

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE**

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

Audrey STOESSEL

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**TITRE : Sélection et ingénierie de fragments d'anticorps pour des
applications de thérapie du cancer et de diagnostic.**

soutenu le 12/12/2012 devant le jury suivant :

Catherine PAUL – Présidente

Renaud WAGNER – Examinateur

Mustapha OULAD-ABDELGHANI – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Etienne WEISS (etienne.weiss@unistra.fr)

Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg

Directeur : Jean-Luc GALZI

ESBS-IREBS-UMR 7242

Boulevard Sébastien Brant

67412 ILLKIRCH CEDEX

et de

Flore RENAUD-PAITRA (flore.renaud@uvsq.fr)

Laboratoire de Génétique et de biologie moléculaire

Directeur : Bernard MIGNOTTE

UMR 8159-CNRS/UVSQ/EPHE

Université de Versailles Saint-Quentin
45 Avenue des Etats-Unis

78035 VERSAILLE CEDEX

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCE DE LA VIE ET DE LA TERRE

SÉLECTION ET INGIÉNIERIE DE FRAGMENTS D'ANTICORPS POUR
DES APPLICATIONS DE THÉRAPIE DU CANCER ET DE DIAGNOSTIC

Audrey STOESSEL

Date de soutenance : 12/12/2012

RÉSUMÉ :

Les anticorps sont de plus en plus des outils incontournables aussi bien en recherche qu'en thérapie. De nombreux anticorps monoclonaux sont actuellement utilisés pour le traitement de diverses maladies. Afin de réduire leur immunogénicité, des recherches sont menées pour développer des anticorps humains. Cependant ces molécules ne peuvent intervenir de par leur taille qu'au niveau extracellulaire. Or les protéines responsables des dérèglements cellulaires, engendrant des maladies telles que le cancer, sont souvent intracellulaires. C'est pourquoi plusieurs équipes s'intéressent au développement des fragments d'anticorps, dont le format scFv est le plus étudié. Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps construit et validé une banque de scFv de 1,5 milliards de clones présentée à la surface de phages. L'avantage de notre banque est qu'elle a été construite à partir de la charpente d'un scFv soluble et actif dans un contexte intracellulaire et dont nous n'avons muté que les boucles CDR3. Nous avons ensuite décidé d'appliquer notre banque, dans un premier temps, à la sélection par phage display de scFv dirigés contre deux oncoprotéines, la protéine virale E6 et la protéine humaine gankyrine, impliquées respectivement dans le cancer du col de l'utérus et dans le cancer du foie. Dans un deuxième temps nous avons, dans le cadre d'une collaboration avec une société privée, tenté d'isoler des scFv dirigés contre des anticorps de lapin, afin d'utiliser nos molécules comme outils de diagnostic et de biologie moléculaire. Nos sélections nous ont permis d'isoler des molécules spécifiques de leurs cibles, solubles et actives dans un contexte intracellulaire, mais ayant une affinité trop faible pour perturber les interactions cellulaires naturelles.

Mots clés : scFv, phage display, cancer, E6, gankyrine, diagnostic, anticorps de lapin

INTRODUCTION GENERALE

1. <u>L'immunociblage.</u>	9
1.1. Les outils d'immunociblage	9
1.1.1. Les anticorps	9
1.1.1.1. Généralités	9
1.1.1.2. Les anticorps monoclonaux	11
1.1.1.3. Vers une humanisation des anticorps	12
1.1.2. Les fragments d'anticorps	14
1.1.2.1. Les fragments d'anticorps naturels	15
1.1.2.2. Les fragments d'anticorps recombinants	15
1.2. Intérêts de l'immunociblage par des fragments d'anticorps recombinants	19
1.2.1. Limites à l'utilisation des anticorps monoclonaux	19
1.2.2. Intérêt des fragments d'anticorps recombinants	20
1.2.3. Le cas des intracorps	22
1.2.3.1. Mode d'action des intracorps	23
1.2.3.2. Applications thérapeutiques des intracorps	23
1.2.3.3. Limites et améliorations des intracorps	24
2. <u>Sélection et expression de fragments d'anticorps recombinants.</u>	26
2.1. Les banques de fragments d'anticorps recombinants	26
2.1.1. Les banques naïves	26
2.1.2. Les banques immunisées	27
2.1.3. Les banques synthétiques et semi-synthétiques	27
2.2. Méthodes de sélection d'anticorps recombinants	28
2.2.1. Le « ribosome display »	28
2.2.2. Le « yeast display »	29
2.2.3. Le « phage display »	29
2.2.3.1. Le phage M13	30
2.2.3.2. La présentation du fragment d'anticorps	30
2.2.3.3. La présentation de l'antigène	31
2.2.3.4. La sélection	32
2.3. Systèmes d'expression d'anticorps recombinants	33
2.3.1. Expression bactérienne	33
2.3.2. Expression dans des cellules de mammifères	34
2.3.3. Autres systèmes d'expression	34
3. <u>Présentation du projet de recherche.</u>	35

ANNEXES

Annexe 2 : Article 1 : Stoessel, A., Philibert, P., Wang, W., Sibler, A.-P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J. G., Courtête, J., Weiss, E., and Martineau, P. (2007) A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnology*, 7(1), p.81.

Annexe 3 : Article 2 : Desplancq, D., Rinaldi, A.-S., Stoessel, A., Sibler, A.-P., Busso, D., Oulad-Abdelghani, M., Van Regenmortel, M. H., and Weiss, E. (2011). Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for *in vitro* protein detection. *Journal of Immunological Methods*, 369(1-2), p.42-50.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV : *adeno-associated virus*
ADN : *acide désoxyribonucléique*
ADNc : *ADN complémentaire*
ARN : *acide ribonucléique*
ARNm : *ARN messenger*
AntP : *facteur de transcription antennapedia*
BSA : *bovine serum albumin*
CAT : *chloramphenicol acetyl-transferase*
CDR : *complementary determining region*
CHC : *carcinome hépatocellulaire*
CHO : *chinese hamster ovary*
CRAb : *chelating recombinant antibody*
DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*
EDTA : *éthylène diamine tétraacétique*
EGFP : *enhanced green fluorescent protein*
EGFR : *epidermal growth factor receptor*
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
FACS : *fluorescence-activated cell sorting*
FCS : *foetal calf serum*
GFPuv : *green fluorescent protein*
GST : *glutathion S-transferase*
HACA : *human anti-chimeric antibody*
HAMA : *human anti-mouse antibody*
HPV : *human papilloma virus*
HRP : *horse radish peroxydase*
HSV : *herpes simplex virus*
Ig : *immunoglobuline*
IPTG : *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*
mAb : *monoclonal antibody*

MBP : maltose binding protein
mdm2 : murine double minute 2
NAR : new antigen receptor
NES : nuclear export signal
NF-kB : nuclear factor-kappa B
NLS : nuclear localisation signal
PARP : Poly ADP Ribose Polymerase
PBS : phosphate buffered saline
PBS-B : PBS contenant 3% de BSA
PBS-F : PBS contenant 10% FCS
PBS-M : PBS contenant 5% de lait
PBS-T : PBS contenant 0,1% de Tween 20
PCR : polymerase chain reaction
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PTD : protein transduction domain
RMN : résonance magnétique nucléaire
RT : température ambiante
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
S407 : sérum 407
SDS-PAGE : sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
scDb : single chain diabody
scFv : single chain Fv
siRNA : silencing RNA
SIT : suicide intrabody technology
taFv : tandem scFv fragment
TAT : trans-activator of transcription
TBS : tris buffered saline
TNF α : tumor necrosis factor α
VEGF : vascular endothelial growth factor
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. L'immunociblage.

1.1. Les outils d'immunociblage.

1.1.1. Les anticorps.

1.1.1.1. Généralités.

Le terme anticorps a été utilisé pour la première fois en 1891 par Paul Ehrlich dans la conclusion de son article intitulé « Experimental Studies on Immunity » dans lequel il stipule que si deux substances engendrent deux « antikörper » différents, elles doivent elles-mêmes être différentes.

Aujourd'hui les anticorps, ou Immunoglobulines (Ig), sont définis comme une classe de protéines sériques induites par un contact avec une molécule étrangère, l'antigène, et qui se lie spécifiquement à l'antigène qui a engendré sa synthèse. Les Ig sont ainsi les molécules de défense de l'organisme.

Les Ig sont constituées de 4 chaînes polypeptidiques : deux chaînes légères (L) identiques et deux chaînes lourdes (H) identiques. L'ensemble est stabilisé par des ponts disulfures intra- et inter-chaîne.

Chez l'homme, les Ig se divisent en 5 classes (ou isotypes) : les Ig M, G, A, E et D qui sont définies par leur type de chaîne lourde : m, g, a, e, et d respectivement. Les chaînes légères quant à elles peuvent être de type k ou l.

- **Les immunoglobulines de type M** sont organisées en pentamères d'un poids moléculaire de 970 kDa. Leurs chaînes lourdes de type m possèdent 5 domaines. Le pentamère est stabilisé par la présence de ponts disulfures et d'une chaîne polypeptidique de 20 kDa appelée chaîne J. Ce sont les premières immunoglobulines produites lors de la réponse immunitaire primaire. De plus elles sont capables de fixer et d'activer le complément.

- **Les immunoglobulines de type A** sont des molécules monomériques d'un poids moléculaire de 160 kDa ou dimériques. Leurs chaînes lourdes de type a1 ou a2 possèdent 4 domaines. Les immunoglobulines de types A1 et A2 diffèrent par leur nombre de ponts disulfures. La forme monomérique est sérique alors que la forme dimérique est sécrétée. Celle-ci est stabilisée par la présence d'une chaîne J mais aussi d'une pièce sécrétoire de 60 kDa qui intervient en protégeant les anticorps contre l'action d'enzyme protéolytiques. Elles sont essentiellement sécrétées au niveau des muqueuses afin de protéger celles-ci contre les pathogènes.

- **Les immunoglobulines de type D** sont des molécules monomériques d'un poids moléculaire de 175 kDa. Leurs chaînes lourdes de type d possèdent 4 domaines. Elles sont essentiellement présentes à la surface des cellules B.

- **Les immunoglobulines de type E** sont des molécules monomériques d'un poids moléculaire de 190 kDa. Leurs chaînes lourdes possèdent 5 domaines et sont de type e. Leur rôle premier est la lutte antiparasitaire, cependant elles interviennent également dans les réactions de type allergie.

- **Les immunoglobulines de type G** forment la classe prédominante des immunoglobulines. Elles sont aussi les plus petites avec un poids moléculaire de 150 kDa. Leurs chaînes lourdes possèdent 4 domaines. Les immunoglobulines de type G sont subdivisées en quatre sous classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 en fonction de leur type de chaîne lourde (g1, g2, g3 et g4 respectivement). Ces quatre sous-classes se différencient notamment par le nombre et la position des ponts disulfures. Les IgG interviennent principalement dans la réponse immunitaire secondaire et sont capables, à l'exception des IgG4, de fixer et d'activer le complément.

Chaque chaîne lourde et chaque chaîne légère est composée de deux régions, une région constante et une variable. La chaîne lourde est constituée d'un domaine variable et de 3 domaines constants pour les Ig G, A et D ou de 4 domaines constants pour les Ig E et M. La chaîne légère est formée d'un domaine variable et d'un domaine constant. L'association des domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère, appelée Fv, est responsable de la spécificité de reconnaissance de l'antigène. L'association des chaînes lourdes par leurs domaines constants 2 et 3 (et 4 pour les Ig E et M) forme la région Fc. Chaque domaine variable contient 3 boucles hypervariables CDR (complementary determining region) nommées CDR1, CDR2 et CDR3. L'association de 6 boucles CDR va constituer le site de liaison à l'antigène appelé paratope. Celui-ci reconnaît une portion de l'antigène natif que l'on nomme épitope. Chaque molécule d'anticorps comprend 2 chaînes lourdes et deux chaînes légères, ils contiennent donc 2 sites de liaison à l'antigène identiques et sont dits bivalents

1.1.1.2. Les anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux sont par définition des anticorps tous identiques produits par la mise en culture d'un hybridome résultant de la fusion d'un lymphocyte, cellule sécrétrice d'anticorps et d'une cellule de myélome immortelle. Les anticorps issus d'un même hybridome seront donc tous capables de reconnaître le même antigène.

C'est en 1975 que Köhler et Milstein ont décrit pour la première fois une méthode permettant de produire de tels anticorps. En effet ils ont montré que l'hybride issu de la fusion de 2 cellules productrices d'anticorps était capable de sécréter les anticorps initialement produits par les 2 types cellulaires parentaux. Ils ont ainsi révolutionné l'utilisation des anticorps monoclonaux en tant qu'outils immunologiques. Très vite de nombreuses applications ont vu le jour pour ce type d'anticorps (Kennett, 1979 ; Yelton and Scharff, 1981) :

- Pour l'étude de la génétique humaine, par exemple, en tant que réactif pour le typage HLA ou pour la détection de différences polymorphiques
- Pour le diagnostic, la détection d'infection virale par exemple

- Comme outil de biologie moléculaire pour la purification d'antigènes spécifiques, pour le marquage de cellules

Les anticorps monoclonaux peuvent être produits en grande quantité et sont spécifiques d'un antigène donné. De plus ils sont continuellement disponibles et peuvent être marqués (Kennett, 1979).

C'est ainsi que l'intérêt des anticorps monoclonaux comme outil thérapeutique s'est développé. Le Muromonab-CD3, un anticorps murin anti-CD3, est utilisé depuis 1986 dans le traitement des rejets de greffe (Van Wauwe *et al*, 1980). Il est le premier anticorps monoclonal admis pour l'usage thérapeutique chez l'homme. Cependant il induit dans la plupart des cas une réponse immunitaire du patient contre l'anticorps murin ou réponse HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) (Urba *et al*, 1992 ; Kimball *et al*, 1995).

Bien que les anticorps monoclonaux murins soit un outil attrayant pour le traitement de nombreuses pathologies comme les rejets de greffe, ou encore le cancer et les maladies autoimmunes, la réponse HAMA reste un problème. De plus il a été montré que celle-ci interfère également avec l'imagerie tumorale et la thérapie radio-immunologique (Kuus-Reichel *et al*, 1994). Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, il est devenu possible de contourner la réponse HAMA par la modification des anticorps monoclonaux murins.

1.1.1.3. Vers une humanisation des anticorps.

Afin de réduire l'immunogénicité des anticorps monoclonaux murins, des travaux d'ingénierie génétique ont conduit à l'apparition de nouveaux types d'anticorps.

- **Les anticorps chimériques** : ils sont formés par l'association des domaines variables d'un anticorps monoclonal murin et des domaines constants d'un anticorps humains (Boulianne *et al*, 1984 ; Morrison *et al*, 1984). Ces anticorps chimériques sont à 70% humains ce qui les rend considérablement moins immunogènes chez l'homme et leur permet d'interagir avec les cellules effectrices et d'induire la cascade du complément via leur région Fc humaine. C'est ainsi qu'aujourd'hui plusieurs anticorps chimériques sont utilisés en thérapie chez l'homme. C'est le cas par exemple du Rituximab, un anti-CD20 utilisé dans le traitement du lymphome non-hodgkinien ou de l'Infliximab, un anti-TNF- α utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde chronique. Bien que l'immunogénicité de ce type d'anticorps soit réduite, certains peuvent entraîner une réponse HACA (Human Anti-Chimeric Antibody) dirigée contre les régions charpentes des domaines variables murins. En effet, alors qu'une étude a montré que moins de 1% des patients traités par du Rituximab développaient une réponse HACA (Davis *et al*, 2000), d'autres recherches ont révélé que près de 60% des patients traités par de l'Infliximab présentaient une telle réponse (Baert *et al*, 2003). Malgré les avantages des anticorps chimériques par rapport aux anticorps murins, la production d'anticorps humains anti-murins par le patient reste un problème.

- **Les anticorps humanisés**. Afin de réduire encore la proportion murine des anticorps chimériques tout en conservant son affinité et sa spécificité de liaison à l'antigène, une deuxième approche a été développée. L'interaction entre un anticorps et son antigène se faisant essentiellement via les boucles CDR, Jones et collaborateurs ont proposé en 1986 de greffer ces boucles hypervariables issues d'un anticorps

monoclonal murin sur une immunoglobuline G humaine (Jones et al. 1986). Cette modification est appelée « CDR grafting ». Ces anticorps dits humanisés sont humains de 85 à 90% et sont donc encore moins immunogènes que les anticorps chimériques. Il a en effet été montré dans une étude comparative d'un anticorps murin et de son dérivé humanisé, que ce dernier n'induisait aucune réponse immunitaire chez les patients (Rebello et al, 1999). Malgré le potentiel de tels anticorps en thérapie, Riechmann et collaborateurs ont montré dès 1988 qu'en utilisant le « CDR grafting » pour humaniser un anticorps monoclonal de rat (anti-Campath-I), l'anticorps résultant conservait sa spécificité de liaison mais avec une affinité plus faible. Ce n'est qu'en mutant un acide aminé de la région charpente adjacente à une des boucles CDR, qu'ils ont réussi à se rapprocher de l'affinité de l'anticorps de rat initial. D'autres groupes ont montré que les régions hypervariables seules n'étaient pas suffisantes pour obtenir des anticorps humanisés ayant une affinité comparable à l'anticorps murin parental, mais que la charpente de l'anticorps était impliquée dans la reconnaissance efficace de l'antigène (Queen et al, 1989 ; Gorman et al, 1991 ; Foote & Winter, 1992). À ce jour, les anticorps humanisés représentent la majorité des anticorps monoclonaux approuvés et utilisés en thérapie.

- **Les anticorps humains.** Plus récemment deux nouvelles techniques ont permis de s'affranchir totalement de la part murine des anticorps monoclonaux afin d'obtenir des anticorps monoclonaux totalement humains.

La première stratégie utilisée pour produire des anticorps monoclonaux totalement humains est la création de souris transgéniques ayant leurs gènes codant pour les Ig murines inactivés et comportant dans leur génome une grande partie des gènes d'Ig humaines. De telles souris, appelées « XenoMouse », sont capables de mimer le système immunitaire humoral humain et de produire une grande diversité d'anticorps monoclonaux humains de haute affinité. Cette technique a permis d'isoler des Ig reconnaissant de nombreux antigènes et notamment l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Jakobovits *et al*, 2007) qui a conduit à la commercialisation du Panitumumab, premier anticorps monoclonal humain produit chez une souris transgénique et approuvé pour la thérapie du carcinome métastatique colorectal.

La deuxième technique, décrite pour la première fois par McCafferty *et al* en 1990, consiste à présenter des fragments d'anticorps, issus de banques combinatoires, à la surface d'un phage filamenteux en fusion à une protéine de capsid du phage qui seront alors mis en présence de l'antigène d'intérêt *in vitro*. Les méthodes d'obtention de telles banques ainsi que les techniques de sélections des anticorps seront plus amplement décrites dans les paragraphes 2.1 et 2.2 respectivement. L'Adalimumab est le premier anticorps monoclonal totalement humain approuvé pour une utilisation thérapeutique obtenu par cette technique. C'est un anticorps anti-TNF- α utilisé dans la thérapie de l'arthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn (Taylor, 2003).

L'appellation des anticorps monoclonaux est régie par une nomenclature internationale qui réfère à son origine. Ainsi tout nom d'anticorps monoclonal porte le suffixe mAb (monoclonal Antibody) précédé des syllabes « mo », « xi », « zu » ou « mu » qui

concernent respectivement les anticorps de souris, chimériques, humanisés, ou humains.

1.1.2. Les fragments d'anticorps.

Dans le cadre de l'utilisation d'un anticorps pour ses capacités de liaison à un antigène uniquement, on peut envisager de se restreindre à des fragments de cet anticorps qui sont plus facilement manipulables. En effet il existe plusieurs applications, comme l'inactivation de cytokines, pour lesquelles les fonctions effectrices de la région Fc ne sont pas désirées. On distingue deux types de fragments d'anticorps : les fragments d'anticorps « naturels » obtenus par protéolysed'immunoglobulines purifiées et les fragments d'anticorps recombinants dont le gène a été modifié.

1.1.2.1. Les fragments d'anticorps naturels.

La papaïne et la pepsine sont deux enzymes protéolytiques qui clivent l'immunoglobuline en différents fragments caractéristiques.

L'hydrolyse d'une Ig par la papaïne conduit à la formation de 2 fragments Fab, constitué de l'association de la chaîne légère avec le domaine variable et un domaine constant de la chaîne lourde, identiques et d'un fragment Fc. Le fragment Fab obtenu conserve sa capacité de lier l'antigène alors que le fragment Fc conserve toutes les autres fonctions de l'anticorps (activation du complément, toxicité cellulaire dépendante de l'anticorps ou fixation aux récepteurs).

La pepsine, quant à elle, génère un fragment $F(ab')_2$ qui est constitué de la région charnière de l'Ig et de 2 fragments Fab liés de manière covalente grâce aux ponts disulfures intacts. La partie restante de la région Fc est clivée en petits fragments.

L'intérêt du fragment $F(ab')_2$ par rapport au fragment Fab est qu'il reste bivalent et qu'il conserve donc une activité de liaison et une affinité pour l'antigène identiques à l'anticorps complet.

1.1.2.2. Les fragments d'anticorps recombinants.

Vers la fin des années 80, les progrès du génie génétique ont permis la manipulation et le clonage des gènes codant pour les anticorps. Les premiers gènes d'immunoglobulines clonés ont été les gènes codant pour des chaînes légères entières et exprimés dans des cellules de mammifère (Rice & Baltimore, 1982). Mais ce n'est qu'en 1988 que Better et collaborateurs ont réussi à produire un fragment d'anticorps Fab actif. Depuis l'intérêt pour les fragments d'anticorps recombinants n'a cessé de croître. Bien que les scFv (single chain Fv) soient le format d'anticorps recombinants le plus largement étudié et utilisé, d'autres formats comme les Fab recombinants ou les anticorps simple domaine sont également analysés. Les avantages majeurs des fragments d'anticorps recombinants sont non seulement de pouvoir les associer mais aussi de créer des protéines de fusion avec, par exemple, des enzymes ou des toxines, afin de leur conférer une deuxième fonctionnalité.

- **Les Fab** : Ces fragments recombinants sont obtenus par l'assemblage de la chaîne lourde tronquée (Fd) et de la chaîne légère de l'anticorps d'intérêt. Le premier

fragment Fab recombinant actif, obtenu par sécrétion chez *Escherichia coli*, a été isolé par Better et collaborateurs en 1988. Ce fragment Fab est issu du clonage des gènes codant pour la région Fd et la chaîne k d'un anticorps chimérique à partir de son ADNc (ADN complémentaire). Chacune des chaînes a été clonée en fusion à une séquence peptidique signal permettant l'export au niveau du périplasme. En effet, une molécule Fab nécessite pour son repliement fonctionnel la formation de ponts disulfures intra- et inter-chaîne. Depuis cette méthode a été utilisée pour construire et produire d'autres fragments Fab (Kaplan *et al*, 1998 ; Wu *et al*, 2004). Des fragments F(ab')₂ bispécifiques ont également été créés à partir de fragments Fab soit par couplage chimique (Shalaby *et al*, 1992) soit par hétérodimérisation grâce à un « leucine zipper » (Kostelny *et al*, 1992).

- **Les anticorps simple domaine** : L'intérêt pour les fragments d'anticorps recombinant s'est également focalisé sur un autre type de molécules issues d'immunoglobulines de camélidés ou de requins : les fragments V_HH et V-NAR (New Antigen Receptor) respectivement. Ils ont pour particularité de se lier à l'antigène via un seul domaine variable. En effet, leurs immunoglobulines correspondantes ne sont composées que d'une chaîne lourde. Ce type de fragment d'anticorps possède d'autres caractéristiques remarquables. Tout d'abord leur région CDR3 est souvent constituée d'un grand nombre d'acides aminés, ils sont donc capables de former un site convexe de liaison à l'antigène. Les anticorps simple domaine fournissent donc de nouvelles spécificités de liaison notamment vis à vis d'antigènes inaccessibles pour des fragments d'anticorps classiques. De plus les V_HH et V-NAR possèdent souvent un pont disulfure supplémentaire qui les stabilise entre la boucle CDR3 et la boucle CDR1 ou 2 (Wesolowski *et al*, 2009). Ces fragments d'anticorps de petite taille (~15 kDa) sont en outre solubles et bien produits chez *Escherichia coli*. Ce type de fragment est donc également optimisé pour la pénétration dans des tissus ou le ciblage d'antigènes intracellulaires.

Plusieurs équipes ont cherché à transférer partiellement les propriétés des V_HH à des anticorps simple domaine humains par substitution de résidus clés. Ce procédé a été appelé camélisation (Davies et Riechmann, 1996). Ce qui a permis de sélectionner à partir de banques de domaines VH ou VL humains optimisés des fragments simple domaine dont les propriétés de stabilité et de solubilité se rapprochent de celles des V_HH.

D'autres équipes, à l'inverse, ont cherché à humaniser des fragments d'anticorps V_HH déjà sélectionnés à partir de banques provenant de camélidés immunisés (Vincke *et al*, 2009)

Toutes ces propriétés des anticorps simple domaine, combinées à l'ingénierie moléculaire, font de ce format de fragment d'anticorps un outil prometteur pour le diagnostic et la thérapie (Wesolowski *et al*, 2009).

- **Les scFv** : Un fragment Fv, constitué des 2 domaines variables d'un anticorps associés de façon non covalente, se dissocie rapidement à faible concentration (Glockshuber *et al*, 1990), contrairement aux fragments Fab qui sont essentiellement stabilisés par les interactions entre les domaines constants. C'est pourquoi 2 équipes (Bird *et al*, 1988 ; Huston *et al*, 1988) ont proposé de stabiliser ce type de fragment en exprimant le Fv sous forme d'une protéine de fusion ; pour cela ils ont suggéré de relier

les gènes codant pour les domaines VH et VL par une séquence codant pour un polypeptide flexible, généralement de 15 acides aminés, appelé linker. Ces protéines ont d'abord été appelées s-Fv puis scFv pour « single-chain Fv ».

Il a été montré, d'une part, que la taille du linker influence la formation du scFv. En effet, lorsque le linker est composé d'au moins 12 acides aminés les domaines VH et VL s'associent entre eux pour former un scFv. Cependant, lorsqu'on réduit la taille du linker à moins de 12 acides aminés les domaines variables ont tendance à s'organiser pour former des dimères (appelés « diabodies ») voire même des trimères (appelés « triabodies ») (Hudson & Kortt, 1999).

D'autre part, les domaines variables peuvent être associés soit sous format VH-linker-VL soit sous forme VL-linker-VH. L'orientation des gènes peut affecter non seulement l'efficacité d'expression mais aussi la stabilité ou l'activité de liaison (Weisser et Hall, 2009) et même la multimérisation du scFv (Kortt et al, 2001).

Le format de scFv le plus courant résulte de l'association des gènes sous l'orientation VH-linker-VL, où le linker est un polypeptide de 15 résidus de type (Gly₄Ser)₃.

La principale limite liée au scFv est sa monovalence. En effet, même si l'affinité du scFv pour son antigène est forte, la dissociation des deux se fait rapidement, notamment dans le cas d'un excès d'antigène (utilisation thérapeutique par exemple) (Holliger et Hudson, 2005). C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont intéressées à la multimérisation des scFv.

- **Les scFv multispécifiques** : Des scFvs multivalents (dia-, tria- ou tetra-bodies) peuvent être générés grâce à la modification de la taille du linker. Cependant de tels scFv restent monospécifiques. Afin d'augmenter l'avidité des scFv multivalents en reconnaissant simultanément plusieurs épitopes sur le même antigène, certains se sont intéressés aux fragments d'anticorps multispécifiques.

C'est ainsi que, dès 1995, Neri et collaborateur ont réussi à exprimer chez *Escherichia coli* et à purifier un « diabody » bispécifique. Pour cela, ils ont fusionné les gènes de 2 scFv sur le même plasmide en réalisant une construction de type V_{H1}-linker-V_{L1}-linker-V_{L2}-linker-V_{H2}. Ils ont alors nommé ces « diabodies » CRAb pour « Chelating Recombinant Antibodies ». Néanmoins plusieurs organisations différentes des gènes des scFv peuvent être utilisées. Aussi d'autres « diabodies » bispécifiques ont été créés : les scDb (« single-chain diabodies ») et les taFv (« tandem scFv fragments ») (Korn *et al*, 2004). Les taFv sont formés par la connection des séquences de 2 scFv par un linker médiant de taille variable, ce qui les rend beaucoup plus flexible que les scDb. De plus les taFv sont capables de se dimériser pour former des fragments d'anticorps tétramériques bispécifiques (Wittel *et al*, 2005).

- **Les « minibodies »** : Dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, les scFv et les diabodies seraient rapidement éliminés par l'organisme en raison de leur petite taille. C'est pourquoi de nouveaux formats de fragments d'anticorps ont été envisagés : les « minibodies ». Ce type de protéines peut être généré grâce à la fusion d'un scFv à des domaines qui tendent à s'associer. Différents formats de « minibodies » ont été créés grâce, par exemple, à l'association de scFv à des hélices amphiphiles (scFv-HLX) ou à

des structures de type « leucine zipper » (scFv-ZIP). D'autres « minibodies » ont été réalisés en liant le scFv, soit directement soit via un lien flexible, à un domaine C_H3 (scFv-C_H3) voire même à la région Fc complète (scFv-Fc) d'une immunoglobuline (Weisser *et al*, 2009).

1.2. Intérêts de l'immunociblage par des fragments d'anticorps recombinant.

1.2.1. Limites à l'utilisation des anticorps monoclonaux.

Les anticorps complets sont aujourd'hui largement utilisés dans le traitement de différentes pathologies et notamment le cancer. Cependant ils possèdent de nombreux inconvénients.

Tout d'abord, l'obtention d'anticorps entiers purs, particulièrement pour une utilisation thérapeutique, est très coûteuse. En effet, les immunoglobulines sont de grosses molécules qui contiennent plusieurs ponts disulfures et des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation. De plus ils doivent généralement être injectés à fortes doses pour être efficaces en thérapie. C'est pourquoi d'importants volumes de cultures de cellules de mammifère sont nécessaires pour les produire ainsi que de nombreuses étapes de purification selon des procédures régies par les bonnes pratiques de fabrication.

D'autre part le poids moléculaire des anticorps limite leur utilisation pour le traitement des tumeurs solides qui représentent 85% des cancers. Parmi les 9 anticorps monoclonaux approuvés pour la thérapie anti-cancéreuse seuls 2 ciblent des tumeurs solides (Chames *et al*, 2009). En effet, l'un des paramètres clé pour le traitement efficace de ce type de cancer est la pénétration intra-tumorale (Tunggal *et al*, 1999). Or les tumeurs solides sont caractérisées par une vascularisation hétérogène et tortueuse, une pression interstitielle importante et une viscosité élevée du sang dans la tumeur (Beckman *et al*, 2007). Ces spécificités rendent les cellules tumorales difficilement accessibles aux anticorps entiers puisque le taux de diffusion est inversement proportionnel à la racine cubique du poids moléculaire (Chames *et al*, 2009). Enfin les anticorps entiers se restreignent à la reconnaissance d'antigènes extracellulaires, bien que certains aient montré la possibilité d'utiliser des anticorps complets dans un contexte intracellulaire, comme Biocca et collaborateurs qui ont, en 1990, réussi à assembler des anticorps dans le cytoplasme de cellules de mammifère par transfection de plasmides codant pour les chaînes lourde et légère d'une immunoglobuline de type M. En effet, les immunoglobulines nécessitent la présence de plusieurs ponts disulfures inter- et intra-chaîne qui ne peuvent se former dans le contexte réducteur du cytoplasme. De plus, ce sont de grosses molécules qui ne sont pas capables de diffuser librement dans les différents compartiments cellulaires et dont les gènes sont plus difficilement manipulables que ceux de fragments d'anticorps.

C'est pourquoi de plus en plus d'équipes s'intéressent à l'étude des fragments d'anticorps.

1.2.2. Intérêt des fragments d'anticorps recombinants.

Ce paragraphe se focalisera essentiellement sur les fragments scFv qui représentent le format d'anticorps recombinant le plus largement étudié et utilisé.

Le premier avantage de ces fragments d'anticorps recombinants est qu'ils conservent la

spécificité de liaison de l'anticorps parental dont ils sont issus (Bird *et al*, 1988 ; Huston *et al*, 1988 ; Kaplan *et al*, 1998).

D'autre part plusieurs systèmes d'expression peuvent être utilisés pour produire des fragments d'anticorps (voir paragraphe 2.3). Cependant le système le plus courant est la production de scFv chez *Escherichia coli*, système plus rapide et moins coûteux que les cellules de mammifère employées pour la production d'anticorps complets. Bien que les scFv nécessitent la présence d'un pont disulfure, qui ne peut se former que dans le périplasme de la bactérie, des études ont montré la possibilité de produire avec d'excellents rendements des scFv dans le cytoplasme bactérien (Martineau *et al*, 1998 et 1999). Ce qui indique que les scFv sont capables de se replier et d'être fonctionnels en l'absence de pont disulfure et d'être ainsi utilisés pour le ciblage d'antigènes intracellulaire.

De plus, la purification de ces protéines peut se faire en une étape par chromatographie d'affinité grâce à la fusion d'un polypeptide étiquette, de type His 6ou FLAG, en C-terminal des gènes codant pour le fragment d'anticorps (Casey *et al*, 1995 ; Wu *et al*, 2004).

Nous avons également vu que les scFv sont non seulement capables de se multimériser, et même de s'associer pour former des molécules bi- ou tri-spécifiques, mais aussi d'être fusionnés facilement à différentes protéines (région Fc, leucines zipper, domaine constant C_H3, etc) pour former des « minibodies ».

Enfin les fragments d'anticorps peuvent aisément être liés ou fusionnés génétiquement à des molécules effectrices. Plusieurs études différentes ont été menées pour générer ce type de fragments bi-fonctionnels :

- **Couplage à des radionucléides** : le marquage de scFv par des radionucléides pour la radioimmunothérapie offre plusieurs avantages par rapport aux anticorps entiers. En effet, les scFv marqués sont non seulement éliminés plus rapidement par le sang et les tissus normaux, mais aussi ils pénètrent plus efficacement et plus rapidement la tumeur (Colcher *et al*, 1999).

- **Couplage à des drogues cytotoxiques** : l'une des approches envisagée pour le traitement du cancer a été de coupler un scFv à une drogue chimiothérapeutique. La faisabilité d'une telle méthode a été montrée en 2007 par Chen et collaborateurs. En effet, ils ont couplé un scFv spécifique du « carcinoembryonic antigen », glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire et qui est anormalement retrouvée dans plusieurs adénocarcinomes, avec la mitomycine, un agent thérapeutique utilisé dans le cancer colorectal. Ils ont ainsi réussi à inhiber la croissance et à induire l'apoptose des cellules tumorales *in vitro*.

- **Couplage à des toxines** : L'association de fragments d'anticorps à des toxines, qui ont été appelées immunotoxines, est une autre voie thérapeutique qui a été explorée. Les premières toxines qui ont été fusionnées à des scFv étaient d'origine bactérienne ce qui limitait leur utilisation en thérapie. Ce problème a pu être contourné par le développement d'une immunotoxine totalement humaine. Cette toxine est une RNase qui ne sera fonctionnelle qu'après internalisation de la molécule grâce à la partie scFv (De Lorenzo *et al*, 2004).

- **Couplage à des cytokines** : Halin et collaborateurs ont montré en 2002 qu'en fusionnant l'interleukine-12, qui a une activité antitumorale et antimétastatique, à un scFv ciblant spécifiquement une protéine surexprimée au niveau de tissus néovascularisés comme les tumeurs, ils augmentaient significativement l'activité antitumorale de l'interleukine-12.
- **Couplage à des enzymes** : Afin de délivrer spécifiquement une drogue au niveau de cellules tumorales, il est possible de fusionner des scFv spécifiques de ces cellules à une enzyme qui aura pour rôle de cliver une pro-droque non toxique en agent cytotoxique exclusivement au niveau de la tumeur. La faisabilité d'une telle méthode a été montrée en 2009 par Afshar et collaborateurs. Ceux-ci ont réussi à inhiber la prolifération de cellules cancéreuses en fusionnant un scFv spécifique du récepteur HER2/neu, membre de la famille des « epidermal growth factor receptor » et dont la surexpression est retrouvée dans certains cancers du sein, à un double mutant de l'enzyme « purine nucleoside phosphorylase ». Celle-ci engendre le clivage de la pro-droque 2-fluoro-2'-deoxyadenosine en 2-fluoroadenine toxique pour les cellules.

L'intérêt pour les fragments d'anticorps et notamment pour les scFv n'a cessé de croître ces dernières années, non seulement à cause des propriétés de ces molécules, et des nombreuses applications imaginables mais aussi parce que ces petites molécules sont capables de cibler des antigènes intra-cellulaires.

1.2.3. Le cas des intracorps.

Un intracorps (ou « intrabody ») est un anticorps, ou plus généralement un fragment d'anticorps, souvent de type scFv, qui est exprimé à l'intérieur d'une cellule.

L'idée d'utiliser des anticorps pour bloquer des fonctions intracellulaires date de 1980 quand Antman et collaborateurs ont montré qu'il était possible de neutraliser la fonction d'une protéine cible en micro-injectant un anticorps purifié. Bien qu'il soit possible d'utiliser les anticorps monoclonaux en tant qu'intracorps (Biocca *et al*, 1990), le format scFv a rapidement été préféré aux anticorps complets pour un emploi dans un contexte intracellulaire.

En effet, l'avantage principal des scFv pour ce type d'utilisation, également appelée immunisation intracellulaire, est que leur petite taille leur permet de diffuser librement dans la cellule, notamment du cytoplasme au noyau. De plus les scFv peuvent facilement être relocalisés au niveau d'autres compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique, la mitochondrie ou la membrane plasmique grâce à la fusion d'une séquence peptidique d'adressage (Lo *et al*, 2008).

1.2.3.1. Mode d'action des intracorps.

L'idée fondamentale de l'immunisation intracellulaire est de neutraliser ou de modifier les fonctions biologiques d'une protéine cible. Pour cela les intracorps sont capables de moduler l'activité d'une protéine selon différents modes d'action.

D'une part les scFv peuvent être fusionnés à des séquences d'adressage spécifiques qui vont agir soit en retenant la protéine cible dans un compartiment cellulaire, comme le réticulum endoplasmique pour empêcher l'expression de protéine de surface (Böldicke

et al, 2005), soit la relocaliser dans un compartiment inapproprié à sa fonction (Sibler *et al*, 2003).

D'autre part l'immunisation intracellulaire peut perturber des voies biologiques ou de signalisation cellulaire en interférant au niveau des interactions normales de la protéine cible. Une étude a montré qu'en ciblant la protéine Ras, qui intervient dans la transduction du signal des récepteurs à tyrosine kinase, il était possible d'induire une régression tumorale (Cochet *et al*, 1998).

Il est également possible d'employer des scFv pour agir sur les voies apoptotiques. Tse et Rabbits ont montré en 2000 qu'il était possible d'induire la mort de cellules par apoptose grâce à un scFv, spécifique de la b-galactosidase, fusionné à la caspase 3. Lorsque ce scFv se fixe à sa cible tétramérique, la caspase 3, qui intervient dans une des voies apoptotiques, s'auto-active et induit la mort cellulaire par apoptose.

Enfin la dégradation d'une protéine cible par la voie du protéasome est une autre application des intracorps, notamment grâce à la technique SIT (Suicide Intrabody Technology) développée par Melchionna et Cattaneo en 2007. Celle-ci consiste à fusionner un scFv à un substrat, Ikb α , qui est dégradé par la voie ubiquitine/protéasome après traitement au TNF α (tumor necrosis factor α) et activation de la voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B). La cible protéique, reconnue par la fusion scFv-Ikb α , sera alors dégradée par le protéasome.

1.2.3.2. Applications thérapeutiques des intracorps.

De nombreuses applications sont envisageables avec des intracorps et principalement dans le domaine thérapeutique. Ces dernières années, l'immunisation intracellulaire s'est focalisée essentiellement sur 3 champs d'investigation :

- **Le traitement du SIDA** : Plusieurs approches ont été envisagées pour traiter les cellules infectées par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), comme l'interruption du cycle viral en bloquant les protéines virales au niveau du réticulum endoplasmique (Zhou P. *et al*, 1998). D'autres études ont visé à stopper la réplication du virus avant ou après intégration au génome cellulaire et même à empêcher cette intégration (Lo *et al*, 2008).

- **Le traitement des maladies neurodégénératives** : Le ciblage de protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives a été étudié et des résultats prometteurs ont été obtenus notamment pour la maladie de Huntington, causée par une aggrégation et une accumulation de la huntingtine mutée (Wolfgang *et al*, 2005), et pour la maladie de Parkinson, qui résulte de la surexpression et de l'oligomérisation de l' α -synucléine (Zhou C. *et al*, 2004).

- **Le traitement du cancer** : Plusieurs axes de recherches ont été suivis pour des applications des intracorps dans la thérapie du cancer.

Des études ont été menées sur la rétention dans le réticulum endoplasmique des récepteurs des facteurs de croissance, comme ErbB2 et EGFR, qui sont des récepteurs à tyrosine kinase de la famille ErbB et des récepteurs impliqués dans l'angiogénèse, comme les récepteurs du VEGF (Vascular Endothelial Growth

Factor) (Lo *et al*, 2008).

Des recherches ont également porté sur les protéines liées au cycle cellulaire et à l'apoptose et notamment sur la protéine Ras, protéine qui intervient dans la chaîne de signalisation cellulaire par activation des tyrosine kinases (Cochet *et al*, 1998).

D'autres équipes se sont aussi intéressées aux protéines de transduction du signal, à celles responsables de la résistance aux drogues chimiothérapeutiques ou aux récepteurs d'adhésion comme les intégrines (Lo *et al*, 2008).

Bien que plusieurs études démontrent l'intérêt de l'utilisation des intracorps dans le traitement de différentes pathologies, il n'existe à ce jour que 10 essais cliniques, achevés ou en cours, avec seulement 8 scFv différents, qui ont tous pour cible un antigène extracellulaire (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=scFv>).

1.1.1.1. Limites et améliorations des intracorps.

Bien que les intracorps semblent être des outils thérapeutiques d'avenir, il reste cependant plusieurs difficultés à résoudre.

Le premier problème lié à l'utilisation intracellulaire de fragments d'anticorps est le repliement fonctionnel du polypeptide à l'intérieur de la cellule. En effet la plupart des scFv nécessite la formation de ponts disulfures pour leur repliement correct. L'expression cytoplasmique des fragments d'anticorps, c'est à dire dans un environnement réducteur ne permet pas la formation de ces ponts disulfures, contrairement à l'expression au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui conduit à la formation de scFv non fonctionnels et peu solubles. Il est cependant possible d'obtenir des fragments d'anticorps actifs en l'absence de ponts disulfures (Sibler *et al*, 2005).

Outre les problèmes liés à l'expression intracellulaire, il est également nécessaire dans le cadre d'une utilisation thérapeutique de mettre au point un système de transfert de gènes sain et efficace. Celui-ci peut se faire par différentes méthodes.

Les vecteurs viraux, comme les rétrovirus, les lentivirus et les adénovirus ont l'avantage d'être transduits efficacement et de fournir une expression à long terme de l'intracorps. Outre l'immunogénicité de ce type de vecteurs, l'efficacité de transfert de gène peut être réduite par des anticorps neutralisants préexistants (Lo *et al*, 2008). Ainsi un autre type de vecteurs viraux a été développé pour réduire l'immunogénicité, particulièrement des adénovirus, tout en conservant les avantages précédemment décrits: les AAV (Adeno-Associated Virus) (Jooss & Chirmule, 2003). Indépendamment des problèmes liés à l'immunogénicité des vecteurs viraux, il existe encore d'autres obstacles à résoudre pour une utilisation en thérapie comme la possibilité de mutagenèse insertionnelle ou la difficulté de production à grande échelle.

Bien qu'aucune étude n'ait encore montré l'emploi de vecteurs non viraux pour le transfert de gènes d'intracorps, des recherches ont prouvé le potentiel de tels vecteurs. En effet, Li *et al* ont utilisé, en 2001, une protéine de fusion pour délivrer de l'ADN exogène à l'intérieur de cellules. Cette protéine de fusion est constituée d'une part d'un scFv spécifique du domaine extracellulaire du récepteur ErbB2 (aussi appelé HER2/neu) et d'autre part d'une forme tronquée de la protamine humaine, protéine capable de lier et de condenser de l'ADN. Une autre approche possible est l'utilisation d'immunoliposomes capables de cibler spécifiquement des cellules. Nielsen *et al*

colaborateurs ont isolé, en 2002, un fragment d'anticorps, spécifique du récepteur ErbB2, qui est endocyté par les cellules, et qu'ils ont conjugué avec du polyéthylène glycol pour générer des immunoliposomes, capables de délivrer spécifiquement un acide nucléique, une drogue ou une protéine à l'intérieur des cellules.

L'une des alternatives à la thérapie génique par des fragments d'anticorps est la transduction, c'est-à-dire l'internalisation de ces intracorps, dans les cellules. De nombreuses études ont été menées sur différentes molécules permettant l'entrée de protéine dans des cellules et notamment sur des domaines de transduction protéique, PTD (Protein Transduction Domain) qui sont de petites séquences peptidiques riches en acides aminés basiques. Plusieurs PTD ont été utilisés à ce jour pour la transduction : le PTD de la protéine TAT (Trans-Activator of Transcription) du VIH, celui de la protéine structurale VP22 de l'Herpes Simplex Virus (HSV) et celui du facteur de transcription *antennapedia* (AntP) de la drosophile (Matsushita & Matsui, 2005). Dans une autre étude, Courtète et collaborateurs ont montré, en 2007, la possibilité de transduire des anticorps entiers, spécifiques de l'oncoprotéine virale E6, impliquée dans le cancer du col de l'utérus, avec des lipides cationiques pour neutraliser cette protéine et ainsi stopper la croissance cellulaire. Ils ont également remarqué que la co-transduction de ces anticorps avec des siRNA dirigés contre la protéine E6 permettait une action synergique de ces deux molécules.

L'intérêt thérapeutique des anticorps monoclonaux n'est plus à démontrer, mais les fragments d'anticorps recombinant offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques, notamment pour l'immunisation intracellulaire. Cependant ces molécules se heurtent encore à différents problèmes, la sélection de molécules de haute affinité et leur expression. Très peu d'essais cliniques sont menés à ce jour avec des scFv (10 d'après <http://www.clinicaltrials.gov>) et aucun avec des intracorps.

Il existe différents types de banques mais aussi techniques de sélection permettant d'isoler des fragments d'anticorps.

2. Sélection et expression de fragments d'anticorps recombinants.

2.1. Les banques de fragments d'anticorps recombinants.

Les techniques de la biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'amplifier et de cloner facilement et rapidement les gènes variables d'immunoglobulines de différentes sources, à partir de l'ARNm, puis de les combiner aléatoirement pour générer des banques de grande diversité. Il existe différents types de banques qui diffèrent par la provenance des gènes variables d'immunoglobulines à l'origine de leur construction. Chaque type de banque possède ses particularités, ses avantages et ses inconvénients.

2.1.1. Les banques naïves.

Une banque de fragments d'anticorps est dite naïve lorsqu'elle est issue des gènes variables réarrangés de cellules B n'ayant pas été en contact avec un antigène. Pour ce type de banque, les lymphocytes B d'un certain nombre d'individus sont isolés, à partir du sang périphérique, de la moelle osseuse ou de cellules de la rate ou à partir d'animaux. L'un des points importants pour la construction de banques naïves est le

nombre d'individus donneurs, plus il sera important plus la diversité de la banque sera grande. Glanville et collaborateur ont montré en 2009 que la diversité combinée de la banque de scFv humaine qu'ils ont construite à partir des lymphocytes d'environ 600 donneurs était de l'ordre de $3,5 \cdot 10^{10}$.

Ce type de répertoire a pour avantages de permettre l'isolement d'anticorps humains dirigés contre des auto-antigènes, des antigènes non-immunogéniques ou toxiques, et d'être utilisable pour la majorité des antigènes. De plus, il est possible d'obtenir des anticorps de haute affinité avec des banques de grande taille. Par contre, la construction de ce type de banque nécessite du temps. En outre, le contenu et la qualité de la banque sont influencés par l'expression inégale des gènes, par l'historique du donneur et par la diversité limitée des IgM (Azzazy & Highsmith, 2002).

2.1.2. Les banques immunisées.

Les banques immunisées sont construites à partir des gènes variables de cellules B, ayant déjà été en contact avec un antigène donné, qui proviennent d'animaux immunisés ou éventuellement de donneurs humains naturellement immunisés ou infectés (infection virale par exemple). Des banques immunisées humaines peuvent également être obtenue à partir de souris transgéniques (« xenomouse »).

Ce type de répertoire possède deux atouts majeurs ; non seulement ces banques sont enrichies en anticorps spécifiques de l'antigène, mais ces anticorps ont également subi une maturation d'affinité par le système immunitaire du donneur. Elles présentent cependant de nombreux désavantages. En effet, le temps nécessaire à l'immunisation d'un animal est long et la réponse immunitaire contre l'antigène d'intérêt n'est pas prédictible. De plus, il n'est pas possible d'obtenir des anticorps contre des auto-antigènes ou des antigènes toxiques et une nouvelle banque doit être construite pour chaque antigène (Azzazy & Highsmith, 2002).

2.1.3. Les banques synthétiques et semi-synthétiques.

Il existe également un autre type de banques dites synthétiques ou semi-synthétiques. Ces banques sont construites en introduisant synthétiquement une diversité dans les CDR. En effet, la spécificité d'un anticorps réside dans ses six CDR qui forment le site de liaison à l'antigène.

Les banques synthétiques sont entièrement construites *in vitro* en utilisant des oligonucléotides qui introduisent une dégénérescence complète ou partielle dans les CDR d'un ou plusieurs gènes variables.

Les banques semi-synthétiques sont formées par la combinaison de la diversité naturelle et synthétique. Elles sont généralement créées pour augmenter la diversité naturelle tout en conservant un certain niveau de diversité fonctionnelle.

L'avantage majeur des répertoires synthétiques est la possibilité de contrôler et de définir leur contenu, leur variabilité locale et leur diversité globale (Azzazy & Highsmith, 2002).

2.2. Méthodes de sélection de fragments d'anticorps recombinants.

Il existe plusieurs systèmes de présentation de fragments d'anticorps recombinants permettant de relier le phénotype aux gènes de la banque dont ils sont issus. Le « phage display » est le système le plus largement utilisé bien qu'il existe d'autres méthodes de présentation comme le « ribosome display » et le « yeast display ».

2.2.1. Le « ribosome display ».

Cette méthode de présentation de fragment d'anticorps est un système de transcription/traduction entièrement *in vitro* qui ne requiert ni culture de cellule ni transformation. Le principe consiste à transcrire de l'ARNm à partir d'une banque d'ADN codants pour des polypeptides, fusionnés génétiquement en 3' à une séquence d'espacement appelée « spacer », dépourvue de codon stop. Lors de la traduction de l'ARNm, en présence d'une quantité stochiométrique de ribosome, le « spacer » permettra alors au polypeptide néosynthétisé d'être piégé par le ribosome. Il y aura ainsi formation d'un complexe ternaire constitué par le polypeptide naissant, l'ARNm et le ribosome, assurant donc le couplage entre le génotype et le phénotype. Après sélection des complexes capables de lier un antigène donné, l'ARNm de ces complexes est récupéré, puis utilisé comme matrice pour générer de l'ADNc qui sera amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les produits de PCR pourront alors être utilisés pour un nouveau tour de sélection (Weisser & Hall, 2009).

La méthode de sélection d'anticorps recombinants par « ribosome display » présente de nombreux avantages. En effet, il n'y a pas de limitations dues aux étapes de clonage et de transformation *in vivo* comme pour le « phage display » par exemple. Mais encore, l'étape d'amplification du matériel sélectionné est rapide et permet de plus d'introduire un certain nombre de mutations augmentant ainsi la diversité.

2.2.2. Le « yeast display ».

Le système du yeast display consiste à exprimer un fragment d'anticorps recombinant à la surface de la levure en fusion à un récepteur d'adhésion, l'a-agglutinine qui est constituée de deux sous-unités, Aga1p et Aga2p, qui interagissent par l'intermédiaire de deux ponts disulfures. Les scFv sont fusionnés génétiquement à la sous-unité Aga2p, pour permettre leur expression à la surface de levure, qui est contrôlée par un promoteur inductible, comme le promoteur Gal par exemple. Ce système permet l'expression d'un grand nombre de molécules identiques (entre 10^4 et 10^5 copies) à la surface de la cellule (Weisser & Hall, 2009).

En outre, cette méthode de présentation rend possible l'utilisation du FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) pour sélectionner rapidement les levures exprimant à leur surface des fragments d'anticorps spécifiques d'un antigène donné. En effet, les scFv sont fusionnés génétiquement à deux étiquettes détectables par un anticorps fluorescent. De plus, l'antigène peut également être marqué, soit par un marquage fluorescent direct, soit par reconnaissance par un anticorps fluorescent. Les cellules doublement marquées sont alors triées et quantifiées en fonction de la liaison à l'antigène et de l'expression du fragment d'anticorps à la surface de la cellule (Boder & Wittrup, 1997).

Les levures exprimant à leur surface des molécules capables de lier l'antigène sont ensuite remises en culture et réutilisées pour un nouveau tour de sélection contre le

même antigène.

L'un des principaux avantages du yeast display est que le repliement des protéines recombinantes se fait dans un système eucaryote et permet donc les modifications post-traductionnelles.

2.2.3. Le « phage display ».

Le « phage display » est actuellement la méthode la plus utilisée pour la sélection de fragments d'anticorps recombinants dirigés contre un antigène donné. Ce système de présentation consiste à exprimer un fragment d'anticorps à la surface d'un phage filamenteux en fusion à une protéine de surface de celui-ci. Le phage filamenteux le plus couramment employé dans cette technique est le phage filamenteux M13.

2.2.3.1. Le phage M13

Le phage M13 est un cylindre flexible de 6,5 nm de diamètre et de 930 nm de long. La capsid du phage est formée d'une part de 5 protéines pVII et 5 protéines pIX au niveau de l'une des extrémités et de 5 protéines pVI et 5 protéines pIII, auxquelles seront fusionnés dans la plupart des cas les fragments d'anticorps, au niveau de l'autre extrémité. La capsid est d'autre part majoritairement constituée de la protéine pVIII (2700 copies) qui forme le cylindre protéique entourant l'ADN du phage et à laquelle peuvent également être fusionnés des fragments d'anticorps.

Les bactériophages filamenteux utilisés pour le « phage display » infectent via la protéine III les entérobactéries (*E. coli*, par exemple) qui possèdent le facteur f codant pour les protéines du pilus de la bactérie. Lors de l'infection, l'ADN simple brin du phage pénètre dans le cytoplasme de la bactérie où les enzymes bactériennes vont le transformer en une forme double brin superenroulée. Celle-ci sert de matrice pour la synthèse des protéines phagiques, dont certaines sont responsables de la synthèse de nouveaux ADN simples brins et d'autres permettent l'encapsidation de ces molécules d'ADN. Le procédé de replication du phage est bien toléré par la bactérie dont la croissance est ralentie alors que 100 à 200 particules phagiques sont produites à chaque génération.

La capsid peut contenir une taille importante d'ADN simple brin, qui peut facilement être purifié et séquencé, ce qui fait du phage M13 un excellent vecteur de clonage. Par contre pour la technique du « phage display », les phages utilisés ne contiennent pas la totalité de leur génome mais un brin d'ADN modifié appelé phagémide. Celui-ci contient un signal d'encapsidation, l'origine de réplication du phage, le gène codant pour la protéine de fusion et un gène de résistance à un antibiotique.

2.2.3.2. La présentation du fragment d'anticorps.

La technique du « phage display » consiste à présenter des fragments d'anticorps (Fab, Fv ou scFV) à la surface du phage filamenteux M13. Pour cela les gènes codant pour ces molécules d'anticorps sont fusionnés en N-terminal de ceux codant pour les protéines pIII ou pVIII du phage.

Le choix de la protéine phagique permettant la présentation du fragment d'anticorps est important et les caractéristiques du fragment sélectionné en dépendent. En effet, la

protéine pVIII est une petite protéine de 50 acides aminés présente en de nombreux exemplaires et qui tolère donc difficilement les fusions à de grandes protéines. Elle est adaptée à l'expression de petits peptides sur toute la surface de la capsidie même si la proportion de protéines de fusion par rapport aux protéines natives ne doit pas excéder 20% pour ne pas gêner l'assemblage de la capsidie. Par contre, la protéine pIII n'est présente qu'en 5 exemplaires à l'une des extrémités du phage et peut être fusionnée à des molécules telles que les scFv. Cependant, la partie N-terminale de la protéine pIII, à laquelle est fusionné le fragment d'anticorps, est impliquée dans la reconnaissance de la bactérie par le phage et donc dans la capacité de celui-ci à infecter une bactérie.

2.2.3.3. La présentation de l'antigène.

Lors de la sélection de fragment d'anticorps par la technique du « phage display », celui-ci est présenté à l'antigène via le phage. Cependant l'antigène doit être immobilisé pour être présenté à l'anticorps, ce qui peut se faire par l'intermédiaire de différents supports. En effet, en l'absence de support, il serait impossible de séparer les phages libres de ceux qui sont capables d'interagir avec l'antigène. Par ailleurs, le choix de la méthode d'immobilisation de l'antigène peut avoir une incidence sur la conformation de l'antigène et donc la sélection des fragments d'anticorps.

Le mode d'immobilisation le plus courant est l'adsorption de l'antigène sur un support plastique comme des immunotubes ou des plaques ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Mais il peut également être présenté en étant fixé sur une colonne d'affinité, afin de maintenir l'intégrité de l'antigène, ou sur un anticorps de capture lui-même adsorbé sur le support solide (Azzazy & Highsmith, 2002).

La sélection de fragment d'anticorps dirigés contre des protéines membranaires, peut se faire directement sur des cellules en culture. S'il s'agit de cellules adhérentes, les phages non liés pourront être éliminés simplement par des lavages du tapis cellulaire et dans le cas de cellules en suspension les phages liés pourront être isolés par centrifugation des cellules. Pour ce type de sélection, il est cependant nécessaire d'inclure une étape de contre-sélection et d'optimiser la méthode de sélection afin de minimiser l'isolement de phages non spécifiques de l'antigène choisi (Azzazy & Highsmith, 2002).

Il est par ailleurs possible d'isoler des fragments d'anticorps à partir d'antigène en solution, ce qui a pour avantage de maintenir l'antigène sous sa forme native. Pour cela, il est nécessaire de marquer l'antigène à la biotine par exemple. Les phages liés pourront alors être récupérés grâce à des billes magnétiques recouvertes d'avidine ou de streptavidine contre lesquelles une contre-sélection préalable aura été réalisée (Azzazy & Highsmith, 2002).

2.2.3.4. La sélection.

Lors de la sélection, la banque de phages exprimant à leur surface des fragments d'anticorps recombinants est incubée en présence de l'antigène. Après différentes étapes de lavage, les phages liés sont élués. Cette élution peut se faire soit avec une solution acide (tampon glycine par exemple) ou basique (triéthylamine par exemple) soit par coupure enzymatique (trypsine par exemple) ou encore grâce à un excès d'antigène.

Les phages élués sont ensuite utilisés pour infecter une culture bactérienne ce qui permettra non seulement le dénombrement du nombre de clones élués mais surtout leur amplification. Les phagémides ne contenant pas les gènes indispensables à la synthèse de nouvelles particules virales, il est nécessaire de sur-infecter les bactéries par un phage auxiliaire (ou phage helper) qui fournira à celle-ci les éléments nécessaires pour produire des phages complets portant un nombre variable de protéines de fusion pIII-fragment d'anticorps. En effet, un même phage est assemblé à la fois avec des protéines issues du génome du phage auxiliaire et avec des protéines de fusion pIII-fragment d'anticorps issues du phagémide. Cela permet de conserver sur le phage nouvellement synthétisé des protéines pIII sauvages dont les fonctions sont essentielles à l'infection. En outre, le signal d'encapsidation porté par le phagémide est beaucoup plus efficace que celui porté par le phage auxiliaire ce qui explique que la grande majorité des phages produits par la bactérie contient le phagémide. Une fois amplifiés les phages produits par la bactérie sont purifiés et titrés pour être utilisés lors d'une nouvelle sélection sur le même antigène. On parle alors de tour de sélection. Trois à quatre tours de sélection sont généralement réalisés sur le même antigène, ce qui permet d'enrichir les phages produits en phages spécifiques de l'antigène. Les phages sélectionnés peuvent alors être analysés et testés pour l'activité de liaison recherchée.

Le « phage display » présente l'avantage de pouvoir coupler directement la protéine exposée à la surface du phage (phénotype) avec l'ADN codé par celui-ci (génotype) et donc d'accéder rapidement aux séquences des molécules sélectionnées.

Le nombre croissant de travaux publiés utilisant la technique du « phage display » indique que cette méthode représente un outil performant pour de très nombreuses applications.

2.3. Systèmes d'expression d'anticorps recombinants.

Les fragments d'anticorps recombinants issus de sélections à partir de banques peuvent être exprimés dans une large variété de cellules hôtes incluant des procaryotes aussi bien que des eucaryotes. Le choix du système d'expression dépend non seulement de l'utilisation ultérieure du fragment d'anticorps mais aussi de la pureté et de la quantité désirées.

2.3.1. Expression bactérienne.

Le système bactérien généralement utilisé pour la production de fragments d'anticorps est l'espèce *Escherichia coli*. En effet, l'obtention de bactéries capables de produire des anticorps est rapide et facile. De plus ce système de production permet d'obtenir de grandes quantités d'anticorps recombinants. Cependant il ne permet pas de réaliser des modifications post-traductionnelles qui peuvent être requises comme dans le cas de couplage à des molécules effectrices.

L'expression de fragments d'anticorps recombinants chez *E. coli* est généralement régulée par un promoteur inductible. Cette expression peut se faire dans le cytoplasme, l'espace périplasmique ou par sécrétion extracellulaire selon la nature du fragment d'anticorps à produire.

Le système d'expression bactérien est le système privilégié pour la production des fragments d'anticorps non glycosylés de type scFv notamment en raison du faible coût de production et de la facilité d'expression avec un excellent rendement (de l'ordre du g/L de culture). Cependant celui-ci est dépendant de chaque fragment d'anticorps individuel.

2.3.2. Expression dans des cellules de mammifères.

Les fragments d'anticorps recombinants peuvent être exprimés dans les cellules de mammifère de façon soit transitoire soit stable en fonction de la quantité de protéine requise.

Les systèmes cellulaires les plus largement utilisés pour l'expression stable de protéines recombinantes sont les cellules CHO (Chinese hamster ovary) et NSO, lignée de cellules de myélome de souris. L'équipe de Tang a, en 2007, exprimé dans les cellules CHO le scFv_{2F9} dérivé d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène humain CD14. L'optimisation de ces systèmes a permis la génération de lignées cellulaires recombinantes permettant d'obtenir couramment une productivité en anticorps de l'ordre de 20-60 pg/cellule/jour. Par contre, l'expression transitoire permet l'obtention rapide de protéines recombinantes à partir de surnageant de culture.

L'avantage de ce type de procédés est qu'il permet d'inclure des modifications post-traductionnelles des systèmes eucaryotes telle que la glycosylation des protéines, qui est parfois nécessaire, comme dans le cas de la production d'anticorps monoclonaux. Par contre ces techniques de production sont coûteuses notamment pour l'obtention des quantités nécessaires pour l'utilisation en thérapie.

2.3.3. Autres systèmes d'expression.

D'autres systèmes d'expressions ont également été étudiés pour la production de fragments d'anticorps recombinants.

L'expression chez la levure et les champignons filamenteux combine les avantages de production et de coût du système bactérien et les avantages du système eucaryote comme le repliement fonctionnel et les modifications post-traductionnelles. De plus, les protéines sont exprimées dans le surnageant de culture, ce qui facilite la purification de celles-ci.

Le système de plantes transgéniques a également été utilisé pour la production de fragments d'anticorps recombinants. Celui-ci présente plusieurs avantages comme le faible coût de production, l'absence de contaminations dues à des pathogènes de mammifères ou à des endotoxines bactériennes ou encore la possibilité de modifier le niveau de production en fonction des besoins. Cependant, le délai initial pour le début de la production est long, il existe des incertitudes liées à la régulation de ce système et il reste des questions concernant la tolérance de glycanes issus de plantes en thérapie.

Nous avons vu que les anticorps sont devenus des molécules essentielles en thérapie. Cependant les fragments d'anticorps recombinants, et notamment les scFv tendent à les remplacer. En effet, ils peuvent être facilement couplés à différentes molécules voire même organisés sous forme de multimères mono- ou multi-spécifiques. De plus, il existe aujourd'hui des méthodes de sélection rapides et faciles de ces fragments

d'anticorps à partir de banques et il est possible de produire ces molécules indépendamment du modèle animal.

3. Présentation du projet de recherche.

Depuis plusieurs années, notre équipe s'est impliquée dans la compréhension et le développement de stratégies d'inhibition de la carcinogenèse avec des outils dérivés du système immunitaire. Elle a sélectionné et caractérisé de nombreux anticorps monoclonaux, et des fragments d'anticorps tels que des Fab et des scFv dirigés contre différentes cibles avec comme objectif l'immunisation intracellulaire (Courtète *et al*, 2007). Mais elle s'est rapidement confronté au problème d'une part d'introduction des anticorps monoclonaux dans les cellules eucaryotes et d'autre part de la solubilité des Fab et scFv dans un contexte intracellulaire, d'où la nécessité de construire une banque de scFv actifs en milieu réducteur.

C'est dans ce contexte scientifique que s'est inscrit mon projet de recherche qui se divise en trois parties : la construction et la validation d'une banque de fragments d'anticorps recombinants, puis la sélection de scFv à partir de cette banque, d'une part, pour le ciblage de deux oncoprotéines et, d'autre part, pour une utilisation en tant qu'outil de biologie moléculaire pour la détection d'anticorps de lapin.

La première partie de mon projet s'est effectuée en collaboration avec l'équipe du docteur Pierre Martineau de Montpellier. Elle impliquait la construction d'une banque de fragments d'anticorps recombinants de type scFv à partir de la séquence d'un scFv correctement replié et fonctionnel dans un milieu réducteur tels que le cytoplasme bactérien et de cellules de mammifère, propriété qui a pu être conservée par introduction de la diversité uniquement dans les boucles CDR3 des scFv, qui sont au cœur de la reconnaissance de l'antigène. Cette banque a ensuite été validée grâce à la sélection et à la caractérisation de scFv dirigés contre différentes protéines.

Dans la suite de mon projet, j'ai été amenée à utiliser cette banque pour deux types d'application. Tout d'abord, nous avons tenté de sélectionner et de caractériser des scFv dirigés contre deux oncoprotéines impliquées dans la cancérogénèse. La première est la protéine E6 du papilloma-virus humain (HPV) qui est responsable du cancer du col de l'utérus (Giovane *et al*, 1999 ; Lagrange *et al*, 2005) et la gankyrine, protéine naturelle, dont la surexpression semble être corrélée au développement d'hépatocarcinomes. Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec une société privée, qui cherche à développer de nouveaux outils de détection immunologique, nous avons cherché au sein de notre banque, des fragments d'anticorps dirigés contre des anticorps de lapin avec pour objectif la mise au point d'un nouvel outil de détection secondaire fluorescent avec pour avantages un meilleur rendement et une production à moindre coût par rapport aux anticorps monoclonaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Afshar, S. et al., 2009. Characterization of an engineered human purine nucleoside phosphorylase fused to an anti-her2/neu single chain Fv for use in ADEPT. *Journal of experimental clinical cancer research CR*, 28(1), p.147.

Alberts, B. et al, 2002. Molecular biology of the cell, 4th edition.
Available at : <http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.20192>.

Amstutz, P. et al., 2001. In vitro display technologies: novel developments and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(4), p.400-405.

Antman, K.H. & Livingston, D.M., 1980. Intracellular neutralization of SV40 tumor antigens following microinjection of specific antibody. *Cell*, 19(3), p.627-635.

Azzazy, H.M.E. & Highsmith, W.E., 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, 35(6), p.425-445.

B

Baert, F. et al., 2003. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(7), p.601-608.

Beckman, R.A., Weiner, L.M. & Davis, H.M., 2007. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer*, 109(2), p.170-179.

Biocca, S., Neuberger, M.S. & Cattaneo, A., 1990. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 9(1), p.101-108.

Bird, R.E. et al., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877), p.423-426.

Boder, E.T. & Wittrup, K.D., 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology*, 15(6), p.553-557.

Böldicke, T. et al., 2005. Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). *Journal of Immunological Methods*, 300(1-2), p.146-159.

Boulianne G.L., et al, 1984. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312(5995) p.643-646.

C

Casey, J. L., Keep, P. A., Chester, K. A., Robson, L., Hawkins, R. E., & Begent, R. H. (1995). Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical applications using metal chelate chromatography. *Journal of Immunological Methods*, 179(1), 105-116.

Chames, P. et al., 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, 157(2), p.220-233.

Chen, D.-J. et al., 2007. Construction of humanized carcinoembryonic antigen specific single chain variable fragment and mitomycin conjugate. *World Journal of Gastroenterology*, 13(43), p.5765-5770.

Cochet, O. et al., 1998. Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Research*, 58(6), p.1170-1176.

Colcher, D. et al., 1999. Single-chain antibodies in pancreatic cancer. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 880, p.263-280.

Cooper, B. et al., 2003. Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology*, 306(1), p.87-99.

Courtête, J. et al., 2007. Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(6), p.1728-1735.

D

Davies, J. & Riechmann, L., 1996. Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein Engineering*, 9(6), p.531-537.

Davis, B. T. A., Grillo-Lo, A. J., White, C. A., Mclaughlin, P., Czuczman, M. S., Link, B. K., Maloney, D. G., et al. (2000). Rituximab Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Non-Hodgkin ' s Lymphoma : Safety and Efficacy of. *Clinical Research*, 18(17), p.3135-3143.

De Lorenzo, C. et al., 2004. A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Research*, 64(14), p.4870-4874.

Der Maur, A.A. et al., 2002. Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), p.45075-45085.

Desplancq, D. et al., 2008. Automated overexpression and isotopic labelling of biologically active oncoproteins in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51(Pt 1), p.53-61.

Donini, M. et al., 2003. Engineering stable cytoplasmic intrabodies with designed specificity. *Journal of Molecular Biology*, 330(2), p.323-332.

Du, M. et al., 2002. Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(4), p.962-969.

F

Foote, J. & Winter, G., 1992. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *Journal of Molecular Biology* 224(2), p.487-499.

Fu, X., et al, 2002. Overexpression of p28/gnakyryn in human hepatocellular carcinoma an hits clinical significance. *World Journal of Gastroenterol*, 8(4), 638-643.

G

Ganguly, N. & Parihar, S.P., 2009. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of Biosciences*, 34(1), p.113-123.

Glanville, J. et al., 2009. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), p.20216-20221.

Gilmore, T.D., 2006. Introduction to NF-kappaB : players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), p. 6680-6684.

Giovane, C. et al., 1999. Targetting of the N-terminal domain of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with monomeric ScFvs blocks the E6-mediated degradation of cellular p53. *Journal of molecular recognition JMR*, 12(2), p.141-152.

Glockshuber, R. et al., 1990. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, 29(6), p.1362-1367.

Gorman, S.D. et al., 1991. Reshaping a therapeutic CD4 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(10), p.4181-4185.

Griffin, H. et al., 2006. Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. *Journal of Molecular Biology*, 355(3), p.360-378.

H

Higashitsuji, H. et al., 2000. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nature Medicine*, 6(1), p.96-99.

Higashitsuji, Hiroaki et al., 2005. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer Cell*, 8(1), p.75-87

Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1126-1136.

Hudson, P.J. & Kortt, A.A., 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of*

Immunological Methods, 231(1-2), p.177-189.

Hudson, P.J. & Souriau, C., 2003. Engineered antibodies. *Nature Medicine*, 9(1), p.129-134.

Huston, J.S. et al., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16), p.5879-5883.

I

Imai, K. & Takaoka, A., 2006. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(9), p.714-27.

J

Jakobovits, A. et al., 2007. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nature Biotechnology*, 25(10), p.1134-1143.

Jones P.T. et al, 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), p.522-525.

Jooss, K. & Chirmule, N., 2003. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Therapy*, 10(11), p.955-963.

Jung, S. & Plückthun, A., 1997. Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Engineering*, 10(8), p.959-966.

K

Kaplan, D. et al., 1998. Expression of a recombinant Fab antibody fragment against cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(1), p.53-58.

Kennett, R.G., 1979. Monoclonal antibodies. Hybrid myelomas--a revolution in serology and immunogenetics. *The American Journal of Human Genetics*, 31(5), p.539-547.

Kimball, J.A. et al., 1995. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transplant Immunology*, 3(3), p.212-221.

Kiyono, T. et al., 1997. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), p.11612-11616.

Köhler, G. & Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), p.495-497.

Korn, T. et al., 2004. Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *Journal of Gene Medicine*, 6(6), p.642-651.

Kortt, A.A. et al., 2001. Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomolecular Engineering*, 18(3), p.95-108.

Kostelny, S.A., Cole, M.S. & Tso, J.Y., 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *The Journal of Immunology*, 148(5), p.1547-1553.

Kuus-Reichel, K. et al., 1994. Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(4), p.365-372.

L

Lagrange, M. et al., 2005. Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6. *The Journal of general virology*, 86(Pt 4), p.1001-1007.

Li, X. et al., 2001. Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 8(8), p.555-565.

Lo, A.S.-Y., Zhu, Q. & Marasco, W.A., 2008. Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (181), p.343-373.

M

Martineau, P., Jones, P. & Winter, G., 1998. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, 280(1), p.117-127.

Martineau, P. & Betton, J.M., 1999. In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in Escherichia coli cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, 292(4), p.921-929.

Matsushita, M. & Matsui, H., 2005. Protein transduction technology. *Journal of Molecular Medicine*. 83(5), p. 324-328.

McCafferty et al, 1990. Phage antibodies : filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348(6301), p-552-554.

Melchionna, T. & Cattaneo, A., 2007. A protein silencing switch by ligand-induced proteasome-targeting intrabodies. *Journal of Molecular Biology*, 374(3), p.641-654.

Morrison, S.L. et al., 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), p.6851-6855.

N

Neri, D. et al., 1995. High-affinity antigen binding by chelating recombinant antibodies (CRAbs). *Journal of Molecular Biology*, 246(3), p.367-373.

Nielsen, U.B. et al., 2002. Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selected for cellular endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1591(1-3), p.109-118.

Nominé, Y. et al., 2006. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Molecular Cell*, 21(5), p.665-678.

Q

Queen, C. et al., 1989. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), p.10029-10033.

R

Rebello, PR et al, 1999. Anti-globulin responses to rat and humanized CAMPATH-1 monoclonal antibody used to treat transplant rejection. *Transplantation*.68(9), p.1417-1420.

Riechmann,L et al, 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 332(6162), p. 323-327.

S

Saerens, D. et al., 2005. Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *Journal of Molecular Biology*, 352(3), p.597-607.

Schwalbach, G. et al., 2000. Production of fluorescent single-chain antibody fragments in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18(2), p.121-132.

Shalaby, M.R. et al., 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *The Journal of Experimental Medicine*, 175(1), p.217-225.

Sibler, A.-P. et al., 2003. Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals. *Experimental Cell Research*, 286(2), p.276-287.

Sibler, A.-P. et al., 2005. Extended half-life upon binding of destabilized intrabodies allows specific detection of antigen in mammalian cells. *The FEBS journal*, 272(11), p.2878-2891.

Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. J. F. Bosma, ed. *Protein Expression and Purification*, 41(1), p.207-234.

T

Tanaka, K., 1995. Molecular biology of proteasomes. *Molecular Biology Reports*, 21, 21-26.

Tang, Y.-M. et al., 2007. Construction and expression of single-chain antibody derived from a new clone of monoclonal antibody against human CD14 in CHO cells. *ImmunoPharmacology and Immunotoxicology*, 29(3-4), p.375-386.

Taylor, P.C., 2003. Antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(3), p.323-328.

Tse, E. & Rabbitts, T.H., 2000. Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: an approach for application in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), p.12266-12271.

Tunggal, J.K. et al., 1999. Penetration of anticancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 5(6), p.1583-1586.

U

Urba, W.J. et al., 1992. Anti-CD3 monoclonal antibody treatment of patients with CD3-negative tumors: a phase IA/B study. *Cancer Research*, 52(9), p.2394-2401.

V

Van Wauwe, J.P., De Mey, J.R. & Goossens, J.G., 1980. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *The Journal of Immunology*, 124(6), p.2708-2713.

Vincke, C. et al., 2009. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), p.3273-3284.

W

Weisser, N.E. & Hall, J.C., 2009. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*, 27(4), p.502-520.

Wesolowski, J. et al., 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), p.157-74.

Wittel, U.A. et al., 2005. The in vivo characteristics of genetically engineered divalent and tetravalent single-chain antibody constructs. *Nuclear Medicine and Biology*, 32(2), p.157-164.

Wolfgang, W.J. et al., 2005. Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), p.11563-11568.

Wu, S.-C. et al., 2004. Construction and characterization of a Fab recombinant protein for Japanese encephalitis virus neutralization. *Vaccine*, 23(2), p.163-171.

Y

Yelton, D.E. & Scharff, M.D., 1981. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annual Review of Biochemistry*, 50(1), p.657-680.

Z

Zhou, C. et al., 2004. A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(6), p.1023-1031.

Zhou, P. et al., 1998. Cells transfected with a non-neutralizing antibody gene are resistant to HIV infection: targeting the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network. *The Journal of Immunology*, 160(3), p.1489-1496.

Zeng, M. et al., 2002. Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein inhibits retinoic X receptor-mediated transactivation by targeting human ADA3 coactivator. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), p.45611-45618.