un contexte comparable aux biomarqueurs tumoraux membranaire pour un diagnostic par imagerie *in vivo*. De plus, de nombreux anticorps anti-PrP étaient disponibles au laboratoire, ainsi que des dosages immunologiques pour tester leur immunoréactivité *in vitro* (Boquet et al., 2000; Féraudet et al., 2005). Parmi tous les anticorps, le plus affin : le SHA31 a été retenu.

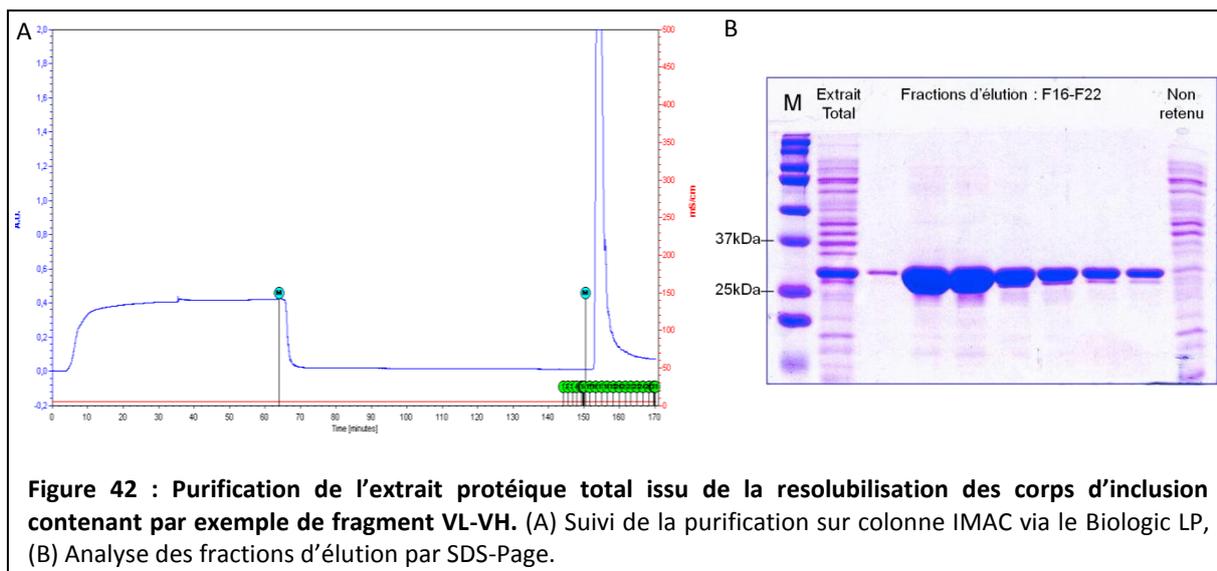
4.1.1 L'expression et renaturation des diabodies SHA31

Les constructions codant les deux orientations possibles du diabody ont été assemblées :

- N_{ter}-VL-VH-C_{ter} (VL-VH)
- N_{ter}-VH-VL-C_{ter} (VH-VL)

4.1.1.1 Expression des fragments monomériques VL-VH et VH-VL

Pour rappel, nous avons choisi d'étudier une production de diabody dans *E. coli* BL21 par voie cytoplasmique. Suite à l'expression massive dans le cytoplasme, les diabodies se retrouvent agrégés et dénaturés dans des corps d'inclusion. Cet agglomérat de protéines est ensuite solubilisé comme décrit dans la partie Matériels et méthodes au moyen d'un agent chaotropique, ici l'urée 8M. Après élimination par centrifugation des débris cellulaires et des corps d'inclusions insolubles, il en résulte un extrait protéique hétérogène duquel le fragment monomérique (Fm) est extrait *via* une chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (figure 42). Lors de l'analyse par électrophorèse sur gel polyacrylamide (figure 42), après élution, on obtient des fractions purifiées de Fm avec une bande majoritaire aux alentours des 30 kDa.



Les fragments monomériques VL-VH ou VH-VL purifiés sont ensuite homodimérisés en suivant le protocole de renaturation de l'équipe de Tsumoto (tableau 5, dans Matériels et méthodes).

4.1.1.2 Fonctionnalité des diabodies homodimériques

S'interrogeant sur l'influence de l'orientation VL-VH ou VH-VL sur la renaturation, les premiers travaux reposent sur la comparaison de la fonctionnalité des diabodies SHA31 renaturés homodimériques VL-VH ou VH-VL. Pour cela, des tests d'immunoanalyses étaient disponibles au laboratoire (Boquet et al., 2000) qui repose sur le même principe que le test décrit dans Matériels et méthodes utilisant l'enzyme Acétylcholine estérase (AChE) couplé à un anticorps comme système de révélation.

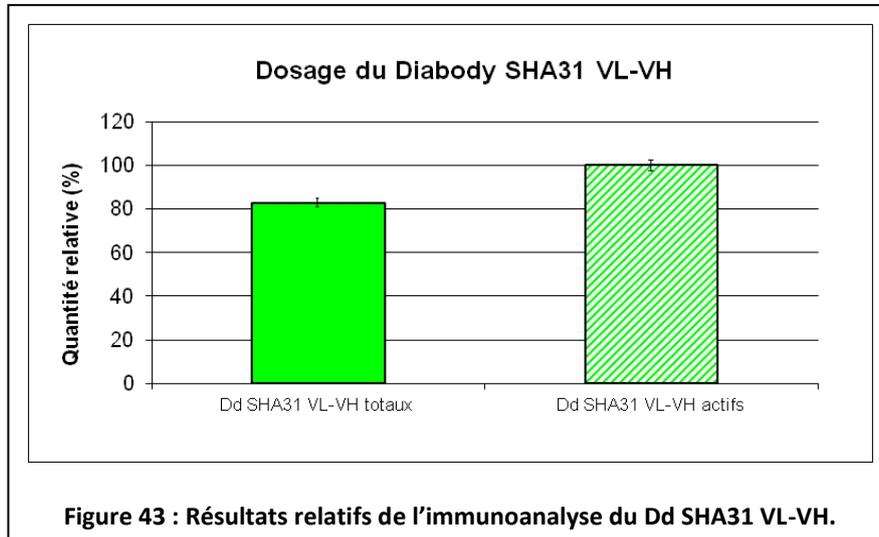
4.1.1.2.1 Renaturation du VL-VH

La quantité et l'activité des diabodies dimériques (Dd) SHA31 VL-VH sont donc mesurées par test ELISA. Les diabodies, d'une part totaux, et d'autre part fonctionnels, sont dosés respectivement *via* l'anticorps anti-polyHis directement couplé à l'AChE et le peptide antigénique également lié à l'AChE. La révélation est colorimétrique avec l'ajout d'un substrat, le réactif d'Ellman (mélange d'Acétylthiocholine et de DNTB), qui sous l'action de l'AChE forme un produit coloré jaune mesurable par absorbance à 414 nm.

Les DO obtenues sont relatives. Elles sont rapportées en pourcentage par rapport à la DO la plus importante de l'analyse quantitative ou de l'étude fonctionnelle respectivement (figure 43 et 44).

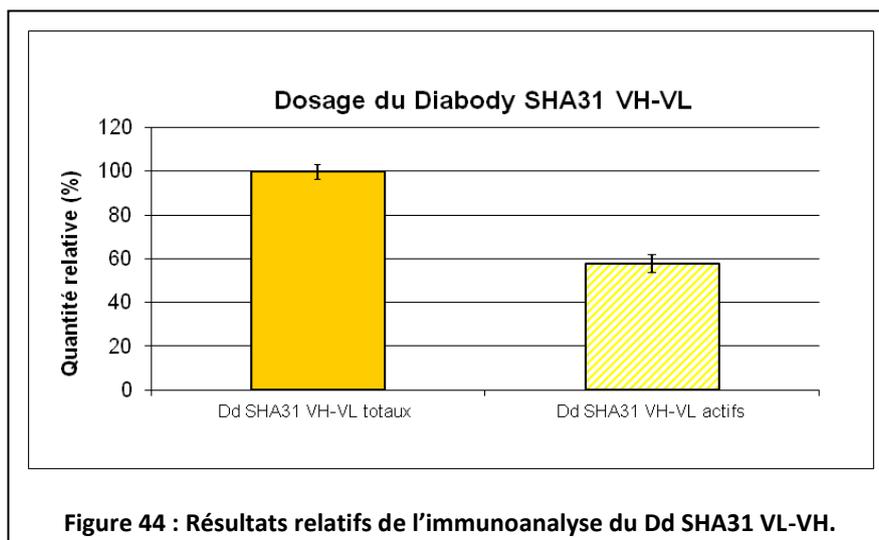
L'immunoanalyse du Dd VL-VH met en évidence une quantité protéique de SHA31Dd importante dans l'échantillon après renaturation, avec 82% de VL-VH par comparaison avec

l'échantillon le plus concentré en diabodies soit le VH-VL (100%). En revanche, pour l'étude de fonctionnalité, le format VL-VH possède la plus haute valeur de DO représentant donc le 100 % (figures 43 et 44).



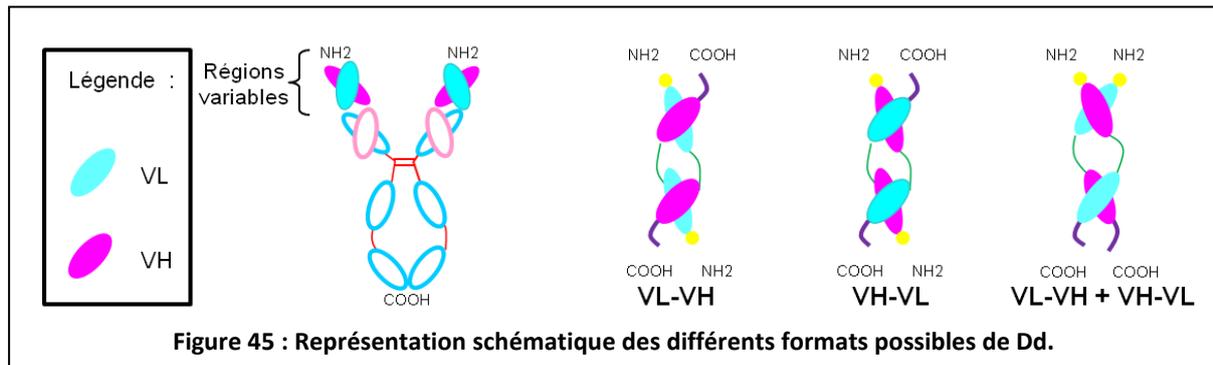
4.1.1.2.2 Renaturation du VH-VL

Sur le même principe, la conformation active du SHA31Dd VH-VL est vérifiée par immunoanalyse (figure 44). On note dans ce cas une quantité maximale en diabodies totaux (100 %), mais un moindre pourcentage de formes fonctionnelles, 58 % en comparaison avec le format actif majoritaire le Dd VL-VH.



La comparaison de la fonctionnalité du Dd VH-VL à celle du VL-VH, révèle donc une différence significative des activités en faveur de l'orientation VL-VH.

D'autre part, lors de la renaturation d'un homodimère, l'association de deux VL-VH ou deux VH-VL a lieu de façon anti-parallèle (figure 45). Ce qui se traduit par une orientation inversée des extrémités N-terminal et C-terminal.

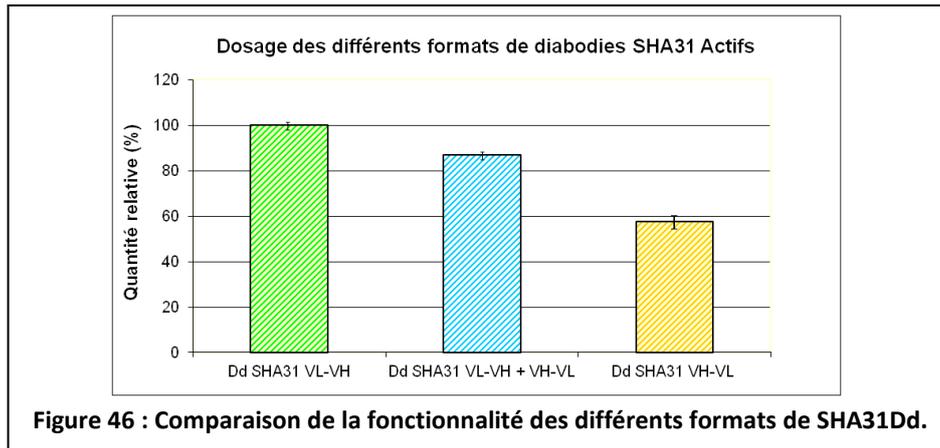


Or, dans la conformation naturelle d'un anticorps, les extrémités -NH₂ et -COOH sont parallèles. Un essai original d'obtention de diabodies a donc été réalisé : la renaturation d'un mélange équimolaire de diabodies VL-VH et VH-VL pour permettre la formation d'hétérodimères présentant des extrémités -NH₂ et -COOH parallèles.

4.1.1.3 Fonctionnalité des diabodies hétérodimériques : VL-VH + VH-VL

Après une première dialyse 8 M urée des diabodies VL-VH et VH-VL séparément, la concentration de chaque échantillon est estimée par dosage BCA. Un mélange équimolaire de VL-VH et VH-VL est alors préparé puis renaturé par une succession de dialyses selon le protocole de renaturation habituel.

La fonctionnalité du matériel renaturé est ensuite analysée par immunoanalyse et comparée à celles des homodimères VL-VH et VH-VL (figure 46). On remarque finalement que l'activité du mélange VL-VH et VH-VL est intermédiaire (83 %) comprise entre celle des homodimères VL-VH (100 %) et celle des homodimères VH-VL (58 %). On note toutefois dans le mélange, un pourcentage significativement plus élevé de diabodies actifs par rapport aux homodimères VH-VL. L'inconvénient du mélange VL-VH et VH-VL est son hétérogénéité avec probablement la présence d'hétérodimères mais également des deux formats d'homodimériques pouvant expliquer cette fonctionnalité intermédiaire.



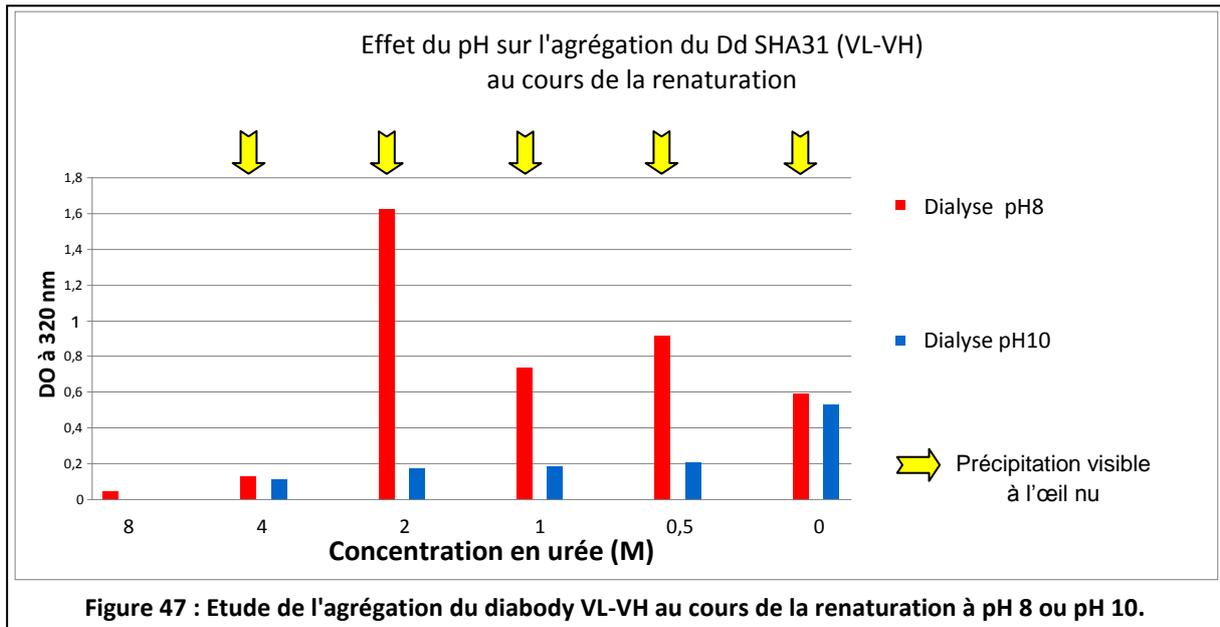
L'ensemble de ces travaux sur l'expression et la renaturation des différents formats de diabodies (VL-VH, VH-VL et le mélange VL-VH + VH-VL) démontre que le format SHA31Dd le plus efficacement renaturé est le VL-VH produisant d'avantage de diabodies actifs. L'orientation VL-VH a donc été conservée pour l'ensemble des études suivantes.

4.1.2 L'optimisation générale du protocole de renaturation

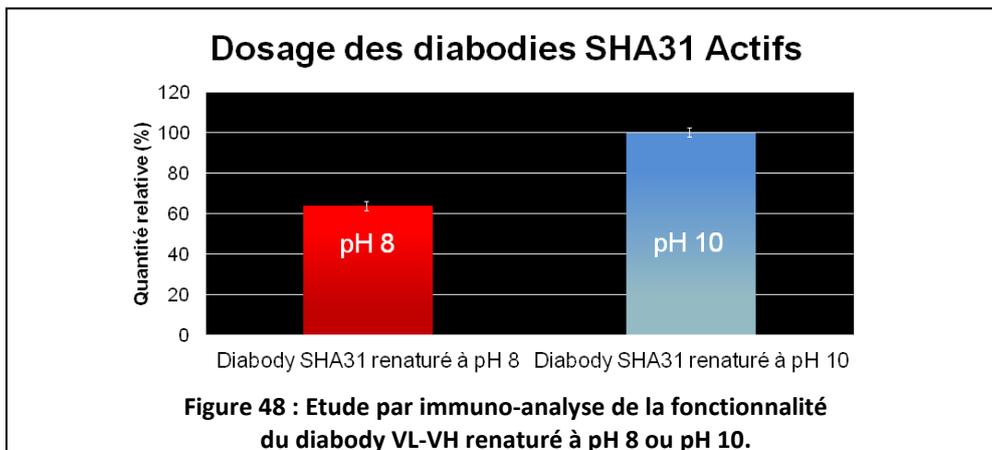
4.1.2.1 Effet du pH sur la renaturation

Au cours du protocole de renaturation, la présence de l'arginine élève le pH des solutions de dialyses à une valeur d'environ pH 10. Il nous est alors paru intéressant d'étudier une renaturation dont le pH serait contrôlé et rapproché du pH physiologique aux alentours de pH 8.

Tout d'abord, durant le protocole de renaturation, on mesure après chaque dialyse l'absorbance à 320 nm reflétant la turbimétrie de la solution, corrélant donc un phénomène d'agrégation dans l'échantillon (figure 47). On constate alors une augmentation significative de l'agrégation lors d'une renaturation à pH 8 comparé à celle à pH 10. Par ailleurs, une précipitation est observable à l'œil nu à pH 8 et non à pH 10.



Dans un deuxième temps, la fonctionnalité des diabodies renaturés à pH 8 et à pH 10 est estimée par immunoanalyse (figure 48). On constate alors que la renaturation à pH 8 entraîne une perte de fonctionnalité de 36%. Ces résultats corroborent les constats sur l'agrégation. En effet, à pH 8 l'augmentation de l'agrégation entraînant un mauvais repliement de l'anticorps recombinant peut expliquer la perte de fonctionnalité des diabodies.

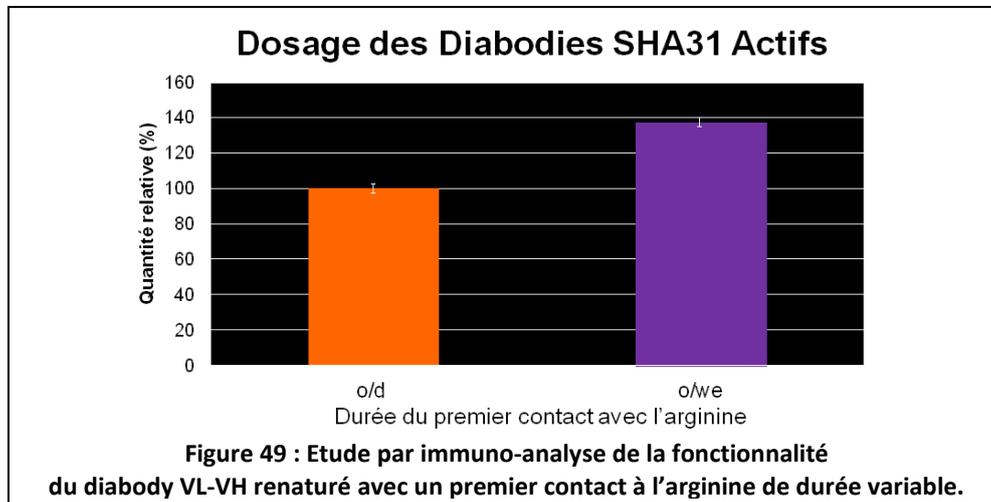


Pour la suite des analyses, on continuera avec des renaturations à pH 10 pour optimiser la formation de conformations actives.

4.1.2.2 Influence de l'Arginine

L'arginine, ajoutée au cours de la renaturation, joue le rôle de chaperon chimique (Arakawa and Tsumoto, 2003). En favorisant la dispersion des protéines, elle diminue les phénomènes d'agrégation et améliore par conséquent la renaturation. On s'est intéressé à l'optimisation de l'effet dispersant de l'arginine.

Dans le protocole initial, l'arginine est ajoutée à partir de la seconde dialyse toute une journée. Afin d'améliorer l'effet chaperon de l'arginine, on a testé un allongement du temps de contact diabody-arginine durant un weekend. La fonctionnalité des diabodies dosée par immuno-analyse est alors augmentée de 37 % par comparaison avec le protocole habituel (figure 49).



Le rôle de chaperon chimique de l'arginine est donc susceptible d'être amélioré par le prolongement de son temps d'action sur un weekend.

Par ailleurs, des polymères chimiques sont en développement par les équipes de physico-chimistes dirigées par le Dr Tribet de l'ENS de Cachan et le Pr Winnick de l'université de Montréal. Ces molécules présentent des propriétés de chaperons dispersant pour certains formats d'anticorps (scFv). L'utilisation de ces polymères pour la renaturation et la stabilité des anticorps ou de leurs fragments fait l'objet d'une collaboration soutenue par une ANR.

4.1.3 L'étude de la conformation des diabodies

Des études préliminaires de caractérisation du SHA31Dd VL-VH ont été menées au moyen de différentes techniques : SDS-PAGE (figure 50), Western-Blot sans et avec compétition (figure 51).

Afin de déterminer la conformation du diabody renaturé, différentes études ont été réalisées : analyse de la structure linéaire (condition a : dénaturée et réduite), analyse d'une structure intermédiaire (condition b : dénaturée mais non réduite) et analyse de la structure native (condition c : sans dénaturation ni réduction). Il est important de noter que l'électrophorèse en SDS-PAGE la plus rigoureuse est celle des échantillons totalement dénaturés, mais elle empêche

l'analyse de l'état dimérique. L'étude de l'échantillon dans la condition c, ne reste qu'une indication de la forme native des protéines, puisque la présence de SDS, indispensable pour la migration orientée, peut altérer leur structure tridimensionnelle.

Ces différentes analyses par SDS-PAGE ont apporté deux informations principales (figure 50). Tout d'abord, lors d'un traitement non dénaturant et non réducteur de l'échantillon soit au plus près des conditions natives (figure 50, ligne c), on distingue, une bande aux alentours de 60 kDa. Cela suggère donc la présence de diabodies dimériques. D'autre part, pour les conditions b et c, on observe une coloration importante dans la zone de dépôt de l'échantillon. Cela sous-entend qu'en absence de pouvoir réducteur il existe de nombreuses protéines de masse moléculaire trop importante empêchant la migration dans le gel de concentration, il doit s'agir d'agrégats.

Dans le but de caractériser avec précision les bandes observées sur gel SDS-PAGE on a effectué un western-Blot. On cible le diabody *via* un anticorps primaire de souris anti-tag HA lui-même reconnu par un anticorps de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase comme décrit dans la partie Matériels et méthodes. On visualise alors, et ce quelle que soit la structure étudiée, principalement 4 bandes d'intensités différentes : une bande proche des 60 kDa, une bande aux alentours de 29 kDa, une bande à 25 kDa et une bande proche de 23 kDa (figure 51). Il faut noter que ces mêmes bandes sont révélées par l'anticorps anti-tag His ce qui prouve l'intégrité de la protéine (résultat non montré).

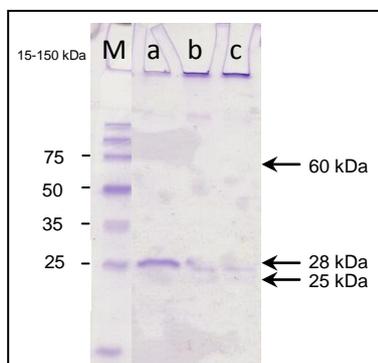


Figure 50 : Gel SDS-PAGE après différents traitements du DdSHA31.

M : marqueur
a : dénaturé et réduit
b : dénaturé et non réduit
c : non dénaturé et non réduit

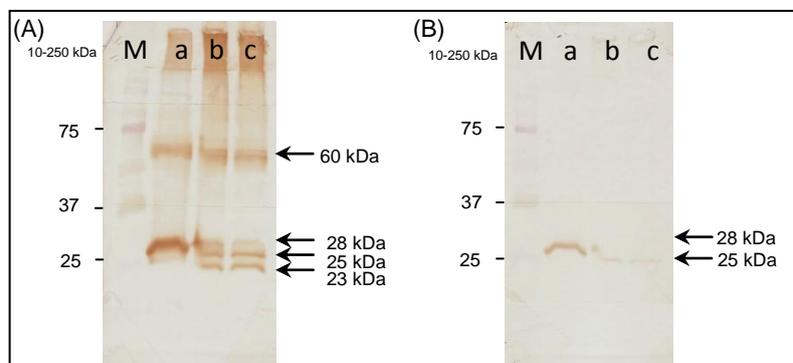


Figure 51 : Western Blot, localisation du DdSHA31 avec l'anticorps primaire anti-tag HA en absence (A) ou en présence (B) de compétiteur.

M : marqueur
Traitements du Dd : a : dénaturé et réduit
b : dénaturé et non réduit
c : non dénaturé et non réduit

La spécificité de ces bandes est vérifiée par une compétition avec l'ajout de 100 μ L de diabodies à 15 μ M durant l'incubation de l'anticorps primaire. On constate que chacune des bandes s'éteint ou est atténuée ce qui permet donc d'affirmer qu'il s'agit de fragments SHA31 de conformations variables :

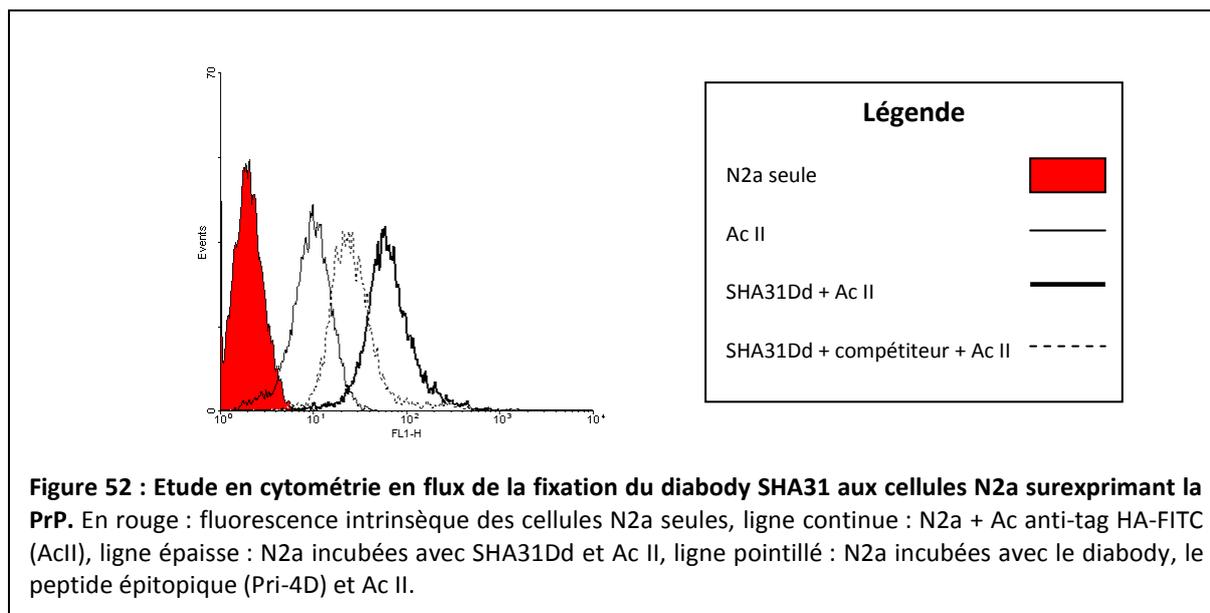
- La bande à environ 29 kDa représente vraisemblablement le fragment monomérique (SHA31Fm) et linéaire dont le poids moléculaire théorique est de 28 104 Da.
- La bande à 25 kDa pour les structures natives et intermédiaires correspondrait au SHA31Fm non réduit présentant un pont disulfure intra-chaîne.
- La bande à 23 kDa pour les structures natives et intermédiaires correspondrait au SHA31Fm non réduit présentant deux ponts disulfures intra caténaux.
- La bande à environ 60 kDa représenterait le diabody dimérique (SHA31Dd).

Ainsi ces analyses permettent de visualiser pour la première fois la présence d'un dimère à la taille attendue de 60 kDa de notre protéine d'intérêt (mis en évidence par le double tag).

4.1.4 L'étude de la reconnaissance de la protéine PrP par SHA31Dd

Après avoir optimisé la renaturation des diabodies SHA31 et vérifié leur structure dimérique, on s'est intéressé à la liaison du SHA31Dd à sa protéine cible, la PrP, dans son contexte membranaire. On réalise pour cela des analyses en cytométrie en flux avec des cellules murines de neuroblastome (N2a) connues pour surexprimer la PrP (figure 52). On étudie alors la fluorescence des cellules N2a seules (figure 52, courbe pleine rouge) ou pré-incubées avec le SHA31Dd révélé par un anticorps anti-tag HA couplé au FITC. On observe alors une augmentation significative de l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) qui passe de 9,38, pour les cellules seules marquées non spécifiquement par l'anticorps secondaire anti-tag HA (figure 52, ligne continue fine noire), à 65,34 pour les cellules pré-incubées avec le SHA31Dd (figure 52, ligne continue épaisse noire). Ce résultat démontre que les diabodies SHA31 se fixent à la surface des cellules N2a.

Afin de vérifier la spécificité de liaison entre le SHA31Dd et la PrP membranaire, on réalise une expérience de compétition. Les cellules N2a sont pré-incubées avec des diabodies en présence d'un compétiteur : l'épitope de la PrP (peptide Pri-4D) contre lequel est dirigé le diabody (Figure 52, ligne en pointillé). On constate alors une diminution de la MFI à 27,40. La fixation des diabodies à la surface des cellules N2a est donc en partie spécifique.



Cette étude met en évidence l'existence de diabodies SHA31 fonctionnels capables de se fixer spécifiquement à la PrP à la surface des cellules N2a.

4.1.5 La conclusion et discussions sur la production d'un diabody

Notre première expérience d'expression et renaturation d'un diabody se révèle concluante. L'optimisation des protocoles d'expression et de renaturation du diabody SHA31 a permis d'améliorer considérablement le rendement de production. Ainsi, une semaine suffit pour obtenir environ 6 mg de diabodies SHA31 fonctionnels à partir d'un litre de culture bactérienne.

Pour ce modèle SHA31, l'orientation des domaines variables affecte l'efficacité de la renaturation. La construction VL-VH semble favoriser la dimérisation, formant ainsi d'avantage de SHA31Dd fonctionnels. Or, des études approfondies sur l'orientation des domaines variables n'indiquent pas, *a priori*, d'influence de l'orientation des constructions lorsque le lien entre VL et VH est au minimum de 5 acides aminés, ce qui n'est plus vrai pour l'expression d'oligomères (tribodies et tetrabodies) (Kortt et al., 2001). Cependant, dans le cas du diabody SHA31, la séquence nucléotidique de la région VL appartient au sous-groupe V9 défini par la classification IMGT. Dans ce sous-groupe peu représenté, la séquence du VL peut avoir une importance structurale qui serait moins affectée par une liaison à la région VH du côté 3' plutôt que par l'extrémité 5'.

Par ailleurs, on a pu constater l'importance du pH sur la renaturation des fragments d'anticorps. Le repliement du diabody SHA31 est amélioré à pH basique en comparaison au pH physiologique. Les phénomènes d'agrégation observés dans la condition pH 8 peuvent s'expliquer

par le pHi du diabody (8.25), proche du pH du tampon. L'influence du pH sur la renaturation d'un anticorps peut donc dépendre de son pHi.

D'autre part, le rôle dispersant de l'arginine est optimisé en prolongeant son temps de contact avec la protéine. Tandis que le protocole initial indiquait une première dialyse en présence d'arginine durant une nuit, la renaturation est améliorée lorsqu'on maintient l'échantillon en dialyse tout un weekend. L'effet dispersant de l'arginine est ainsi plus efficace ce qui limite l'agrégation des protéines et par conséquent facilite leur repliement correct. On peut penser que cette étape est le moment où les protéines commencent à se replier et qu'il leur faut du temps pour atteindre leur état le plus stable.

Néanmoins, des études préliminaires ont mis en évidence la présence de diabodies agrégés en quantité importante. Des analyses approfondies de caractérisation des diabodies renaturés, au moyen de chromatographies d'exclusion de taille, doivent être menées afin de définir plus précisément la composition de l'échantillon après renaturation (Kugler et al., 2009).

Finalement, la méthode de production des diabodies, utilisée au laboratoire, constitue une alternative intéressante au protocole classiquement utilisé pour les anticorps (voie eucaryote), qui permet, en plus du rendement important, un gain de temps et une diminution du coût.

L'ensemble des savoir-faire, en termes d'expression et de renaturation, ainsi acquis sur le diabody SHA31, ont été appliqués à un nouveau modèle d'intérêt majeur pour le diagnostic *in vivo* de certaines tumeurs, en particulier de la sphère génitale.

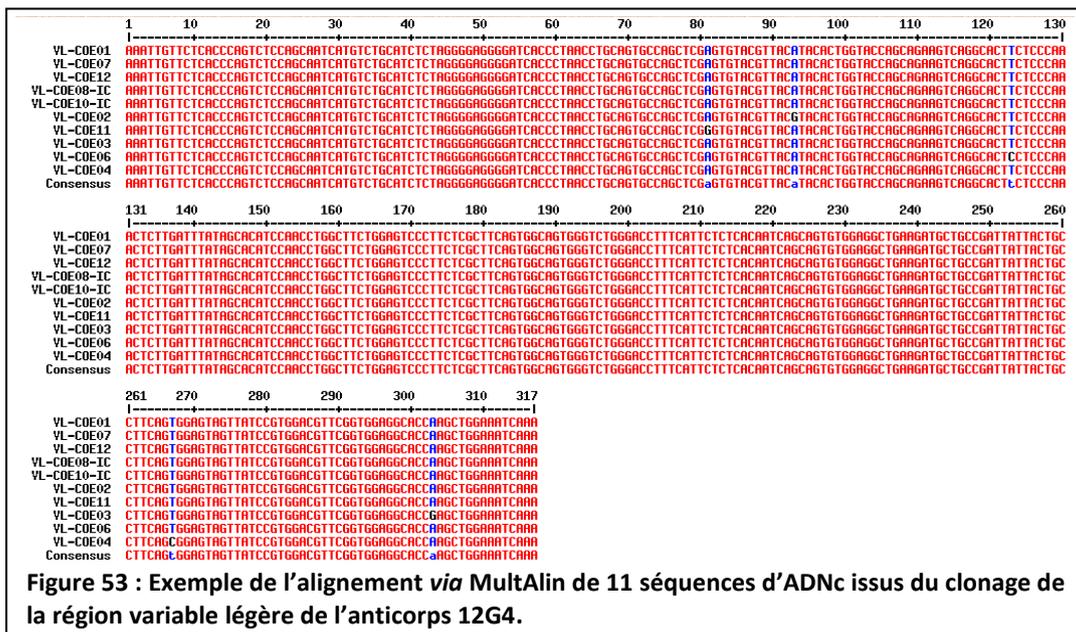
4.2 Le développement d'un modèle relevant en cancérologie : le diabody 12G4

4.2.1 Les constructions moléculaires

4.2.1.1 Clonage

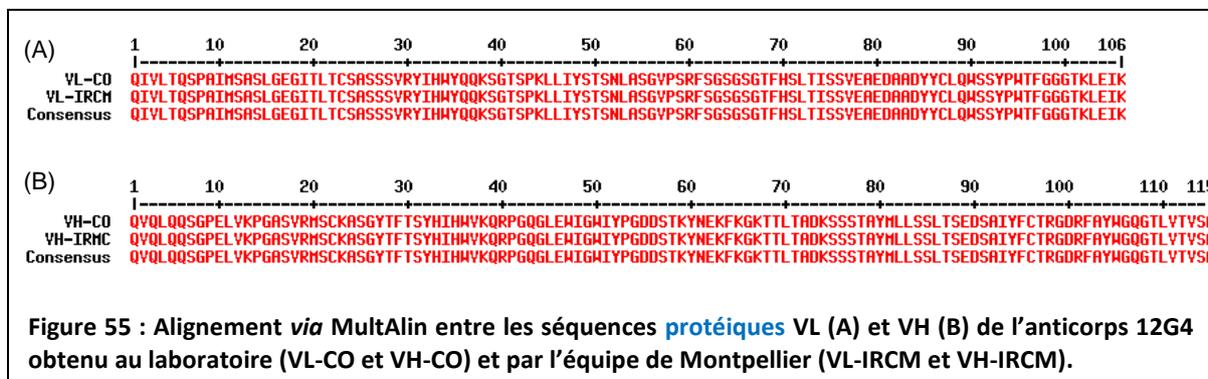
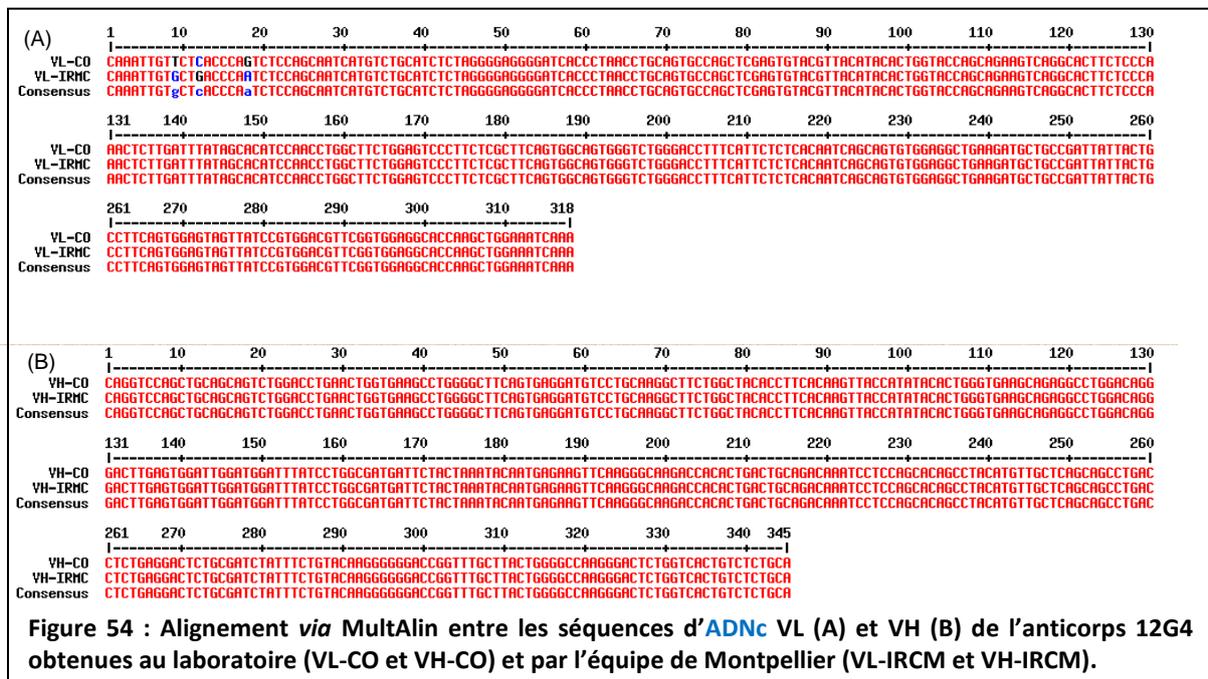
Pour chaque région variable, plus d'une dizaine de préparations de vecteurs de séquençage (TOPO® vector) contenant un insert ont été analysés.

Les séquences brutes ont alors été traitées avec un le logiciel Ig BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) afin de vérifier que les séquences clonées codent une immunoglobuline, ce logiciel précise également le sens du cadre de lecture. Les séquences, dont la lecture est déterminée de 3' à 5', sont inversées et complémentées (notée IC) avec Molecular ToolKit (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/>). Ensuite le logiciel IMGT/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) permet d'isoler spécifiquement la séquence codant le domaine variable et d'éliminer les régions la bordant (à l'extrémité 5' la séquence brute inclut l'oligonucléotide de la Race-PCR puis la région Shine-Dalgarno non codante, suivi de la séquence codant le peptide linker, et du coté de l'extrémité 3' on retrouve le début de la région constante). Les multiples séquences ainsi obtenues sont alignées grâce au programme MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) afin de lever certaines ambiguïtés de séquence et de définir ainsi la région consensus. Dans ce logiciel, les similarités sont présentées selon un code couleur : en rouge la valeur du consensus élevé (>90%), en bleu la valeur du consensus faible (comprise entre 50% et 90%) (figure 53).



Les séquences nucléotidiques consensus déterminées pour les gènes VL et VH du 12G4 sont ensuite comparées aux séquences obtenues par l'équipe de l'IRCM (figure 54). On observe ainsi une totale homologie entre notre séquence du gène VH et VH-IRCM. En revanche, la séquence codant VL ne présente que 94% de similitude avec celle de l'IRCM. Les différences sont concentrées dans la région 5' du gène VL (position 9, 12 et 18), ce qui peut s'expliquer par des techniques de clonage différentes. L'utilisation d'amorces universelles peut être responsable de certaines mutations, or la Race-PCR, avec l'ajout d'un oligonucléotide, évite ces altérations de séquence.

Néanmoins, après l'alignement des séquences protéiques, les domaines VL et VH obtenus sont identiques à ceux de l'équipe de l'IRCM (figure 55). Les différences observées entre les séquences nucléotidiques VL-CO et VL-IRCM sont donc silencieuses.



4.2.1.2 Assemblage

Les régions variables 12G4 clonées, il reste à les assembler pour former un fragment d'anticorps. Deux orientations sont possibles VL-VH ou VH-VL. Au vu de la littérature, l'orientation ne semble pas impacter sur la fonctionnalité des formats monovalent ou bivalent (Kortt et al., 2001). Cependant, suite aux résultats précédents, obtenus avec le SHA31, nous avons donc choisi l'orientation VL-VH.

Chacune des régions variables vérifiées au séquençage a donc été amplifiée au moyen d'un couple d'amorces appelées A_{VL1} , A_{VL2} pour le domaine VL et A_{VH1} , A_{VH2} pour le domaine VH. La nature des amorces utilisées permet de choisir le format recombinant entre un scFv ou un diabody. Les deux fragments ont été construits en utilisant pour les deux formats des amorces A_{VL1} et A_{VH2} identiques mais en variant les amorces A_{VL2} et A_{VH1} impliqués dans la composition du lien entre VL et VH. On distingue ainsi $A_{VL2-scFv}$ et $A_{VH1-scFv}$ de $A_{VL2-diab}$ et $A_{VH1-diab}$ (tableaux 6 et 7 ; figure 56 et 57).

Tableau 6 : Description des amorces utilisées pour l'assemblage VL-VH constituant le scFv 12G4.

Région variable légère (VL)		Région variable lourde (VH)	
AVL1 : TACGATTTTCTACGATTTCCAGCTTAC AATAAGCTTGGGTGGTCCGGCCCCAGCC GGCCCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCC	AVL2 -scFv : GGAGCCGCGCCGCCAGAACCACCACC ACCAGAACCACCACCACCCTGTTTGAT TTCCAGCTTGGTGC	AVH1-scFv : GCGGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGTGA TCCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGG	AVH2 : TATTGTAAGCTATTGTAAGCTGGAAAT CGTATTCTGCGGCCGGCCCCGAGG CCGCAGAGACAGTGACCAGAGTCC Le C permet de conserver une serine tout en créant un site <i>Sfi</i> I
Séquence VL-scFv (424 paires de bases (pb)) après amplification <i>via</i> AVL1 et AVL2		Séquence VH-scFv (430 pb) après amplification <i>via</i> AVH1 et AVH2	

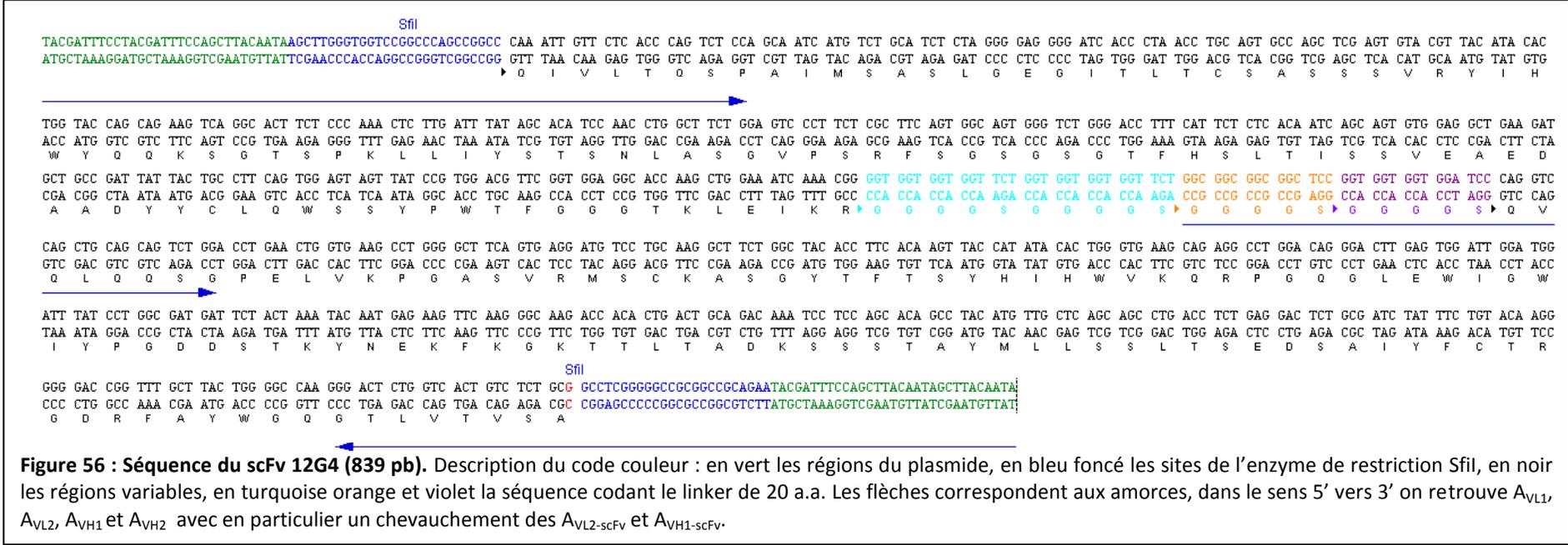


Figure 56 : Séquence du scFv 12G4 (839 pb). Description du code couleur : en vert les régions du plasmide, en bleu foncé les sites de l'enzyme de restriction SfiI, en noir les régions variables, en turquoise orange et violet la séquence codant le linker de 20 a.a. Les flèches correspondent aux amorces, dans le sens 5' vers 3' on retrouve AVL1, AVL2, AVH1 et AVH2 avec en particulier un chevauchement des AVL2-scFv et AVH1-scFv.

Tableau 7 : Description des amorces utilisées pour l'assemblage VL-VH constituant le diabody 12G4.

Région variable légère (VL)		Région variable lourde (VH)	
AVL1 : TACGATTTCTACGATTTCCAGCTTAC AATAAGCTTGGGTGGTCCGGCCAGCC GGCCCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCC	AVL2-diab : GGATCCACCACCACCCCGTTTGATTTCC CAGCTTGGTGC	AVH1-diab : GGTGGTGGTGGATCCAGGTCCAGCTG CAGCAGTCTGG	AVH2 : TATTGTAAGCTATTGTAAGCTGGAAA TCGTATTCTGCGGCCGCGCCCGCGA GGCCGCAGAGACAGTGACCAGAGTCC
Séquence VL-diab (394 pb) après amplification via AVL1 et AVL2 SfiI TACGATTTCTACGATTTCCAGCTTACAATAAGCTTGGGTGGTCCGGCCAGCCAGCC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CTA GGG GAG GGG ATC ACC CTA ACC TGC AGT GCC AGC TCG AGT GTA CGT TAC ATA CAC TGG ATGCTAAAGGATGCTAAAGGTCGAATGTTATTCGAACCCACCAGCCGGGTCCGGCCGG CTT TAA CAA CAG TGG GTC AGA GGT CGT TAG TAC AGA CGT AGA GAT CCC CTC CCC TAG TGG GAT TGG ACG TCA CGG TCG AGC TCA CAT GCA ATG TAT GTG ACC P Q I V L T Q S P A I M S A S L G E G I T L T C S A S S S V R Y I H W		Séquence VH-diab (384 pb) après amplification via AVH1 et AVH2 SfiI GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTC CAG CAG TCC GGA CCT GAA CTG GTC AAG CTT GGG GCT TCA GTC AGG ATG TCC TGG AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACA AGT TAC CAT ATA CAC TGG GTC AAG CAG AGG CTT GGA CAG GGA CCA CCA CCA CCT AGG GTC CAG GTC GAC GTC ACA CTT GGA CTT GAC CAC TTC GGA CCC CGA APT CAC TCC TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TGG AAG TGT TCA ATG GTA TAT GTG ACC CAC TTC TTC GGA CTT GTC CCT G G G G S P Q V Q L Q D S G P E L V K P G A S V R M S C K A S G Y T F T S Y H I H M V K O R P G O G	

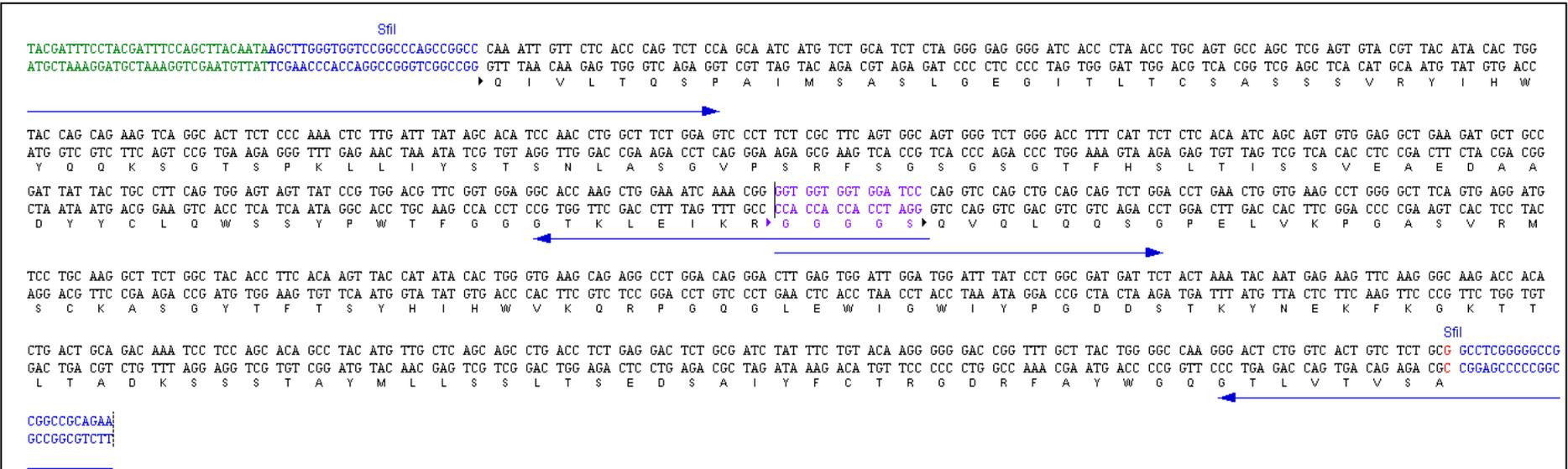
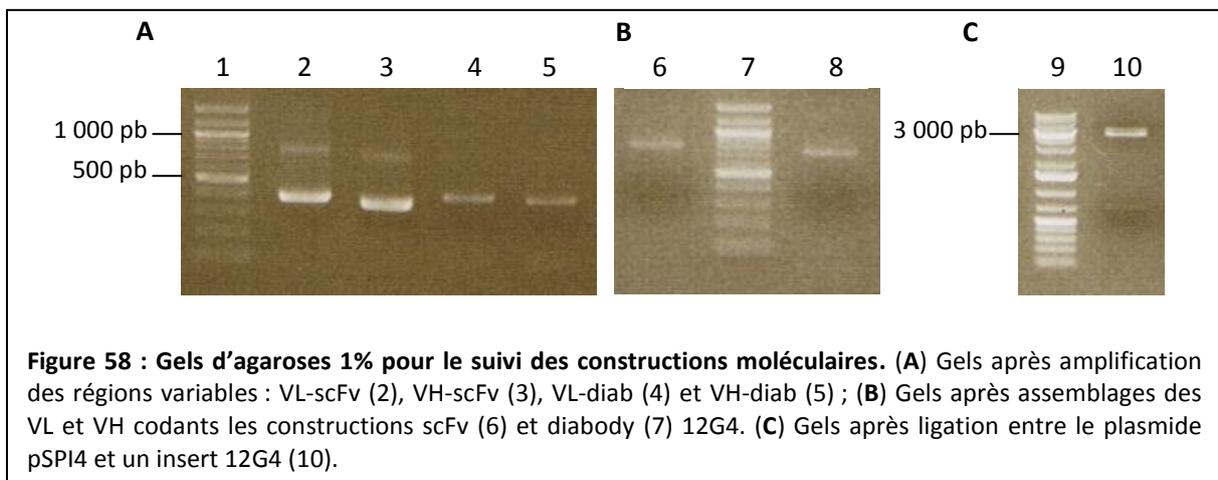


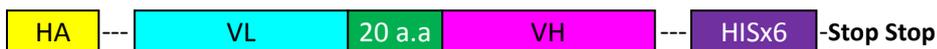
Figure 57 : Séquence du diabody 12G4 (763 pb). Description du code couleur : en vert les régions du plasmide, en bleu foncé les sites de l'enzyme de restriction SfiI, en noir les régions variables, en violet la séquence codant le linker de 5 a.a. Les flèches correspondent aux amorces, dans le sens 5' vers 3' on retrouve AVL1, AVL2, AVH1 et AVH2 avec en particulier un chevauchement des AVL2-diab et AVH1-diab.

Ensuite VL-scFv et VH-scFv sont associés, de même entre VL-diab et VH-diab, par hybridation dans la zone de chevauchement entre la région 3' du VL et 5' du VH. Après l'élongation, les fragments VL-VH obtenus sont amplifiés *via* les amorces des extrémités A_{VL1} et A_{VH2} (représentation schématique dans Matériels et méthodes, figure 32). Les constructions sont vérifiées par contrôle de la taille sur gel d'agarose 1% (figure 58). Ainsi les fragments codant le scFv sont observés entre 700 et 800 pb et ceux codant le diabody entre 600 et 700 pb. Ces fragments, sont alors sous clonés *via* les sites de restriction SfiI dans les différents vecteurs d'expression pSPI4 et pSPI4-biot. Ces plasmides permettent tous deux l'addition d'un tag HA en N-terminal et un tag His en C-terminal de la protéine exprimée.



Pour finir, les quatre formats 12G4 ainsi construits ont été vérifiés par séquençage, ils coderont les quatre fragments d'anticorps suivant :

scFv 12G4 :



scFv 12G4-biot :



Diab 12G4 :



Diab 12G4-biot :



Dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous concentrerons sur les fragments diabodies qui présentent un intérêt majeur pour des applications dans le diagnostic et le suivi *in vivo* des tumeurs exprimant le récepteur AMHR11.

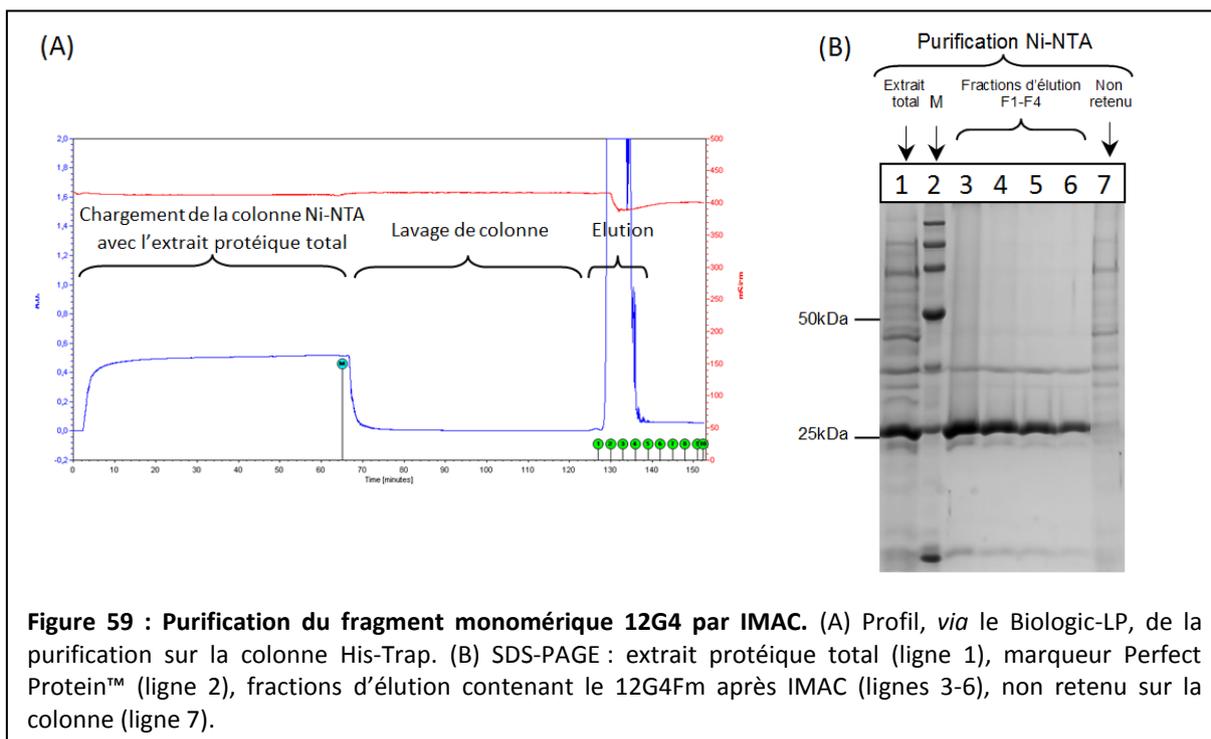
4.2.2 La production du diabody 12G4

Dans cette partie, on s'intéressera plus particulièrement au format diabody classique : **Diab 12G4**.

4.2.2.1 Expression et Purification du diabody 12G4

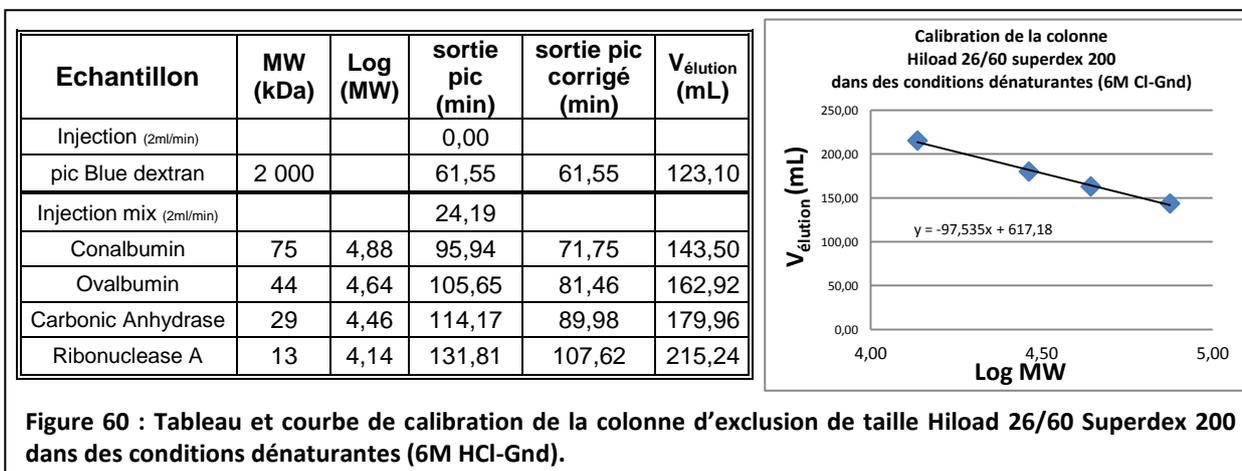
Des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) ont été transformées avec le vecteur pSPI4 contenant l'insert diabody 12G4. L'expression du fragment d'anticorps est induite en ajoutant 1 mM d'IPTG durant 3 h de culture à 30°C. Cette production massive entraîne l'agrégation des protéines sous forme de corps d'inclusion qui sont ensuite solubilisés *via* une solution dénaturante (Matériels et méthodes). Nous distinguons donc la forme dénaturée soit "monomérique" du diabody 12G4 (12G4Fm) de la forme "dimérique" du diabody (12G4Dd) obtenue après le processus de renaturation.

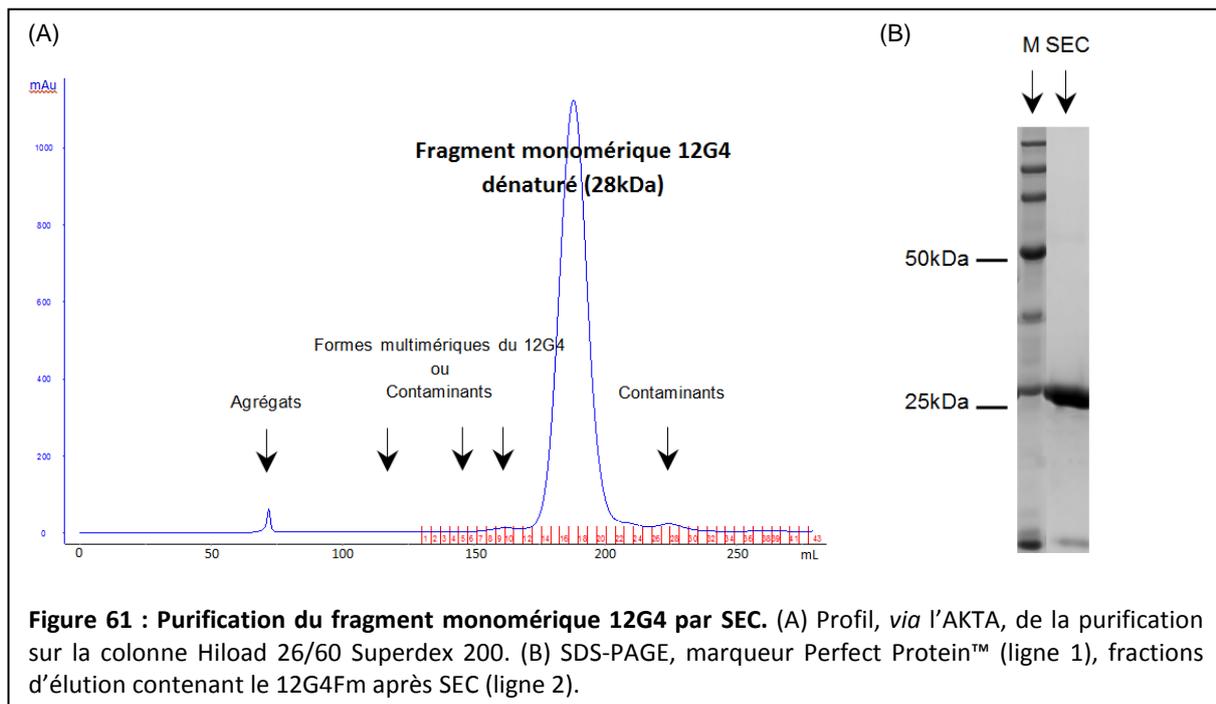
Après comparaison, la solubilisation avec le chlorure de guanidine (HCl-Gnd) est plus efficace que celle avec l'urée. Les corps d'inclusion formés de 12G4Fm sont donc repris en solution dénaturante contenant 6M HCl-Gnd, 5mM de TCEP, et 20mM d'imidazole dans du tampon Tris-HCl 0,1M. Après 1h à 37°C, la solution obtenue est très visqueuse due à la libération d'ADN génomique. Nous ajoutons donc une courte étape de sonication 30s à 14W, suivi d'une centrifugation pour culoter les corps insolubles. Dans le surnageant, notre protéine d'intérêt sous forme 12G4Fm est alors purifiée *via* son tag His sur colonne de nickel. À cette étape, nous obtenons un pic d'élution saturant à 280 nm soit supérieur à 2 de DO (figure 59A). L'analyse par SDS-PAGE a montré dans les fractions d'élution une bande majoritaire correspondant à la masse moléculaire attendue du 12G4Fm (28 054 Da) déjà fortement purifié (plus de 80 % pureté) par IMAC (figure 59B).



Des études plus approfondies, réalisées par l'équipe de physicochimistes du Dr Tribet, ont révélées, à notre grande surprise, qu'à l'issu de l'IMAC les fragments 12G4 sont présents sous différentes formes : monomères, oligomères et même petits agrégats. Nous avons donc décidé de rajouter une seconde étape de purification par la taille au moyen d'une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) préparative (colonne Hiload 26/60 Superdex 200) afin d'isoler exclusivement les fragments dénaturés monomériques 12G4.

Après l'IMAC, les fractions d'élution qui contiennent le 12G4Fm sont purifiées sur la colonne d'exclusion de taille préparative. Par comparaison aux protéines de calibration (Figure 60), le pic majoritaire correspond au fragment 12G4 monomérique (29 kDa) (figure 61A). Ces résultats sont confirmés par analyse en SDS-PAGE de la fraction isolée (figure 61B). Finalement, par dosage BCA, on détermine près de 80 mg de 12G4Fm produits par litre de culture bactérienne.





Ces premières étapes d'expression et de purifications mettent en évidence une production importante et rapide de 12G4Fm purifié. Nous nous intéressons à présent à l'optimisation de la renaturation pour replier les 12G4Fm en diabodies dimériques et fonctionnels (12G4Dd).

4.2.2.2 Renaturation et Optimisation du protocole

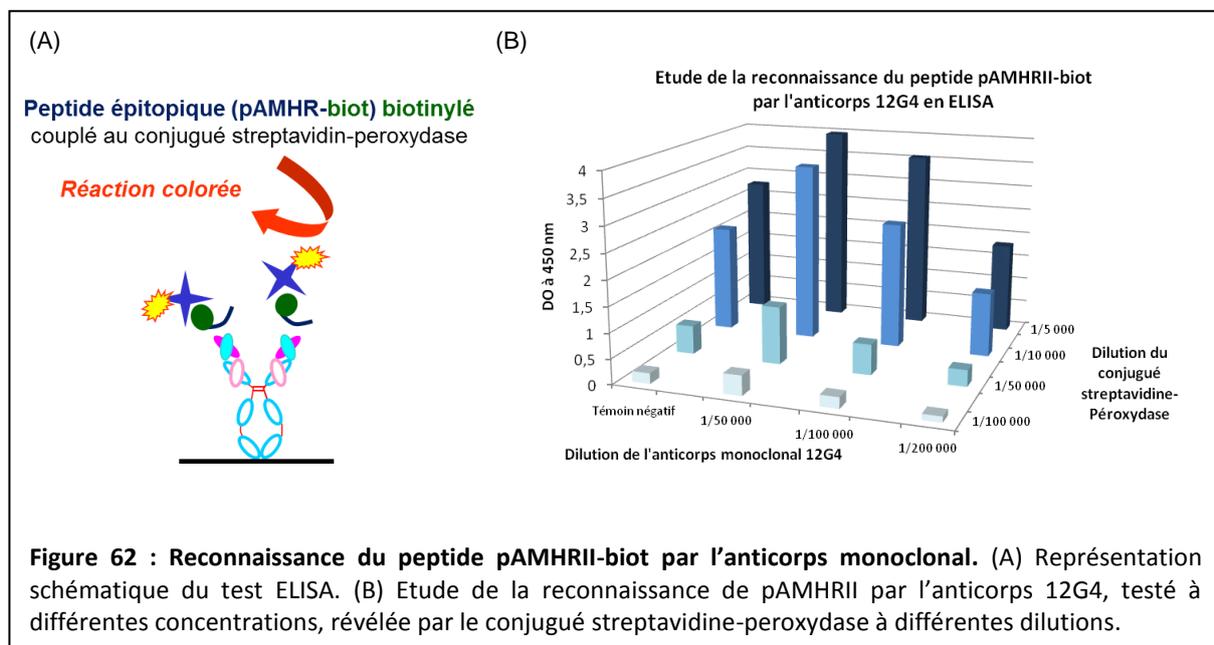
Le laboratoire dispose d'une expertise en immunoanalyse pour étudier la quantité totale et fonctionnelle d'anticorps recombinants (Boquet et al., 2000) (Padiolleau-Lefevre et al., 2007). Sur le même principe, nous avons mis au point un nouveau test d'immunoanalyse pour quantifier rapidement les 12G4Dd fonctionnels et ainsi, évaluer l'efficacité des protocoles de renaturation développés.

4.2.2.2.1 Etude rapide de la fonctionnalité : Test « ELISA 12G4Dd »

Nous avons développé un nouveau test ELISA qui démontre la fonctionnalité des diabodies 12G4 après renaturation : ELISA 12G4Dd. La mise au point d'une telle analyse nécessite la reconnaissance, de la part de l'anticorps étudié, d'un peptide linéaire. Dans le modèle 12G4, l'anticorps est dirigé contre un récepteur membranaire, mais un épitope linéaire a été identifié : DRAQVEM (Salhi et al., 2004). Nous avons donc commandé un peptide de synthèse dont la séquence correspond à celle du peptide 48 reconnu par l'anticorps 12G4 lors du TEP-scan dans l'étude du Dr Salhi. Notre peptide épitopique nommé pAMHRII-biot, se compose d'une biotine en N-terminal suivi

de l'épitope minimal du 12G4 (DRAQVEM) élargit de 5 a.a en N-terminal et 3 a.a en C-terminal: biot-WNLTQDRAQVEMQGS.

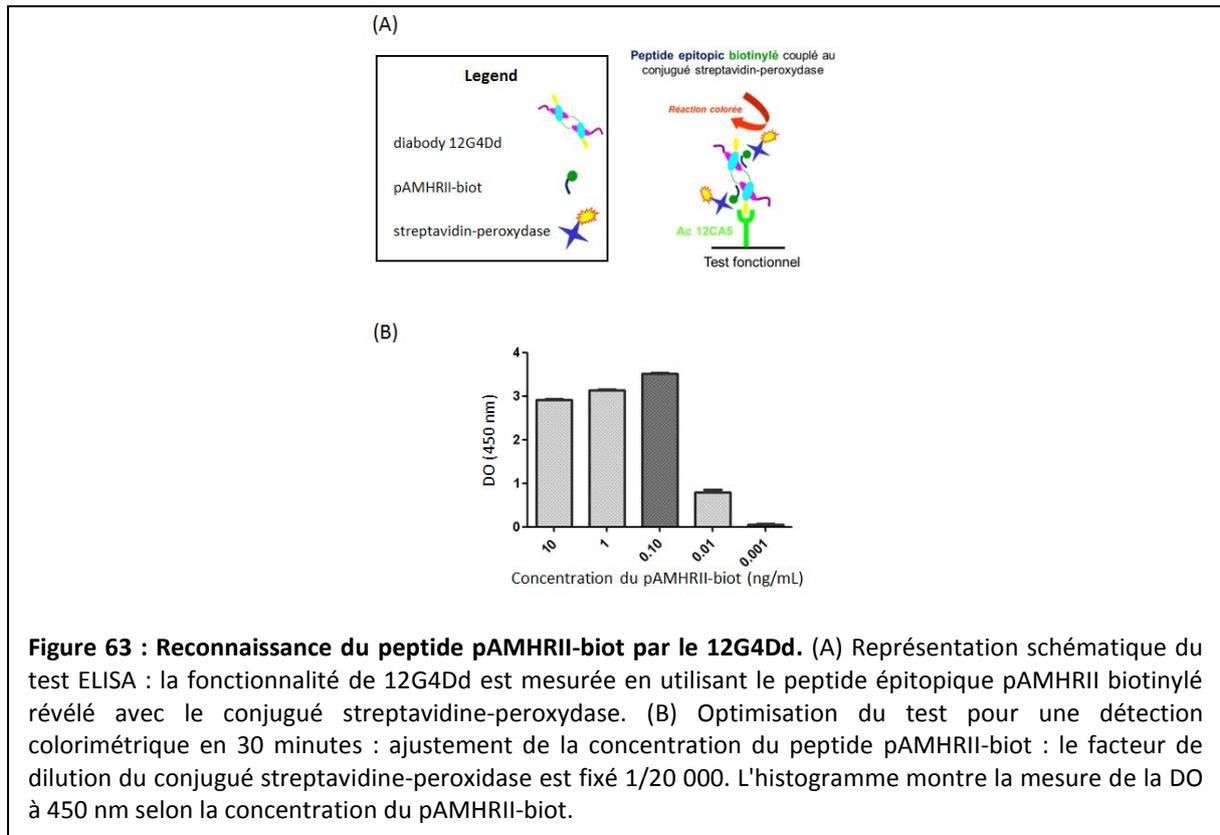
Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que dans le contexte d'un test ELISA l'anticorps monoclonal 12G4 était capable de lier pAMHRII-biot (figure 62A). Pour cela une gamme d'anticorps monoclonaux 12G4 a été immobilisée sur plaque 96 puits durant une nuit à 4°C. Le peptide pAMHRII-biot a ensuite été incubé toute une nuit à une concentration fixe de 10 ng/mL. Enfin la fixation du peptide est révélée après lavage par l'ajout d'un conjugué streptavidine-peroxydase suivi du substrat enzymatique, le TMB dont l'absorbance est mesurée à 450 nm. Cette étude démontre que l'anticorps 12G4 est capable de lier spécifiquement le peptide pAMHRII-biot et que le couple antigène-anticorps peut être révélé avec le conjugué streptavidine-peroxydase et son substrat (figure 62B).



La faisabilité démontrée avec l'anticorps monoclonal, nous avons, dans un deuxième temps, adapté le test pour l'analyse des anticorps recombinants. Pour cela, les fragments ne sont pas immobilisés directement dans les puits mais captés *via* leur tag HA par l'anticorps 12CA5, préalablement absorbé (figure 63A). Nous avons alors optimisé la quantité de peptide pAMHRII-biot à utiliser pour permettre la détection colorimétrique à 450 nm en 30 min. Sur les conseils du fournisseur, le conjugué streptavidine-peroxydase est dilué au 20 000^{ème}, le plus haut signal est ainsi obtenu avec un le peptide à 0,10 ng/mL (figure 63B).

Pour standardiser la fonctionnalité des 12G4Dd à une concentration protéique donnée, les échantillons sont analysés en SDS-PAGE et l'intensité de la bande du diabody à 29 kDa est quantifiée *via* un logiciel informatique (Image J). Les quantités relatives de 12G4Dd fonctionnels obtenues en

immunoanalyse sont donc normalisées en fonction de la quantité totale de diabodies 12G4 (Fm et Dd confondus).



4.2.2.2 Protocole de renaturation

La renaturation des diabodies (soit l'association de deux 12G4Fm formant un 12G4Dd) est inspirée d'un protocole de référence mis au point par les fragments de type scFv (Tsumoto et al., 1998, 2003). Le repliement des anticorps recombinants repose sur des dialyses successives avec une diminution progressive en agent chaotrope, dans ce cas, le chlorure de guanidine (HCl-Gnd), en présence d'un agent dispersant, l'arginine (Arg) et d'un pouvoir réducteur à certaines étapes de la renaturation.

Pour optimiser la dimérisation des diabodies, nous avons défini différents tampons de dialyse en s'appuyant sur le fait que les forces hydrophobes guident le processus de renaturation. Pour étudier l'influence des ponts disulfures dans le repliement correct du 12G4Dd, nous avons testés 13 conditions de renaturation, nommées de A à M (tableau 8, la lettre est indiquée à droite).

Les conditions de A à F diffèrent seulement par l'addition du couple redox à différentes dialyses. La renaturation dite E correspond au protocole de référence précédemment décrit par l'équipe des Dr Tsumoto et Asano. Dans cette condition (encadrée en noir dans le tableau 8), le tampon de dialyse ne contient pas d'agent réducteur aux étapes 4 M et 2 M HCl-Gnd, ensuite le couple redox est ajouté aux dialyses 1 M et 0,5 M HCl-Gnd mais est absent du tampon final.

D'autre part, il existe les conditions de G à M qui diffèrent de celles de A à F par la présence de 5 mM DTT dans le tampon de dialyse d'avantage maintenu de G à M.

Enfin, dans les conditions B, D, F, H, J et L, le tampon final contient toujours les réactifs redox, c'est-à-dire le couple de glutathions sous forme oxydé (0,75 mM) et réduit (7,5 mM) (nommé redox). A l'inverse, les conditions A, C, E, G, I et K ne comportent aucun agent réducteur dans le tampon final. Seul la renaturation M, présente un pouvoir réducteur, 5 mM de DTT, dans la dialyse finale mais également tout le long de la renaturation.

Tableau 8 : Résumé des différentes conditions de renaturation.

Composition du tampon	4 M HCl-Gnd + 0,4M Arginine + 0,1 M TrisHCl	2 M HCl-Gnd + 0,4M Arginine + 0,1 M TrisHCl	1 M HCl-Gnd + 0,4M Arginine + 0,1 M TrisHCl	0,5 M HCl-Gnd + 0,4M Arginine + 0,1 M TrisHCl	0 M HCl-Gnd + 0,4M Arginine + 0,1 M TrisHCl	Nom de la condition	
Durée des dialyses	o/we	o/d	o/n	o/d	o/n		
12G4Fm (10 µM) Tampon : HCl-Gnd 6M + TCEP 5 mM + TrisHCl 0,1 M	-DTT	-DTT	-DTT	-DTT	0	A	
				-DTT	redox	B	
				redox	0	C	
				redox	redox	D	
	+DTT (5mM)	+DTT (5mM)	+ DTT(5mM)	Redox	redox	0	E
				redox	0	F	
				redox	0	G	
				redox	redox	H	
				redox	0	I	
				redox	redox	J	
				redox	0	K	
			+ DTT(5mM)	0	L		
			+ DTT(5mM)	redox	M		

Les effets des différentes conditions de renaturation sur la fonctionnalité de 12G4Dd ont été mesurés *via* le test « ELISA 12G4Dd » décrit précédemment. Les quantités relatives de diabodies fonctionnels sont rapportées en pourcentage par rapport à la condition E de référence fixée à 100% (figure 64).

Détermination de la fonctionnalité des diabodies 12G4 par test "ELISA 12G4Dd"

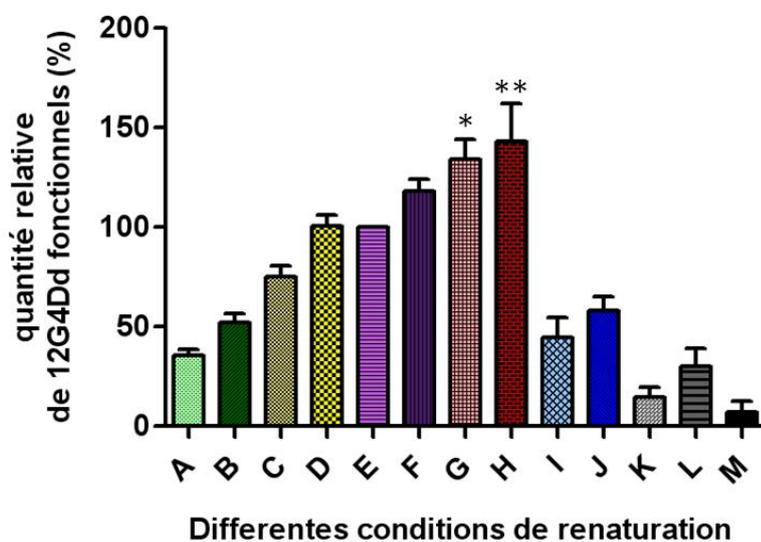


Figure 64 : Analyse de la fonctionnalité par test "ELISA 12G4Dd" des diabodies 12G4 renaturés dans différentes conditions. Les quantités relatives de diabodies 12G4 fonctionnels sont représentées en pourcentage, avec le 100 % attribué à la référence des Dr Tsumoto et Asano (condition E) (test ANOVA, $p < 0,05$: Amélioration significative du repliement par rapport à la condition de référence E).

La première observation est la présence de DTT au début des dialyses qui favorise considérablement la fonctionnalité de 12G4Dd. Les meilleures conditions, G et H, permettent de produire respectivement 130 et 140% de 12G4Dd. Elles sont semblables dans leur composition de tampon jusqu'à l'avant dernière dialyse, avec en particulier la présence d'un pouvoir réducteur à chaque étape : 5 mM DTT aux dialyses 4 M et 2 M HCL-Gnd, et le couple redox aux dialyses 1 M et 0,5 M HCL-Gnd. Les conditions G et H se distinguent par la composition du dernier tampon de dialyse où H contient du redox tandis que G ne possède aucun agent de réduction.

Nous pouvons également noter une amélioration constante de la fonctionnalité du 12G4Dd de la condition A à F, en commençant à 35 % et finissant à près de 120%. On constate que la condition de référence E (100%) peut-être facilement améliorée en maintenant le couple redox dans le tampon final ce qui correspond à la condition F avec 20% de 12G4Dd fonctionnels supplémentaires. De manière générale, la conservation du pouvoir redox dans le tampon final améliore la quantité de diabodies fonctionnels : B vs A, D vs C, F vs E, H vs G, J vs I et L vs K.

En revanche, les quantités de diabodies fonctionnels obtenues dans les protocoles de I à M sont bien inférieures à la condition de référence : environ 50 % dans des conditions I et J, 30 % dans la condition L et seulement 10 % avec les protocoles de renaturation K et M.

Finalement, nous avons choisi la condition H pour renaturer au mieux le diabody 12G4.

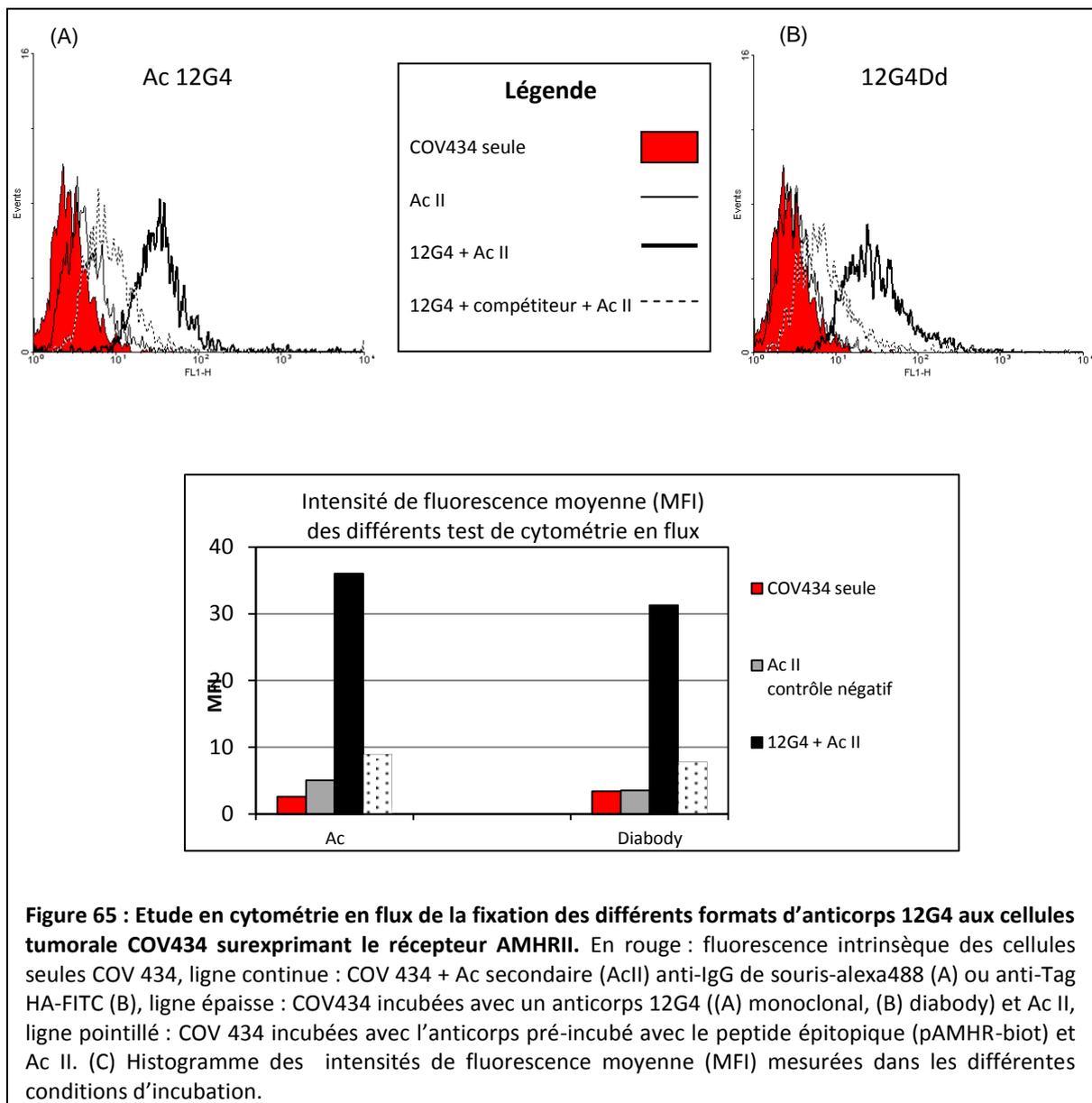
4.2.2.3 Caractérisation du diabody 12G4 renaturé

4.2.2.3.1 Etude de la fonctionnalité *ex-vivo* : Analyse en cytométrie en flux

Le test « ELISA 12G4Dd » a permis de définir rapidement quelle condition de renaturation est la plus efficace. Une deuxième approche fonctionnelle, dite *ex-vivo*, est la cytométrie en flux pour étudier la fixation de 12G4Dd à son récepteur cible AMHRII dans son contexte membranaire. Nous avons donc comparé l'anticorps monoclonal 12G4 et le diabody 12G4Dd se liant à la lignée tumorale ovarienne COV434 qui surexprime AMHRII-humain (figure 65A et 65B).

L'anticorps entier 12G4 est un contrôle positif, connu pour se fixer au COV434-AMHRII positive. Ainsi, l'incubation des cellules avec 1 μ M d'anticorps 12G4 entraîne une augmentation significative de l'intensité de fluorescence moyenne (MFI supérieur à 35) en comparaison à celle des cellules incubées uniquement avec l'anticorps secondaire, un anticorps anti-IgG de souris couplé à l'alexa 488 (MFI = 5). La spécificité de liaison a été démontrée par compétition, en pré-incubant l'anticorps 12G4 avec le peptide épitopique, pAMHRII-biot. Dans ce cas, la fixation de l'anticorps aux cellules COV434-AMHRII est inhibée, démontrée par une MFI réduite à 9.

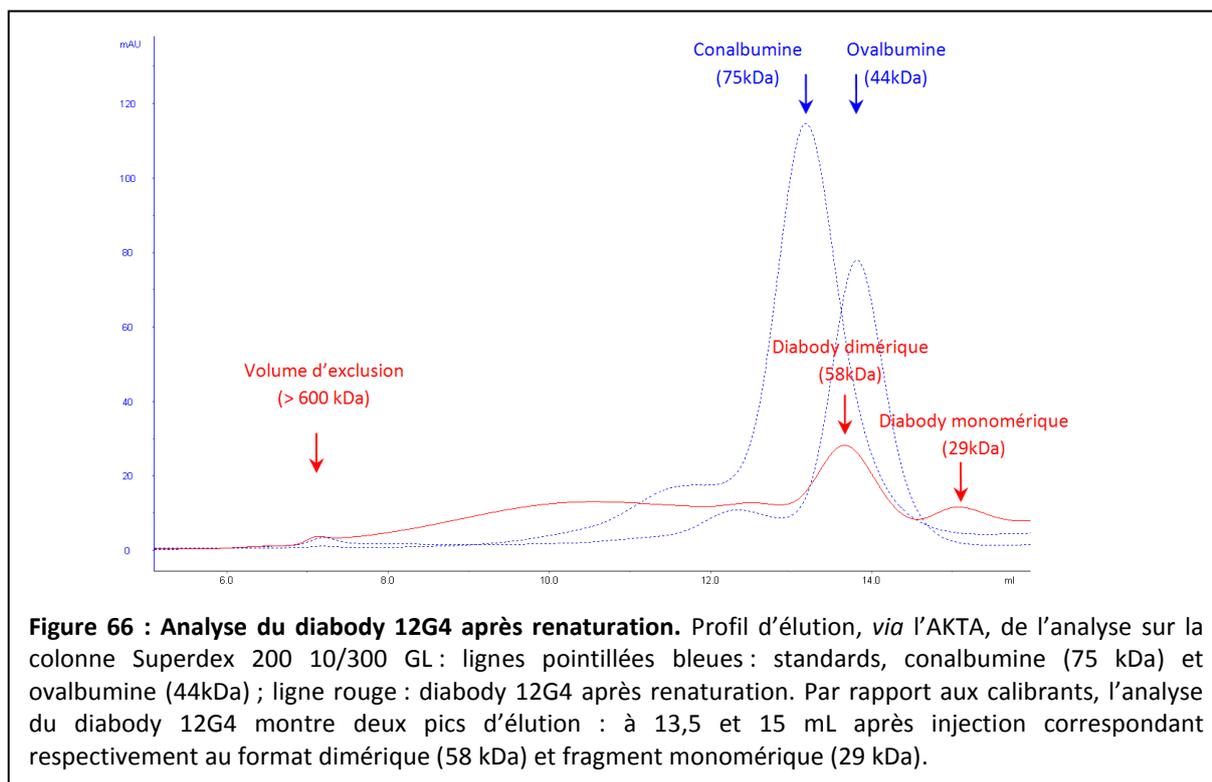
Des analyses similaires ont été réalisées avec le diabody 12G4 à 2 μ M, issu d'un protocole de renaturation H. De façon intéressante, les résultats obtenus avec le 12G4Dd sont identiques à ceux de l'anticorps entier et les valeurs de MFI très semblables (figure 65C). Ces résultats soulignent donc que la fonctionnalité du diabody recombinant est comparable à celle de l'anticorps monoclonal.



4.2.2.3.2 Etude de la conformation du diabody

Lors des travaux sur le modèle SHA31, la seule technique à notre disposition pour mettre en évidence l'existence du format dimérique était l'analyse en SDS-PAGE. Depuis nous disposons d'un système de chromatographie moyenne pression, qui permet l'analyse des protéines dans leur conformation native. Après renaturation dans les conditions optimales (H), nous avons donc approfondi l'étude de l'échantillon 12G4Dd sur colonne d'exclusion de taille analytique.

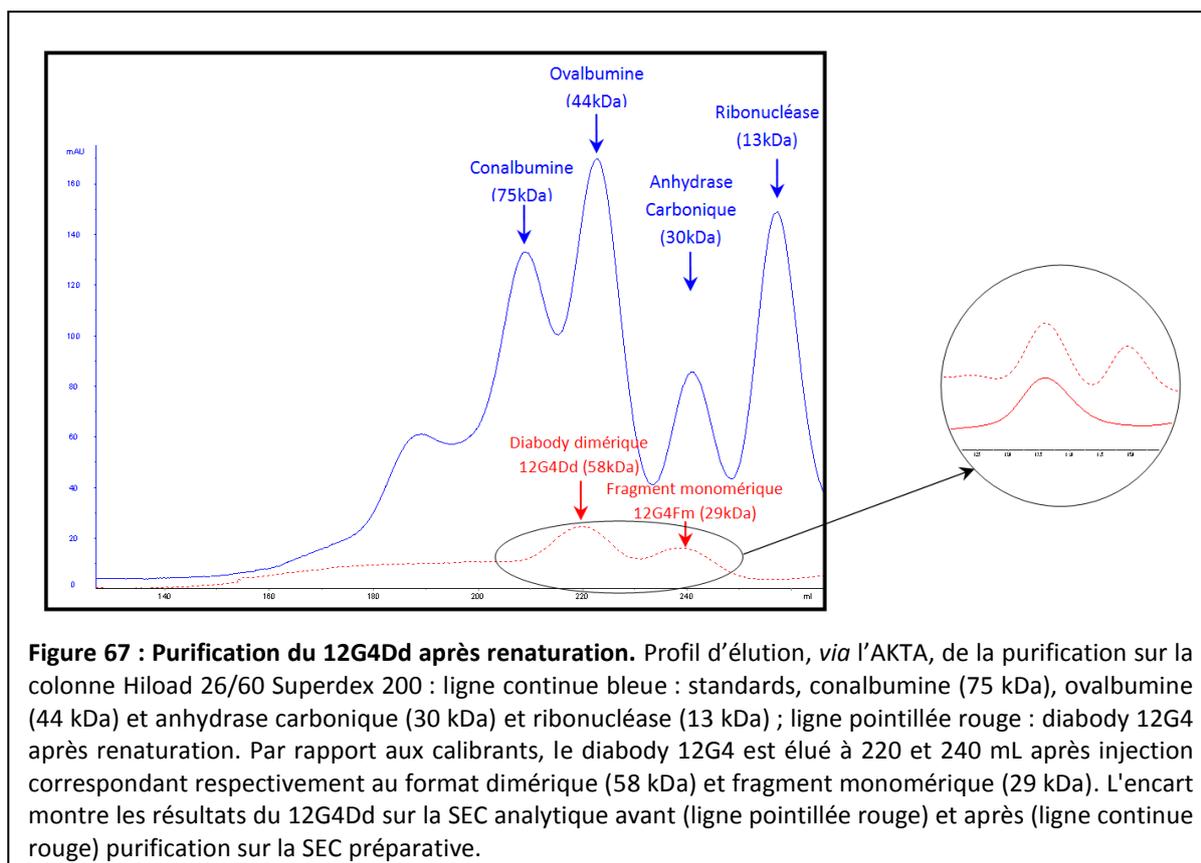
Une fraction de 100µL d'échantillon 12G4 renaturé a été chargée sur la colonne Superdex 200 10/300 GL préalablement calibrée (figure 66).



Cette analyse révèle la présence d'une fraction dimérique 12G4, mais pas seulement. En effet tout comme l'analyse en SDS-PAGE sur le diabody SHA31 renaturé, on constate la présence d'agrégats élués dans le volume d'exclusion, de formes multimériques mis en évidence avec un plateau entre le volume d'exclusion et le pic du dimère, et également la présence de fragments monomériques non renaturés. Ces résultats nous ont donc conduit à purifier l'échantillon 12G4Dd après renaturation afin d'isoler exclusivement la fraction dimérique qui nous intéresse.

4.2.2.3.3 Purification des dimères 12G4

Le protocole de renaturation du diabody 12G4 étant optimisé, nous avons produit des grandes quantités de 12G4Dd mais contenant de multiples formats. Cet échantillon a ensuite été purifié au moyen de la colonne Hiloal 26/60 superdex 200 préparative calibrée avec des standards tels que la conalbumine (MW : 75 kDa), l'ovalbumine (MW : 44 kDa), l'anhydrase carbonique (MW : 29 kDa) et la ribonucléase (MW : 13 kDa) (figure 67). Ainsi la fraction soluble 12G4Dd (MW : 58 kDa) est isolée des oligomères (MW > 56 kDa) et des fragments 12G4Fm (MW : 29 kDa). Les fractions d'éluion, contenant uniquement le format dimérique, ont été rassemblées et concentrées sur membrane MWCO 10 000 par ultrafiltration. L'échantillon 12G4Dd purifié et concentré a ensuite été analysé sur la colonne Superdex 75 (encart de la figure 67). Comme attendu, nous observons un unique pic à environ 58 kDa correspondant au 12G4Dd. Finalement, nous obtenons environ 20 mg de 12G4Dd purifié à partir d'un litre de culture bactérienne.



4.2.2.4 Conclusion et Discussion

Actuellement, l'expression des protéines recombinantes à ponts disulfure de type diabody reste un défi technologique. La production de grandes quantités de diabodies correctement repliés et fonctionnels est laborieuse et consommatrice de temps. Plusieurs études décrivent différents systèmes d'expression tels que les cellules eucaryotes, les levures, ou les systèmes procaryotes, périsplasmique ou cytoplasmique, qui présentent des rendements d'expression variable du μg au mg de diabody par litre de culture (Miller et al., 2012). Au sein du laboratoire, différentes approches procaryotes ont été évaluées pour l'expression d'un fragment scFv. Et c'est finalement la voie cytoplasmique dans *E. coli* combinée au protocole de renaturation (Tsumoto et al. 1998) qui a été retenue. Cette approche a permis la production de grandes quantités, plusieurs dizaines de milligrammes de scFv SAF34 entièrement fonctionnels. Ce fragment d'anticorps dirigé contre la protéine prion, présente des propriétés thérapeutiques identiques à celles du fragment Fab SAF34 obtenu par voie enzymatique à partir de l'anticorps monoclonal (Padiolleau-Lefevre et al., 2007).

Néanmoins, en comparaison au scFv, la renaturation du format diabody implique une difficulté supplémentaire consistant à l'assemblage correct d'un homodimère. En connaissant l'importance des interactions intramoléculaires dans les premières étapes du processus de repliement protéique (Umetsu et al., 2003), nous proposons ici une nouvelle méthode qui explore

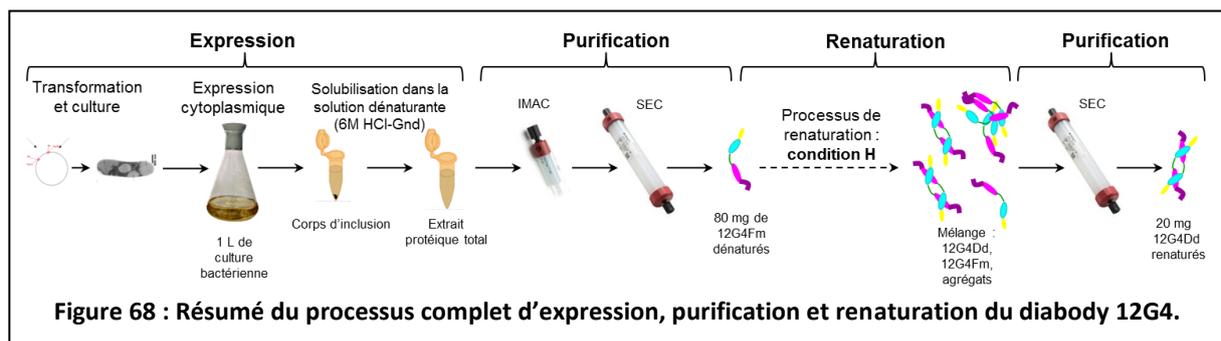
plusieurs conditions de renaturation. Notre stratégie compare différents chemins de repliement qui favorisent soit l'interaction moléculaire soit l'établissement de ponts disulfure et permet de définir la condition optimale de renaturation et de stabilisation de l'anticorps recombinant étudié.

Tout d'abord, à partir d'un litre de culture bactérienne et 3 h d'induction avec 1 mM d'IPTG, suivi des étapes de purification d'affinité et de taille, nous obtenons 80 mg de 12G4Fm. Ces premiers résultats soulignent la performance et le faible coût du système d'expression cytoplasmique.

Ensuite, l'approche comparative de renaturation, a permis de déterminer le chemin optimal de repliement des diabodies analysés. Pour le modèle 12G4, nous pouvons conclure que l'étape essentielle dans le repliement du 12G4Dd est la troisième dialyse. La fonctionnalité est maximale dans les conditions de renaturation de E à H, pour lesquels les réactifs redox sont ajoutés à 1 M HCl-Gnd. Il est très intéressant de noter que les meilleures conditions de renaturation sont plus particulièrement G et H, avec des tampons à 4 M et 2 M HCl-Gnd contenant 5 mM de DTT.

Nous pouvons alors formuler une hypothèse sur le processus de renaturation du 12G4Dd. Dans les étapes initiales de renaturation, le DTT empêcherait la formation des ponts disulfures. Ainsi seules les interactions intramoléculaires, permises avec la diminution progressive en agent chaotropique (4 M puis 2 M HCl-Gnd), entraineraient le repliement du 12G4Dd. Ensuite, à 1 M HCl-Gnd, plusieurs interactions intramoléculaires seraient possibles et le couple redox stabiliserait le 12G4Dd dans sa conformation correcte en favorisant les ponts disulfures thermodynamiquement stables.

Ainsi, en résumé, après une nouvelle étape de SEC, 20mg de format dimérique, le 12G4Dd à 58 kDa, ont pu être isolés (figure 68).



À notre connaissance, ce rendement de production est l'un des plus élevés décrits dans la littérature en comparaison aux systèmes eucaryotes (Takemura et al., 2000; Hayashi et al., 2004) et à l'expression de diabodies par voie périplasmique décrite dans des articles récents (Holliger et al., 1999; di Tommaso et al., 2012).

Néanmoins, les conditions de renaturation G ou H ne peuvent pas être étendues à tous les modèles de diabodies. En effet, l'approche comparative de renaturation a également été réalisée sur le modèle SHA31 et le meilleur protocole pour le diabody SHA31 est la condition F : pas de DTT à 4 M et 2 M HCl-Gnd puis ajout du couple redox à 1 M HCl-Gnd jusqu'à la dernière dialyse. Ces résultats diffèrent des conditions pour le 12G4Dd, soulignant qu'il est nécessaire d'explorer toutes ces conditions et de trouver les meilleures conditions pour chaque diabody. Cette nouvelle approche comparative, favorise ainsi la production de plusieurs dizaines de mg de diabodies solubles et fonctionnels issus d'anticorps monoclonaux différents.

D'autre part, l'équipe japonaise spécialisée dans l'étude du repliement des fragments d'anticorps a récemment développé une nouvelle molécule, le Lauroyl-L-Glutamate, décrite comme plus efficace que les agents chaotropiques habituels (Kudou et al., 2011). Ce nouveau détergeant pourrait être testé en remplacement du chlorure de guanidine dans notre protocole comparatif afin d'augmenter encore le rendement de renaturation.

Par ailleurs, pour explorer rapidement les différents protocoles de renaturation, nous avons besoin d'un test de fonctionnalité rapide. Nous avons donc développé un test d'immunoanalyse fonctionnel pour le 12G4Dd : « ELISA 12G4Dd ». La fonctionnalité du 12G4Dd est révélée en liant le peptide épitopique biotinylé (pAMHRII-biot). La spécificité de cet « ELISA 12G4Dd » est contrôlée avec l'utilisation d'un peptide témoin biotinylé non reconnu par les 12G4Dd. Les résultats de fonctionnalité du 12G4Dd sont normalisés en fonction de la quantité totale de protéine en mesurant l'intensité des bandes (29 kDa) correspondant au fragment 12G4 après dénaturation pour l'analyse SDS-PAGE.

La mise au point de cet « ELISA 12G4Dd » démontre, pour la première fois, la fonctionnalité de différents fragments recombinants 12G4 comme le scFv et le diabody. Ce nouveau test peut également être intéressant avec l'anticorps monoclonal 12G4 dans la comparaison, par exemple, de l'affinité relative pour le peptide épitopique des formats chimérisés ou humanisés, ou à l'inverse, dans la comparaison de l'affinité des anticorps pour différents peptides du récepteur AMHRII en compétition avec le peptide pAMHRII-biot.

Par ailleurs, les diabodies 12G4Dd reconnaissent spécifiquement leur antigène, le récepteur AMHRII humain, dans son contexte membranaire. Ces résultats sont démontrés par des analyses *ex vivo* de cytométrie en flux. Cette étude compare la fixation de l'anticorps monoclonal 12G4 et celle du 12G4Dd aux cellules de la lignée tumorale ovarienne, COV434 qui surexprime le récepteur AMHRII-h. Bien que nous ayons recours à des anticorps secondaires différents, respectivement une

IgG anti-souris-alexa 488 et un anticorps anti-tag HA-FITC, l'anticorps monoclonal (1 μ M) et le format diabody (2 μ M) se lient aux COV434-AMHRII positive dans des proportions similaires. Ce résultat signifie, qu'après la purification, la quantité de 12G4Dd fonctionnels est comparable à celle de l'anticorps entier, ce qui valide la stratégie d'expression employée. Plus remarquable est le résultat obtenu dans l'expérience de compétition avec le peptide épitopique (pAMHRII-biot). Les fixations de l'anticorps monoclonal et du diabody sont toutes les deux inhibées en présence de pAMHRII-biot. Cette importante observation souligne le fait que les régions variables de l'anticorps monoclonal 12G4 et du 12G4Dd se comportent de façons identiques dans l'expérience de compétition. Cela suggère que la conformation structurale des régions variables du diabody 12G4Dd est correcte et similaire à celle de l'anticorps dont il est issu. De plus, la chromatographie d'exclusion de taille après renaturation permet d'isoler la fraction dimérique 12G4 de masse moléculaire attendue : 58 kDa. L'ensemble de ces résultats démontre donc que la renaturation « H » produit un diabody 12G4 bien structuré et fonctionnel.

Ces résultats de cytométrie en flux sont très prometteurs pour les futures expériences *in vivo* avec l'injection de 12G4Dd dans des souris porteuses de tumeurs ovariennes issues de la lignée COV434 AMHRII-h positive.

Mais pour faire de notre 12G4Dd un outil de diagnostic *in vivo*, le diabody doit être efficacement couplé à un système de détection c'est-à-dire des molécules fluorescentes, isotopiques, magnétique ou encore une plateforme multimodale capable de lier ces différents traceurs.

4.2.3 Le marquage du diabody 12G4

4.2.3.1 Couplage direct

L'étude du marquage des diabodies a été initiée sur le modèle SHA31, en parallèle du développement du 12G4Dd.

4.2.3.1.1 Couplage sur thiol

4.2.3.1.1.1 Mise au point du protocole

Chaque fragment monomérique possède naturellement 4 cystéines, 2 par région variable qui, après renaturation, formeront un pont intra-chaîne au sein de chaque région variable. Ainsi le diabody dimérique comporte 4 ponts disulfures essentiels dans sa stabilité structurale. Dans une stratégie de couplage d'un traceur *via* les thiols, il était donc nécessaire d'ajouter une cystéine dans

la séquence protéique afin de cibler ce nouveau groupement thiol (SH) dans le diabody sans affecter les cystéines intrinsèques. Donc trois nouvelles constructions moléculaires codant trois diabodies SHA31 VL-VH modifiés (diab-SH) ont été préparés avec une cystéine supplémentaire : en N-terminal (NSH), dans le lien entre VL et VH (LSH) et en C-terminal (CSH).

Le couplage sur thiol se fait au moyen d'un groupement maléimide associé à un fluorochrome. Le marquage a lieu après la renaturation totale des diabodies NSH, LSH ou CSH puisque, en théorie, les seuls thiols libres seront ceux ajoutés respectivement en N-terminal, dans le lien ou en C-terminal. L'outil de marquage utilisé est le DyLight 488 Maléimide.

Avant le marquage des diab-SH renaturés, on réalise une étape de réduction *via* un gel TCEP (Tris[2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride) afin de libérer les thiols anormalement oxydés. En théorie, les ponts disulfures intra-chaînes thermodynamiquement stables ne sont pas altérés.

Le protocole de marquage du fournisseur prévu pour les anticorps est adapté aux diabodies. Un milligramme de fluorochrome-maléimide (MW=800 g/mole) est solubilisé dans 100 μ L de DMF. A partir de 20 μ L de solution, 250 nmoles de traceurs sont utilisées pour le couplage de 20 nmoles d'anticorps monoclonaux. Par ailleurs, les solutions de diabodies avant renaturation étaient ajustées à 20 μ M, mais si on estime une perte de matériel d'environ 50 % après renaturation, la concentration finale des diab-SH est d'environ 10 μ M soit 10 nmoles/mL. On a donc testé un marquage de 20 nmoles de diab-SH couplé avec 250 nmoles de traceurs.

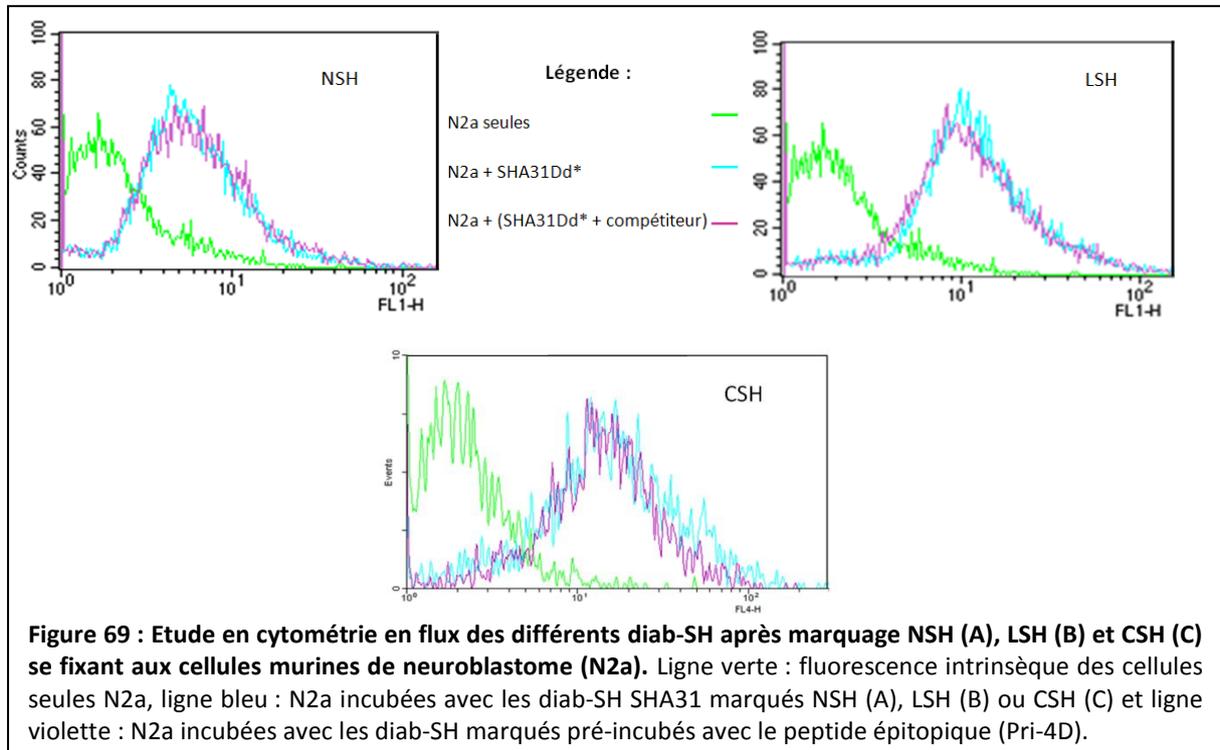
4.2.3.1.1.2 Analyse des diabodies-SH renaturés et marqués sur les thiols

Lors de la renaturation des diab-SH SHA31, en suivant le protocole classique en urée (tableau 5, dans Matériels et méthodes), une importante agrégation était visible à l'œil nu. Il est important de noter que ce phénomène n'a jamais lieu lors de la renaturation du SHA31Dd VL-VH initial (sans cystéine supplémentaire). Après renaturation, les trois formats ont été réduits 30-45 min sur gel TCEP, suivi d'un couplage au DyLight 488 Maléimide ou l'Alexa fluor 680, durant 2h.

La présence de diabodies NSH, LSH et CSH marqués et fonctionnels a été étudiée en cytométrie en flux, avec les cellules N2a surexprimant la PrP (figures 69).

Par comparaison avec la fluorescence intrinsèque des cellules N2a seules, on observe une augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des cellules pré-incubées avec les diab-SH SHA31 marqués. Ces mesures se font sans anticorps secondaire, la fluorescence observée est directement portée par les diabodies. Ces résultats révèlent donc la présence des diab-SH marqués à la surface des cellules N2a. Cependant, les tests de compétition, réalisés en pré-incubant les différents diab-SH avec le peptide épitopique (Pri-4D), ne montrent aucune diminution de la MFI. Les

trois formats de diab-SH marqués ne se fixent donc pas spécifiquement sur la PrP à la surface des cellules N2a.

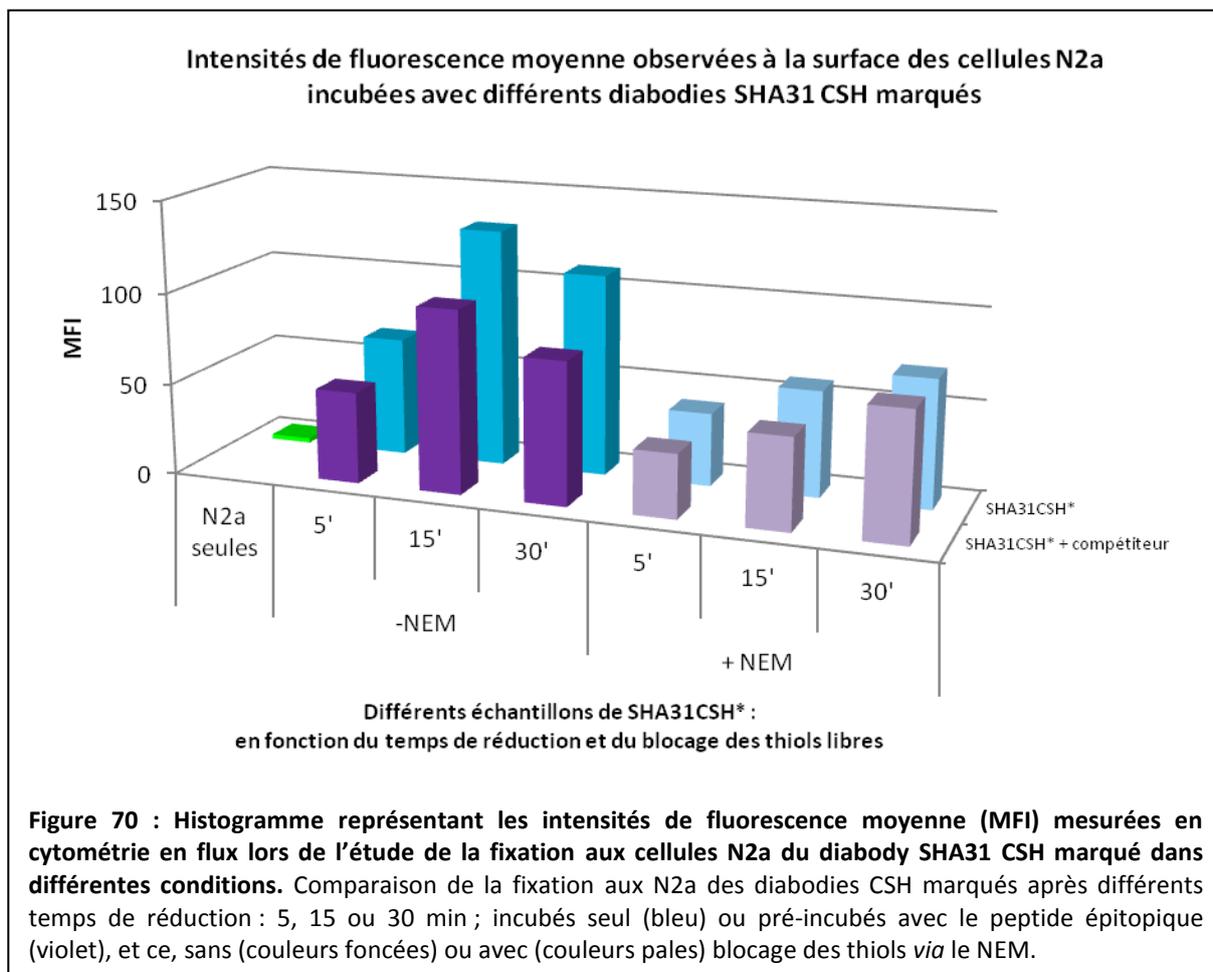


Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette fixation non spécifique.

La première idée, suggère la présence de thiols libres suite à l'étape de réduction sur gel TCEP qui a lieu avant le marquage. Les thiols non bloqués des diab-SH formeraient des liaisons covalentes avec des thiols libres présents à la surface des cellules N2a.

La seconde théorie repose sur la difficulté à renaturer un diabody qui possède une cystéine supplémentaire. En effet cet ajout peut provoquer la formation de ponts disulfures inter-chaînes anarchiques entraînant l'agrégation des diab-SH et par conséquent leur repliement incorrect. Lors du marquage, les agrégats seraient couplés aux fluorochromes, et ce sont ces formes agrégées et marquées qui se fixeraient aléatoirement à la surface des cellules N2a.

Pour analyser la première hypothèse, différentes conditions de marquage ont été menées en jouant sur deux paramètres : le temps de réduction sur gel TCEP et l'ajout ou non d'un agent bloquant les thiols, le N-ethylmaléimide (NEM). L'étude a été réalisée sur les trois formats de diab-SH mais les observations sont identiques. Les résultats sont illustrés avec l'exemple du diabody CSH (figure 70).



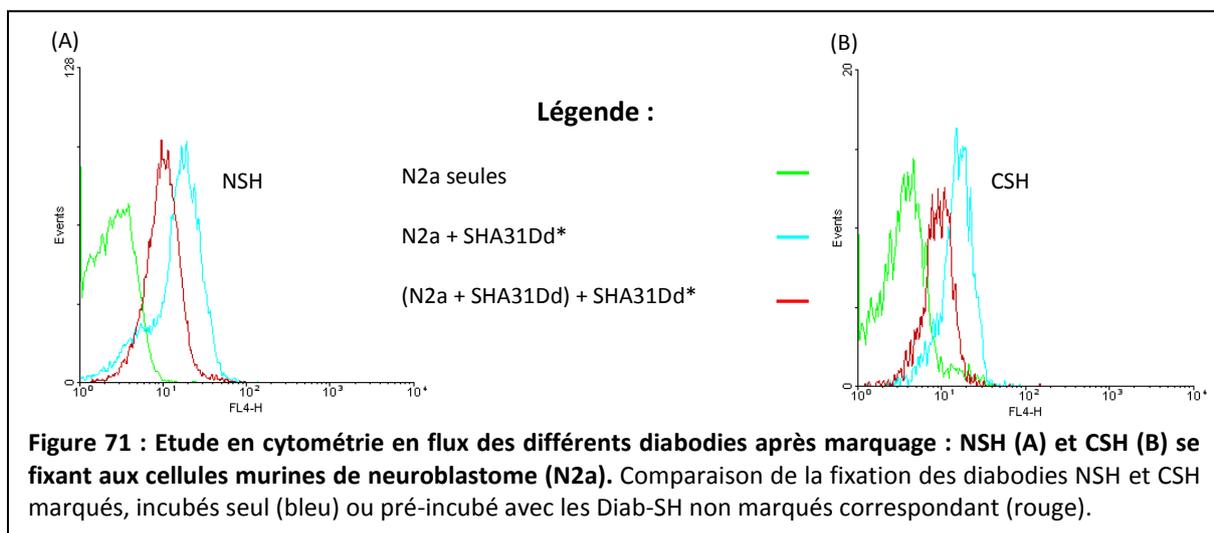
Les temps de réduction sur gel TCEP des diab-SH sont variés entre 5, 15 et 30 min d'incubation. La première observation qui était prévisible, est la diminution de l'intensité de fluorescence moyenne lorsqu'on diminue la durée d'incubation sur gel TCEP puisque le nombre de thiols réduits est moindre. En revanche, cela n'améliore pas la spécificité de fixation des diab-SH sur les cellules N2a.

D'autre part, après marquage des diab-SH, les éventuels thiols libres, non couplés à un fluorochrome, ont été bloqués avec le NEM (figure 70, couleurs pales). En comparaison aux échantillons non bloqués (figure 70, couleurs foncées), le couplage du NEM sur les thiols libres diminue les intensités de fluorescence moyenne des échantillons. Ces résultats suggèrent donc qu'une partie des diab-SH se fixent à la surface des cellules N2a *via* leurs thiols libres. Pour autant, la fixation sur les N2a des diabodies bloqués au NEM n'est pas du tout inhibée en présence du peptide compétiteur. Malgré le blocage des thiols libres, une quantité importante de diab-SH se fixe non spécifiquement à la surface des cellules.

La seconde hypothèse soulevait le problème de renaturation des formats diab-SH. L'apparition de précipités au cours des dialyses successives confirme l'existence de protéines dont le

repliement incorrect aboutit à la formation d'agrégats. De plus, l'étude en immunoanalyse des diab-SH, révèle une chute considérable de leur fonctionnalité. En effet, en test ELISA, en diluant au millième les échantillons, l'activité des diabodies classiques (sans cystéine supplémentaire) est maximale tandis que celle des diab-SH est nulle. D'autre part, en cytométrie en flux, nous constatons que la fixation des diab-SH marqués est en grande partie inhibée lorsque les cellules N2a sont pré-incubées avec des diab-SH non marqués (figure 71). Cela suggère que ces fragments d'anticorps, dont le repliement est incorrect, se fixe aléatoirement à la surface des N2a. Ainsi les sites non spécifiques sont saturés ce qui limite la fixation des diab-SH marqués.

Ces différents résultats semblent expliquer que la renaturation incorrecte des diab-SH et la présence de thiols libres sont responsables de leur fixation non spécifique à la surface des cellules N2a.



Finalement, bien que la stratégie de marquage orienté sur un thiol soit « chimiquement » efficace, cette méthode se révèle très complexe. La renaturation des protéines à pont disulfures n'est jamais aisée, mais l'ajout d'une cystéine supplémentaire rend le processus de repliement très compliqué. La difficulté de renaturation des diab-SH empêche donc d'envisager leur utilisation pour des applications de diagnostic *in vivo*.

4.2.3.1.2 Couplage sur BAD

Une seconde méthode de marquage des diabodies s'appuie sur la grande affinité connue de l'avidine, ou de la streptavidine pour la biotine (10⁻¹⁴-10⁻¹⁵ M). Ainsi au moyen du vecteur pSPI4-biot, les diabodies exprimés présentent une séquence particulière en C-terminal, décrite comme un domaine accepteur de biotine (BAD). La biotinylation, orientée sur le BAD, peut-être induite *in vivo* durant l'expression dans *E. coli* ou *in vitro* après purification des diabodies sous l'action de la biotine holoenzyme synthétase : BirA (Beckett et al., 1999; Cloutier et al., 2000). Puisque la composition des

tampons de renaturation n'est pas adaptée à l'activité enzymatique, nous avons utilisé la biotinylation *in vivo*. Dans 1 L de culture, lors de l'induction avec l'IPTG, 5 mL de solution de biotine à 10 mM sont ajoutés. Sous l'action de BirA *in vivo*, la biotine est fixée aux protéines possédant le domaine BAD. Le diabody ainsi produit s'accumule sous forme de corps d'inclusion qui sont ensuite repris dans une solution dénaturante. Les fractions protéiques purifiées par IMAC sont analysées en SDS-PAGE suivi d'un western-blot pour vérifier la présence de biotine au moyen d'un conjugué streptavidine-peroxydase. Les diabodies biotinylés (diab-biot) et purifiés sont ensuite renaturés suivant le protocole classique (tableau 5, dans Matériels et méthodes). Durant les dialyses successives, de gros flocons de précipitation apparaissent traduisant l'agrégation des diab-biot. En comparaison à la renaturation habituelle, seule la présence de biotines greffées aux diabodies diffère. Ces résultats suggèrent que la biotine est responsable de ce phénomène d'agrégation soit les biotines s'agrègent entre elles (Haguet, 2002), soit elles empêchent le repliement correct des diabodies entraînant leur précipitation. Cette méthode ne semble donc pas efficace pour l'obtention de diabodies marqués et fonctionnels.

4.2.3.1.3 Couplage sur amine

La stratégie de marquage du diabody sur les amines primaires (NH_2) repose sur l'utilisation d'un ester N-hydroxysuccinimide (NHS) ou d'un groupement isothiocyanate ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$), lié un fluorochrome, permettant la formation d'une liaison covalente sur les amines primaires accessibles du diabody. Il s'agit donc d'un marquage non ciblé, mais localisé tout le long du diabody au niveau N-terminal et sur les lysines.

Le marquage du diabody sur les amines primaires demande une adaptation du protocole de renaturation.

En effet, au cours de la renaturation, la présence d'arginine est un facteur important dans la dispersion des protéines. Or cet acide aminé possède une amine primaire susceptible de réagir avec un ester NHS ou un isothiocyanate. Afin d'éviter ce marquage non désiré, le couplage doit avoir lieu avant l'ajout d'arginine, c'est-à-dire avant la seconde dialyse à 4 M agent chaotrope et 0,4 M arginine.

D'autre part, les bains de dialyses contiennent du tampon Tris-HCl pH 8 qui possède également des amines primaires libres. Ce tampon est donc remplacé avec une première dialyse où l'agent chaotrope est repris en tampon borate à 50 mM pH 8,5.

Les résultats nous ont amenés à distinguer le marquage sur les amines en tampon urée et en tampon chlorure de guanidine.

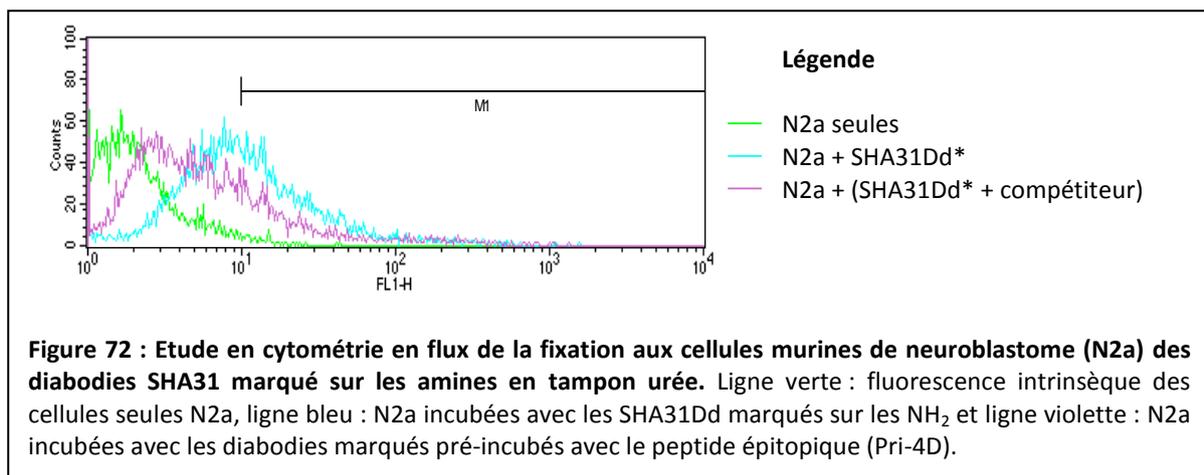
4.2.3.1.3.1 En urée

Les premiers essais de marquage sur les amines ont été réalisés sur le modèle SHA31 dans le tampon urée. L'outil de couplage utilisé est le DyLight 488 NHS Ester (DL488). Selon les instructions du fournisseur, 50 µg d'ester NHS-DL488 sont utilisés pour le marquage de 0,25 à 1 mg de protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 45 kDa. Autrement dit, le principe est d'utiliser 50 µg d'esters NHS marqués pour marquer $2,6 \cdot 10^{-9}$ à $2,2 \cdot 10^{-8}$ moles de protéines.

A l'issue de la dialyse à 8 M urée en tampon borate, la quantité de VL-VH, encore monomérique, est estimée par dosage BCA. Puis la concentration est ajustée à environ 22 µM soit $2,2 \cdot 10^{-8}$ moles/mL ou encore 0,6 mg/mL. Ensuite, on incube 1 mL de cette solution d'anticorps recombinants avec 50 µg d'ester NSH marqués, durant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. La concentration de l'échantillon marqué est ensuite ajustée à 15 µM. La solution, transférée dans une cassette de dialyse à 10 MWCO permettant l'élimination du fluorochrome en excès, est dialysée contre 2L de bain à 4 M urée, 0,4 M arginine et 0,1 M Tris-HCl pH 8 durant 2 jours à 4°C et à l'abri de la lumière. On poursuit enfin avec le protocole de renaturation habituel à l'abri de la lumière.

Au moyen d'un spectre d'absorption, l'efficacité de couplage du fluorochrome sur le diabody a été évaluée. On estime en moyenne la présence de 0,3 fluorochrome par fragment monomérique, donc environ un diabody dimérique sur deux serait couplé à un fluorochrome.

Des expériences de cytométrie en flux sont alors réalisées pour vérifier la présence de diabodies à la fois fonctionnels et couplés au fluorochrome (figure 72).



On étudie alors la fluorescence des cellules N2a, surexprimant la PrP, seules ou incubées avec le diabody marqué et dilué au dixième. On observe alors une augmentation significative de l'intensité de fluorescence moyenne qui augmente, de 1,60 pour les cellules seules, à 9,15 pour les

cellules incubées avec les SHA31Dd marqué. Ce résultat démontre que des diabodies marqués se fixent à la surface des cellules N2a.

Afin de vérifier la spécificité de liaison entre le diabody SHA31 et la PrP membranaire, on réalise une expérience de compétition en pré-incubant les diabodies marqués (dilués au 1/10) avec le compétiteur : le peptidique épitopique Pri-4D (excès molaire x10). On constate alors une diminution de la MFI à 5,05. La fixation des SHA31Dd à la surface des cellules N2a est donc en partie spécifique. Cela suppose donc l'existence de diabodies marqués et fonctionnels capables de se fixer spécifiquement à la PrP à la surface des cellules N2a.

Au vu de ces résultats prometteurs, nous avons appliqué cette méthode au diabody 12G4.

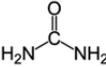
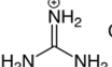
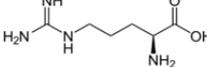
4.2.3.1.3.2 En chlorure de guanidine

L'expression et la renaturation des 12G4Dd ont été optimisés avec le chlorure de guanidine. Cet agent chaotrope a été substitué à l'urée en raison de son important pouvoir de solubilisation protéique et l'absence de modification des acides aminés. Le protocole de couplage développé sur les diabodies SHA31 a été répété sur les fragments 12G4 dénaturés à l'étape dépourvue d'arginine : 6 M HCl-Gnd en tampon Borate. Après le marquage, les fluorochromes sont éliminés par dialyse avec 4 M HCl-Gnd, 0,4 M arginine et 0,1 M Tris-HCl pH8 durant 2 jours à 4°C et à l'abri de la lumière. Avant la poursuite de la renaturation, l'efficacité de couplage est mesurée et étonnamment, aucun fluorochrome n'est fixé aux diabodies.

L'unique variation repose sur la composition du tampon lors du couplage, plus précisément seule la nature de l'agent chaotrope diffère. Le marquage du diabody SHA31 en HCl-Gnd a également été testé et les résultats sont également négatifs. Une analyse approfondie a donc été menée sur l'efficacité de couplage aux amines en variant la composition du tampon de réaction.

4.2.3.1.3.3 Etude du couplage sur les amines en fonction du tampon

Le couplage de la molécule isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sur les amines primaires d'un peptide contrôle a été testé dans différentes conditions réactionnelles. Pour cela nous disposons d'un court peptide, dit C-diab, de 13 acides aminés (1426 Da), qui correspond à la région C-terminal de nos diabodies classiques. Ce peptide C-diab présente trois sites potentiels de couplage au FITC, le N-terminal et deux NH₂ *via* deux lysines. Ce peptide a été dilué dans différents tampons qui correspondent à des solutions à différentes étapes de renaturation des diabodies (tableau 9).

Tableau 9 : Résumé des différentes conditions de couplage du FITC au peptide CK2.							
Tampon Borate (50 mM)		Tampon 8 M Urée en Borate (50 mM)		Tampon 6 M HCl-Gnd en Borate (50 mM)		Tampon 0,4 M Arg en Borate (50 mM)	
							
témoin négatif : peptide seul	Peptide + FITC x100	témoin négatif : peptide seul	Peptide + FITC x100	témoin négatif : peptide seul	Peptide + FITC x100	témoin négatif : peptide seul	Peptide + FITC x100
Peptide-CK2 20µg/mL dilué au 1/100 dans tampon X	140 µL = 2nmole						
FITC 10mM (en DMSO)	20µL		20µL		20µL		20µL
DMSO	20µL		20µL		20µL		20µL

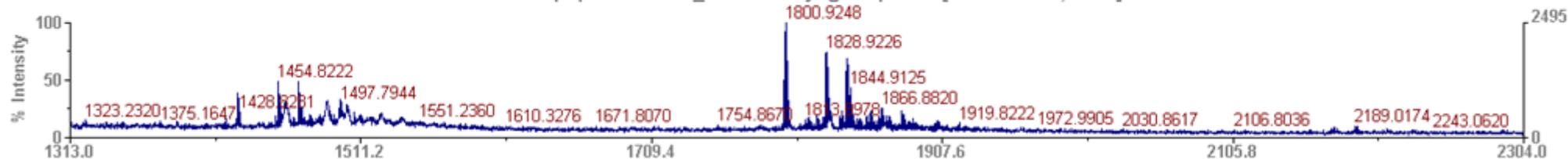
Les multiples solutions peptidiques ont été incubées une nuit avec le FITC (389 Da) en excès molaire de 100. L'efficacité de couplage a été analysée précisément par spectrométrie de masse, plus précisément par MALDI-TOF (figure 73).

Voyager Spec #1[BP = 1426.9, 3799]



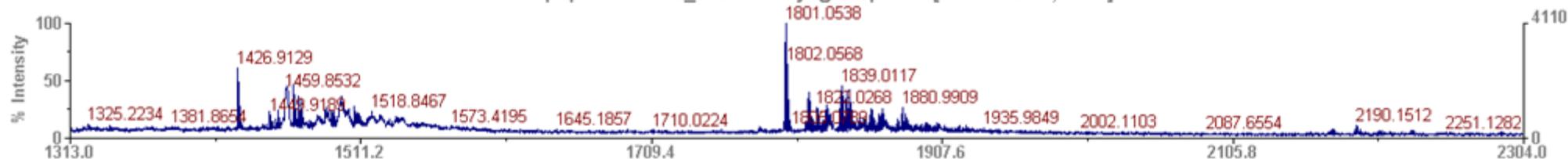
Mass (m/z)

<<Borate-pep+FITCx100_0002>> Voyager Spec #1[BP = 1800.9, 2495]



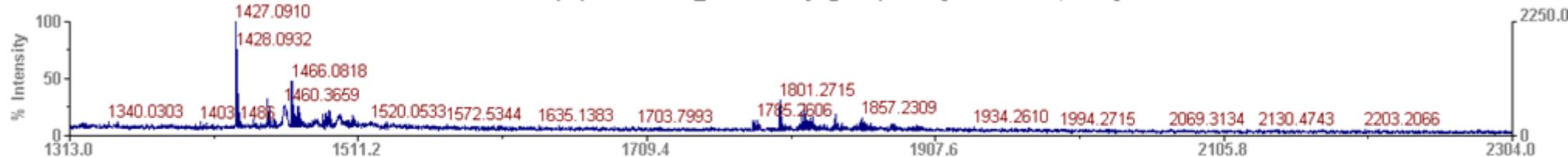
Mass (m/z)

<<Uree-pep+FITCx100_0001>> Voyager Spec #1[BP = 1801.1, 4110]



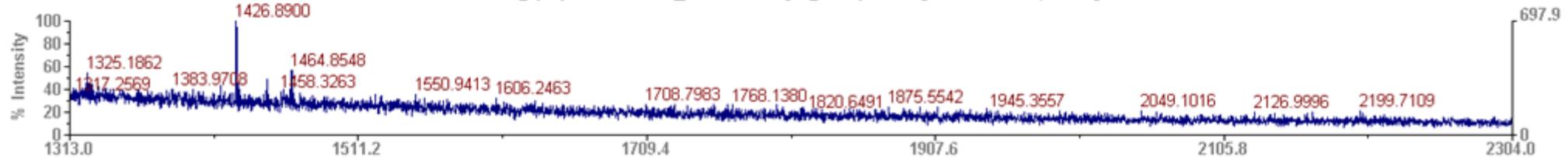
Mass (m/z)

<<GndHCl-pep+FITCx100_0002>> Voyager Spec #1[BP = 1051.5, 3146]



Mass (m/z)

<<Arg-pep+FITCx100_0001>> Voyager Spec #1[BP = 1057.4, 3804]



Mass (m/z)

Figure 73 : Analyse en MALDI-TOF de l'efficacité de couplage du FITC sur le peptide C-diab dans différents milieux réactionnels. (A) le peptide C-diab seul ; (B) Couplage en Borate (contrôle positif) ; (C) Couplage en Urée ; (D) Couplage en HCl-Gnd ; (E) Couplage en Arginine.

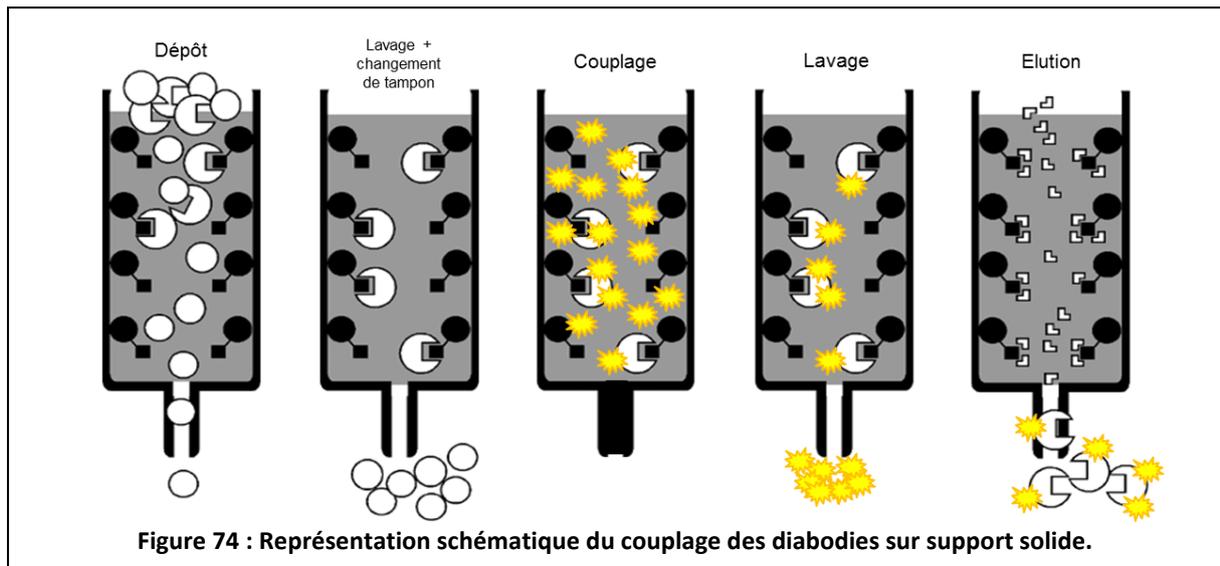
Le tampon de référence pour un couplage amine est le borate à pH 8. La fixation du FITC au peptide C-diab dans ce tampon représente donc un contrôle positif du couplage. Le spectre correspondant met en évidence un pic majoritaire à 1 800 Da qui représente le peptide couplé à une molécule FITC, un second pic est également présent à 2 189 Da traduisant la présence de 2 FITC par peptide. L'analyse du couplage en tampon 8 M urée en borate, révèle un spectre identique au contrôle positif. En revanche, dans le tampon 6 M HCl-Gnd, l'efficacité de couplage est bien moindre, avec la présence d'un faible pic à 1 800 Da. Pour finir en présence d'arginine aucun peptide n'est couplé au FITC. Ces résultats démontrent que la composition du tampon affecte directement le marquage des protéines sur les amines. Les tampons, quelque peu atypiques durant la renaturation des diabodies, se révèlent incompatibles avec un couplage amine. En début et fin de protocole, le tampon contient respectivement du chlorure de guanidine et de l'arginine. Ces deux molécules sont indispensables au repliement protéique correct, en leur absence, les diabodies précipitent. Mais dans le cadre d'un marquage sur les amines, elles présentent des fonctions NH₂ très réactives qui compétent avec celles des diabodies. Le couplage direct des fragments d'anticorps sur leurs amines semble donc impossible.

Pour surmonter cette difficulté, nous avons mis au point une stratégie originale de couplage des amines sur support solide.

4.2.3.2 Couplage sur support solide

4.2.3.2.1 Principe

Confrontés d'une part aux impératifs de renaturation et d'autre part aux modalités de marquage, nous avons développés une alternative de couplage sur support solide. En effet, la présence du HCl-Gnd ou de l'arginine est essentielle pour empêcher l'agrégation des protéines. Le principe repose donc sur une étape d'immobilisation des diabodies sur phase solide qui dans ce contexte ne pourront s'agréger malgré l'absence du HCl-Gnd ou de l'arginine. Les diabodies ainsi immobilisés seront incubés avec un agent de couplage en tampon adapté. Enfin l'élution des diabodies marqués se fera dans des conditions identiques à celles avant immobilisation (figure 74).



L'utilisation de phases solides fait appel aux chromatographies d'affinité. Différentes propriétés d'affinité peuvent être utilisées, pour nos diabodies, nous avons choisi une rétention sur colonne à protéine L *via* la chaîne légère de groupe kappa ou sur colonne de nickel *via* le tag His.

4.2.3.2.2 Immobilisation *via* protéine L

La chromatographie d'affinité sur protéine L est une technique pour capturer les anticorps entier mais également les fragments (Björck, 1988). La protéine L est une protéine de paroi cellulaire à multidomains isolée de *Peptostreptococcus Magnus*. Elle appartient à un groupe de protéines qui contiennent des domaines répétés capables d'interagir avec les immunoglobulines sans stimuler une réaction immunitaire. Parmi ce groupe, les mieux caractérisées sont la protéine A (issue de *Staphylococcus aureus*) et la protéine G (de *Streptocoque*). Ces deux protéines lient principalement l'interface CH2-CH3 des chaînes lourdes, tandis que la protéine L se distingue en fixant exclusivement la région variable des domaines kappa au niveau du FR1. Contrairement aux protéines A et G, la protéine L peut donc lier les fragments recombinants de type scFv ou diabody qui possèdent des chaînes kappa. Nous avons donc tenté d'immobiliser les diabodies 12G4 après renaturation en vue d'un couplage sur phase solide (figure 75A). Nous avons déposé un échantillon de 12G4Dd sur une colonne de protéine L, mais on observe lors du chargement une augmentation de l'absorbance à 280 nm. Cela signifie que les diabodies ne sont pas retenus sur la colonne. Nous avons répété l'expérience avec l'anticorps monoclonal 12G4 et les résultats sont identiques (figure 75B). Comme le souligne certaines études, l'interaction de la protéine L est variable selon la nature de la chaîne kappa, moins de 60 % des immunoglobulines de mammifères interagissent avec la protéine L (De Château et al., 1993). L'affinité de la protéine L pour les VL 12G4 est donc trop faible pour capturer

ces anticorps. La stratégie de couplage sur phase solide des diabodies 12G4 est donc impossible avec une colonne protéine L classique.

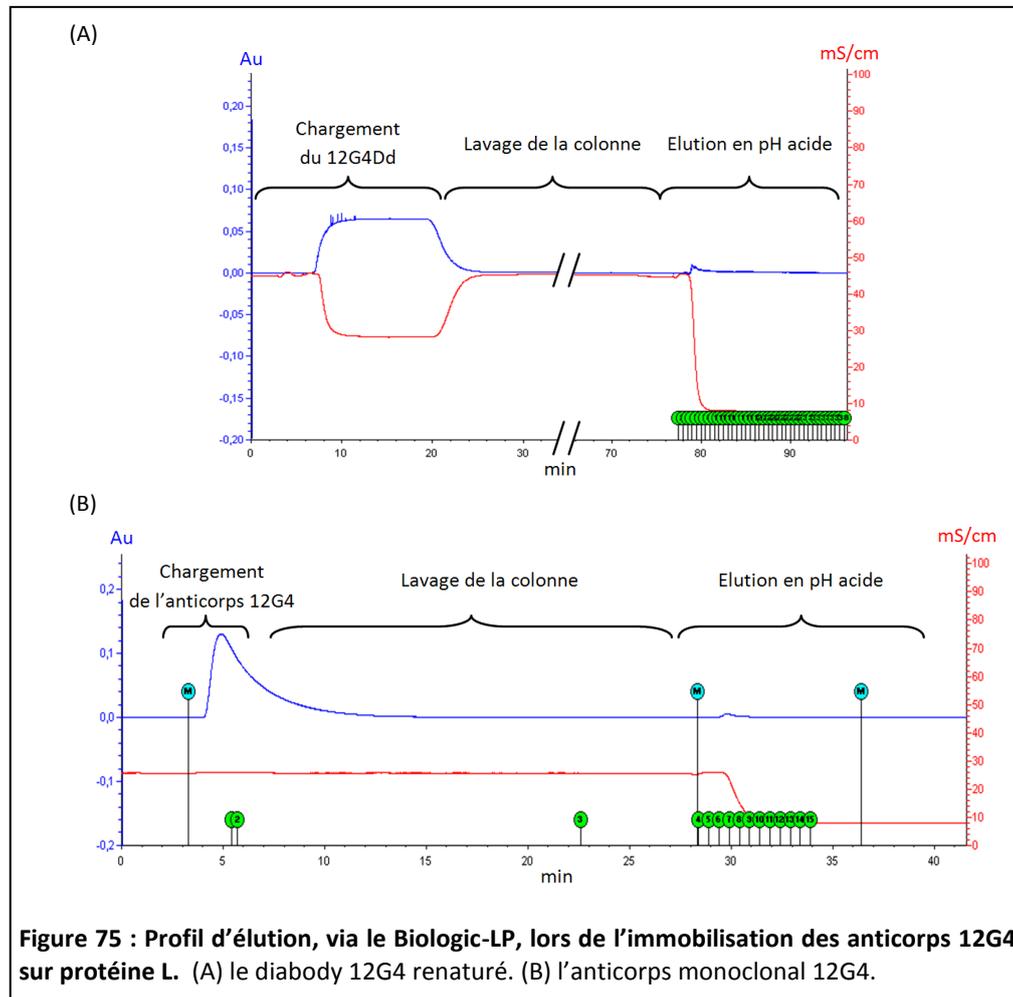


Figure 75 : Profil d'éluion, via le Biologic-LP, lors de l'immobilisation des anticorps 12G4 sur protéine L. (A) le diabody 12G4 renaturé. (B) l'anticorps monoclonal 12G4.

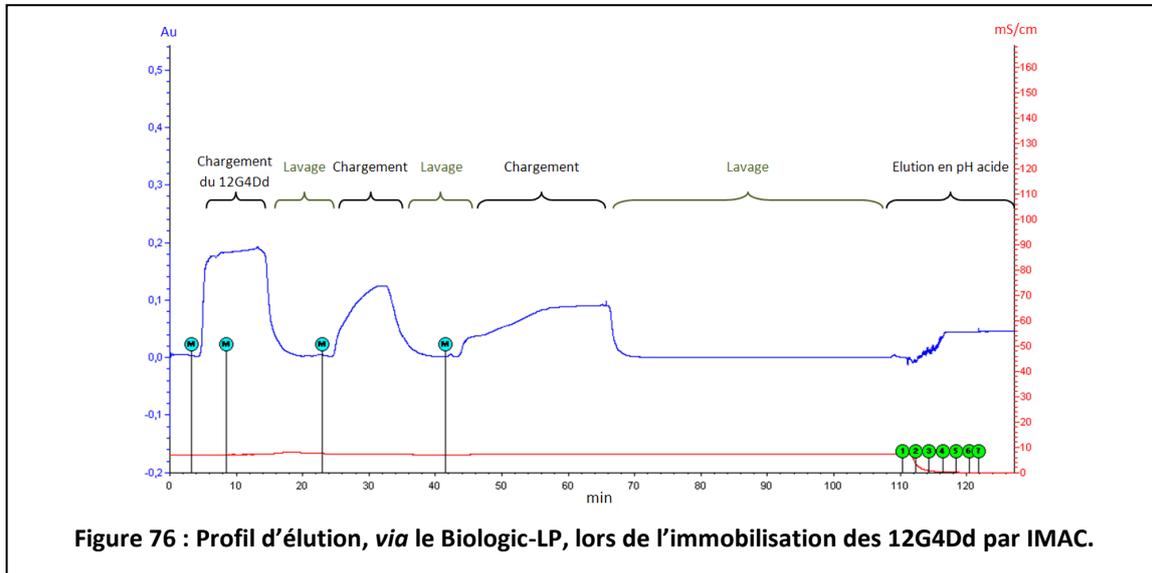
4.2.3.2.3 Immobilisation *via* IMAC

Les colonnes chargées en nickel sont classiquement utilisées pour capturer les protéines ayant des régions riches en histidine. L'IMAC est donc une méthode intéressante pour immobiliser les diabodies 12G4 *via* leur tag His. Deux approches sont possibles, une fixation sur colonne avant ou après renaturation.

4.2.3.2.3.1 Ni-NTA après renaturation

Le marquage du 12G4Dd après renaturation évite que le couplage ne perturbe le repliement protéique. Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à cette approche (figure 76). Les échantillons de diabodies 12G4 fonctionnels ont été déposés sur une colonne de nickel. Trois chargements successifs ont été effectués sur la colonne mais on observe pour chacun l'apparition

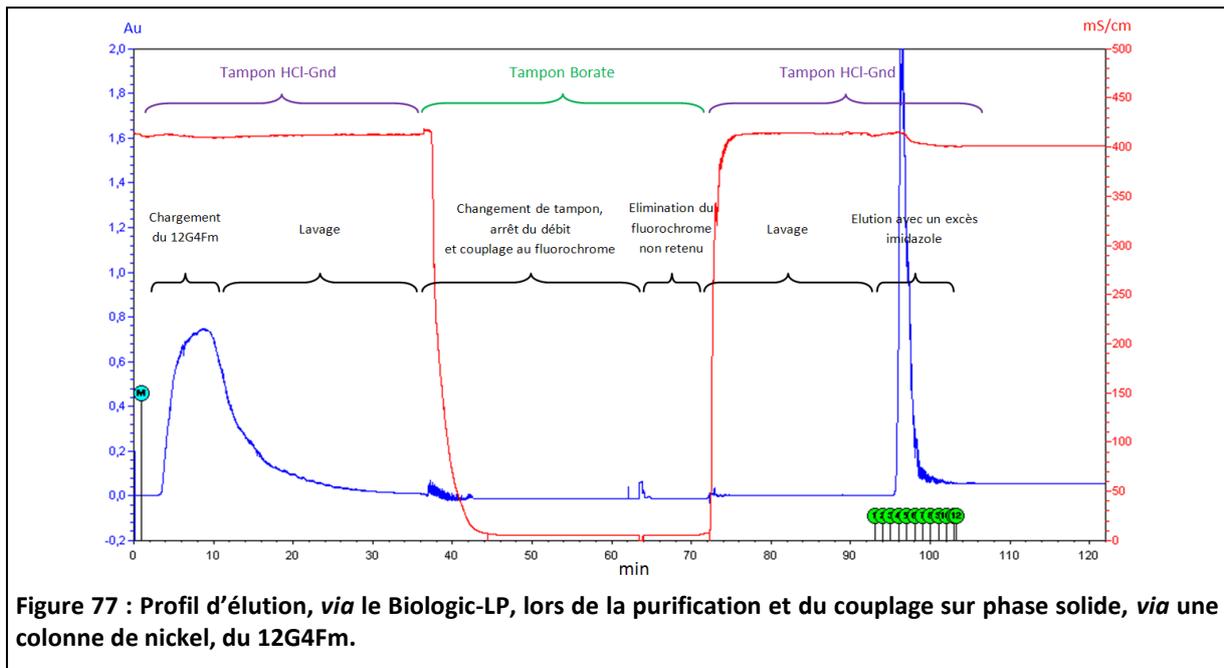
d'un plateau d'élution. Le diabody 12G4 renaturé n'est donc pas retenu sur la colonne. Ces résultats suggèrent qu'après le repliement, le tag His n'est plus suffisamment accessible pour interagir avec les ions nickel et donc immobiliser les diabodies sur la colonne.



Dans un deuxième temps, nous avons donc tenté de réaliser le couplage avant de renaturer le diabody 12G4.

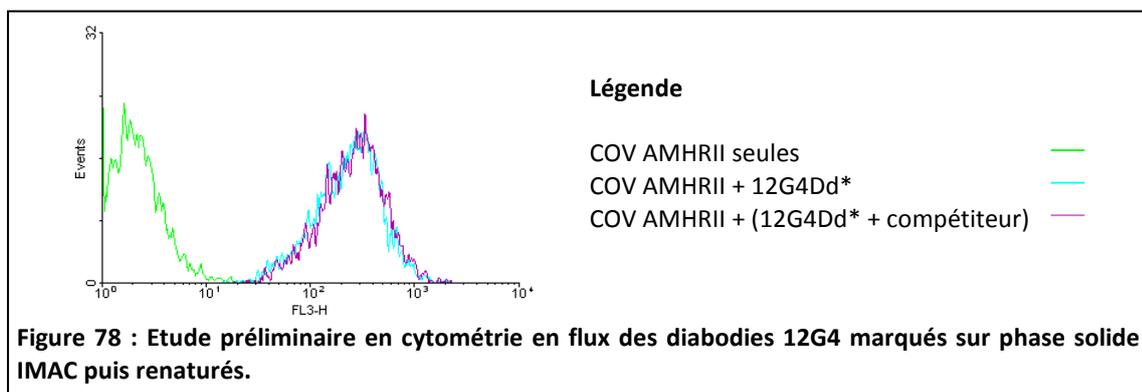
4.2.3.2.3.2 Ni-NTA avant renaturation

Lors de la production des diabodies, les corps d'inclusion repris en solution dénaturante contenant du chlorure de guanidine, sont purifiés sur colonne de nickel. Nous utilisons cette étape de purification pour réaliser le couplage (figure 77). L'extrait protéique total est chargé sur la colonne afin de fixer 1 à 2 mg de 12G4Fm. Après équilibration de la colonne en tampon Borate 50 mM, la solution d'agent de couplage, l'alexa fluor680-succinimidyl en excès molaire entre 2 et 4, est chargée sur la colonne puis incubée 1 h à l'abri de la lumière. La colonne est ensuite lavée avec 1 mL de tampon Borate, la solution contenant l'alexa fluor680 non retenu est rechargée sur la colonne et incubée une nouvelle heure. Après le lavage en excès de la colonne avec le tampon borate puis la solution dénaturante, les diabodies marqués sont élués en chlorure de guanidine avec un excès d'imidazole. Enfin, les diabodies suivent le processus classique de purification sur SEC et de renaturation.



L'efficacité de couplage des diabodies, a été déterminée avant et après renaturation en réalisant un spectre d'absorption de l'échantillon. On estime qu'un diabody sur 50 est couplé à l'alexa fluor680-succinimidyl ester (A680).

Malgré ce faible rendement, la fonctionnalité des diabodies 12G4Dd marqués a été analysée en cytométrie en flux (figure 78). Une étude préliminaire sur la reconnaissance du récepteur AMHRII, a mis en évidence la fixation des 12G4Dd marqués à la surface des cellules COV434-AMHRII positive. Néanmoins, la spécificité de liaison sur les récepteurs n'a pas été démontrée. En raison de la faible quantité en peptide compétiteur (quantité maximale utilisable par échantillon : 2 nmoles soit un excès d'environ 20 molécules par rapport aux diabodies (100 μ L entre 5 et 2 μ M)) combiné au faible rendement de couplage, il est difficile de conclure sur la réactivité des diabodies marqués. Il existe une compétition intrinsèque entre les diabodies marqués et non marqués pour le peptide épitopique. Le protocole de couplage sur phase solide doit être optimisé afin d'améliorer le rendement de marquage et analyser correctement la fonctionnalité des diabodies marqués et renaturés.



4.2.3.3 *Conclusions et Discussion*

Le développement d'une stratégie de marquage demande de trouver le meilleur compromis entre efficacité de couplage et fonctionnalité des anticorps. En effet, le marquage des formats diabodies est d'autant plus délicat que ces fragments sont réduits aux régions variables où les fonctions réactives c'est-à-dire les amines et les carboxyles, peuvent être engagés dans une interaction antigène-anticorps.

Dans notre méthode de production procaryote par voie cytoplasmique, deux approches sont possibles : un marquage avant ou bien après renaturation.

Dans le cas d'un marquage à l'état dénaturé, toutes les fonctions de couplage sont accessibles. Le risque est de marquer un site qui perturbera le repliement correct de la protéine. A l'inverse, le couplage après renaturation ne se fera que sur des acides aminés exposés au solvant, mais qui peuvent être essentiels dans la reconnaissance de l'anticorps à son antigène. Il faudrait alors optimiser le rendement de couplage pour conserver la fonctionnalité du fragment d'anticorps.

Dans ces conditions, il est donc préférable de disposer d'un marquage localisé. Ainsi, le fluorochrome sera orienté sur un site préalablement défini qui ne devrait pas perturber la fonctionnalité de l'anticorps. Dans cette idée, nous avons développé dans un premier temps deux stratégies, un couplage sur les thiols et sur la région BAD. Malheureusement, ces deux approches se sont révélées inadaptées à notre méthode de production procaryote par voie cytoplasmique. En effet, les couplages chimiques sont efficaces en revanche les modifications protéiques posent problème lors de la renaturation. L'ajout d'un thiol, ou d'une biotine sur la séquence du diabody entraîne la précipitation excessive de ces protéines. Ces modifications, en vue d'un couplage orienté, sont responsables d'une agrégation empêchant la formation de structures fonctionnelles. Dans le processus de renaturation, l'agrégation reste impossible à contrôler. Dans ces conditions, les méthodes de couplage sur thiol ou biotine ne sont donc pas envisageables.

Néanmoins au vu des progrès réalisés au cours de cette thèse sur le processus de renaturation, il serait bien de tester le protocole de renaturation comparatif sur le repliement de ces diabodies modifiés. En particulier, sur les diab-SH, la principale difficulté est de contrôler la formation des ponts disulfures. L'étude des différentes conditions de renaturation en présence des pouvoirs réducteurs (DTT et couple redox) pourraient donc définir un protocole prévenant la précipitation des diab-SH.

Par ailleurs, l'équipe d'Anna Wu, leader dans le développement de fragments diabodies, a breveté un format de diab-SH original : le cys-diab (Olafsen et al., 2004) Bien que leur méthode s'affranchit du problème de renaturation au moyen d'une expression eucaryote ou procaryote par voie périplasmique, leurs premiers essais de production de diab-SH étaient inefficaces. Une étude testant

différents formats de diab-SH a permis d'identifier le format appelé cys-diab fonctionnel qui présente une cystéine espacée par 2 glycines dans la région C-terminal des diabodies. Plusieurs cys-diab avec des spécificités différentes ont ainsi été produits en vue d'un couplage orienté sur la cystéine supplémentaire (Sirk et al., 2008; Barat et al., 2009). Ce format cys-diab est donc une alternative intéressante à nos diab-SH. La construction moléculaire codant le cys-diab 12G4 a été réalisée. Leur production sera donc étudiée toujours en suivant notre méthode d'expression procaryote par voie cytoplasmique suivi de notre technique de renaturation comparative.

D'autre part, nous avons eu recours à une méthode classique de couplage protéique sur les amines. Malgré les risques de perte de la fonctionnalité des diabodies, ce couplage non orienté a été testé dans différentes conditions. Cette méthode s'est révélée concluante lors des essais sur le modèle SHA31 en tampon urée. Mais c'était sans compter sur les complications de couplage lors du changement d'agent chaotrope, avec l'utilisation du chlorure de guanidine. En effet ce tampon favorable lors de la renaturation, se montre incompatible avec un couplage amine. Le HCl-Gnd, présente un pouvoir de resolubilisation bien supérieur à l'urée et la diminution progressive de sa concentration favorise le repliement correct des diabodies. Pourtant lors du couplage amine, cette molécule possède des fonctions NH_2 qui compètent avec celles de la protéine, et par conséquent, empêchent le marquage efficace des diabodies. Or, lors des tentatives de substitution du HCl-Gnd par un tampon adapté au couplage amine, la fonctionnalité des diabodies a été dégradée en raison de leur précipitation.

Cette nouvelle contrainte nous a amené à développer une approche de couplage originale sur support solide. L'intérêt de cette stratégie est d'immobiliser les diabodies sur phase solide sans risquer leur agrégation lors d'un changement de tampon. Ensuite le tampon initial est substitué par une phase mobile adaptée au couplage (le tampon borate par exemple) et le fluorochrome est incubé sur la colonne en présence des diabodies immobilisés. Néanmoins, l'immobilisation sur phase solide n'est pas toujours efficace. Jusqu'à présent seul la capture des diabodies dénaturés *via* une colonne de nickel fonctionne. Cette méthode a ainsi permis de marquer les diabodies 12G4, mais le rendement de couplage doit être amélioré pour atteindre idéalement un fluorochrome par fragment monomérique. Cette stratégie de couplage sur phase solide est donc actuellement en cours d'optimisation avec en particulier un travail sur les rapports protéine-fluorochrome lors de l'incubation.

Pour dépasser les échecs que nous avons rencontrés pour immobiliser les fragments d'anticorps renaturés, d'autres méthodes de couplage sur phase solide pourraient être envisagées.

Précédemment, le domaine VL kappa de l'anticorps 12G4 a révélé un manque d'affinité avec la protéine L classique de *Peptostreptococcus magnus*. Mais cette interaction pourrait être améliorée par optimisation moléculaire de la protéine L ou de l'anticorps recombinant. Différents mutants de protéine L présentent des affinités et des sites de liaisons différents sur les VL-kappa (Stura et al., 2002). Ces variants pourraient être testés pour l'immobilisation de diabodies 12G4. La seconde alternative, serait de substituer un framework du modèle 12G4 par un autre, connu pour interagir fortement avec la protéine L (Muzard et al., 2009; Zahid et al., 2011).

D'autre part, dans les systèmes de chromatographie par affinité, il est possible de préparer ses propres résines. Pour immobiliser nos diabodies, nous pouvons utiliser leurs différentes étiquettes moléculaires.

Dans les études de cytométrie en flux, les diabodies 12G4 ont été détectés au moyen d'anticorps secondaire dirigés contre leur tag HA. Cette analyse démontre que l'interaction de cet anticorps avec le tag HA est possible même après renaturation des 12G4Dd. Les diabodies après renaturation pourraient donc être immobilisés sur une résine greffée en anticorps anti-tag HA. Sur le même principe, une colonne d'anticorps anti-tag His pourrait être testée également après renaturation. Car les affinités diffèrent entre l'anticorps anti-His et les molécules nickel pour la queue poly-histidine des diabodies. Les résultats pourraient donc être différents de ceux obtenus avec la colonne de nickel.

Une dernière technique originale d'immobilisation des diabodies renaturés, emploierait une phase solide présentant le peptide épitopique. En plus de l'intérêt d'immobilisation pour le couplage, seul les diabodies fonctionnels serait capturés, permettant ainsi de les purifier des formats non ou mal renaturés. De plus, l'immobilisation *via* le peptide épitopique protégerait le paratope empêchant ainsi le couplage sur un site essentiel à l'interaction antigène-anticorps.

4.2.4 Les modèles animaux pour l'imagerie

La finalité de tout ce travail d'expression et de marquage des diabodies est d'étudier le comportement de ces fragments *in vivo*. L'analyse doit porter plus précisément sur l'adressage et la reconnaissance spécifique du diabody à sa cible. Nous sommes donc amenés à mettre au point des modèles animaux xéno greffés qui présentent, de manière localisée dans la tumeur, la cible d'origine humaine du diabody. Les modèles en cancérologie reposent donc sur l'établissement de masses tumorales exprimant des biomarqueurs d'intérêt. Les souris utilisées pour réaliser les tumeurs sont des souris nude affectées par une mutation génétique causant l'absence ou la détérioration du

thymus. Ces souris possèdent donc un nombre très réduit de lymphocyte T responsable d'une inhibition du système immunitaire, facilitant ainsi la croissance tumorale.

4.2.4.1 Modèles de cancers ovariens

Pour le modèle du 12G4, des tumeurs ovariennes ont été établies *via* des lignées tumorales ovariennes COV434, issues plus précisément d'un cancer humain de la granulosa. On distingue la lignée « wild type » (WT) provenant de l'ATCC, et la COV434-AMHR11 dérivées de la lignée WT transfectée avec un plasmide contenant l'ADN complémentaire de l'AMHR11. L'injection sous-cutanée d'environ 5.10^6 cellules de chacune des lignées, permet le développement de deux types de tumeurs atteignant des tailles moyennes de 300 mm^3 . Ces deux tumeurs, WT et AMHR11, sont importantes pour démontrer la fixation spécifique des diabodies 12G4 uniquement dans la tumeur surexprimant le récepteur de type II à l'AMH.

L'établissement des tumeurs et leur croissance sont à présent bien maîtrisés et reproductibles (figure 79).



Figure 79 : Souris nude xéno greffées *via* des lignées tumorales ovariennes COV434-AMHR11.

Les diabodies 12G4Dd couplé au fluorochrome pourraient donc prochainement être injectés dans les souris xéno greffées et suivi *in vivo* à l'aide d'un dispositif d'imagerie par fluorescence en collaboration avec le centre d'imagerie du SHFJ. Cependant, la poursuite de l'étude est actuellement en discussion avec la société Surgimab, qui développe l'anticorps monoclonal 12G4 fluorescent et dispose de la licence d'exploitation du modèle 12G4 en imagerie par fluorescence. Des négociations sont en cours sur l'utilisation des diabodies 12G4 fluorescents.

5 Conclusions générales et Perspectives

Les anticorps présentent un intérêt grandissant dans la recherche et le développement de traitements pour de nombreuses maladies. Aujourd'hui un grand nombre d'essais cliniques, en particulier en oncologie, ont recours à des anticorps monoclonaux thérapeutiques (Beck et al., 2010). Les applications de ces biomolécules ne se limitent pas à la thérapie et se diversifient vers le diagnostic *via* l'imagerie *in vivo*. Cette dernière est en pleine essor avec l'évolution des techniques pour le diagnostic tumoral. L'imagerie TEP est en particulier l'approche privilégiée pour la détection et la quantification des tumeurs au moyen du traceur ^{18}F FDG, un dérivé du glucose accumulé par les cellules actives, incluant donc les cellules tumorales. Face à ce traceur que l'on pourrait qualifier de traceur référence (« gold standard») et à ses limitations (non spécifique), il devient nécessaire de développer de nouveaux traceurs, permettant non seulement de quantifier la tumeur, mais aussi de préciser les biomarqueurs présents à la surface des cellules tumorales et ainsi aider le praticien à prescrire un traitement adapté. L'ajustement de la thérapie au diagnostic prend le nom de « théranostic ». Si de nouveaux biomarqueurs sont identifiés (Nakagawa, 2012) et les traitements spécifiques se multiplient (Scott et al., 2012), il reste encore à développer de nouveaux outils de diagnostic spécifiques et adaptés à l'imagerie *in vivo*.

Les anticorps monoclonaux sont parfaits pour la thérapie, grâce à leur partie Fc, ils sont maintenus longtemps dans la circulation et de plus, ils sont capables de recruter le système immunitaire ce qui améliore leur efficacité anti-tumorale. En revanche, leurs propriétés pharmacocinétiques sont inadaptées à l'imagerie TEP. Un des facteurs essentiels de cette imagerie est l'obtention d'un rapport signal sur bruit de fond élevé dans un temps court de l'ordre de quatre heures. Le défi pour le théranostic est donc de développer ces nouveaux traceurs de taille adaptée qui permettent un diagnostic *in vivo* rapide et un suivi personnalisé des tumeurs.

Récemment, beaucoup de nouveaux formats d'anticorps recombinants (tableau 3) émergent pour des applications tant thérapeutiques que diagnostiques (Bes et al., 2006; Chen et al., 2006; Olafsen and Wu, 2010; Kaur et al., 2012). Le diabody, le plus petit fragment d'anticorps bivalent (environ 60 kDa), représente une classe importante de ces molécules recombinantes (Di Tommaso et al., 2012; Asano et al., 2012). En plus de ses propriétés pharmacocinétiques et de sa rapide clairance, ce format assure la spécificité, l'affinité et même l'avidité de l'anticorps dont il est issu. Ainsi les diabodies se révèlent particulièrement bien adaptés pour des applications de diagnostic *in vivo*. Des études ont démontré leur pertinence en particulier pour l'imagerie quantitative TEP (Cai et al. 2007; Eder et al. 2010; Olafsen et al. 2012).

Une perspective émergente du théranostic, est le développement, à partir des anticorps anti-tumoraux sur le marché ou en étude clinique, des fragments diabodies correspondants. Les praticiens disposeraient ainsi d'une collection de diabodies nécessaires tout d'abord, pour la caractérisation des biomarqueurs présents à la surface de tumeurs non accessibles à des biopsies guidant alors la stratégie thérapeutique à mettre en place pour le patient. D'autre part, ces molécules permettront, le suivi de l'évolution tumorale par une imagerie quantitative au cours du traitement du patient.

Ainsi, à partir de l'anticorps monoclonal murin 12G4, de l'IRCM, dirigé contre le récepteur de l'hormone anti-müllérienne (AMHRII-h) surexprimé par certaines lignées tumorales, nous avons entrepris le développement du diabody 12G4.

Mon travail de thèse a abordé les différents points essentiels au développement de ces fragments en vue de leur utilisation pour une application diagnostique chez l'Homme. Notre système d'expression permet de produire une quantité importante de protéines recombinantes, à un faible coût ce qui nous permet d'envisager d'ors et déjà les études précliniques dans les modèles animaux disponibles au laboratoire.

Dans la perspective d'utiliser les diabodies 12G4 *in vivo* d'abord chez la souris puis chez l'Homme, la stabilité de ces fragments, dans le temps et dans un organisme vivant, doit être maîtrisée. Dans le cadre d'un financement d'un appel d'offre ANR blanc international en collaboration avec l'équipe du Dr Christophe Tribet de l'École Normale Supérieure de Paris et du Pr Françoise Winnick de l'université de Montréal, de nouveaux polymères, déjà autorisés chez l'Homme, sont étudiés pour la stabilisation et la formulation d'anticorps thérapeutiques mais également pour la renaturation et la stabilisation de leurs fragments afin de développer des solutions injectables *in vivo*.

Différentes stratégies de couplage ont également été étudiées pour utiliser ces diabodies comme sondes marquées en imagerie *in vivo*. Notre stratégie repose sur la formation d'une liaison covalente avec des molécules de détection sans perturber la fonction de reconnaissance du diabody. Au vu de l'intérêt d'un couplage localisé, de nouvelles constructions moléculaires ont été développées codant des diabodies présentant un site spécifique de couplage. Malheureusement ces méthodes se sont montrées inexploitable en raison de la précipitation de ces nouveaux formats protéiques. Nous avons donc eu recours à un couplage chimique classique sur les amines. Confrontés à l'incompatibilité des tampons pour un couplage sur les fonctions NH_2 , nous avons développé une stratégie originale de marquage sur phase solide. Cette méthode permet ainsi le couplage sur les amines des diabodies immobilisés, mais elle nécessite une optimisation afin d'obtenir une efficacité

de couplage d'un fluorochrome par monomère. Ce rendement semble être le juste compromis, entre marquage et fonctionnalité, utilisable sur différents modèles de diabodies sans risquer d'entraver la liaison antigène-anticorps.

En parallèle, nous avons développé une stratégie originale de marquage localisé des diabodies. De plus, cette nouvelle approche serait adaptée à l'imagerie multimodale actuellement en essor. En raison de son potentiel brevetable, les détails de cette méthode n'ont pas été abordés dans ce mémoire.

Si dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur les traceurs fluorescents pour des raisons pratiques, notre objectif est de développer des diabodies marqués aux ^{18}F pour le diagnostic en imagerie TEP. En raison de la demi-vie de ce radioisotope, il devient nécessaire de disposer de techniques de couplages amines après renaturation. Une fois notre nouvelle approche de marquage mise en place, nous pourrions, en collaboration avec l'équipe du Dr Frédéric Dollé du SHFJ, étudier et suivre l'évolution du ^{18}F -diabody 12G4 injecté chez les souris xénotransgéniques, par imagerie TEP au moyen d'appareils adaptés au petit animal disponible au sein du SHFJ.

L'utilisation chez l'homme de ces diabodies 12G4, qui sont rappelés le, d'origine murine, est tout à fait envisageable sans grand risque de réaction immunitaire chez les patients. En effet, pour des applications diagnostiques, les molécules sont injectées ponctuellement à très faibles doses. Comme déjà souligné, l'anticorps monoclonal murin est lui, peu adapté à une application thérapeutique en raison des réponses du système immunitaire qu'il génère. Les groupes pharmaceutiques ont donc généralement recours à l'humanisation de leur anticorps avant de procéder aux essais cliniques chez l'Homme. Ainsi, l'anticorps humanisé, dérivé du 12G4 est actuellement en développement par le LFB : l'anticorps monoclonal 3C23K. Pour la caractérisation moléculaire et le suivi thérapeutique, l'avantage des fragments d'anticorps est de pouvoir disposer d'une molécule diagnostique de spécificité et d'affinité identiques à l'anticorps thérapeutique adapté. Il serait donc préférable de développer en collaboration avec le LFB, le diabody 3C23K humanisé. Dans ce cadre, l'imagerie *in vivo* par fluorescence avec le diabody murin et le diabody humanisé dans des modèles animaux adaptés pourrait être en plus une approche préclinique très performante et rapide pour valider la conservation des propriétés initiales de l'anticorps murin vis-à-vis de sa cible après humanisation.

Enfin, au-delà de l'axe AMH, de nouveaux diabodies peuvent être développés avec un intérêt particulier pour le diagnostic des tumeurs non décelables avec le ^{18}F FDG, on pense notamment aux tumeurs cérébrales.

Au laboratoire, on s'intéresse à l'axe endothéline dérégulé dans de nombreux cancers humains. Les récepteurs aux endothélines, de type A (ET_AR) et B (ET_BR), sont surexprimés à la surface des certaines cellules tumorales. Ainsi, une grande quantité de récepteurs ET_BR a été identifiée sur les cellules de mélanomes (Demunter et al., 2001) et de gliomes (Egidy et al., 2000; Anguelova et al., 2005; Naidoo et al., 2005). Le laboratoire a donc entrepris le développement d'anticorps dirigés contre ces biomarqueurs tumoraux, produisant ainsi plusieurs anticorps monoclonaux se fixant à ET_BR appelés RendomAb B (Allard, 2012).

Dans le cas des gliomes, le développement de diabodies dérivant de ses anticorps favoriserait d'une part un diagnostic spécifique des tumeurs cérébrales exprimant ET_BR , et d'autre part, le cas échéant, ces diabodies seraient intéressants en thérapie car, de par leur taille réduite, ils sont plus propices à passer la barrière hémato-encéphalique. Dans ce nouveau contexte, des collaborations se mettent en place avec les spécialistes de l'imagerie cérébrale à Neurospin.

L'ensemble de ce travail de thèse a donc permis d'établir les bases d'une stratégie efficace de production et de couplage des fragments diabodies ouvrant la voie, au sein du laboratoire, au développement de nouvelles molécules dédiées au diagnostic *in vivo* secteur de recherche et de développement en pleine émergence.

6 Bibliographie

- Abès, R., Teillaud, J.-L., 2011. Modulation of tumor immunity by therapeutic monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 30, 111–124.
- Allard, B., 2012. Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs aux endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers. Thèse d'immunologie. http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/66/96/77/PDF/VA_Allard_Bertrand_27012012.pdf
- Alt, K., Wiehr, S., Ehrlichmann, W., Reischl, G., Wolf, P., Pichler, B.J., Elsässer-Beile, U., Bühler, P., 2010. High-resolution animal PET imaging of prostate cancer xenografts with three different ⁶⁴Cu-labeled antibodies against native cell-adherent PSMA. *The Prostate* 70, 1413–1421.
- Analyse du leem, 2012. Biomédicaments en France état des lieux 2011. http://www.leem.org/sites/default/files/Biom%C3%A9dicaments%20en%20France%202011%20version%20finale_0.pdf
- Andersen, D.C., Reilly, D.E., 2004. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 456–462.
- Anguelova, E., Beuvon, F., Leonard, N., Chaverot, N., Varlet, P., Couraud, P.-O., Dumas-Duport, C., Cazaubon, S., 2005. Functional endothelin ET B receptors are selectively expressed in human oligodendrogliomas. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137, 77–88.
- Arakawa, T., Tsumoto, K., 2003. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 304, 148–152.
- Artemov, D., Mori, N., Ravi, R., Bhujwalla, Z.M., 2003. Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor. *Cancer Res.* 63, 2723–2727.
- Asano, R., Kudo, T., Makabe, K., Tsumoto, K., Kumagai, I., 2002. Antitumor activity of interleukin-21 prepared by novel refolding procedure from inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 528, 70–76.
- Asano, R., Kudo, T., Nishimura, Y., Makabe, K., Hayashi, H., Suzuki, M., Tsumoto, K., Kumagai, I., 2002. Efficient construction of a diabody using a refolding system: anti-carcinoembryonic antigen recombinant antibody fragment. *J. Biochem.* 132, 903–909.
- Asano, R., Nakayama, M., Kawaguchi, H., Kubota, T., Nakanishi, T., Umetsu, M., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., Kumagai, I., Asano, R., Nakayama, M., Kawaguchi, H., Kubota, T., Nakanishi, T., Umetsu, M., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., Kumagai, I., 2012. Construction and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a refolding system, Construction and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a refolding system. *FEBS Journal, FEBS Journal* 279, 279, 223–233, 233.
- Aubrey, N., Devaux, C., Sizaret, P.Y., Rochat, H., Goyffon, M., Billiald, P., 2003. Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 617–628.
- Baarends, W.M., van Helmond, M.J., Post, M., van der Schoot, P.J., Hoogerbrugge, J.W., de Winter, J.P., Uilenbroek, J.T., Karels, B., Wilming, L.G., Meijers, J.H., 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development* 120, 189–197.

- Bailey, G.S., 1996. The Iodogen Method for Radiolabeling Protein, in: Walker, J.M. (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 673–674.
- Bakkum-Gamez, J.N., Aletti, G., Lewis, K.A., Keeney, G.L., Thomas, B.M., Navarro-Teulon, I., Cliby, W.A., 2008. Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. *Gynecol. Oncol* 108, 141–148.
- Barat, B., Sirk, S.J., McCabe, K.E., Li, J., Lepin, E.J., Remenyi, R., Koh, A.L., Olafsen, T., Gambhir, S.S., Weiss, S., Wu, A.M., 2009. Cys-diabody Quantum Dot Conjugates (ImmunoQdots) for Cancer Marker Detection. *Bioconjug. Chem.*
- Barbet, J., Peltier, P., Bardet, S., Vuillez, J.P., Bachelot, I., Denet, S., Olivier, P., Leccia, F., Corcuff, B., Huglo, D., Proye, C., Rouvier, E., Meyer, P., Chatal, J.F., 1998. Radioimmunodetection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J. Nucl. Med.* 39, 1172–1178.
- Barski, G., SORIEUL, S., CORNEFERT, F., 1960. [Production of cells of a “hybrid” nature in cultures in vitro of 2 cellular strains in combination]. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 251, 1825–1827.
- Baty, D., Chames, P., 2006. Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 21, 255–263.
- Baum, R.P., Prasad, V., Müller, D., Schuchardt, C., Orlova, A., Wennborg, A., Tolmachev, V., Feldwisch, J., 2010. Molecular Imaging of HER2-Expressing Malignant Tumors in Breast Cancer Patients Using Synthetic ¹¹¹In- or ⁶⁸Ga-Labeled Affibody Molecules. *J Nucl Med* 51, 892–897.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., Corvaia, N., 2010. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 345–352.
- Beckett, D., Kovaleva, E., Schatz, P.J., 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* 8, 921–929.
- Behr, T., Becker, W., Hannappel, E., Goldenberg, D.M., Wolf, F., 1995. Targeting of Liver Metastases of Colorectal Cancer with IgG, F(ab)₂, and Fab Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibodies Labeled with ^{99m}Tc: The Role of Metabolism and Kinetics. *Cancer Res* 55, 5777s–5785s.
- Behring, Kitasato, 1965. [On the development of immunity to diphtheria and tetanus in animals]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 90, 2183.
- Belville, C., Jamin, S.P., Picard, J.Y., Josso, N., di Clemente, N., 2005. Role of type I receptors for anti- Müllerian hormone in the SMAT-1 sertoli cell line. *Oncogene.* 21, 4984-92
- Berkmen, M., 2012. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 82, 240–251.
- Bes, C., Troadec, S., Chentouf, M., Breton, H., Dominique Lajoix, A., Heitz, F., Gross, R., Pluckthun, A., Chardes, T., 2006. PIN-bodies: A new class of antibody-like proteins with CD4 specificity derived from the protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343, 334–344.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G., 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13703–13708.

- Björck, L., 1988. Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J. Immunol.* 140, 1194–1197.
- Blow, N., 2007. Antibodies: The generation game. *Nature* 447, 741–744.
- Boellaard, R., 2009. Standards for PET Image Acquisition and Quantitative Data Analysis. *Journal of Nuclear Medicine* 50, 11S–20S.
- Boquet, D., Créminon, C., Clément, G., Frobert, Y., Nevers, M.-C., Essono, S., Grassi, J., 2000. Quantitative Measurement of Bitagged Recombinant Proteins Using an Immunometric Assay: Application to an Anti-Substance P Recombinant Antibody. *Analytical Biochemistry* 284, 221–230.
- Borel, A., 2001. Etude théorique et expérimentale d'agents de contraste pour l'imagerie médicale par résonance magnétique. Thèse de Chimie.
- Boulianne, G., Hozumi, N., Shulman, M., 1984. Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* 643–646.
- Cai, W., Olafsen, T., Zhang, X., Cao, Q., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Wu, A.M., Chen, X., 2007a. PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an 18F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody. *J. Nucl. Med* 48, 304–310.
- Cai, W., Olafsen, T., Zhang, X., Cao, Q., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Wu, A.M., Chen, X., 2007b. PET Imaging of Colorectal Cancer in Xenograft-Bearing Mice by Use of an 18F-Labeled T84.66 Anti-Carcinoembryonic Antigen Diabody. *J Nucl Med* 48, 304–310.
- Carter, P.J., 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology* 6, 343–357.
- Centre international de Recherche sur le Cancer, 2010. GLOBOCAN 2008: Incidence et mortalité du cancer dans le monde. <http://globocan.iarc.fr/>
- Chakroun, N., n.d. Développement de l'appareil génital. http://www.dematice.org/ressources/PCEM2/Histologie/P2_histo_002/paper/document.pdf
- Chalker, J.M., Bernardes, G.J.L., Davis, B.G., 2011. A “tag-and-modify” approach to site-selective protein modification. *Acc. Chem. Res.* 44, 730–741.
- Chames, P., Baty, D., 2009. Fragments d'anticorps à domaine unique. *médecine/sciences* 25, 1159–1162.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., Baty, D., 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 157, 220–233.
- Chatal, J.F., Peltier, P., Bardiès, M., Chétanneau, A., Thedrez, P., Faivre-Chauvet, A., Gestin, J.F., 1992. Does immunoscintigraphy serve clinical needs effectively? Is there a future for radioimmunotherapy? *Eur J Nucl Med* 19, 205–213.
- Chen, D.L., Kinahan, P.E., 2010. Multimodality molecular imaging of the lung. *J Magn Reson Imaging* 32, 1409–1420.
- Chen, L.H., Huang, Q., Wan, L., Zeng, L.Y., Li, S.F., Li, Y.P., Lu, X.F., Cheng, J.Q., 2006. Expression, purification, and in vitro refolding of a humanized single-chain Fv antibody against human CTLA4 (CD152). *Protein Expression and Purification* 46, 495–502.

- Chopra, A., 2011. Radioiodinated anti-DNA-histone 1 complex chimeric tumor necrosis therapy (TNT) monoclonal antibody 1 - Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) - NCBI Bookshelf [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK82385/>
- Clark, 1998. Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 157–163.
- Cloutier, S.M., Couty, S., Terskikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnères, M., Mani, J.C., Leisinger, H.J., Mach, J.P., Deperthes, D., 2000. Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol. Immunol.* 37, 1067–1077.
- Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B.J., Batra, S.K., 1999. Single-chain antibodies in pancreatic cancer. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 880:263-80., 263–280.
- Collinet, P., Estevez, J.-P., Ascencio, M., Farine, M.-O., Vinatier, D., Cosson, M., Mordon, S., 2009. [Diagnosis of cervical squamous intraepithelial lesions by fluorescence imaging: clinical feasibility study]. *Gynecol Obstet Fertil* 37, 307–312.
- Constant, N., Coquart, J., Ganier, A., Gbalou, F., Olivier, A., Waltz, C., Constant, N., Reynaud, C., Abou, C., 2006. L'IRM. Défis du CEA 16–17.
- Cosimi, A.B., Burton, R.C., Colvin, R.B., Goldstein, G., Delmonico, F.L., LaQuaglia, M.P., Tolkoff-Rubin, N., Rubin, R.H., Herrin, J.T., Russell, P.S., 1981. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* 32, 535–539.
- Culy, C.R., Lamb, H.M., 2000. 131I tositumomab. *BioDrugs* 14, 195–202.
- de Bie, S.H., Ferreira, T.C., Pauwels, E.K., Cleton, F.J., 1992. Immunoscintigraphy for cancer detection: “a thousand ills require a thousand cures”. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118, 1–15.
- de Château, M., Nilson, B.H., Erntell, M., Myhre, E., Magnusson, C.G., Akerström, B., Björck, L., 1993. On the interaction between protein L and immunoglobulins of various mammalian species. *Scand. J. Immunol.* 37, 399–405.
- de Marco, A., 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 8, 26.
- Demunter, A., De Wolf-Peeters, C., Degreef, H., Stas, M., van den Oord, J.J., 2001. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch.* 438, 485–491.
- Desplancq, D., Rinaldi, A.-S., Stoessel, A., Sibler, A.-P., Busso, D., Oulad-Abdelghani, M., Van Regenmortel, M.H., Weiss, E., 2011. Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for in vitro protein detection. *J. Immunol. Methods* 369, 42–50.
- di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J.Y., Vigier, B., Josso, N., Cate, R., 1994. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol. Endocrinol.* 8, 1006–1020.
- di Tommaso, A., Juste, M.O., Martin-Eauclaire, M.-F., Dimier-Poisson, I., Billiald, P., Aubrey, N., 2012. Diabody mixture providing full protection against experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus australis* venom. *J. Biol. Chem.* 287, 14149–14156.

- Dias, C.R., Jeger, S., Osso Jr, J.A., Müller, C., De Pasquale, C., Hohn, A., Waibel, R., Schibli, R., 2011. Radiolabeling of rituximab with ^{188}Re and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ using the tricarbonyl technology. *Nuclear Medicine and Biology* 38, 19–28.
- Donahoe, P.K., Swann, D.A., Hayashi, A., Sullivan, M.D., 1979. Müllerian duct regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. *Science* 205, 913–915.
- Driol, C., 2008. Imagerie par rayonnement gamma diffusé à haute sensibilité. Thèse de physique : <http://biblioweb.u-cergy.fr/theses/08CERG0448.pdf>
- Ducruet, C., 2010. L'industrie pharmaceutique parie sur les anticorps monoclonaux. *Les Echos* 10.
- Eder, M., Knackmuss, S., Le Gall, F., Reusch, U., Rybin, V., Little, M., Haberkorn, U., Mier, W., Eisenhut, M., 2010. ^{68}Ga -labelled recombinant antibody variants for immuno-PET imaging of solid tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 1397–1407.
- Egidy, G., Eberl, L.P., Valdenaire, O., Irmeler, M., Majdi, R., Diserens, A.C., Fontana, A., Janzer, R.C., Pinet, F., Juillerat-Jeanneret, L., 2000. The endothelin system in human glioblastoma. *Lab. Invest.* 80, 1681–1689.
- Erb, D.A., Nabi, H.A., 2000. Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium- $^{99\text{m}}$ -labeled antiCEA Fab' fragment. *J Nucl Med Technol* 28, 12–18; quiz 21.
- Essono, S., Clément, G., Padiolleau-Lefevre, S., Créminon, C., Grassi, J., Boquet, D., 2010. Peptide mass-assisted antibody cloning strategy for accurate characterization of potential therapeutic monoclonal antibodies against neurodegenerative diseases. *Protein Engineering Design and Selection* 23, 203–210.
- Fagreus, A., 1948. Antibody production in relation to the development of plasma cells. *Acta Med Scand* 1.
- Fass, L., 2008. Imaging and cancer: A review. *Molecular Oncology* 2, 115–152.
- Féraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Créminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., Grassi, J., 2005. Screening of 145 Anti-PrP Monoclonal Antibodies for Their Capacity to Inhibit PrPSc Replication in Infected Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 11247–11258.
- Fischer, B., Sumner, I., Goodenough, P., 1993. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 3–13.
- Fujimori, K., Covell, D.G., Fletcher, J.E., Weinstein, J.N., 1989. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')₂, and Fab in tumors. *Cancer Res.* 49, 5656–5663.
- Gainkam, L.O.T., Huang, L., Caveliers, V., Keyaerts, M., Hernot, S., Vaneycken, I., Vanhove, C., Revets, H., De Baetselier, P., Lahoutte, T., 2008. Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. *J. Nucl. Med.* 49, 788–795.
- Garg, P.K., Garg, S., Bigner, D.D., Zalutsky, M.R., 1992. Localization of fluorine-18-labeled Mel-14 monoclonal antibody F(ab')₂ fragment in a subcutaneous xenograft model. *Cancer Res.* 52, 5054–5060.
- Garron, J.Y., Moinereau, M., Pasqualini, R., Saccavini, J.C., 1991. Direct $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeling of monoclonal antibodies: radiolabeling and in vitro stability. *Int J Rad Appl Instrum B* 18, 695–703.
- Gebauer, M., Skerra, A., 2009. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* 13, 245–255.

- Geha, R.S., 1981. Regulation of the immune response by idiotypic-antiidiotypic interactions. *N. Engl. J. Med.* 305, 25–28.
- George, A.J., Jamar, F., Tai, M.S., Heelan, B.T., Adams, G.P., McCartney, J.E., Houston, L.L., Weiner, L.M., Oppermann, H., Peters, A.M., 1995. Radiometal labeling of recombinant proteins by a genetically engineered minimal chelation site: technetium-99m coordination by single-chain Fv antibody fusion proteins through a C-terminal cysteinyl peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8358–8362.
- Gillenwater, A., Jacob, R., Richards-Kortum, R., 1998. Fluorescence spectroscopy: a technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. *Head Neck* 20, 556–562.
- Girgis, M.D., Olafsen, T., Kenanova, V., McCabe, K.E., Wu, A.M., Tomlinson, J.S., 2011. Targeting CEA in Pancreas Cancer Xenografts with a Mutated scFv-Fc Antibody Fragment. *EJNMMI Res* 1, 24.
- Goldenberg, D.M., Sharkey, R.M., Paganelli, G., Barbet, J., Chatal, J.-F., 2006. Antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy. *JCO* 24, 823–834.
- Goldsmith, S.J., Signore, A., 2010. An overview of the diagnostic and therapeutic use of monoclonal antibodies in medicine. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 54, 574–581.
- Goutayer, M., 2008. Nano-émulsion pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo. Thèse de Chimie Physique et Chimie Analytique.
- Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C., Flajnik, M.F., 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. , Published online: 09 March 1995; | doi:10.1038/374168a0 374, 168–173.
- Guillot-Chene, P., Lebecque, S., Rigal, D., 2009. [Towards an industrial control of the cloning of lymphocytes B human for the manufacturing of monoclonal antibodies stemming from the human repertoire]. *Ann Pharm Fr* 67, 182–186.
- Guo, J., Cai, M., 2003. [New type recombinant antibody fragment scFv multimer and cancer targeting]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 20, 361–365.
- Gupta, V., Harkin, D.P., Kawakubo, H., Maheswaran, S., 2004. Transforming Growth Factor-beta superfamily: evaluation as breast cancer biomarkers and preventive agents. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 165–182.
- Ha, T.U., Segev, D.L., Barbie, D., Masiakos, P.T., Tran, T.T., Dombkowski, D., Glander, M., Clarke, T.R., Lorenzo, H.K., Donahoe, P.K., Maheswaran, S., 2000. Mullerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 275, 37101–37109.
- Haguet, V., 2002. Détection électronique d'une interaction biomoléculaire entre des électrodes nanostructurées.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hamers, R., 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448.
- Hayashi, H., Asano, R., Tsumoto, K., Katayose, Y., Suzuki, M., Unno, M., Kodama, H., Takemura, S. ichi, Yoshida, H., Makabe, K., Imai, K., Matsuno, S., Kumagai, I., Kudo, T., 2004. A highly effective and stable bispecific diabody for cancer immunotherapy: cure of xenografted tumors by bispecific diabody and T-LAK cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 53, 497–509.

- Holliger, P., Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* 23, 1126–1136.
- Holliger, P., Manzke, O., Span, M., Hawkins, R., Fleischmann, B., Qinghua, L., Wolf, J., Diehl, V., Cochet, O., Winter, G., Bohlen, H., 1999. Carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell activation in colon carcinoma induced by anti-CD3 x anti-CEA bispecific diabodies and B7 x anti-CEA bispecific fusion proteins. *Cancer Res.* 59, 2909–2916.
- Hoogenboom, H.R., 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* 23, 1105–1116.
- Hoshiya, Y., Gupta, V., Kawakubo, H., Brachtel, E., Carey, J.L., Sasur, L., Scott, A., Donahoe, P.K., Maheswaran, S., 2003. Mullerian inhibiting substance promotes interferon gamma-induced gene expression and apoptosis in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278, 51703–51712.
- Hoshiya, Y., Gupta, V., Segev, D.L., Hoshiya, M., Carey, J.L., Sasur, L.M., Tran, T.T., Ha, T.U., Maheswaran, S., 2003. Mullerian Inhibiting Substance induces NFkB signaling in breast and prostate cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 43–49.
- Hu, S. zhen, Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L.E., Wong, J.Y.C., Shively, J.E., Wu, A.M., 1996. Minibody: A Novel Engineered Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (Single-Chain Fv-CH3) Which Exhibits Rapid, High-Level Targeting of Xenografts. *Cancer Res* 56, 3055–3061.
- Huang, L., Gai kam, L.O.T., Caveliers, V., Vanhove, C., Keyaerts, M., Baetselier, P., Bossuyt, A., Revets, H., Lahoutte, T., 2008. SPECT Imaging with 99mTc-Labeled EGFR-Specific Nanobody for In Vivo Monitoring of EGFR Expression. *Molecular Imaging and Biology* 10, 167–175.
- Hudson, P.J., Kortt, A.A., 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods* 231, 177–189.
- Hwang, W.Y.K., Foote, J., 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36, 3–10.
- Imbeaud, S., Faure, E., Lamarre, I., Mattéi, M.G., di Clemente, N., Tizard, R., Carré-Eusèbe, D., Belville, C., Tragethon, L., Tonkin, C., Nelson, J., McAuliffe, M., Bidart, J.M., Lababidi, A., Josso, N., Cate, R.L., Picard, J.Y., 1995. Insensitivity to anti-müllerian hormone due to a mutation in the human anti-müllerian hormone receptor. *Nat. Genet.* 11, 382–388.
- Inca, 2011. La situation du cancer en France en 2011. Inca.
- Iqbal, U., Trojahn, U., Albaghdadi, H., Zhang, J., O'Connor-McCourt, M., Stanimirovic, D., Tomanek, B., Sutherland, G., Abulrob, A., 2010. Kinetic analysis of novel mono- and multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1016–1028.
- Ivančević, V., Perka, C., Hasart, O., Sandrock, D., Munz, D.L., Ivančević, V., 2002. Imaging of low-grade bone infection with a technetium-99m labelled monoclonal anti-NCA-90 Fab' fragment in patients with previous joint surgery. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 29, 547–551.
- Jacquet, A., Kersual, N., Garambois, V., Colombo, P.-E., Goncalvez, R.-B., Theillet, C., Gaucher, C., Fournier, N., de Romeuf, C., Prost, J.-F., Urbain, R., Pèlerin, A., Navarro-Teulon, I., 2011. Towards a new targeted therapy for ovarian cancer: development of an anti-human müllerian inhibiting substance type II receptor humanized antibody. Poster

- Jacquet, A., Kersual, N., Garambois, V., Fontayne, A., Pujols, F., Fournier, N., Pugnère, M., Chavanieu, A., de Romeuf, C., Prost, J.-F., Urbain, R., Pèlerin, A., Gaucher, C., Navarro-Teulon, I., 2012. 3C23K: an anti-human Müllerian inhibiting substance type II receptor humanized monoclonal antibody for ovarian cancer targeted therapy. Poster
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G., 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522–525.
- Kaur, S., Venktaraman, G., Jain, M., Senapati, S., Garg, P.K., Batra, S.K., 2012. Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Letters* 315, 97–111.
- Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K., 1979. A New Mouse Myeloma Cell Line that Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody-Secreting Hybrid Cell Lines. *J Immunol* 123, 1548–1550.
- Kelloff, G.J., Krohn, K.A., Larson, S.M., Weissleder, R., Mankoff, D.A., Hoffman, J.M., Link, J.M., Guyton, K.Z., Eckelman, W.C., Scher, H.I., O’Shaughnessy, J., Cheson, B.D., Sigman, C.C., Tatum, J.L., Mills, G.Q., Sullivan, D.C., Woodcock, J., 2005. The Progress and Promise of Molecular Imaging Probes in Oncologic Drug Development. *Clin Cancer Res* 11, 7967–7985.
- Kenanova, V., Olafsen, T., Crow, D.M., Sundaresan, G., Subbarayan, M., Carter, N.H., Ikle, D.N., Yazaki, P.J., Chatziioannou, A.F., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Shively, J.E., Colcher, D., Raubitschek, A.A., Wu, A.M., 2005. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res* 65, 622–631.
- Kersual, N., Garambois, V., Salhi, I., Chardès, T., Mollevi, C., Colombo, P.-E., Pouget, J.-P., Behrens, C., Gaucher, C., Urbain, R., Prost, J.-F., Pèlerin, A., Navarro-Teulon, I., 2011. Anti-tumor effect of an anti-human MISRII antibody in mouse model for ovarian cancers: towards a new targeted therapy. Poster
- Kobayashi, H., Choyke, P.L., 2011. Target-cancer cell specific activatable fluorescence imaging Probes: Rational Design and in vivo Applications. *Acc Chem Res* 44, 83–90.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497.
- Kortt, A.A., Dolezal, O., Power, B.E., Hudson, P.J., 2001. Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomolecular Engineering* 18, 95–108.
- Kramer-Marek, G., Kiesewetter, D.O., Martiniova, L., Jagoda, E., Lee, S.B., Capala, J., 2008. [18F]FBEM-Z(HER2:342)-Affibody molecule-a new molecular tracer for in vivo monitoring of HER2 expression by positron emission tomography. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 1008–1018.
- Krasner, C., Joyce, R.M., 2001. Zevalin: 90yttrium labeled anti-CD20 (ibritumomab tiuxetan), a new treatment for non-Hodgkin’s lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol* 2, 341–349.
- Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R., Pluckthun, A., 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J.Immunol.Methods* 201, 35–55.
- Kudou, M., Yumioka, R., Ejima, D., Arakawa, T., Tsumoto, K., 2011. A novel protein refolding system using lauroyl-l-glutamate as a solubilizing detergent and arginine as a folding assisting agent. *Protein Expression and Purification* 75, 46–54.

- Kugler, M., Stein, C., Schwenkert, M., Saul, D., Vockentanz, L., Huber, T., Wetzel, S.K., Scholz, O., Pluckthun, A., Honegger, A., Fey, G.H., 2009. Stabilization and humanization of a single-chain Fv antibody fragment specific for human lymphocyte antigen CD19 by designed point mutations and CDR-grafting onto a human framework. *Protein Engineering, Design and Selection* 22, 135–147.
- La Marca, A., Volpe, A., 2007. The Anti-Mullerian hormone and ovarian cancer. *Hum. Reprod. Update* 13, 265–273.
- Lam, S., MacAulay, C., leRiche, J.C., Palcic, B., 2000. Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer* 89, 2468–2473.
- Lanzavecchia, A., Corti, D., Sallusto, F., 2007. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 523–528.
- Lawrence, L.J., Kortt, A.A., Iliades, P., Tulloch, P.A., Hudson, P.J., 1998. Orientation of antigen binding sites in dimeric and trimeric single chain Fv antibody fragments. *FEBS Letters* 425, 479–484.
- Lebars, D., 1998. Production du FDG. *Acomen* 4, 27–33.
- Lee, S.B., Hassan, M., Fisher, R., Chertov, O., Chernomordik, V., Kramer-Marek, G., Gandjbakhche, A., Capala, J., 2008. Affibody Molecules for In vivo Characterization of HER2-Positive Tumors by Near-Infrared Imaging. *Clin Cancer Res* 14, 3840–3849.
- Lehmann, K., Hoffmann, S., Neudecker, P., Suhr, M., Becker, W.-M., Rösch, P., 2003. High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. *Protein Expr. Purif.* 31, 250–259.
- Leung, K., 2012. IRDye800CW-anti-CD105 TRC105 chimeric monoclonal antibody - Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) - NCBI Bookshelf [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84304/>
- Li, J., Mahajan, A., Tsai, M.-D., 2006. Ankyrin Repeat: A Unique Motif Mediating Protein–Protein Interaction†. *Biochemistry* 45, 15168–15178.
- Littlefield, J.W., 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145, 709–710.
- Lonberg, N., 2005. Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.* 23, 1117–1125.
- Malakoff, D., 2011. Can Treatment Costs Be Tamed? *Science* 331, 1545–1547.
- Malmberg, J., Perols, A., Varasteh, Z., Altai, M., Braun, A., Sandström, M., Garske, U., Tolmachev, V., Orlova, A., Karlström, A.E., 2012. Comparative evaluation of synthetic anti-HER2 Affibody molecules site-specifically labelled with ¹¹¹In using N-terminal DOTA, NOTA and NODAGA chelators in mice bearing prostate cancer xenografts. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39, 481–492.
- Mano, M., 2006. The burden of scientific progress: Growing inequalities in the delivery of cancer care. *Acta Oncologica* 45, 84–86.
- Martineau, P., Jones, P., Winter, G., 1998. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 280, 117–127.

- Masiakos, P.T., MacLaughlin, D.T., Maheswaran, S., Teixeira, J., Fuller, A.F., Jr, Shah, P.C., Kehas, D.J., Kenneally, M.K., Dombkowski, D.M., Ha, T.U., Preffer, F.I., Donahoe, P.K., 1999. Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. *Clin. Cancer Res.* 5, 3488–3499.
- McCabe, K.E., Liu, B., Marks, J.D., Tomlinson, J.S., Wu, H., Wu, A.M., 2011. An Engineered Cysteine-Modified Diabody for Imaging Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)-Positive Tumors. *Molecular Imaging and Biology.*
- Miao, Z., Ren, G., Liu, H., Jiang, L., Cheng, Z., 2010. Small-animal PET imaging of human epidermal growth factor receptor positive tumor with a ⁶⁴Cu labeled affibody protein. *Bioconjug. Chem.* 21, 947–954.
- Miksch, G., Ryu, S., Risse, J.M., Flaschel, E., 2008. Factors that influence the extracellular expression of streptavidin in *Escherichia coli* using a bacteriocin release protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 319–326.
- Milenic, D.E., Yokota, T., Filpula, D.R., Finkelman, M.A., Dodd, S.W., Wood, J.F., Whitlow, M., Snoy, P., Schlom, J., 1991. Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. *Cancer Res.* 51, 6363–6371.
- Miller, J., Doss, M., McQuillen, R., Shaller, C.C., Tolner, B., Yu, J.Q., Chester, K., Robinson, M.K., 2012. Impact of expression system on the function of the C6.5 diabody PET radiotracer. *Tumor Biology.*
- Miot, M., Betton, J.-M., 2004. Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb. Cell Fact.* 3, 4.
- Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M.J., Matzuk, M.M., Josso, N., Cate, R.L., Behringer, R.R., 1996. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* 10, 2577–2587.
- Mordon, S., 2006. *La Physique pour la Santé : du diagnostic à la thérapie*, hal-00001383, version 1. ed. Institut de Physique Nucléaire de Lyon.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., Oi, V.T., 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6851–6855.
- Moutel, S., Perez, F., 2009. [Intrabodies, potent tools to unravel the function and dynamics of intracellular proteins]. *Med Sci (Paris)* 25, 1173–1176.
- Murphy, G.P., Snow, P.B., Brandt, J., Elgamal, A., Brawer, M.K., 2000. Evaluation of prostate cancer patients receiving multiple staging tests, including ProstaScint scintiscans. *Prostate* 42, 145–149.
- Muzard, J., Adi-Bessalem, S., Juste, M., Laraba-Djebari, F., Aubrey, N., Billiald, P., 2009. Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. *Anal. Biochem.* 388, 331–338.
- Naidoo, V., Naidoo, S., Mahabeer, R., Raidoo, D.M., 2005. Localization of the endothelin system in human diffuse astrocytomas. *Cancer* 104, 1049–1057.
- Nakagawa, H., 2012. [Research and development for cancer biomarker]. *Nippon Rinsho* 70, 743–747.
- Nelson, A.L., Dhimolea, E., Reichert, J.M., 2010. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9, 767–774.

- Neyt, M., Albrecht, J., Cocquyt, V., 2006. An Economic Evaluation of Herceptin® in Adjuvant Setting: The Breast Cancer International Research Group 006 Trial. *Ann Oncol* 17, 381–390.
- Novotný, J., Bruccoleri, R., Newell, J., Murphy, D., Haber, E., Karplus, M., 1983. Molecular anatomy of the antibody binding site. *J. Biol. Chem.* 258, 14433–14437.
- Okada, Y., 1962. Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell Res.* 26, 98–107.
- Olafsen, T., Betting, D., Kenanova, V.E., Salazar, F.B., Clarke, P., Said, J., Raubitschek, A.A., Timmerman, J.M., Wu, A.M., 2009. Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. *J. Nucl. Med* 50, 1500–1508.
- Olafsen, T., Cheung, C.-W., Yazaki, P.J., Li, L., Sundaresan, G., Gambhir, S.S., Sherman, M.A., Williams, L.E., Shively, J.E., Raubitschek, A.A., Wu, A.M., 2004. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. *Protein Eng. Des. Sel* 17, 21–27.
- Olafsen, T., Sirk, S.J., Olma, S., Shen, C.K.-F., Wu, A.M., 2012. ImmunoPET using engineered antibody fragments: fluorine-18 labeled diabodies for same-day imaging. *Tumour Biol.* 33, 669–677.
- Olafsen, T., Wu, A.M., 2010. Antibody Vectors for Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine* 40, 167–181.
- Orlandi, R., Güssow, D.H., Jones, P.T., Winter, G., 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3833–3837.
- Orvis, G.D., Jamin, S.P., Kwan, K.M., Mishina, Y., Kaartinen, V.M., Huang, S., Roberts, A.B., Umans, L., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., Wang, D., Martin, J.F., Behringer, R.R., 2008. Functional redundancy of TGF-beta family type I receptors and receptor-Smads in mediating anti-Mullerian hormone-induced Mullerian duct regression in the mouse. *Biol. Reprod.* 78, 994–1001.
- Padiolleau-Lefevre, S., Alexandrenne, C., Dkhissi, F., Clement, G., Essono, S., Blache, C., Couraud, J.-Y., Wijkhuisen, A., Boquet, D., 2007. Expression and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high affinity than Fab and whole antibody: Implications for therapeutic use in prion diseases. *Mol. Immunol.* 44, 1888–1896.
- Padiolleau-Lefèvre, S., Débat, H., Phichith, D., Thomas, D., Friboulet, A., Avasse, B., 2006. Expression of a functional scFv fragment of an anti-idiotypic antibody with a beta-lactam hydrolytic activity. *Immunol. Lett.* 103, 39–44.
- Pan, K.-L., Hsiao, H.-C., Weng, C.-L., Wu, M.-S., Chou, C.P., 2003. Roles of DegP in prevention of protein misfolding in the periplasm upon overexpression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 3020–3030.
- Pene, F., Courtine, E., Cariou, A., Mira, J.-P., 2009. Toward theragnostics. *Critical Care Medicine* 37, S50–S58.
- Pichler, B., Judenhofer, M., Wehrl, H., 2008. PET/MRI hybrid imaging: devices and initial results. *European Radiology* 18, 1077–1086.
- Pietersz, G.A., Patrick, M.R., Chester, K.A., 1998. Preclinical characterization and in vivo imaging studies of an engineered recombinant technetium-99m-labeled metallothionein-containing anti-carcinoembryonic antigen single-chain antibody. *J. Nucl. Med.* 39, 47–56.

- Porter, R.R., 1950. The formation of a specific inhibitor by hydrolysis of rabbit antiovalbumin. *Biochem. J.* 46, 479–484.
- Potter, M., Boyce, C.R., 1962. Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature* 193, 1086–1087.
- Programme de gestion thérapeutique des médicaments, 2005. Prise de position préliminaire Trastuzumab(Herceptin) dans le traitement adjuvant du cancer du sein. http://www.pgtm.qc.ca/documentation/FSW/Trastuzumab_Analysell_20090604.pdf
- Rahmim, A., Zaidi, H., 2008. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nuclear Medicine Communications* 29, 193–207.
- Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Bedecarrás, P., 2003. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 21–31.
- Rhodes, B.A., 1991. Direct labeling of proteins with ^{99m}Tc. *Int J Rad Appl Instrum B* 18, 667–676.
- Rietsch, A., Beckwith, J., 1998. The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* 32, 163–184.
- Ritt, P., Vija, H., Hornegger, J., Kuwert, T., 2011. Absolute quantification in SPECT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 38, 69–77.
- Roguska, M.A., Pedersen, J.T., Keddy, C.A., Henry, A.H., Searle, S.J., Lambert, J.M., Goldmacher, V.S., Blättler, W.A., Rees, A.R., Guild, B.C., 1994. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 969–973.
- Romer, T., Leonhardt, H., Rothbauer, U., 2011. Engineering antibodies and proteins for molecular in vivo imaging. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 882–887.
- Rosebrough, S.F., Grossman, Z.D., McAfee, J.G., Kudryk, B.J., Subramanian, G., Ritter-Hrncirik, C.A., Witanowski, L.S., Tillapaugh-Fay, G., Urrutia, E., Zapf-Longo, C., 1988. Thrombus imaging with indium-111 and iodine-131-labeled fibrin-specific monoclonal antibody and its F(ab')₂ and Fab fragments. *J. Nucl. Med.* 29, 1212–1222.
- Rudolph, R., Lilie, H., 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49–56.
- Salhi, I., Cambon-Roques, S., Lamarre, I., Laune, D., Molina, F., Pugnère, M., Pourquier, D., Gutowski, M., Picard, J.-Y., Xavier, F., Pèlerin, A., Navarro-Teulon, I., 2004. The anti-Müllerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand. *Biochem. J.* 379, 785–793.
- Sarda, L., Colin, P., Boccara, F., Daou, D., Lebtahi, R., Faraggi, M., Nguyen, C., Cohen, A., Slama, M.S., Steg, P.G., Le Guludec, D., 2001. Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms. *J. Am. Coll. Cardiol.* 37, 786–792.
- Schatz, P.J., 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)* 11, 1138–1143.
- Schirrmann, T., Meyer, T., Schütte, M., Frenzel, A., Hust, M., 2011. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules* 16, 412–426.

- Schoffelen, R., Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M., Franssen, G., McBride, W.J., Rossi, E.A., Chang, C.-H., Laverman, P., Disselhorst, J.A., Eek, A., van der Graaf, W.T.A., Oyen, W.J.G., Boerman, O.C., 2010. Pretargeted immuno-positron emission tomography imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a bispecific antibody and a ⁶⁸Ga- and ¹⁸F-labeled hapten peptide in mice with human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1019–1027.
- Schroeder, H.W., Jr, Cavacini, L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–52.
- Schroff, R.W., Foon, K.A., Beatty, S.M., Oldham, R.K., Morgan, A.C., Jr, 1985. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res.* 45, 879–885.
- Schuhmacher, J., Kaul, S., Klivényi, G., Junkermann, H., Magener, A., Henze, M., Doll, J., Haberkorn, U., Amelung, F., Bastert, G., 2001. Immunoscintigraphy with positron emission tomography: gallium-68 chelate imaging of breast cancer pretargeted with bispecific anti-MUC1/anti-Ga chelate antibodies. *Cancer Res.* 61, 3712–3717.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D., Old, L.J., 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12, 278–287.
- Seaman, M.E., Contino, G., Bardeesy, N., Kelly, K.A., 2010. Molecular imaging agents: impact on diagnosis and therapeutics in oncology. *Expert Rev Mol Med* 12, e20.
- Shokri, A., Sandén, A.M., Larsson, G., 2003. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 654–664.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., 2012. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 62, 10–29.
- Singh, S.M., Panda, A.K., 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 303–310.
- Sirk, S.J., Olafsen, T., Barat, B., Bauer, K.B., Wu, A.M., 2008. Site-specific, thiol-mediated conjugation of fluorescent probes to cysteine-modified diabodies targeting CD20 or HER2. *Bioconjug. Chem* 19, 2527–2534.
- Slavin-Chiorini, D.C., Kashmiri, S.V., Schlom, J., Calvo, B., Shu, L.M., Schott, M.E., Milenic, D.E., Snoy, P., Carrasquillo, J., Anderson, K., 1995. Biological properties of chimeric domain-deleted anticarcinoma immunoglobulins. *Cancer Res.* 55, 5957s–5967s.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Song, J.Y., Chen, K.Y., Kim, S.Y., Kim, M.R., Ryu, K.S., Cha, J.H., Kang, C.S., MacLaughlin, D.T., Kim, J.H., 2009. The expression of Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone type II receptor protein and mRNA in benign, borderline and malignant ovarian neoplasia. *Int. J. Oncol.* 34, 1583–1591.
- Stephen, A.E., Pearsall, L.A., Christian, B.P., Donahoe, P.K., Vacanti, J.P., MacLaughlin, D.T., 2002. Highly purified müllerian inhibiting substance inhibits human ovarian cancer in vivo. *Clin. Cancer Res.* 8, 2640–2646.
- Straka, M.R., Joyce, J.M., Myers, D.T., 2000. Tc-99m nofetumomab merpentan complements an equivocal bone scan for detecting skeletal metastatic disease from lung cancer. *Clin Nucl Med* 25, 54–55.

- Stura, E.A., Graille, M., Housden, N.G., Gore, M.G., 2002. Protein L mutants for the crystallization of antibody fragments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1744–1748.
- Sumer, B., Gao, J., 2008. Theranostic nanomedicine for cancer. *Future medicine* 137–140.
- Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., 2010. Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR. *J Immunol* 184, 1968–1976.
- Takemura, S. ichi, Asano, R., Tsumoto, K., Ebara, S., Sakurai, N., Katayose, Y., Kodama, H., Yoshida, H., Suzuki, M., Imai, K., Matsuno, S., Kudo, T., Kumagai, I., 2000. Construction of a diabody (small recombinant bispecific antibody) using a refolding system. *Protein Engineering, Design and Selection* 13, 583–588.
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M., Plückthun, A., 2012. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin) from research to therapy. *Meth. Enzymol.* 503, 101–134.
- Tanaka, K., Fukase, K., 2008. PET (positron emission tomography) imaging of biomolecules using metal–DOTA complexes: a new collaborative challenge by chemists, biologists, and physicians for future diagnostics and exploration of in vivo dynamics. *Organic & Biomolecular Chemistry* 6, 815.
- Tesic, M., Sheldon, K.M., Ballinger, J.R., Boxen, I., 1995. Labelling small quantities of monoclonal antibodies and their F(ab')₂ fragments with technetium-99m. *Nucl. Med. Biol.* 22, 451–457.
- Thie, H., Meyer, T., Schirrmann, T., Hust, M., Dübel, S., 2008. Phage display derived therapeutic antibodies. *Curr Pharm Biotechnol* 9, 439–446.
- Thorp-Greenwood, F.L., Coogan, M.P., 2011. Multimodal radio- (PET/SPECT) and fluorescence imaging agents based on metallo-radioisotopes: current applications and prospects for development of new agents. *Dalton Transactions* 40, 6129.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T., 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 28, 1–8.
- Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T., Kumagai, I., 1998. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent—application to a human single-chain Fv fragment. *Journal of Immunological Methods* 219, 119–129.
- Umetsu, M., Tsumoto, K., Hara, M., Ashish, K., Goda, S., Adschiri, T., Kumagai, I., 2003. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol.Chem.* 278, 8979–8987.
- Vaidyanathan, G., Zalutsky, M.R., 1994. Improved synthesis of N-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate and its application to the labeling of a monoclonal antibody fragment. *Bioconjug. Chem.* 5, 352–356.
- Vallejo, L.F., Rinas, U., 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.* 3, 11.
- van Houten, E.L.A.F., Themmen, A.P.N., Visser, J.A., 2010. Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 71, 191–197.

- van Loghem, E., Litwin, S.D., 1972. Antigenic determinants on immunoglobulins of nonhuman primates. *Transplant. Proc.* 4, 129–135.
- Venturi, M., Seifert, C., Hunte, C., 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 315, 1–8.
- Verhaar, M.J., Keep, P.A., Hawkins, R.E., Robson, L., Casey, J.L., Pedley, B., Boden, J.A., Begent, R.H., Chester, K.A., 1996. Technetium-99m radiolabeling using a phage-derived single-chain Fv with a C-terminal cysteine. *J. Nucl. Med.* 37, 868–872.
- Walsh, G., 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat. Biotechnol.* 28, 917–924.
- Ward, E.S., Ghetie, V., 1995. The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Ther Immunol* 2, 77–94.
- Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D., 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175, 231–237.
- Williams, A., Barclay, A., 1988. The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. *A. Rev. Immunol.* 381–405.
- Wu, A.M., 2009. Antibodies and antimatter: the resurgence of immuno-PET. *J. Nucl. Med* 50, 2–5.
- Wu, A.M., Yazaki, P.J., 2000. Designer genes: recombinant antibody fragments for biological imaging. *Q J Nucl Med* 44, 268–283.
- Wu, H., Nie, Y., Huse, W.D., Watkins, J.D., 1999. Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *Journal of Molecular Biology* 294, 151–162.
- Xu, X., Clarke, P., Szalai, G., Shively, J.E., Williams, L.E., Shyr, Y., Shi, E., Primus, F.J., 2000. Targeting and therapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors in transgenic mice with an antibody-interleukin 2 fusion protein. *Cancer Res.* 60, 4475–4484.
- Yazaki, P.J., Kassa, T., Cheung, C., Crow, D.M., Sherman, M.A., Bading, J.R., Anderson, A.-L.J., Colcher, D., Raubitschek, A., 2008. Biodistribution and tumor imaging of an anti-CEA single-chain antibody-albumin fusion protein. *Nucl. Med. Biol.* 35, 151–158.
- Yazaki, P.J., Wu, A.M., Tsai, S.W., Williams, L.E., Ikler, D.N., Wong, J.Y., Shively, J.E., Raubitschek, A.A., 2001. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjug. Chem.* 12, 220–228.
- Zahid, M., Loyau, S., Bouabdelli, M., Aubrey, N., Jandrot-Perrus, M., Billiald, P., 2011. Design and reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential. *Anal. Biochem.* 417, 274–282.
- Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M.T., De Pasquale, C., Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibli, R., Binz, H.K., Waibel, R., Plückthun, A., 2010. Efficient Tumor Targeting with High-Affinity Designed Ankyrin Repeat Proteins: Effects of Affinity and Molecular Size. *Cancer Res* 70, 1595–1605.
- Zec, I., Tislaric-Medenjak, D., Megla, Z.B., Kucak, I., 2011. Anti-Müllerian hormone: a unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochem Med (Zagreb)* 21, 219–230.

- Zelaschi, D., Newby, C., Parsons, M., van West, B., Cavalli-Sforza, L.L., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., 1983. Human immunoglobulin allotypes: previously unrecognized determinants and alleles defined with monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3762–3766.
- Zhang, Y., Hong, H., Cai, W., 2011. PET Tracers Based on Zirconium-89. *Curr Radiopharm* 4, 131–139.
- Zhang, Z., Song, L., Fang, M., Wang, F., He, D., Zhao, R., Liu, J., Zhou, Z., Yin, C., Lin, Q., Huang, H., 2003. Production of soluble and functional engineered antibodies in *Escherichia coli* improved by FkpA. *BioTechniques* 35, 1032–1038, 1041–1042.
- Zhu, W., Okollie, B., Bhujwala, Z.M., Artemov, D., 2008. PAMAM dendrimer-based contrast agents for MR imaging of Her-2/neu receptors by a three-step pretargeting approach. *Magn Reson Med* 59, 679–685.
- Zielinski, R., Hassan, M., Lyakhov, I., Needle, D., Chernomordik, V., Garcia-Glaessner, A., Ardeshirpour, Y., Capala, J., Gandjbakhche, A., 2012. Affibody-DyLight Conjugates for In Vivo Assessment of HER2 Expression by Near-Infrared Optical Imaging. *PLoS ONE* 7, e41016.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

1 Research paper

2 High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance
3 type II receptor diabody, a new recombinant antibody for *in vivo* ovarian
4 cancer imaging

5 Céline Ortega ^a, Amaury Herbet ^a, Sophie Richard ^a, Nathalie Kersual ^c, Narciso Costa ^a,
6 André Pèlerin ^c, Frédéric Ducancel ^a, Jean-Yves Couraud ^b,
7 Isabelle Navarro-Teulon ^c, Didier Boquet ^{a,*}

8 ^a CEA, iBiTecS, SPI, Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS), Bt. 136, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France

9 ^b Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, EA 3515, F-91191 Gif sur Yvette, France

10 ^c IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U896, Université Montpellier 1, CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque, 34298 Montpellier, France

11

14 A R T I C L E I N F O

15 Article history:

16 Received 13 June 2012

17 Received in revised form 3 August 2012

18 Accepted 6 August 2012

19 Available online xxxx

20 Keywords:

21 Antibody

22 Diabody

23 Cytoplasmic prokaryotic expression

24 Refolding

25 Ovarian cancer

26 Human anti-Müllerian hormone receptor

47

48 1. Introduction

49 Antibodies and related products are the fastest growing class
50 of therapeutic agents and several hundreds of these promising

Abbreviations: 12G4Db, dimeric diabody 12G4; 12G4Fm, monomeric
format 12G4; Arg, arginine; BSA, bovine serum albumin; DTT, dithiothreitol;
Gu-HCl, guanidine-HCl; IMAC, immobilized metal ion affinity chromatography;
IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; mAb, monoclonal antibody; pAMHR-
biot, biotinylated epitopic peptide AMHR; PBS, phosphate buffered saline; RACE-
PCR, rapid amplification of cDNA ends by polymerase chain reaction.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 6908 4697, +33 1 6908 6907.

E-mail address: didier.boquet@cea.fr (D. Boquet).

0022-1759/\$ – see front matter © 2012 Published by Elsevier B.V.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

A B S T R A C T

Prescription of therapeutic antibodies has radically modified the prognosis of some important diseases. However, the very high cost of these new drugs is a problem for public health organizations, which require assessment of the effectiveness of the antibody for each patient before beginning or during the treatment. *In vivo* immunoimaging is particularly well adapted to meet this demand. However, full-length antibodies are unsuitable for *in vivo* imaging due to their persistence in the serum and must be engineered in smaller formats to improve their pharmacokinetic properties without modifying their affinity and specificity. The small bivalent antibody fragment called diabody perfectly meets these *in vivo* imaging requirements. However, obtaining diabodies is laborious, time-consuming and sometimes unsuccessful. Using a diabody derived from a monoclonal antibody (12G4) directed against the human anti-Müllerian hormone receptor, a biomarker of ovarian cancers for which therapeutic antibodies are already undergoing clinical trials, we describe here a new diabody refolding protocol with various reducing conditions. Diabody functionality was checked *in vitro* and *ex vivo* with, respectively, a new immunoassay involving the epitopic peptide as a tracer and flow cytometry experiments with cells expressing recombinant anti-Müllerian hormone receptors. Our optimized protocol allows us to find the best refolding conditions for each diabody and to obtain large amounts of functional diabodies.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

51 new drugs are being evaluated in numerous clinical trials (Beck
52 et al., 2010). These new treatments have dramatically improved
53 the prognosis of several diseases (breast cancer, inflammatory
54 diseases...), but their high cost is a significant financial burden
55 for national health systems. Consequently, an important
56 challenge is to develop new methods to check the efficacy of
57 these treatments for each patient in terms, for example, of
58 tumor regression for cancer. A highly adapted approach to
59 monitoring of disease progression is quantitative *in vivo*
60 imaging as positron emission tomography (PET) imaging. To
61 date, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) is the most frequently
62 used PET radiolabeled tracer and has a very advanced PET

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

63 radiopharmaceutical distribution network worldwide. But FDG
64 has limitations in its ability to evaluate the extent of tumor
65 tissue. Non-specific uptake can result in false-positive results
66 and high background FDG uptake in some areas, such as the
67 brain, prevents detection of small amounts of tumor tissue. To
68 overcome the limitations of FDG and to help the clinician to
69 prescribe an effective treatment adapted to the identified tumor
70 biomarkers of the patient, a new generation of tracers is
71 required. This is a powerful technique for monitoring disease
72 progression and the efficacy of the prescribed treatment, and
73 quantitative and sensitive *in vivo* imaging is also very important
74 for pharmaceutical companies that develop new therapeutic
75 antibodies, as it can be used to i) identify the most effective
76 drugs, and ii) demonstrate the specificity and efficacy of drugs
77 targeting tumor cells during all stages of clinical trials.

78 For therapeutic purposes, monoclonal antibodies (mAbs)
79 are classically indicated because of their pharmacokinetic
80 properties, capacity to trigger an immunological response as
81 complement-dependent cytotoxicity, antibody-dependent cy-
82 Q32 toxicity mediated by the Fc region (Zhang et al., 2004) and
83 promotion of long-lasting adaptive immunity (Abès and
84 Teillaud, 2011). But for imaging purposes radiolabeled intact
85 mAbs are not the optimal choice because of their prolonged
86 persistence in the circulation, which leads to high background
87 activity in the blood and normal tissues. Bivalent antibody
88 fragments with intermediate molecular masses possess more
89 ideal tumor-targeting characteristics, including rapid tissue
90 penetration, high target retention, and rapid blood clearance. In
91 particular, the diabody format (a dimer of scFvs; molecular
92 mass about 55 kDa) has been evaluated for targeting in several
93 tumor antigen systems and has proven effective in rapid tumor
94 localization and ¹⁸F high-contrast imaging (Cai et al., 2007) for
95 review (Wu, 2009).

96 For clinical imaging, the isotope ¹⁸F offers the advantages of
97 broad availability, a higher positron yield (nearly 100%, com-
98 pared with 23% for ¹²⁴I), and a short half-life, which is better
99 suited for routine clinical use. Wu and colleagues have reported
100 (Cai et al., 2007) that the diabody is the best antibody fragment
101 for ¹⁸F labeling and that imaging can be optimal only 1–2 h
102 after injection. All these properties are compatible with routine
103 clinical use. ¹⁸F diabody tracers are perfectly adapted to this
104 challenge, but on one condition: that they can be produced
105 inexpensively. To meet this challenge, prokaryotic expression is
106 a very promising alternative to eukaryotic expression.
107 *Escherichia coli* remains the host of choice for antibody
108 fragments, as it offers a large panoply of expression vectors
109 and an unrivaled rapidity of expression (a few hours) enabling
110 fast production of the recombinant proteins, advantages that
111 make this system faster, cheaper, and easier to use than those
112 of other organisms (Humphreys and Glover, 2001; Andersen
113 and Reilly, 2004; Berkmen, 2012).

114 Here we describe the expression of the 12G4 diabody for *in*
115 *vivo* diagnostic applications. The 12G4 mAb (Salhi et al., 2004)
116 is directed against the human AMH type II receptor (hAMHR-II)
117 and expression of this receptor is noted in a wide range of
118 malignancies that arise from the primordial Müllerian duct
119 and constitute a relevant target for epithelial ovarian cancer
120 immunotherapy (Bakkum-Gamez et al., 2008) and also
121 immunoimaging. Consequently, for diagnostic applications,
122 we have produced the 12G4 diabody in an efficient expression
123 system *i.e.* in bacteria as inclusion bodies. We describe here all

steps necessary to obtain this soluble and functional antibody
124 fragment. We cloned the cDNA encoding the heavy and light
125 variable regions of the 12G4 mAb to allow assembly of the
126 12G4 diabody cDNA. We have designed a new ELISA to check
127 the functionality of the 12G4 diabody and have optimized the
128 expression and purification process. We have also used new
129 buffers to optimize the *in vitro* folding steps and the func-
130 tionality of 12G4 diabody was tested using fluorescence-
131 activated cell cytometry to observe its specific binding to the
132 hAMHR-II overexpressed in COV-434 cells. 133

2. Materials and methods 134

2.1. Cloning of cDNA encoding VH and VL regions of 12G4 mAb: 135 assembling 12G4 diabody coding sequences 136

Total RNA was extracted from 5 · 10⁶ 12G4 hybridoma cells
137 using the GenElute Mammalian Total RNA kit (Sigma, St. Louis,
138 MO, USA). The cDNA encoding the VH and VL regions was
139 amplified, cloned by RACE-PCR and the 12G4 diabody was
140 assembled as previously described (Essono et al., 2010). Briefly,
141 after characterizing each sequence, specific primers were
142 designed to amplify the entire variable domains VL and VH
143 (V-J and V-D-J regions) for light and heavy chains, respectively.
144 VL and VH products were assembled by overlap extension PCR
145 (SOE-PCR) (Horton et al., 1989) with a 5-amino-acid linker
146 Gly4Ser (Hudson and Kortt, 1999). Each product was cloned
147 into the SPI 4 vector, a prokaryote expression plasmid derived
148 in our laboratory from the pET9c vector with kanamycin
149 resistance (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany); we
150 introduced an additional N-terminal HA-Tag and a C-terminal
151 His-Tag for detection and purification purposes (Boquet et al.,
152 2000). Two different SfiI enzyme sites were introduced for scFv
153 directional subcloning (Kreber et al., 1997). A complete
154 description of the sequence encoding the 12G4 diabody is
155 detailed in Fig. S1 in the supplementary data. 156

2.2. Expression of 12G4 diabody 157

E. coli BL21 (DE3) transformed with the prokaryotic
158 expression vector SPI 4 encoding the 12G4 diabody was
159 grown in shaking culture (220 rpm, 37 °C) in LB supplemented
160 with 50 µg/mL kanamycin to an OD of 0.6 at 600 nm. Then,
161 protein expression was induced by the addition of 1 mM
162 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma, St. Louis,
163 MO) for 3 h (220 rpm 30 °C). Induced cells were harvested by
164 centrifugation at 4000 g for 10 min at 4 °C. Diabody was
165 purified as previously described with some adaptations. Briefly,
166 induced bacteria (250 mL) were pelleted by centrifugation and
167 resuspended in 25 mL of Tris-HCl buffer (0.1 M pH 8.0; Sigma,
168 St. Louis, MO, USA) containing a cocktail of protease inhibitors
169 (Pefabloc® SC, Roche Diagnostics, Meylan, France). The solution
170 was sonicated and centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4 °C.
171 The supernatant was discarded and the pellet was solubilized
172 in 25 mL of buffer A (6 M guanidine-HCl (Gu-HCl), 5 mM
173 Tris(2-carboxyethyl)phosphine, 20 mM imidazole, 0.1 M
174 Tris-HCl pH 8) (Sigma, St. Louis, MO, USA), and incubated
175 for 1 h at 37 °C with shaking at 230 rpm. The lysate was
176 sonicated (1 min at 16 W) then cleared by centrifugation at
177 14,000 g for 30 min at 4 °C. After 0.45 µm filtration of the
178 supernatant, the 12 G4 diabody was purified using a 1 mL 179

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

180 HisTrap HP Immobilized Metal Affinity Chromatography
 181 (IMAC) column (GE-Healthcare, Vélizy, France) on a Biologic
 182 LP apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at
 183 0.5 mL/min. After the protein loading, the resin was washed
 184 with buffer A until OD_{280 nm} decreased to baseline. Then, 12G4
 185 diabody elution was performed with buffer B (6 M Gu-HCl,
 186 5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine, 200 mM imidazole in
 187 0.1 M Tris-HCl pH 8) at 0.5 mL/min. Pooled elution fractions
 188 were then purified by size exclusion chromatography. His-tag
 189 proteins were loaded at 2 mL/min on a gel filtration column
 190 (HiLoad 26/60 Superdex™ 200 prep grade, GE-Healthcare,
 191 Vélizy, France) in buffer B without imidazole. Fractions of
 192 “monomeric” form of the 12G4 diabody (12G4Fm) were pooled
 193 and the final concentration was adjusted to 10 μM (correspond-
 194 ing to an OD_{280nm} equal to 0.2 after estimation with BCA assay
 195 according to the supplier's instructions (Thermo Fisher Scientific
 196 Inc., Rockford, IL USA)). At each step, fractions were analyzed by
 197 SDS-PAGE on 5%–12% polyacrylamide gel and stained with
 198 Coomassie blue (Imperial Protein Stain, Thermo Fisher Scientific
 199 Inc., Rockford, IL USA). Protein size was determined using
 200 Perfect Protein™ Markers (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt,
 201 Germany). Before SDS-PAGE analysis, proteins were separated
 202 from Gu-HCl to avoid a precipitate with SDS, by precipitation
 203 using 90% ethanol (Pepinsky, 1991). The diabody was then
 204 refolded by gradual removal of Gu-HCl by stepwise dialysis from
 205 6 to 0 M, in different conditions described in Section 2.4.

206 2.3. Immunoassay

207 Assays were performed using Nunc MaxiSorb 96-well
 208 plates coated with 12CA5 mAb (10 μg/mL) directed against
 209 the HA-Tag added to the N-terminal of the diabody, as already
 210 described (Boquet et al., 2000). Functional diabody was
 211 detected by its capacity to bind an epitopic peptide named
 212 pAMHR-biot (WNLTQDRAQVEMQGS). The pAMHR-biot pep-
 213 tide was recognized by the streptavidin horseradish peroxidase
 214 conjugate (Pierce® streptavidin Poly-HRP, Thermo Fisher
 215 Scientific Inc., Rockford, IL USA). In order to have reproducible
 216 and quantitative functional immunoassays, we added a quality
 217 control using a standard peptide named HA-His peptide
 218 (YPYDVPDYASLGGSHHHHHH) (Fig. 3A). This peptide control,
 219 routinely added in our assays, is also captured by the 12CA5
 220 mAb and revealed by the biotinylated PolyHis 24 mAb as our
 221 samples allow us to check the quality of our immunoassay
 222 reagents in terms of efficiency of capture and detection, thus
 223 validating the comparison between different immunoassays
 224 done on different days, and finally to normalize the quantifi-
 225 cation of our samples (Boquet et al., 2000).

226 In the first step we added 50 μL of serially diluted diabodies
 227 in Arg buffer (0.4 M Arg in 0.1 M Tris-HCl pH 8) and incubated
 228 for 8 h at room temperature. After washing with 10 mM
 229 phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.05% Tween 20 (washing
 230 buffer), we added the tracer i.e. 50 μL of pAMHR-biot peptide
 231 for functional assay prepared in EIA buffer (0.15 M NaCl, 0.1%
 232 BSA in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) and incubated overnight
 233 at 4 °C. After washing, we added 50 μL of streptavidin-HRP
 234 conjugate diluted in conjugate buffer (1% BSA, 0.05% Tween 20
 235 in PBS 1×) and incubated for 1 h at room temperature.
 236 Between each stage, the plate was washed three times with
 237 1× PBS buffer containing 0.05% Tween 20. Finally, solid phase-
 238 bound HRP activity was measured by addition of 100 μL per

well of TMB substrate (TMB substrate kit, Thermo Fisher 239
 Scientific Inc., Rockford, IL USA). After 30 min in the dark, the 240
 colorimetric reaction was stopped with 100 μL of 1 M HCl. The 241
 resulting absorbance was measured at 450 nm. We calculated 242
 the ratio of the functional value at OD_{450 nm} after 30 min 243
 to the density values of the 12G4Fm 28 kDa band scanned in 244
 SDS-PAGE (data not shown) and calculated with ImageJ 245
 freeware (Wayne Rasband, NIH). So, the relative quantities of 246
 functional “dimeric” 12G4 diabody (12G4Dd) obtained from 247
 the functional immunoassay were normalized to take into 248
 account the total amount of 12G4 diabody. 249

250 2.4. Optimization of renaturation conditions using a stepwise 251 dialysis system

252 Diabody renaturation was based on protocols described 252
 previously (Tsumoto et al., 1998; Umetsu et al., 2003; Asano 253
 et al., 2002; Clement et al., 2005), with modifications. The 254 Q4
 concentration of the monomeric diabody 12G4Fm was adjusted 255
 to 10 μM in buffer A (6 M guanidine-HCl (Gu-HCl), 5 mM 256
 Tris(2-carboxyethyl)phosphine, 0.1 M Tris-HCl pH 8). Gu-HCl 257
 was removed by successive dialysis with stepwise reductions 258
 of Gu-HCl concentration successively to 4, 2, 1, 0.5 and 0 M. 259
 Throughout dialysis, buffers contained 0.4 M Arg to suppress 260
 protein aggregation. Finally, to optimize the correct formation 261
 of disulfide bonds, and consequently to improve the 12 G4 262
 diabody refolding, thiol reagents, such as dithiothreitol (DTT, 263
 5 mM) or glutathione in its oxidized and reduced forms 264
 (0.75 mM and 7.5 mM, respectively), were added to the dialysis 265
 buffer at different stages. 266

267 2.5. Purification and determination of apparent molecular mass 268 by gel filtration

269 Purification and estimation of molecular mass were per- 269
 formed on an AKTA purifier (GE-Healthcare, Vélizy, France) 270
 by gel filtration with a HiLoad 26/60 Superdex™ 200 prep 271
 grade column (GE-Healthcare, Vélizy, France) equilibrated 272
 with 0.1 M Tris-HCl pH 8 containing 0.4 M Arg and redox 273
 reagents (7.5 mM reduced glutathione and 0.75 mM oxidized 274
 glutathione). Elution time was compared with calibration using 275
 the Gel Filtration LMW Calibration Kit (GE-Healthcare, Vélizy, 276
 France) with carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (44 kDa) 277
 and conalbumin (75 kDa) standards. Then, we analyzed the size 278
 of samples after refolding (total 12 G4 refolded diabody) and 279
 after purification by size exclusion chromatography (12G4Dd) 280
 using a Superdex 200 10/300 GL (GE-Healthcare, Vélizy, France) 281
 equilibrated with the buffer described above. 282

283 2.6. Flow cytometry

284 Around 1.5 · 10⁵ COV434-AMHRIL (COV434 stably trans- 284
 fected with expression vector encoding the type II AMH 285
 receptor) cells were resuspended in ice-cold staining buffer 286
 (1% PBS, 5% goat normal serum, 0.1% BSA), and incubated for 287
 30 min at 4 °C. After pelleting by centrifugation, cells were 288
 incubated with 100 μL of 2 μM 12 G4 diabody, adjusted to pH 7, 289
 for 1 h on ice. Cells were washed twice with ice-cold staining 290
 buffer, pelleted by centrifugation at 4 °C, and incubated for 1 h 291
 in the dark with a monoclonal anti-HA-FITC antibody (Sigma, 292
 St. Louis, MO, USA) diluted 1/1000. As positive control, cells 293

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

294 were incubated with the monoclonal antibody 12 G4 (1 μ M) for
 295 1 h at 4 °C and detected with an anti-mouse IgG-alexa 488
 296 conjugate (Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) diluted
 297 1/200. For competition experiments, 2 μ M 12G4Db or 1 μ M
 298 12 G4 mAb was incubated with 200 μ M epitopic peptide
 299 (pAMHR-biot) overnight at 4 °C. Cells were incubated with
 300 100 μ L of 12 G4 Db and pAMHR-biot solution for 1 h at 4 °C,
 301 washed twice with ice-cold staining buffer, and incubated for
 302 for 1 h with the anti-HA-FITC mAb for 12G4Db or with the anti-
 303 mouse IgG-alexa 488 conjugate for 12 G4 mAb. In all experi-
 304 ments, after the final wash, the cells were pelleted and
 305 resuspended in FACS flow buffer. The mean relative fluores-
 306 cence after excitation at a wavelength of 488 nm was deter-
 307 mined for each sample on a FACSCalibur flow cytometer (BD
 308 Biosciences, San Jose, CA, USA).

309 3. Results

310 3.1. Expression and purification of 12G4 diabody

311 In order to produce the 12G4 diabody, we received from
 312 Dr. I. Teulon the 12G4-mAb-producing hybridoma cells. To
 313 clone the cDNA encoding the VL and VH regions of this antibody,
 314 we used RACE-PCR as previously described (Essono et al., 2010)
 315 and obtained exactly the same amino acid sequence as that
 316 reported by Dr. I. Teulon in patent EP 1 918 304 on the gener-
 317 ation of murine 12G4 mAb and protection of its sequences
 318 (“Monoclonal antibodies and fragments thereof directed against
 319 the human anti-Müllerian hormone type II receptor (AMHR-II”).
 320 We assembled the 12G4 diabody in a VL-VH orientation
 321 separated by a 5-amino-acid linker (GGGGS) (Hudson and

Kortt, 1999) and subcloned the coding sequence at the *Sfi* I
 322 restriction sites (Kreber et al., 1997) in our expression vector
 323 pSPI 4 (derived from the Novagen commercial vector pET3c)
 324 according the same strategy already used for the SAF34 scFv
 325 expression (Padiolleau-Lefevre et al., 2007) (see Fig. 1A). The
 326 pSPI 4 vector allows the addition of Tag HA at the N-terminal
 327 end and Tag His at the C-terminal end of the expressed protein
 328 (Fig. 1B). We quantified by ELISA the functional 12G4 diabody
 329 expression (Boquet et al., 2000). This new functional ELISA
 330 is described in detail below, as is an essential tool to optimize
 331 12G4 diabody expression.

332 Expression of the diabody 12G4 fragment was induced by
 333 adding 1 mM IPTG for 3 h at 30 °C. We distinguish here the
 334 “monomeric” form of the 12G4 diabody (12G4Fm) obtained
 335 directly after the solubilization of the inclusion bodies by
 336 denaturing agents from the “dimeric” 12G4 diabody (12G4Db)
 337 obtained after the renaturation process (Fig. 1C). After the
 338 solubilization of the inclusion bodies by 6 M Gu-HCl buffer (for
 339 details see Materials and methods), we purified the 12G4Fm by
 340 IMAC. At this stage, we obtained a 12G4Fm saturating peak at
 341 280 nm (Fig. 2A). The SDS-PAGE analysis showed a major band
 342 corresponding to the expected molecular mass of 12G4Fm (28
 343 054 Da) already highly purified (more than 80% purity) after
 344 only the first IMAC step (Fig. 2B). Then, we loaded the pooled
 345 fractions of 12G4Fm on a preparative size exclusion column
 346 (Hiload 26/60 Superdex 200). Again, we obtained a massive
 347 peak of 12G4Fm at the correct size according to the calibration
 348 of the column with the protein markers in the same denaturing
 349 buffer used for 12G4Fm (Fig. 2C). We pooled the more con-
 350 centrated fractions and considered that the result was a highly
 351 purified form of unfolded 12G4Fm. Finally, we obtained about
 352

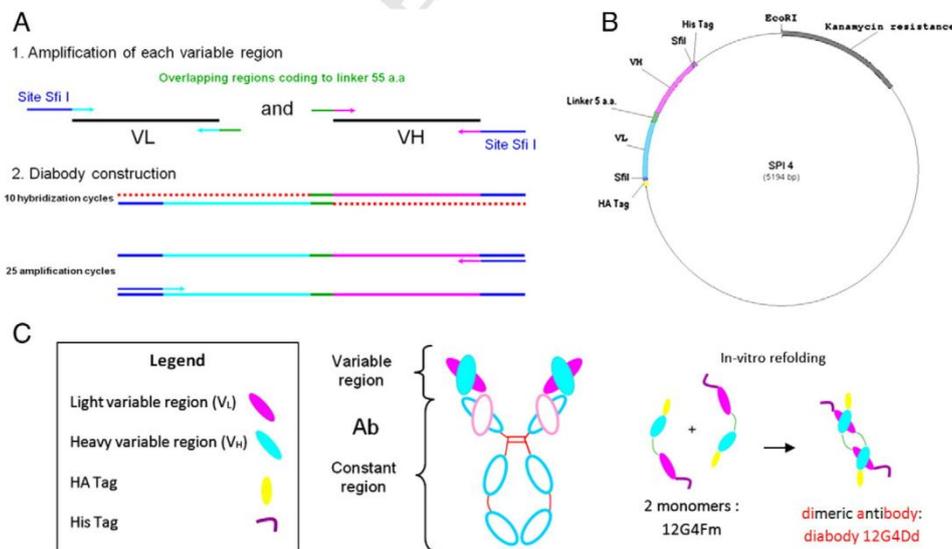


Fig. 1. Construction of diabody 12G4. (A) Details of the diabody 12G4 gene construction. (B) SPI 4.0 prokaryotic vector with kanamycin resistance for the expression of the inclusion body of the diabody fragment, showing an HA tag at the N-terminus for immunoassay, variable light and variable heavy chain DNA (VL and VH), a linker sequence of five amino acids between the VL and VH chains, and a histidine tag at the C-terminus for purification (C) Schematic representation of an entire antibody and engineered diabody fragments.

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

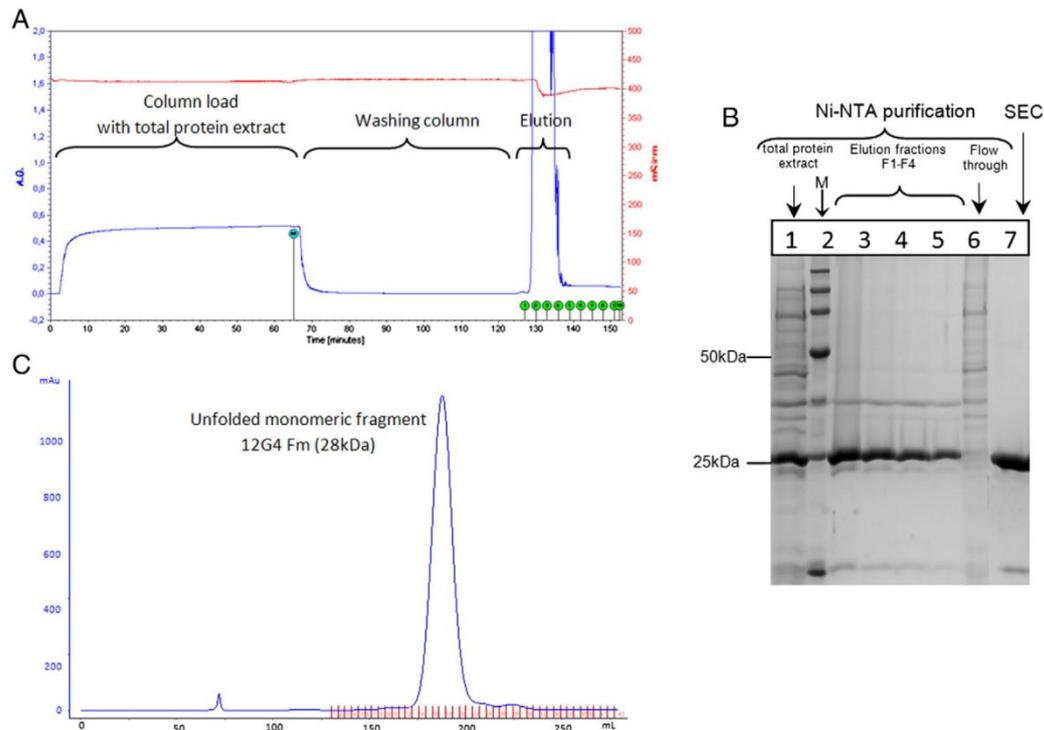


Fig. 2. Purification of the monomeric format 12G4 after resolubilization of inclusion bodies. (A) IMAC profile of His-tagged monomer 12G4Fm. (B) SDS-PAGE, total protein extract (line 1), Perfect Protein™ marker (line 2), monomeric format 12G4 after IMAC (lines 3–5) and purified monomeric format 12G4 by SEC purification (line 8). (C) SEC elution profile of the pool of IMAC elution fractions (F1–F4).

353 80 mg of 12G4Fm per liter of bacterial culture as quantified by
354 BCA assay (data not shown).

355 3.2. Refolding optimization

356 Now able to produce a large quantity of purified 12G4Fm
357 rapidly, we optimized the renaturation step to produce func-
358 tional 12G4Db. To evaluate the most efficient renaturation
359 protocol, we developed a new immunoassay to quantify func-
360 tional 12G4Db, on the same principle as the immunoassays
361 previously used in our laboratory (Boquet et al., 2000)
362 (Padiolleau-Lefevre et al., 2007).

363 3.2.1. Functional ELISA

364 We developed a new immunoassay (functional assay)
365 (Fig. 3A) to demonstrate the functionality of 12G4Db and, of
366 course, of the 12G4 mAb by the binding of the biotinylated
367 epitopic peptide WNLTQDRAQVEMQGS, named pAMHR-biot,
368 described by Salhi et al. (2004). Colorimetric detection in both
369 assays was achieved by the addition of streptavidin-peroxidase
370 conjugate. We optimized the quantities of reagents to enable
371 colorimetric detection at 450 nm in 30 min. For the functional
372 assay, with a 1/20,000 dilution of streptavidin-peroxidase
373 conjugate, the highest signal was obtained with an epitopic
374 pAMHR-biot peptide concentration of 0.10 ng/mL (Fig. 3B). To

375 quantify the total 12G4 diabody present after each renaturation
376 protocol, the samples were subjected to denaturing SDS-PAGE
377 and 28 kDa band intensity was scanned (data not shown). The
378 relative quantities of functional 12G4Db obtained from the
379 functional immunoassay were normalized to take into account
380 the amount of total 12G4 diabody.

381 3.2.2. Renaturation protocols

382 To optimize the renaturation of 12G4Db, we defined
383 different dialysis buffers assuming that hydrophobic strength
384 drives the renaturation process. To study the influence of
385 disulfide bonds in the correct refolding of the 12G4Db, we used
386 13 sets of renaturation conditions, named A to M (see Fig. 4A).
387 In conditions B, D, F, H, J and L (letter in bold in Fig. 4A), the
388 final buffer always contained redox reagents, i.e. addition of
389 glutathione in oxidized (0.75 mM) and reduced (7.5 mM)
390 forms (redox conditions). In conditions A, C, E, G, I and K
391 there was no reducing agent in the final buffer, unlike M, which
392 had 5 mM DTT in all dialysis steps. Conditions A to F differed
393 only by addition of redox conditions at different steps of
394 dialysis. E was similar to the renaturation protocol previously
395 described by Asano et al. (2002), with no reducing agent in 4 M
396 and 2 M Gu-HCl buffers and then addition of redox conditions
397 in 1 M and 0.5 M Gu-HCl buffers so that finally there was no
398 reducing agent in the final buffer. Conditions G to M differed

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

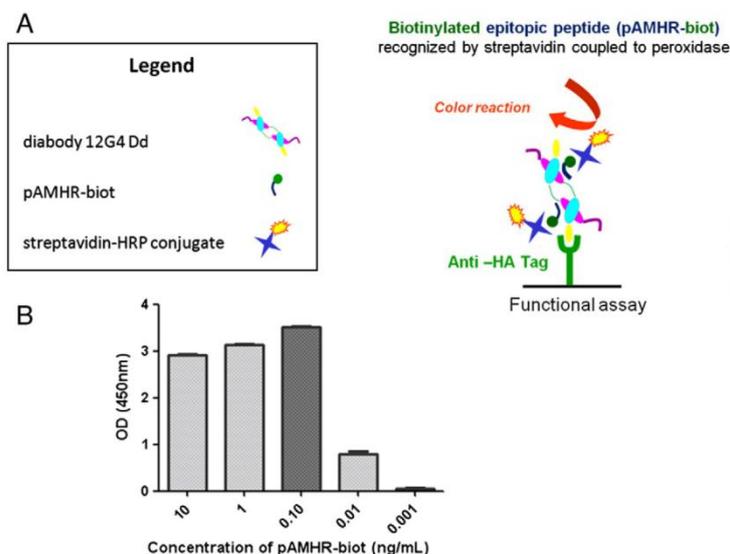


Fig. 3. (A) Diagrammatic representation of the immunoassay: diabody functionality is measured using biotinylated epitopic peptide revealed with streptavidin-peroxidase conjugate. (B) Functional assay optimization of colorimetric detection in 30 min: adjustment of epitopic peptide concentration (pAMHR-biot): dilution factor of streptavidin-peroxidase conjugate is fixed 1/20,000 (as recommended by the supplier). Histogram shows the measurement of OD at 450 nm according to the concentration of pAMHR-biot.

399 from conditions A to F by the presence or not of 5 mM DTT in
400 the dialysis buffer. The effects of the different renaturation
401 conditions on the functionality of 12G4Db were measured
402 using the functional immunoassay described in this article.

403 The results are summarized in Fig. 4B. Clearly, there was a
404 dramatic effect of the presence of 5 mM DTT at the beginning of
405 dialysis on the functionality of 12G4Db. The best conditions, G
406 and H, were very similar in their buffer composition in that a
407 reducing agent was present throughout dialysis, except in the
408 final buffer, where G had no reducing agent and H had redox
409 conditions, to produce 90% and 100%, respectively, functional
410 12G4Db. We also noted a constant improvement of the
411 functionality of the 12G4Db from conditions A to H, starting
412 at 20% and finishing at 100%. Condition E produced about 70%
413 of active 12G4Db. We obtained 40% functionality in conditions I
414 and J, 20% in condition L and only about 10% with the K and M
415 renaturation protocols. Finally, we selected condition H as the
416 best for renaturing 12G4Db.

417 3.3. Expression, purification and functionality of 12G4 418 dimeric diabody

419 After optimization of the 12G4Db renaturation protocol, we
420 produced large quantities of the diabody. Fig. 5A summarizes the
421 complete process of expression and purification of 12G4Db from
422 one liter of bacterial culture and 3 h of expression induction by
423 1 mM IPTG. After the steps of IMAC purification and use of the
424 preparative Superdex 200 column before renaturation, we
425 obtained 80 mg of 12G4Fm. Following the renaturation process,
426 we isolated the soluble 12G4Db (MW 56 kDa) from aggregates
427 or 12G4Fm (MW 28 kDa), using a final preparative Superdex
428 200 column Fig. 5B. The 12G4Db-containing fractions were

429 pooled and concentrated by ultrafiltration with a MWCO 10,000
430 membrane and 100 μ L was loaded on an analytical Superdex 75
431 column (inset Fig. 5B) calibrated with calibration standards as
432 conalbumin (MW 75 kDa), ovalbumin (MW 44 kDa), carbonic
433 anhydrase (MW 29 kDa) and ribonuclease. As expected, we
434 observed a single peak (continuous line) at about 58 kDa
435 corresponding to the 12G4Db. Finally, we obtained 20 mg of
436 12G4Db from one liter of bacterial culture. The functionality of
437 the diabody was first evaluated using the immunoassays and we
438 confirmed the relative value near of 100% as previously obtained
439 for renaturation condition H in Fig. 4B.

440 In a second functional approach, we used flow cytometry to
441 compare 12G4 mAb and 12G4Db binding to COV 434 over-
442 expressing the hAMHR II receptor. As shown in Fig. 6A, the
443 12G4 mAb (thick black line) caused a clear shift in fluorescence
444 intensity, MFI greater than 35 in FL1 Fig. 6C, compared with the
445 MFI of 5 (Fig. 6C) for the negative control i.e. COV 434 hAMHR II
446 cell incubated with an anti-mouse IgG-alexa 488 conjugate
447 (thin continuous line Fig. 6A). The specificity of interaction was
448 demonstrated by the shift of the 12G4 mAb labeling peak with
449 an excess of epitopic peptide pAMHR-biot (dotted line curve),
450 attested by an MFI value of 9 Fig. 6C. Interestingly, we obtained
451 the same results with 12G4Db Fig. 6B (same representation
452 curves) with very similar MFI values (Fig. 6C), underscoring the
453 full functionality of this recombinant antibody.

454 4. Discussion

455 Antibodies are of great interest in the search for development
456 of treatments for numerous diseases, as attested by the large
457 number of clinical trials using therapeutic monoclonal anti-
458 bodies (Beck et al., 2010). In parallel, many new recombinant

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

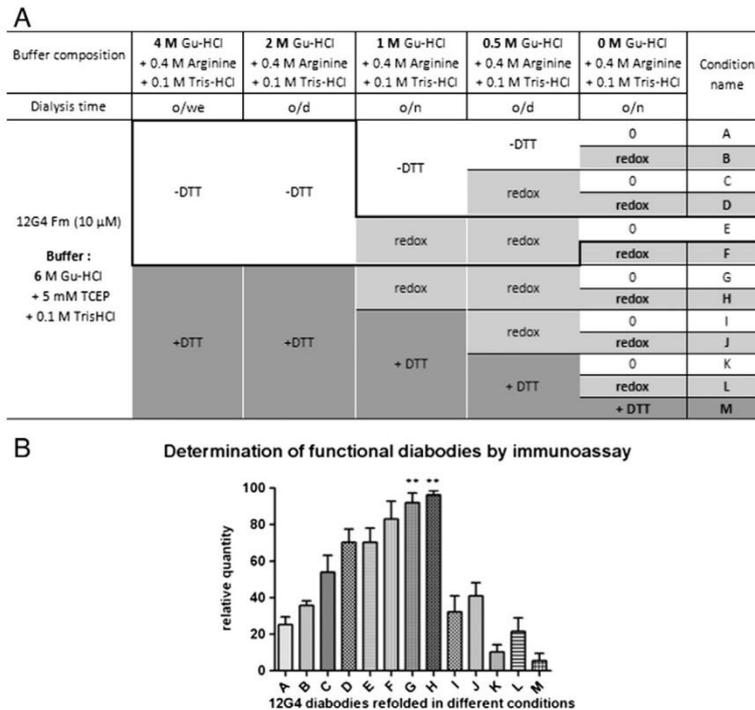


Fig. 4. Refolding optimization. (A) The table summarizes the reducing conditions of refolding. (B) Analysis of the functionality by immunoassay of refolded diabodies in the various conditions: relative quantity of functional diabody 12G4 shown as a percentage compared with the maximum functionality, 100% corresponds to condition H (**ANOVA test, $p < 0.05$: significant refolding improvement according to reference condition (E).

459 antibody formats as single-chain variable fragments (scFv),
 460 bivalent or bispecific diabodies, minibodies... are emerging
 461 for both therapeutic and diagnostic applications (Bes et al.,
 462 2006; Chen et al., 2006; Olafsen and Wu, 2010) Kaur et al.,
 463 2012). Diabodies, the smaller bivalent recombinant antibody
 464 format (about 50 kDa), represent an important class of these
 465 engineered molecules (Di Tommaso et al., 2012b; Asano et al.,
 466 2012). Moreover, due to their pharmacokinetic properties and
 467 fast clearing, without compromising affinity and specificity,
 468 diabodies are particularly well adapted for *in vivo* imaging
 469 (Olafsen et al., 2012). Nevertheless, the expression of this
 470 unnatural antibody format is a challenge and to produce large
 471 quantities of correctly refolded and functional diabodies is labo-
 472 rious and time-consuming. Several studies describe expression
 473 systems such as eukaryotic cells, yeast, or periplasmic or cyto-
 474 plasmic expression in bacteria, with expression ranging from μg
 475 to mg of diabody produced per liter of culture (Miller et al.,
 476 2012). We have also experimented with prokaryotic systems to
 477 express recombinant antibody fragments, as single-chain vari-
 478 able fragments (Padiolleau-Lefevre et al., 2007) and finally
 479 selected cytoplasmic expression in *E. coli* and the stepwise
 480 refolding protocol for our scFv (Tsumoto et al., 2010). This
 481 approach allowed us to produce large quantities of fully
 482 functional SAF34 scFv, an antibody directed against cellular
 483 prion protein, with therapeutic properties identical to those of

SAF34 Fab (Padiolleau-Lefevre et al., 2007). Nevertheless, some
 484 recombinant antibody fragments were poorly refolded and
 485 consequently exhibited low functionality. A further difficulty
 486 involving diabody refolding compared with scFv is correct
 487 assembly of the homodimer. Knowing that intramolecular inter-
 488 actions are essential in the first steps of the protein refolding
 489 process (Umetsu et al., 2003), we propose here a new way to
 490 explore several renaturation conditions favoring either the
 491 molecular interactions or the establishment of disulfide bridges
 492 in order to optimize the refolding and stabilization of each re-
 493 combinant antibody. In only 3 h of induction of *E. coli* expression,
 494 we were able to produce after purification 80 mg per liter of
 495 12G4Fm, underlining the performance and low cost of this
 496 expression system. For the refolding of 12G4Db, we can
 497 conclude that the crucial refolding step is the dialysis against
 498 1 M Gu-HCl. We obtained the best refolding with conditions G and
 499 H, for which the redox reagents are added to 1 M Gu-HCl. We
 500 can hypothesize that, at this concentration of denaturing
 501 reagent, several intramolecular interactions are permitted and
 502 the shuffling of disulfide bonds is crucial to stabilize the 12G4Db
 503 in its correct conformation. It is very interesting to note that
 504 in the best renaturation conditions (G and H), the 4 M and 2 M
 505 Gu-HCl dialysis buffers contain 5 mM DTT, thus preventing
 506 formation of disulfide bridges. To summarize, our optimized
 507 refolding (condition H) yields 20 mg of functional 12G4Db. To
 508

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

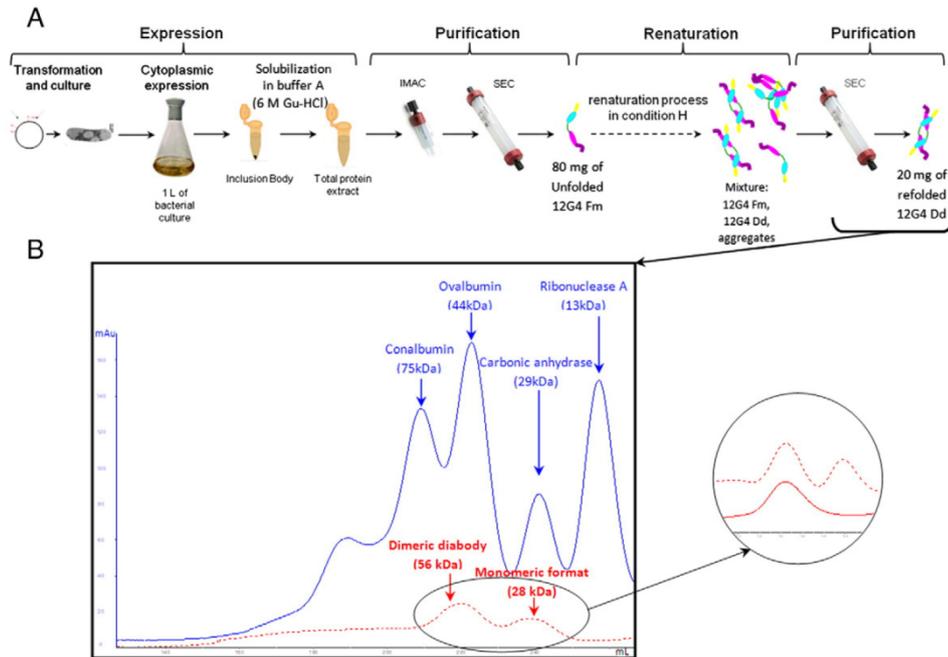


Fig. 5. (A) Summary of the complete process of 12G4Db expression and purification. (B) SEC elution profile of the diabody 12G4 (dotted line) in relation to the known standards (continuous line) of conalbumin (75 kDa), ovalbumin (44 kDa) and carbonic anhydrase (30 kDa). The diabody eluted 110 and 120 min after injection into the column as expected for a 56 kDa dimeric diabody and 28 kDa monomeric format, respectively. The insert shows analytical SEC elution profile of total refolded diabody 12G4 (dotted line) and the dimeric diabody 12G4 purified by preparative SEC (continuous line).

our knowledge, this is one of the larger amounts described in the literature (Takemura et al., 2000; Hayashi et al., 2004), and much above the periplasmic diabody expression described in recent articles (Holliger et al., 1999; di Tommaso et al., 2012a). Nevertheless, G and H refolding cannot be extended to all diabodies. We refolded SHA31Db, derived from the SHA31 mAb directed against prion protein (Féraudet et al., 2005), using all renaturation protocols and the best condition is F (no DTT in 4 M and 2 M Gu-HCl dialysis buffers), then redox reagent added to 1 M Gu-HCl until the last dialysis. This differs from the conditions for 12G4Db, underlining that is necessary to explore all these conditions to find the best conditions for each diabody. In this manner, we produced several tens of mg of soluble and functional diabodies derived from different mAbs.

To explore all refolding conditions quickly, we need a fast functional assay. We therefore developed a functional immunoassay for 12G4Db. Functional 12G4Db was revealed by binding of the biotinylated epitopic peptide pAMHR-biot. This immunoassay is very specific as an irrelevant biotinylated peptide was not recognized at all by 12G4Db (data not shown). We normalized the 12G4Db functional signals to the total quantity of 12G4 diabody obtained from SDS-PAGE 28 kDa band intensity values. For the first time, we describe, in this article, a new immunoassay that demonstrates the functionality of different 12G4 recombinant antibody formats as scFv and diabody, and which is also useful with complete 12G4 mAb in

comparing, for example, the relative affinities of peptides derived from AMHR2 receptor with the pAMHR-biot peptide in a competition format.

The flow cytometry results are very promising for future *in vivo* experiments involving injection of labeled 12G4Db in nude mice xenografted with AMHR2-COV434 cells. With very similar concentrations of 12G4 mAb (1 μ M) and 12G4Db (2 μ M), we obtain very similar results in term of cell labeling, taking into account that two different secondary antibodies are added for labeling: an anti-mouse IgG-alexa 488 conjugate for the complete 12G4 mAb and an anti-HA-FITC antibody for 12G4Db. This means that after purification the quantity of functional 12G4Db is comparable to that of functional 12G4 mAb, which validates the expression strategy. More remarkable still is the result obtained with the peptide competition experiment. We observed a similar shift for the 12G4 mAb and the 12G4 diabody. This important observation underlines the fact that the variable regions of 12G4 mAb and 12G4 diabody behave identically in the peptide competition experiment, which strongly suggests that the structural conformation of the variable regions of the 12G4 diabody is right and identical to that of 12G4 mAb. Moreover, the size exclusion chromatography also indicates the right molecular weight for the 12G4. Taking these observations together, we are confident that renaturation condition H produces a fully functional well-structured 12G4 diabody.

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., J. Immunol. Methods (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

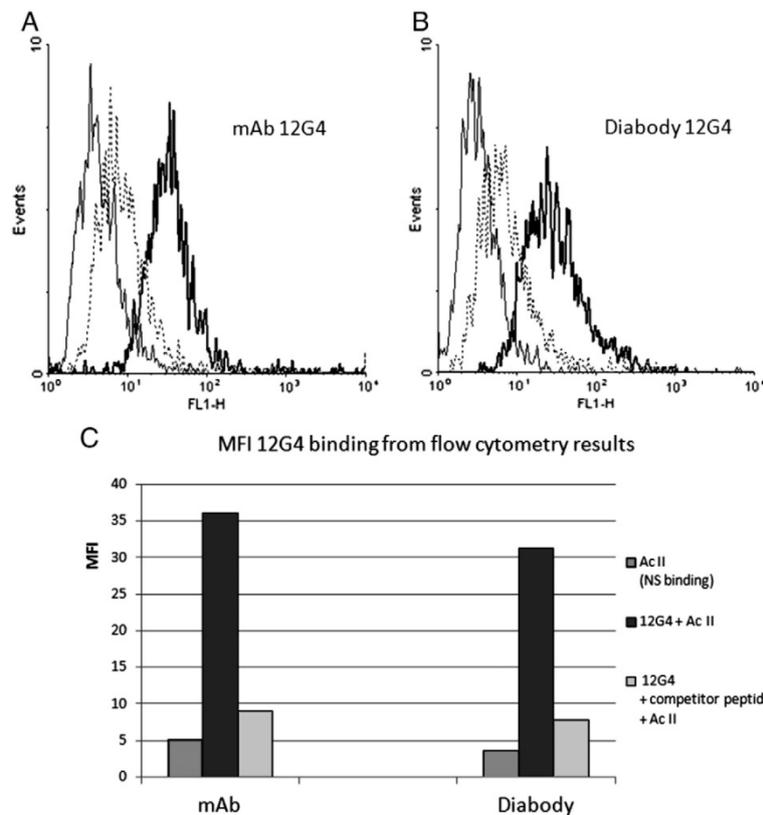


Fig. 6. Flow cytometry analysis of binding of various antibody 12G4 formats to COV 434 cells overexpressing membrane human AMH type II receptor. Continuous line = COV hAMHRII cells with secondary antibody alone to record background fluorescence (Alexa488 conjugated goat anti-mouse antibody for mAb 12G4 (A) or FITC-conjugated anti-HA for diabody (B)); dark line: cells incubated with antibody 12G4 ((A) mAb, (B) diabody) and secondary antibody; dotted line = cells incubated with antibody pre-incubated with epitopic peptide (pAMHR-biot) and secondary antibody (C) Histogram, geometric mean of flow cytometry fluorescent intensity (MFI); dark bar corresponds to mAb study, light gray bar corresponds to diabody 12G4 analysis.

561 In conclusion, a challenge for *in vivo* molecular imaging is to
562 produce size-adapted antibody tracers for a cost compatible
563 with diagnostic use in human subjects. We have clearly shown
564 that we are able to produce a very large quantity of functional
565 12G4 diabody in a prokaryotic expression system. We are
566 preparing other diabodies directed against relevant biomarkers
567 for cancer diagnosis, for which the same expression strategy
568 will be applied.

569 Supplementary data to this article can be found online at
570 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>.

571 Acknowledgments

572 We thank Patricia Lamourette, Karine Moreau and Marc
573 Plaisance for providing ascites of 12CA5 and poly His 22
574 antibodies. We also thank Dr. David Marsh for correcting the
575 manuscript. This work was supported by institutional funds
576 from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA, France) and
577 from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
578 Recherche (EA3515, Université Paris Diderot and Ecole Doctorale

ED 425, Université Paris Sud). We also thank France Alzheimer-
579 Union Nationale des Associations Alzheimer for a grant that
580 enabled acquisition of the AKTA purifier.
581

References

- 582
- 583 Abès, R., Teillaud, J.-L., 2011. Modulation of tumor immunity by therapeutic
584 monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 111.
- 585 Andersen, D.C., Reilly, D.E., 2004. Production technologies for monoclonal
586 antibodies and their fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 456.
- 587 Asano, R., Kudo, T., Makabe, K., Tsumoto, K., Kumagai, I., 2002. Antitumor
588 activity of interleukin-21 prepared by novel refolding procedure from
589 inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 528, 70.
- 590 Asano, R., Nakayama, M., Kawaguchi, H., Kubota, T., Nakanishi, T., Umetsu, M.,
591 Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., Kumagai, I., Asano, R.,
592 Nakayama, M., Kawaguchi, H., Kubota, T., Nakanishi, T., Umetsu, M.,
593 Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., Kumagai, I., 2012. Construction
594 and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a
595 refolding system, Construction and humanization of a functional bispecific
596 EGFR × CD16 diabody using a refolding system. *FEBS J.* 279, 223.
- 597 Bakkum-Gamez, J.N., Aletti, G., Lewis, K.A., Keeney, G.L., Thomas, B.M.,
598 Navarro-Teulon, I., Cliby, W.A., 2008. Müllerian inhibiting substance
599 type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by
600 gynecologic cancers. *Gynecol. Oncol.* 108, 141.

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., *J. Immunol. Methods* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

- 601 Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., Corvaia, N., 2010. Strategies and challenges for the
602 next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 345.
- 603 Berkmen, M., 2012. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia*
604 *coli*. *Protein Expr. Purif.* 82, 240.
- 605 Bes, C., Troadec, S., Chentouf, M., Breton, H., Dominique Lajoix, A., Heitz, F., Gross,
606 R., Pluckthun, A., Charzes, T., 2006. PIN-bodies: a new class of antibody-like
607 proteins with CD4 specificity derived from the protein inhibitor of neuronal
608 nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 334.
- 609 Boquet, D., Créminon, C., Clément, G., Frobert, Y., Nevers, M.-C., Essono, S.,
610 Grassi, J., 2000. Quantitative measurement of bitagged recombinant
611 proteins using an immunometric assay: application to an anti-substance
612 P recombinant antibody. *Anal. Biochem.* 284, 221.
- 613 Cai, W., Olafsen, T., Zhang, X., Cao, Q., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Wu, A.M.,
614 Chen, X., 2007. PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing
615 mice by use of an 18F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen
616 diabody. *J. Nucl. Med.* 48, 304.
- 617 Chen, L.H., Huang, Q., Wan, L., Zeng, L.Y., Li, S.F., Li, Y.P., Lu, X.F., Cheng, J.Q., 2006.
618 Expression, purification, and *in vitro* refolding of a humanized single-chain
619 Fv antibody against human CTLA4 (CD152). *Protein Expr. Purif.* 46, 495.
- 620 di Tommaso, A., Juste, M.O., Martin-Eauclaire, M.-F., Dimier-Poisson, I.,
621 Billiald, P., Aubrey, N., 2012a. Diabody mixture providing full protection
622 against experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus*
623 *australis* venom. *J. Biol. Chem.* 287, 14149.
- 624 Di Tommaso, A., Juste, M.O., Martin-Eauclaire, M.-F., Dimier-Poisson, I., Billiald,
625 P., Aubrey, N., 2012b. A diabody cocktail providing full protection against
626 experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus australis*
627 venom. *J. Biol. Chem.*
- 628 Essono, S., Clément, G., Padiolleau-Lefevre, S., Créminon, C., Grassi, J., Boquet, D.,
629 2010. Peptide mass-assisted antibody cloning strategy for accurate
630 characterization of potential therapeutic monoclonal antibodies against
631 neurodegenerative diseases. *Protein Eng. Des. Sel.* 23, 203.
- 632 Féraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Créminon, C., Vilette,
633 D., Lehmann, S., Grassi, J., 2005. Screening of 145 anti-PrP monoclonal
634 antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells.
635 *J. Biol. Chem.* 280, 11247.
- 636 Hayashi, H., Asano, R., Tsumoto, K., Katayose, Y., Suzuki, M., Unno, M., Kodama,
637 H., Takemura, S. ichi, Yoshida, H., Makabe, K., Imai, K., Matsuno, S.,
638 Kumagai, I., Kudo, T., 2004. A highly effective and stable bispecific diabody
639 for cancer immunotherapy: cure of xenografted tumors by bispecific
640 diabody and T-LAK cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 497.
- 641 Holliger, P., Manzke, O., Span, M., Hawkins, R., Fleischmann, B., Qinghua, L.,
642 Wolf, J., Diehl, V., Cochet, O., Winter, G., Bohlen, H., 1999. Carcinoembryonic
643 antigen (CEA)-specific T-cell activation in colon carcinoma induced by
644 anti-CD3 x anti-CEA bispecific diabodies and B7 x anti-CEA bispecific fusion
645 proteins. *Cancer Res.* 59, 2909.
- 646 Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Engineering
647 hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by
648 overlap extension. *Gene* 77, 61.
- 649 Hudson, P.J., Kortt, A.A., 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and
650 triabodies. *J. Immunol. Methods* 231, 177.
- 651 Humphreys, D.P., Glover, D.J., 2001. Therapeutic antibody production
652 technologies: molecules, applications, expression and purification.
653 *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 4, 172.
- 654 Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard,
655 H.R., Pluckthun, A., 1997. Reliable cloning of functional antibody variable
656 domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a
657 reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods* 201, 35.
- 658 Miller, J., Doss, M., McQuillen, R., Shaller, C.C., Tolner, B., Yu, J.Q., Chester, K.,
659 Robison, M.K., 2012. Impact of expression system on the function of
660 C6.5 diabody PET radiotracer. *Tumor Biol.*
- 661 Olafsen, T., Wu, A.M., 2010. Antibody vectors for imaging. *Semin. Nucl. Med.*
662 40, 167.
- 663 Olafsen, T., Sirk, S.J., Olma, S., Shen, C.K.-F., Wu, A.M., 2012. ImmunoPET using
664 engineered antibody fragments: fluorine-18 labeled diabodies for same-day
665 imaging. *Tumor Biol.*
- 666 Padiolleau-Lefevre, S., Alexandrenne, C., Dkhis, F., Clement, G., Essono, S.,
667 Blache, C., Couraud, J.-Y., Wijkhuisen, A., Boquet, D., 2007. Expression
668 and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high
669 affinity than Fab and whole antibody: Implications for therapeutic use in
670 prion diseases. *Mol. Immunol.* 44, 1888.
- 671 Pepinsky, R.B., 1991. Selective precipitation of proteins from guanidine
672 hydrochloride-containing solutions with ethanol. *Anal. Biochem.* 195, 177.
- 673 Salhi, I., Cambon-Roques, S., Lamarre, L., Laune, D., Molina, F., Pugnère, M.,
674 Pourquier, D., Gutowski, M., Picard, J.-Y., Xavier, F., Pèlerin, A.,
675 Navarro-Teulon, L., 2004. The anti-Müllerian hormone type II receptor:
676 insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody
677 and the natural ligand. *Biochem. J.* 379, 785.
- 678 Takemura, S. ichi, Asano, R., Tsumoto, K., Ebara, S., Sakurai, N., Katayose, Y.,
679 Kodama, H., Yoshida, H., Suzuki, M., Imai, K., Matsuno, S., Kudo, T.,
680 Kumagai, I., 2000. Construction of a diabody (small recombinant bispecific
681 antibody) using a refolding system. *Protein Eng. Des. Sel.* 13, 583.
- 682 Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T., Kumagai, I., 1998.
683 Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from
684 inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction
685 of oxidizing reagent—application to a human single-chain Fv fragment.
686 *J. Immunol. Methods* 219, 119.
- 687 Tsumoto, K., Arakawa, T., Chen, L., 2010. Step-wise refolding of recombinant
688 proteins. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 285.
- 689 Umetsu, M., Tsumoto, K., Hara, M., Ashish, K., Goda, S., Adschiri, T., Kumagai, I.,
690 2003. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded
691 proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly
692 efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J. Biol. Chem.* 278, 8979.
- 693 Wu, A.M., 2009. Antibodies and antimatter: the resurgence of immuno-PET.
694 *J. Nucl. Med.* 50, 2.

Please cite this article as: Ortega, C., et al., High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for ..., *J. Immunol. Methods* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.003>

Résumé

Le pronostic de certains cancers s'est considérablement amélioré avec l'arrivée sur le marché des anticorps thérapeutiques. Devant l'essor de ces nouveaux médicaments associé à l'identification de nouveaux biomarqueurs, de nouvelles perspectives émergent pour l'imagerie moléculaire in vivo. En effet, disposer de nouveaux traceurs moléculaires spécifiques de ces biomarqueurs permettra de caractériser l'hétérogénéité des cellules cancéreuses, de suivre l'expression de ces marqueurs au cours de l'évolution de la tumeur, mais également de suivre l'efficacité d'un traitement sur la régression tumorale du patient. Pour répondre à cette évolution de diagnostic moléculaire in vivo, il convient de développer de nouvelles sondes moléculaires. L'objectif de ma thèse répond à ce nouveau besoin avec l'ingénierie et le marquage d'un format d'anticorps recombinant adapté à l'imagerie in vivo : le diabody 12G4 dirigé contre le récepteur de l'hormone antimüllérienne (AMH), marqueur de certains cancers de la sphère génitale.

Mots clés : Anticorps, cancer, diagnostic, imagerie *in vivo*, récepteur à l'hormone antimüllérienne, diabody, expression, renaturation, marquage.

LABORATOIRE D'INGENIERIE DES ANTICORPS POUR LA SANTE (LIAS),
SERVICE DE PHARMACOLOGIE ET D'IMMUNOANALYSE (SPI),
INSTITUT DE BIOLOGIE ET TECHNOLOGIE DE SACLAY (iBiTec-S)
CEA-Saclay Bât 152
91 191 Gif-sur-Yvette

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex